

JOSÉ BENEDITO FIORAVANTI

200206630

**CITOMEGALOVÍRUS EM TRANSPLANTADOS
HEPÁTICOS: DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO
POR MEIO DO ESTUDO COMPARATIVO ENTRE
ANTIGENEMIA E “NESTED- PCR”.**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Médico José Benedito Fioravanti.

Campinas, 10 de agosto de 2001.

Sandra Cecília Botelho Costa

**Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa
- Orientadora -**

CAMPINAS

2001

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

JOSÉ BENEDITO FIORAVANTI

**CITOMEGALOVÍRUS EM TRANSPLANTADOS
HEPÁTICOS: DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO
POR MEIO DO ESTUDO COMPARATIVO ENTRE
ANTIGENEMIA E “NESTED-PCR”.**

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Cecília Botelho Costa

CAMPINAS

2001

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	1/UNICAMP
	F511C
V.	
T.	47565
P.	837/02
C	
D	09
PREC.	R\$ 11,00
DATA	06-02-02
N.º CPD	

CM00163095-2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

F511c

Fioravanti, José Benedito

Citomegalovírus em transplantados hepáticos: Diagnóstico e monitorização através do estudo comparativo entre antigenemia e "NESTED" PCR / José Benedito Fioravanti. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Sandra Cecília Botelho Costa

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Transplante. 2. Fígado - Cirurgia. 3. Reação em cadeia da polimerase. I. Sandra Cecília Botelho Costa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Membros:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Sandra Cecília Botelho Costa

Prof. Dr. José Murilo Robilotta Zeitune

J. Murilo Robilotta Zeitune

Prof. Dr. Alex Vianey Callado França

Alex Vianey Callado França

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 10/08/01

DEDICATÓRIA

DEDICO ESTE TRABALHO:

A meus pais, HENRIQUE e NILVA que, apesar de terem ido precocemente, me fizeram nascer:

À minha esposa VERA LÚCIA, presente em todos os momentos, me fez viver;

A meus filhos, VICTOR e LHYSIS, razão de crescimento, que não me deixa morrer.

AGRADECIMENTOS

À DEUS pelo caminho, pela expressão da verdade e pelas luzes diárias.

À Prof^a. Dr^a. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA, pela orientação deste trabalho pela compreensão, e o apoio

À Mestra MARIA TERESA FIORAVANTI, pelo acompanhamento de quem tinha um passo à frente;

À funcionária e mestranda da UNICAMP SANDRA BONON, pelo apoio na coleta e execução das técnicas;

Aos acadêmicos MURILO, LEONARDO, FERNANDA E NARA, pelo apoio nas coletas e processamento inicial das amostras;

À JOSÉ EDUARDO, JOSÉ E SIMONE PAPAIZ, E SANDRA; amigos de trajetória;

Aos queridos CAIO LEANDRO E ANTONIO ROBERTO pela orientação na digitação e diagramação;

A TODOS que, de forma direta ou indireta, vibraram pela totalidade deste trabalho.

“ Há homens que lutam um dia e são bons;

Há outros que lutam um ano e são melhores;

Há aqueles que lutam muitos anos e são muito bons.

Porém, há os que lutam toda a vida: esses são os imprescindíveis.”

(Bertold Brecht)

	<i>Pág</i>
RESUMO	xxv
1. INTRODUÇÃO	29
1.1. Histórico dos Transplantes Hepáticos e do Citomegalovirus Humano (HCMV).....	31
1.2. Características Biológicas do HCMV.....	33
1.3. Replicação e Patogênese do HCMV.....	36
1.4. Transmissão e Epidemiologia do HCMV.....	37
1.5. Manifestações Clínicas do HCMV.....	39
1.5.1. Infecção Congênita pelo HCMV.....	39
1.5.2. Infecção Perinatal pelo HCMV.....	40
1.5.3. Infecção pelo HCMV em Pacientes com HIV.....	40
1.5.4. Infecção pelo HCMV em Pacientes Transplantados.....	40
1.6. Diagnóstico Laboratorial do HCMV.....	41
1.6.1. Isolamento Viral.....	41
1.6.1. A. Cultura Clássica.....	41
1.6.1. B. Cultura Rápida de Isolamento Viral.....	42
1.6.2. Métodos Sorológicos.....	42

1.6.2. A. Métodos Sorológicos Clássicos.....	43
1.6.2. B. Métodos Sorológicos Modernos.....	44
1.6.3. Exames Citológicos e Histopatológicos.....	45
1.6.3. A. Exames Citológicos.....	45
1.6.3. B. Exames Histopatológicos.....	45
1.6.4. Identificação de Antígenos Virais – Antigenemia.....	46
1.6.5. Métodos Moleculares.....	47
1.6.5. A. Hibridização de Ácidos Nucleares.....	47
1.6.5. B. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	47
1.7. Profilaxia e Monitoramento da Infecção pelo HCMV.....	52
2. OBJETIVOS.....	55
3. CASUÍSTICA.....	59
3.1. Critérios para definição de Infecção Ativa por HCMV.....	61
3.2. Critérios para caracterizar provável Doença por HCMV.....	62
3.3. Critérios de Inclusão no Estudo.....	63
3.4. Critérios de Suspensão do Estudo.....	63
4. MÉTODOS.....	65
4.1. Método Sorológico ELISA.....	67
4.2. “Nested-PCR”.....	67
4.2.1. Extração de dna:.....	67

4.2.2. Amplificação Gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	68
4.2.2.A.- Condições de reação:.....	68
4.2.2.B. Iniciadores (“Primers”):.....	69
4.2.2.C. “Nested-pcr”:.....	70
4.2.3. Detecção do Fragmento Amplificado.....	70
4.2.4. Amplificação Gênica Pela Reação em Cadeia da Polimerase com Controle Interno da Reação (utilização de “primers” que detectam o gene da beta-globina).....	71
4.2.4.A. Condições da Reação:.....	71
4.2.4.B. Iniciadores (“Primers”):.....	71
4.2.4.C. “Nested-PCR”:.....	71
4.2.5. Cuidados Especiais para se evitar contaminação das amostras durante a reação da PCR:.....	72
4.3. Antigenemia.....	73
4.4. Análises de dados.....	75
5. RESULTADOS	77
5.1. Pré-transplante.....	79
5.2. Pós-transplante.....	82
5.2.1. Infecção Ativa por Citomegalovirus Humano.....	82
5.2.2. Provável Doença por Citomegalovirus Humano.....	91

6. DISCUSSÃO.....	101
7. CONCLUSÃO.....	111
8. SUMMARY.....	115
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
10. APÊNDICE.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS

HCMV	Citomegalovírus Humano
Nm	nanômetros
HHV-5	Herpes Vírus Humano tipo 5
DNA	ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
Períodos:IE	“immediate early”, E -“early” e L -“late”
HSV	vírus Herpes simples
HIV	vírus da imuno deficiência
IFI	imunofluorescência indireta
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
RIA	radioimunoensaio
IgG	imuno globulina tipo G
IgM	imuno globulina tipo M
Fc	porção da molécula de imunoglobulina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pb	pares de base
mg/Kg	Miligrama por kilograma/peso
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
“DAME”	Divisão de Arquivo Médico
ALT	alanina-amino-transferase
SST	TW - solução salina tamponada com fosfatos contendo Tween
DO	densidades ópticas
Rpm	rotações por minuto
AEC	amino-eatil-carbazol

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Sequência de nucleotídeos dos iniciadores “primers” para a PCR..	69
TABELA 2 : Sequência de nucleotídeos dos iniciadores “primers” para a “Nested-PCR”	70
TABELA 3 : Sequência de nucleotídeos dos iniciadores para a PCR da beta globina.....	71
TABELA 4 : Sequência de nucleotídeos dos iniciadores para a “Nested-PCR” da beta globina.....	72
TABELA 5 : Características dos receptores de transplante hepático.....	79
TABELA 6 : Principais doenças dos receptores hepáticos	79
TABELA 7 : <i>Status</i> sorológico do doador e receptor no pré-transplante quanto à sorologia por IgM e IgG.....	80
TABELA 8 : <i>Status</i> sorológico do doador e receptor no pré-transplante quanto a PCR e Antigenemia.....	81
TABELA 9 : Porcentagem de infecção ativa por HCMV detectada nos receptores.....	83
TABELA 10 : Primeiro dia pós-transplante hepático em que ocorre positividade dos testes “Nested-PCR” e Antigenemia.....	84
TABELA 11 : Dias de positividade para testes “Nested-PCR” e Antigenemia nos transplantados hepáticos estudados, os números entre parênteses, na coluna da Antigenemia, mostram as quantidades de células positivas observadas.....	88

TABELA 12 : Comparação entre os resultados obtidos por meio da Antigenemia em relação à “Nested- PCR” nos transplantados hepáticos.....	89
TABELA 13 : Comparação entre “Nested-PCR” e a infecção ativa pelo HCMV..	90
TABELA 14 : Comparação entre a Antigenemia e a infecção ativa pelo HCMV..	90
TABELA 15 : Início das manifestações clínicas de provável doença pelo HCMV com a de positividade dos testes “Nested-PCR” e Antigenemia (em dias pós-transplante).....	93
TABELA 16 : Comparação entre os resultados de provável doença pelo HCMV com a “Nested-PCR”.....	94
TABELA 17 : Comparação entre os resultados de provável doença pelo HCMV com a Antigenemia.....	95
TABELA 18 : Resultados gerais dos transplantados hepáticos estudados em relação aos testes empregados para detecção de infecção pelo HCMV (“Nested-PCR”, Antigenemia e Sorologia).....	99

LISTA DE FIGURAS

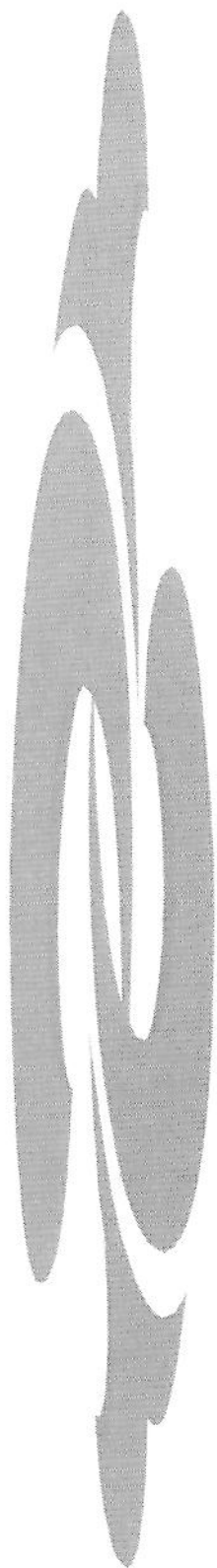
	<i>Pág</i>
FIGURA 1 : Estrutura Esquemática do Citomegalovirus Humano, mostrando o envelope, capsômero, nucleocapsídeo e a cadeia de DNA.....	34
FIGURA 2 : Estrutura de Citomegalovirus Humano, pela microscopia eletrônica.....	35
FIGURA 3 : Amplificação do DNA por “Nested-PCR”.....	50
FIGURA 4 : Detecção de DNA-HCMV pela “Nested-PCR”.....	51
FIGURA 5 : Análise direta do fragmento, após eletroforese em minigel de agarose 2%.....	81
FIGURA 6 : <i>Reação de Imunoperoxidase (Antigenemia)</i>	82

LISTA DE GRÁFICOS

Pág

GRÁFICO 1 :	Primeiro dia pós-transplante hepático em que ocorreu positividade dos testes “Nested-PCR” (1ª coluna) e Antigenemia (2ª coluna) para os pacientes 01 a 14.....	85
GRÁFICO 2 :	Primeiro dia pós-transplante hepático em que ocorreu positividade dos testes “Nested-PCR” (1ª coluna) e Antigenemia (2ª coluna) para os pacientes 15 a 27	86
GRÁFICO 3 :	Distribuição por números de receptores e o primeiro resultado positivo para as técnicas de “Nested-PCR” e Antigenemia.....	87
GRÁFICO 4 :	Valores em porcentagem da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo da Antigenemia em relação ao “Nested-PCR” nos transplantados hepáticos estudados.....	89
GRÁFICO 5 :	Valores em porcentagem de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo da Antigenemia em relação à Infecção ativa pelo HCMV nos transplantados hepáticos.....	91
GRÁFICO 6 :	Valores em porcentagem da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo de provável doença pelo HCMV em relação ao “Nested-PCR” nos transplantados hepáticos estudados	94
GRÁFICO 7 :	Valores em porcentagem da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo de provável doença pelo HCMV em relação ao Antigenemia nos transplantados hepáticos estudados.....	95

GRÁFICO 8 :	Representação gráfica comparativa por sorogrupo entre infecção ativa e provável doença pelo HCMV.....	96
GRÁFICO 9 :	Representação gráfica comparativa entre as técnicas “Nested-PCR” e Antigenemia com a infecção ativa e provável doença pelo HCMV.....	97
GRÁFICO 10 :	Representação gráfica comparativa entre os períodos de detecção do HCMV pelas técnicas de Antigenemia e “Nested-PCR” e o início das manifestações clínicas para os pacientes 1 e 10.....	98



RESUMO

O Citomegalovirus Humano (HCMV) é um dos mais importantes patógenos que acometem pacientes submetidos a transplante hepático, estando associado à alta morbidade e mortalidade. Atualmente faz-se necessário o emprego de técnicas laboratoriais que sejam rápidas, sensíveis e específicas, no diagnóstico do HCMV, a fim de ser instituído um tratamento antiviral o mais precoce possível.

Neste estudo, foram feitas comparações entre duas técnicas laboratoriais distintas: a "Nested-PCR" e a Antigenemia, avaliando a eficácia das mesmas na monitorização de infecção ativa e doença por HCMV, neste grupo de pacientes. Dessa maneira, foram pesquisados pacientes submetidos a transplante hepático no Hospital de Clínicas da FCM/UNICAMP, desde antes do transplante até seis meses após o ato cirúrgico, tanto em ambiente hospitalar, quanto ambulatorial. Posteriormente, foi feita uma análise das duas metodologias diagnósticas utilizadas, comparando-as quanto à sua eficácia.

Foram avaliados 27 pacientes, de setembro de 1998 a janeiro de 2001, acompanhando o doador no pré-transplante, e o receptor até, no mínimo, 180 dias após a cirurgia. Realizaram-se 12 coletas de sangue de cada paciente receptor, sendo essas coletas: semanais, durante o primeiro mês; quinzenais, nos segundo e terceiro mês, e mensais posteriores até o sexto mês.

Conforme dados anteriores na literatura confirmados por este trabalho, a cirrose hepática provocada pelo vírus C foi o principal fator etiológico (55,55%) do transplante hepático, sendo que a cirrose alcoólica aparece como segundo maior (29,63%).

Foi observado no pré transplante que, dos 27 pacientes, 92% dos transplantados já haviam tido contato anterior com o HCMV (Sorologia IgG positiva), 15% dos receptores apresentaram "Nested-PCR" positiva e 5% Antigenemia positiva.

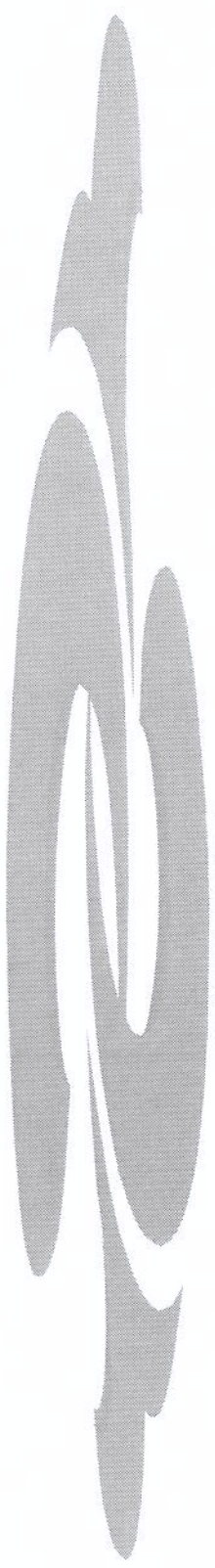
Segundo os critérios de infecção ativa, 25/27 (92%) dos pacientes apresentaram infecção ativa, sendo que em 12/27 (44%) destes, foram acompanhadas manifestações clínicas compatíveis com HCMV doença, sendo a febre (72%), e a mialgia (43%) as mais comuns, tendo também alterações das enzimas hepáticas (57%) e leucopenia (11%).

O trabalho demonstra que a “Nested-PCR” se positiva, em média, com 47 dias pós-transplante, precedendo em 20 dias as manifestações clínicas, enquanto que a Antigenemia, se positiva, em média, após 85 dias do transplante.

Dos pacientes estudados, cinco evoluiu a óbito, e destes, três com manifestações clínicas de doença pelo HCMV.

Em conformidade com estudos anteriores, a doença pelo HCMV, nos pacientes transplantados hepáticos estudados ocorreu nos três primeiros meses pós-transplante.

Deste modo, releva-se a importância clínica da detecção precoce do HCMV em pacientes transplantados hepáticos, e que as técnicas da “Nested-PCR” e da Antigenemia, empregadas neste trabalho, se mostraram adequadas para a monitorização destes pacientes em relação à infecção pelo HCMV.



1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO DOS TRANSPLANTES HEPÁTICOS E DO CITOMEGALOVIRUS HUMANO (HCMV)

O transplante de fígado representa a única forma efetiva de tratamento de uma série de doenças hepáticas terminais. Foi relatado pela primeira vez, em 1955, tendo sido efetuado pelo uso da técnica heterotópica, pela qual o fígado do doador é colocado no abdômen inferior e o fígado do receptor é deixado em sua posição original.

O primeiro transplante ortotópico, em que o fígado do doador substitui o do receptor, em caráter experimental, foi realizado em cães nos laboratórios de MOORE, em Boston, e STARZL, em Chicago, respectivamente em 1959 e 1960.

Em 1963, STARZL realizou o primeiro transplante ortotópico de fígado em humanos, usando azatioprina, corticóide e globulina antilinfocitária como agentes imunossuppressores. Nos quatro anos seguintes, realizou um total de sete cirurgias, porém em nenhum caso a sobrevida foi maior que 23 dias. O aumento da sobrevida pós-transplante hepático ocorreu em Cambridge, num grupo liderado por Roy Calne.

Com a introdução de novos agentes imunossuppressores, em 1978, como a ciclosporina combinada com a prednisona, aumentou-se para 80% a sobrevida após um ano de cirurgia. No início dos anos 80, o transplante hepático passou de um procedimento experimental para a terapêutica de escolha no tratamento das doenças crônicas ou agudas do fígado.

Desde o início dos transplantes hepáticos até hoje, foram realizadas mais de 50.000 cirurgias mundiais, a maioria, nos últimos dez anos (European Liver Transplant Registry; Villejuiif, 1997).

No Brasil, o desenvolvimento do transplante hepático, a partir de 1985, foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Atualmente estes procedimentos vêm sendo realizados em instituições públicas e privadas, diferenciando-se em sua infra-estrutura tecnológica.

O Citomegalovírus Humano (HCMV) foi inicialmente relacionado por Ribbert (1904), ao agente etiológico da “Doença de Inclusão Citomegálica”, cuja denominação deriva-se do efeito citopático característico, representado pelos aumentos dos volumes celulares por inclusões intranucleares e citoplasmáticas observadas nos tecidos infectados (WELLER & HANSHAW, 1962; WELLER, 1970; MURRAY, 1997).

COLE & KUTTNER (1926) demonstraram a transmissão do HCMV em cobaia e sugeriram que este agente possuía características de vírus e que sua infecção seria espécie-específica. A primeira evidência de que o vírus de glândula salivar era relativamente freqüente veio do trabalho de FARBER & WOLBACH (1932) que demonstraram ter encontrado células citomegálicas típicas em 12% de 183 crianças estudadas. Em 1954, MARGARETH SMITH, usando a infecção salivar de camundongo como modelo, conseguiu isolar o vírus em cultura de tecidos (SMITH, 1956).

Em 1956 e 1957, foram publicados diversos trabalhos, por SMITH, ROWE e WELLER, sobre o isolamento de um vírus dos tecidos de crianças com manifestações clínicas de infecção provável pelo HCMV (DREW, 1988; COSTA, 1999).

A partir de 1960, com a enorme evolução nos procedimentos cirúrgicos para transplantes renais e cardíacos, a infecção pelo HCMV passou a ser reconhecida como uma entidade de grande importância clínica. Nesta ocasião, também WELLER *et al* (1957) sugeriram o nome citomegalovirose em substituição à nomenclatura antiga.

Em 1979, o Grupo de Estudos dos Herpesvírus do Comitê Internacional classificou a família *Herpesviridae* em três subfamílias: vírus herpes simples (*Alphaherpesvirinae*), citomegalovírus (*Betaherpesvirinae*) e vírus linfoproliferativo (*Gammaherpesvirinae*) (HO, 1991).

Em 1980, foi iniciada a utilização de medidas para o controle do vírus, nos grupos de risco por meio de agentes antivirais e de intervenções imunológicas e, mais atualmente, os avanços para a compreensão dessa virose estão relacionados aos aspectos moleculares da infecção e controle clínico, principalmente nos grupos de risco (RUBIN, 1990; COSTA, 1999).

1.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO HCMV

A classificação do citomegalovírus é baseada nas propriedades biológicas de especificidade do hospedeiro, ciclo de replicação lento e efeitos citopáticos. O HCMV é um membro espécie-específico da família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae* e gênero *Cytomegalovirus*. É considerado um vírus complexo, sendo o maior membro da família, com diâmetro de aproximadamente 200nm, e possui uma ultra-estrutura semelhante à de outros Herpes-vírus. É também conhecido como Herpes Vírus Humano tipo 5 (HHV-5) (BROWN & ABERNATHY, 1998; COSTA, 1999).

O genoma viral é composto por uma cadeia dupla de DNA (ácido desoxirribonucléico) linear contendo 240 kilobases, que codifica 33 proteínas estruturais e um número indefinido de proteínas não estruturais, sendo algumas delas conhecidas por serem imunogênicas e desencadearem resposta humoral específica. O vírion consiste de um núcleo de 64 nm envolto por um capsídio de forma icosaédrica, contendo 162 capsômeros e medindo 100 nm. Possui, ainda, um envelope pleomórfico complexo que consiste de, pelo menos, seis glicoproteínas, sendo três achadas em grande quantidade e consideradas como as maiores constituintes, tendo sítios antigênicos para anticorpos neutralizantes. (MUSTAFA, 1994; COSTA, 1999). Os desenhos esquemáticos do vírus encontram-se nas Figuras 1 e 2.

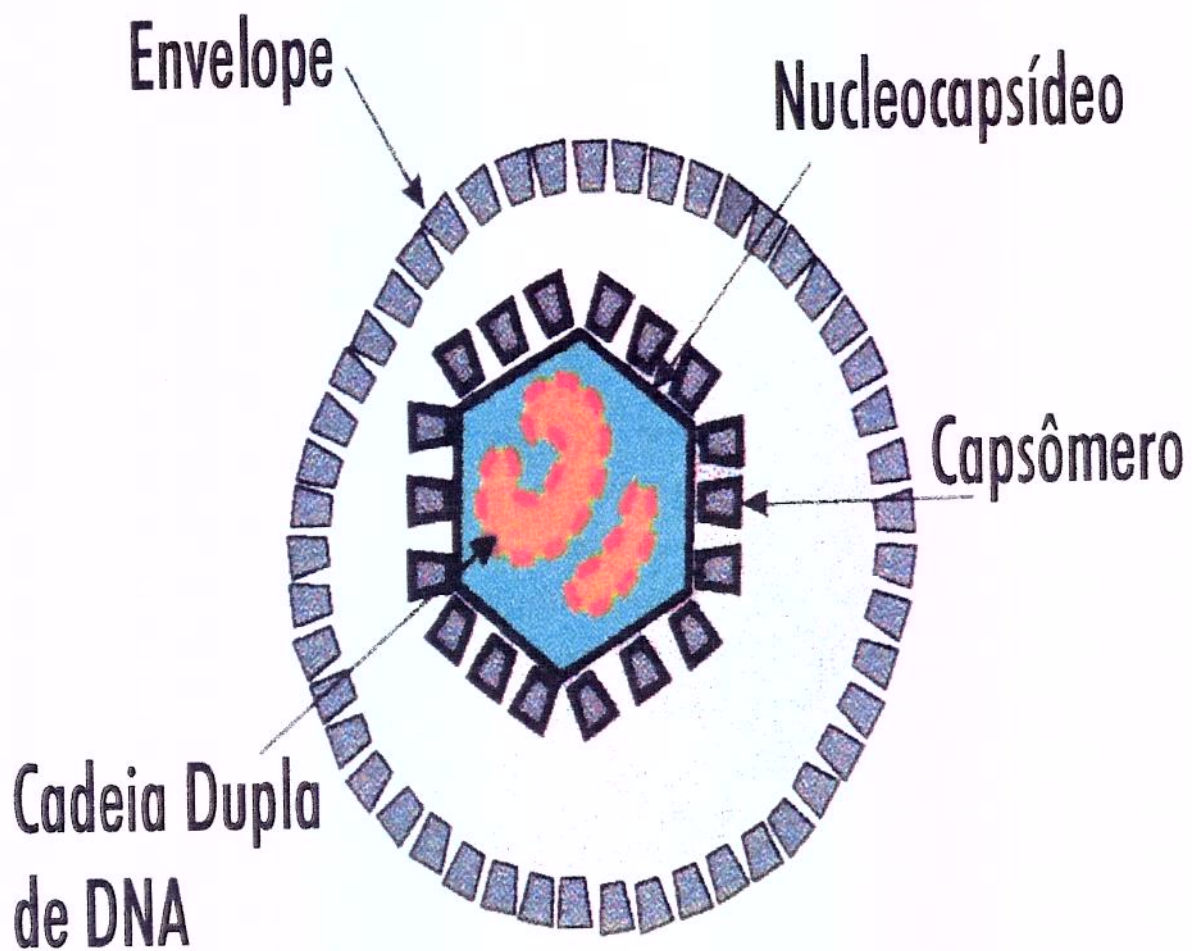


FIGURA 1: Estrutura esquemática do citomegalovírus humano, mostrando o envelope, capsômero, nucleocapsídeo e a cadeia de DNA

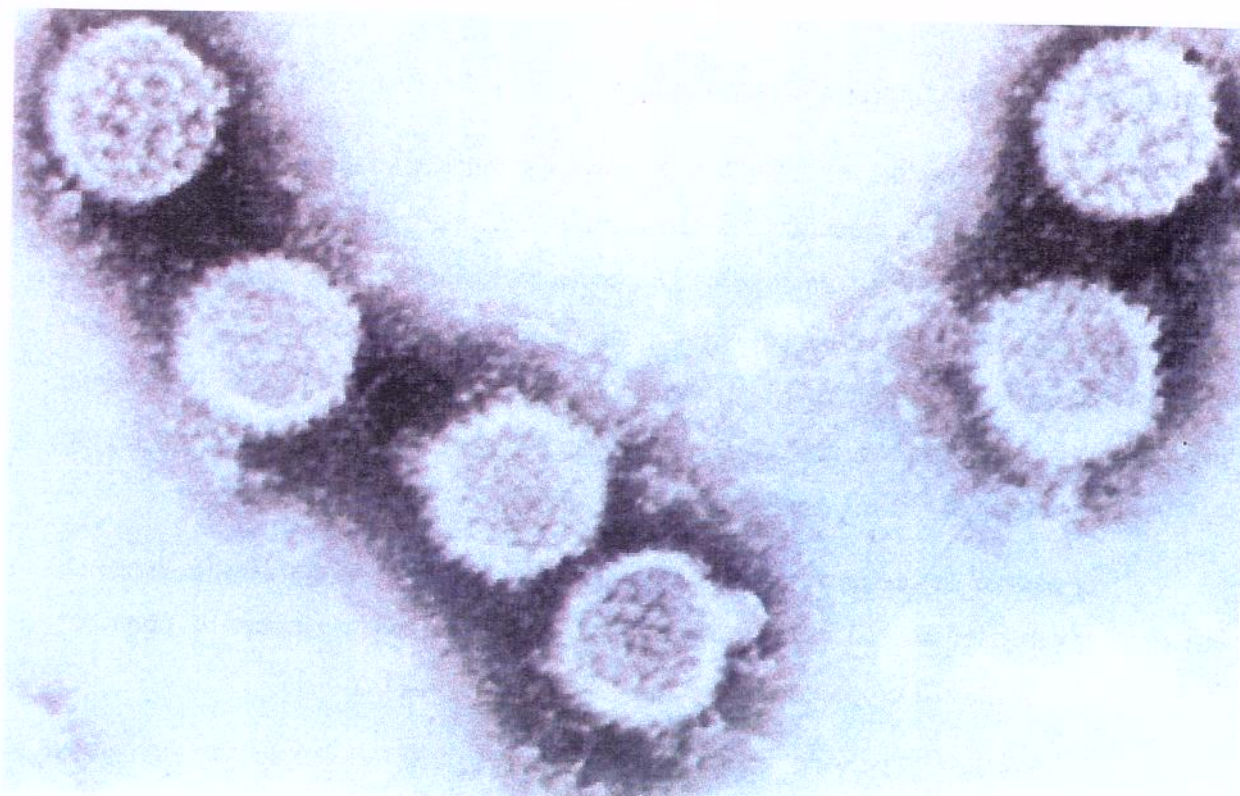


FIGURA 2: Estrutura do citomegalovirus humano, pela microscopia eletrônica

O vírus é bastante termolábil e sua vida média a 37° C é de apenas 45 minutos, sendo totalmente inativado a 56° C por 30 minutos, pelo pH menor que 5, pela exposição ao éter a 20% por duas horas, pela luz ultravioleta por cinco minutos, ciclos de congelamento e descongelamento e é mais estável na urina a 4°C. (DREW, 1988; BROWN & ABERNATHY, 1998; COSTA, 1999).

O ciclo replicativo do HCMV apresenta padrão similar aos demais herpes-vírus. Após infecção e incorporação do material genético, um pequeno número de genes é transcrito, codificando proteínas que auto-regulam sua expressão. Os genes virais são expressos por períodos: imediatamente precoce ou IE (“immediate early”) de duração de 0 a 2 horas, precoce ou E (“early”), de 2 a 24 horas, e tardio ou L (“late”), com 24 horas pós-infecção e, as proteínas são classificadas como alfa, beta ou gama, respectivamente. As proteínas sintetizadas durante os períodos IE e E são geralmente associadas à regulação da replicação do vírus, enquanto as sintetizadas no período L são elementos estruturais (STRAUS, 1990; COLIMOM & MICHELSON, 1990).

1.3. REPLICAÇÃO E PATOGÊNESE DO HCMV

O HCMV tem por característica a replicação lenta em cultura celular e também nos hospedeiros infectados, quando pode manter a infecção por períodos prolongados ou permanecer em estado latente. Para iniciar o quadro infeccioso, é necessário que o vírus seja adsorvido aos receptores de superfície celular, seguido da fusão do envelope viral com lamela externa na membrana citoplasmática. Desnuda o capsídeo no citoplasma e o genoma viral inicia sua replicação no núcleo celular, onde ocorrem transcrições, replicações do DNA viral e produção de novos capsídeos (SILVA, 2000).

O padrão de replicação do HCMV é similar a do HSV (vírus Herpes simples), inicia-se aproximadamente 12 horas após a infecção, e seu ciclo replicativo pode ser dividido em três períodos: precoce imediato, precoce e tardio, a saber:

1. IE (alfa) – período imediato ou alfa: ocorre a transcrição de segmentos específicos do genoma e a produção de proteínas chamadas precoces imediatas; tem a duração de duas a quatro horas após a infecção; os mRNAs são transportados e traduzidos; ocorre a produção de proteínas que permitem ao vírus ter o controle da síntese macromolecular da célula hospedeira. Os genes transcritos podem ter influência na expressão de outros genes virais.
2. E (beta) – período precoce ou beta: é caracterizado pela transcrição e replicação contínua de grande parte do DNA viral, produção de proteínas como a DNA polimerase; possui a duração de 24 horas ou mais;
3. L (gama) – período tardio ou gama: os componentes virais são produzidos, há montagem e liberação de novos vírions e esse período tem a duração de 36 a 48 horas (STTINSKI, 1990; MUSTAFA, 1994).

O HCMV, assim como os outros herpes-vírus, possuem três características importantes: a latência, a associação celular e a reativação. A latência explica o fato de que, uma vez infectado com este vírus, o paciente estará infectado por toda a sua vida, mesmo sem evidência de replicação viral ativa; a infecção primária é seguida por infecção persistente e / ou recorrente causada pela ativação do vírus latente; a reinfeção também pode ocorrer devido à diversidade antigênica do HCMV.

A associação celular significa que o vírus é transmitido entre indivíduos e dissemina-se célula a célula, sendo a imunidade celular essencial para a defesa do hospedeiro, a qual é mediada por linfócitos T citotóxicos antígeno - específicos (RUBIN,1990).

Normalmente a infecção pelo HCMV é subclínica, porém, em certas condições como aquelas encontradas em pacientes com deficiência imunológica ou em crianças desnutridas ou com infecções congênitas, o quadro clínico apresentado pode ser grave e muitas vezes conduzir à morte (HO,1990).

O HCMV é uma importante causa de morbidade e mortalidade em imunocomprometidos. Entre os pacientes com alto risco de contrair infecção pelo HCMV estão aqueles submetidos a transplantes hepático, renal, medula óssea, coração, e aqueles com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) e aqueles submetidos à quimioterapia antineoplásica. O uso cada vez mais comum de medicamentos imunossupressores tem contribuído para o aumento das infecções pelo HCMV (HO, 1990).

1.4. TRANSMISSÃO E EPIDEMIOLOGIA DO HCMV.

A incidência da infecção pelo HCMV ocorre praticamente em todas as regiões do mundo (KRECH,1973). A soroprevalência dos anticorpos para o HCMV, não depende tanto da área geográfica, mas sim do nível sócio econômico das comunidades estudadas (HUNTER, 1983; PANNUTI *et al.*, 1987).

Os estudos atuais somente demonstraram hospedeiros humanos para o HCMV, sendo transmitido por contato direto, via transmissão horizontal e vertical, tais como: secreções orofaríngeas, lágrimas, secreções cervicais e vaginais, líquido seminal, leite materno, urina, fezes e sangue. Ao lado de várias formas de infecção natural, o HCMV pode ser transmitido iatrogenicamente, por meio de transfusões de sangue ou por transplante de órgãos (ALFORD & BRITT, 1990; BRUGGEMAN, 1993; BROWN & ABERNATHY, 1998).

As pesquisas correlacionando a idade e as prevalências da infecção pelo HCMV sugerem dois períodos de maior incidência da infecção: o período perinatal, via canal do parto, leite materno, banco de leite e contato com crianças contaminadas e o período de maturidade sexual, em contatos homossexuais ou heterossexuais (DREW, 1988; MUSTAFA, 1994; BROWN & ABERNATHY, 1998).

Uma vez infectado com HCMV, o indivíduo não elimina mais o vírus, permanecendo em estado de latência podendo ser reativado em condições especiais (SHEN *et al.*, 1996; BRUGGEMAN *et al.*, 1999).

A doença clínica causada pelo HCMV é resultante de três padrões epidemiológicos distintos: infecção primária, quando ocorre em pacientes previamente soronegativos; infecção secundária quando ocorre reativação de infecção latente e reinfeção quando ocorre por outras linhagens do vírus (HIBBERD & SNYDMAM, 1995; MURRAY, 1997; PATEL & PAYVA, 1997; MAYA & AZULAY, 2000). A sintomatologia é distinta nas diferentes formas de doença clínica: dois terços dos pacientes com infecção primária são sintomáticos, menos de 20% na reativação viral têm sintomas e cerca de 40% dos reinfectados têm sintomatologia atribuível ao HCMV (COSTA, 1999).

O HCMV é o agente infeccioso mais freqüente que acomete transplantados de órgãos, afetando dois terços desses pacientes. Independente do órgão transplantado, a alta prevalência é devido à capacidade do vírus de permanecer latente por longo período e também à propriedade de reativar-se em condições especiais, sendo de relevância à ativação do HCMV o uso de terapia imunossupressora. (RUBIN, R.H.; LEAVIN, M.; COHEN, C., 1979).

Sintomatologias concernentes à replicação viral são observadas dentro de um período de um a quatro meses após o transplante. (RUBIN, 1990).

A citomegalovirose é a maior causa de morbidade durante as primeiras 14 semanas após o transplante hepático, aumentando tanto o custo quanto o tempo de permanência no hospital. Assim, o HCMV causa tanto aumento na morbidade quanto na mortalidade, uma vez que esta infecção predispõe a superinfecção com outros patógenos oportunistas, assim como aumenta o risco de rejeição do órgão transplantado. (SUTHERLAND *et al.*, 1992)

Quanto ao transplante hepático, o HCMV é a maior causa de infecção após a cirurgia, sendo sua prevalência de 20 a 60% nesses pacientes. Entre os pacientes com infecção ativa, aproximadamente 80% desenvolverão manifestações clínicas da doença (COPE *et al.*, 1997). Estes valores aumentam consideravelmente quando o receptor é soronegativo antes do transplante e o doador é soro-positivo. Nestes casos, a primo-infecção ocorre em 80 a 100% dos casos, dos quais 50 a 70% desenvolvem doença clínica pelo HCMV (GANE *et al.*, 1997).

1.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO HCMV.

O quadro clínico do paciente imunocompetente com HCMV pode transcorrer de forma assintomática ou caracterizar-se quando as manifestações clínicas se fazem presentes, similares à mononucleose infecciosa. De forma genérica, os pacientes de risco para essa virose podem ser classificados em diferentes grupos, a saber: infecção congênita, infecção perinatal, infecção em pacientes com HIV e infecção em pacientes transplantados.

1.5.1. Infecção congênita pelo hcmv

A infecção congênita pelo HCMV é adquirida por transmissão vertical e cerca de 10% dos recém-nascidos infectados apresentam sintomatologia pós-parto, e as manifestações clínicas mais freqüentes são prematuridade, icterícia, hepatoesplenomegalia, petéquias, microcefalia, coriorretinite, calcificações perivasculares, ventrículomegalia, diminuição do reflexo de sucção e convulsões. A taxa de mortalidade é de 20% a 30% e aproximadamente 90% dos sobreviventes têm seqüelas neurológicas, tais como: retardo mental, perda da audição, diminuição da acuidade visual; é relatado que 5% a 15% dos portadores assintomáticos podem, com o crescimento, ter uma diminuição da acuidade auditiva (DREW, 1988; ALFORD & BRITT, 1990; MUSTAFA, 1994; MAYA & AZULAY, 2000). Os achados laboratoriais podem apresentar: aumento de enzimas hepáticas, trombocitopenia, hiperbilirrubinemia, aumento de proteínas líquóricas.

1.5.2. Infecção perinatal pelo hcmv

A infecção perinatal pelo HCMV ocorre por contaminação durante o parto, pela ingestão de leite contaminado ou eventual transfusão sanguínea. Existe um período de incubação de 4 a 12 semanas, sendo que a maioria das crianças evolui de forma assintomática, porém podem ocorrer manifestações clínicas de hepatite, pneumonite, esta com clínica indistinguível de outros agentes bacterianos ou virais; também pode assemelhar-se a mononucleose, apresentando linfocitose com neutropenia, trombocitopenia e anemia hemolítica (MAYA & AZULAY, 2000).

1.5.3. Infecção pelo hcmv em pacientes com hiv

Estudos demonstram que a concomitância viral HCMV com HIV vem aumentando recentemente, explicada pela maior sobrevida dos pacientes devido ao uso de drogas anti-retrovirais ou o uso precoce de medicação profilática. A manifestação clínica mais comum é a retinite (85% dos casos), podendo ocorrer um comprometimento ocular até a cegueira (DREW, 1988). Porém, podem também surgir esofagite, enterite, colite, pneumonite, manifestações neurológicas tais como encefalite micronodular difusa, ventrículo-encefalite, mononeurite múltipla ou polirradiculoneurite (MAYA & AZULAY, 2000).

1.5.4. Infecção pelo hcmv em pacientes transplantados

A infecção pelo HCMV tem sido caracterizada como uma das maiores causas de mortalidade e morbidade em pacientes imunocomprometidos, como os transplantados hepáticos, renais, de medula óssea e de coração, constituindo grupos de grande risco para adquirir doença grave por HCMV (PATEL & PAYA, 1997; COSTA *et al.*, 1999). As manifestações clínicas nestes casos são variáveis e dependentes do tipo de transplante, do estado sorológico do doador e do receptor, e do regime de imunossupressão empregado (GRUNDY, 1990).

Neste grupo de pacientes, a infecção pode ser primária, geralmente mais grave (MUSTAFA, 1994), tendo origem em fontes diversas como o próprio enxerto ou secundária, quando o paciente apresenta infecção latente pelo HCMV (MAYA & AZULAY, 2000).

As manifestações clínicas mais frequentes são: pneumonia intersticial, esofagite, gastrite, colite, retinite, febre, demora na viabilidade do enxerto em transplantados de medula óssea e rejeição do enxerto entre os receptores de órgão sólido como fígado, rim e coração (LJUNGMAN & PLOTKIN, 1995).

Evidências de replicação viral e sintomas clínicos em transplantados são vistos no decorrer de um a quatro meses após o transplante (COSTA, 1999).

1.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO HCMV

É de suma importância o diagnóstico correto da infecção pelo HCMV de modo que, associando-se os dados clínicos e laboratoriais, poder-se-á não só identificar a infecção corretamente como também verificar se é ou não acompanhada de manifestações clínicas, o que caracteriza a doença pelo HCMV.

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por meio de cinco categorias de exames: isolamento do vírus, exames citológicos e histopatológicos, métodos sorológicos, métodos moleculares, identificação de antígenos virais (PANNUTI, *et al.*, 1987; CHOU, 1990; SUASSUNA & MACHADO, 1992).

1.6.1. Isolamento viral

1.6.1.A - Cultura clássica

O método habitualmente empregado para a detecção do vírus consiste em isolamento por meio da cultura de fibroblastos humanos, em que o material suspeito é inoculado e o vírus em condições favoráveis, multiplica-se, determinando efeito citopático característico. O HCMV pode ser isolado de materiais biológicos diversos, como urina, saliva, secreções cervicais, leite, sangue, lavados e aspirados de órgãos, tecidos obtidos por

biópsia ou autópsia. Além da complexidade envolvida nos métodos de cultura de células, a lenta replicação do vírus faz com que seja necessário um período mínimo de 25 dias para o resultado final (WELLER & HANSHAW, 1962; PANNUTI, 1984). O efeito citopático é em geral característico e suficiente para a identificação, mas pode ser confirmado pela técnica de imunofluorescência, utilizando anticorpos poli ou monoclonais específicos (PANNUTI *et al.*, 1987; DREW, 1988).

1.6.1.B – Cultura rápida de isolamento viral

As utilizações das técnicas de cultura rápidas representam um grande avanço no diagnóstico da infecção pelo HCMV. Com o emprego de anticorpos monoclonais, os antígenos virais precoces são detectados, permitindo uma diminuição considerável no tempo de espera em relação à cultura convencional, utilizando-se a técnica de imunofluorescência ou imunoperoxidase. Dependendo do anticorpo utilizado, a sensibilidade do teste é superior ao método de cultura convencional e a técnica mais atual emprega monocamadas de fibroblastos, cultivadas sobre lamínulas de vidro em placas (“shell vials”), com pequenos volumes de meio de cultura (McKEATING *et al.*, 1985; DEGIROLAMI *et al.*, 1987; AGHA *et al.*, 1988; LELAND, HANSING, FRENCH, 1989; LEE & HALSWORTH, 1990).

A utilização das técnicas de cultura rápida representa um grande avanço no diagnóstico da infecção pelo HCMV (MAYA & AZULAY, 2000).

1.6.2. Métodos Sorológicos

Estes métodos detectam anticorpos produzidos contra o HCMV e não apresentam grande complexidade de execução. O requisito principal para a obtenção de resultados positivos é a capacidade de o paciente apresentar resposta imunológica humoral adequada contra o HCMV. Assim uma limitação importante destes métodos aparece quando ocorre redução na resposta imunológica, como pode acontecer em pacientes com imunodeficiências (SUASSUNA & MACHADO, 1992).

A avaliação sorológica é um meio adequado de determinar uma história passada de infecção pelo HCMV, estabelecida pela presença de anticorpos específicos da classe IgG (MAYA & AZULAY, 2000).

Os principais métodos sorológicos utilizados para o diagnóstico das infecções pelo HCMV podem ser divididos em clássicos e modernos; os clássicos não discriminam anticorpos IgM e IgG e, dentre estes, são os mais comuns o de neutralização viral e o de fixação de complemento; os modernos, por sua vez, discriminam anticorpos IgM e IgG, sendo comumente utilizados os de imunofluorescência, radioimunoensaio e imunoenaios enzimáticos (SUASSUNA & MACHADO, 1992).

1.6.2.A - Métodos sorológicos clássicos

A neutralização viral foi a primeira técnica com aplicação clínica no diagnóstico de HCMV. É um método difícil e apresenta leitura demorada, pois é necessário incubar o soro em teste com uma amostra do vírus e, em seguida, cultivar o vírus. Devido à demora do cultivo celular, a neutralização viral vem sendo abandonada como método diagnóstico (SUASSUNA & MACHADO, 1992).

A reação de fixação de complemento para diagnóstico da infecção pelo HCMV é uma técnica muito difundida e as suas principais vantagens são: facilidade de execução, disponibilidade de antígenos no comércio e amplo espectro de reatividade cruzada entre cepas diferentes de HCMV, além de não-reatividade com antígenos Herpes *simplex* ou Varicela zoster. Um aumento do título inicial, de quatro vezes ou mais, em soros pareados é considerado evidência de infecção ativa (MILLER *et al.*, 1989; BUFFONE *et al.*, 1991; SUASSANA & MACHADO, 1992; DREW, 1988).

A técnica é adequada para detecção de soroconversão. A principal desvantagem da técnica é a sua baixa sensibilidade em comparação a outros métodos sorológicos (DREW, 1988).

1.6.2.B – Métodos sorológicos modernos

Entre estes, destacam-se a imunofluorescência indireta (IFI), o imunoensaio enzimático (ELISA) e radioimunoensaio (RIA).

- Imunofluorescência Indireta (IFI)

A IFI apresenta maior sensibilidade, além de detectar diferentes classes de imunoglobulinas. A especificidade da IFI para IgG pode ser comprometida pelos receptores para a porção Fc de imunoglobulinas, induzidos pelo HCMV nas células utilizadas como substrato na reação. As porções Fc de moléculas de imunoglobulina, presentes no soro testado podem interagir com esses receptores, ocasionando resultados falso-positivos (REYNALDS, STAGNO, ALFORD, 1979).

A IFI para anticorpos IgM, por outro lado, não sofre a interferência causada pelos receptores Fc. A expectativa para a detecção de IgM era de que esta pudesse permitir diagnóstico de infecção primária. No entanto, a IgM eleva-se tanto em infecções primárias, como em reativações ou reinfecções e pode, em alguns casos, persistir por período prolongado. Além disso, merece ser ressaltado que a detecção de IgM pode revelar falso-positivos, quando existe a presença de fator reumatóide nos soros testados, sendo necessária a adsorção desses soros com látex visando a minimizar este problema. Assim, a IFI é um método simples, com aplicação clínica confiável e com razoável sensibilidade e especificidade (REYNALDS, STAGNO, ALFORD, 1979).

- Imunoensaios de Ligação
 - Radioimunoensaio (RIA)
 - Imunoensaio enzimático (ELISA)

Ambos utilizam os mesmos princípios analíticos, mudando apenas o tipo de substância reveladora empregado na leitura. Os RIA utilizam substâncias radioativas. Para o ELISA, emprega-se uma enzima e o antígeno purificado é imobilizado numa placa de plástico, à qual o soro a ser testado é adicionado. Se na amostra existirem anticorpos contra o antígeno imobilizado, ocorrerá a ligação entre os dois imunorreagentes. A seguir, o

sistema é lavado, removendo-se os anticorpos não ligados. Na etapa seguinte, adiciona -se um conjugado à placa (antiimunoglobulina humana, marcada com uma enzima). Finalmente, acrescenta - se um substrato que sofre a ação da enzima, gerando um produto colorido, detectado visualmente ou por fotometria. A técnica permite detectar quantitativamente diferentes classes de imunoglobulinas, possuindo boa sensibilidade e especificidade (SUASSUNA & MACHADO, 1992).

Entre os imunoensaios de desenvolvimento mais recente podem ser destacados: o imunoensaio com partículas de látex, que é um dos mais promissores testes sorológicos, por ter elevada sensibilidade, especificidade e ser rápido; o imunoensaio fluorescente em fase sólida, com desempenho bom em relação aos outros testes já citados, ainda que o alto custo do equipamento necessário para a sua realização limita o uso do mesmo (BECKWITH *et al.*, 1985) e, finalmente, o ensaio com antígeno imobilizado em membrana. Este teste é rápido, com leitura visual de bom rendimento, porém, de alto custo (SUASSANA & MACHADO, 1992).

1.6.3. Exames citológicos e histopatológicos

1.6.3.A - Citológicos

Os métodos citológicos para a identificação do HCMV podem ser realizados em lavados, secreções e aspirados de tecidos (DREW, 1988; MAYA & AZULAY, 2000). Em geral, é um método sem muita sensibilidade e especificidade (SUASSUNA & MACHADO, 1992).

1.6.3. B - Histopatológicos

O diagnóstico da presença do HCMV em cortes de tecidos é feito por meio da visualização das inclusões típicas. O achado de células com inclusões típicas permite, muitas vezes, atribuir ao HCMV a disfunção ou lesão do órgão estudado. No entanto, este método é considerado de baixa sensibilidade, mas evidencia a doença tecidual invasiva (SUASSUNA & MACHADO, 1992; MAYA & AZULAY, 2000).

Métodos de imuno-histoquímica ou hibridização *in situ* associada a esta técnica podem melhorar sua sensibilidade e especificidade. As vantagens das técnicas histológicas são: baixo custo, simplicidade e disponibilidade, quase universal, do equipamento requerido para a sua utilização (MAYA & AZULAY, 2000).

1.6.4. Identificação de antígenos virais - antigenemia

A identificação do antígeno do HCMV em leucócitos do sangue periférico (Antigenemia) foi desenvolvida por van der Bij *et al.*, em 1988, e tem sido demonstrada como sendo uma técnica rápida (4 a 5 horas), direta e sensível na detecção quantitativa do HCMV. (THE *et al.*, 1990).

A Antigenemia é baseada na detecção imunocitoquímica direta de proteínas da matriz viral (pp65) em leucócitos do sangue periférico, usando uma mistura de anticorpos monoclonais (C10 e C11), diretamente contra essas proteínas; estes anticorpos possuem especificidade pelo antígeno pp65 codificado pelo HCMV, não detecta reação cruzada com células infectadas por outros vírus pertencentes ao herpes-vírus e não reagem com outras células. (BOECKH & BOIVIN, 1998).

O antígeno pp65 é a proteína viral dominante que se pode detectar nos leucócitos de sangue periférico durante as infecções ativas. O número de leucócitos positivos para pp65 pode variar de 1 a 100 X 10⁵ leucócitos em infecções sintomáticas (van der BIJ *et al.*, 1988).

O teste da Antigenemia é um método sensível para a estimativa da carga viral sistêmica do HCMV e pode ser detectado de vários dias a uma semana antes do aparecimento dos sintomas (THE *et al.*, 1990)

A vantagem da Antigenemia é que pode ser facilmente quantificada, revelando uma estimativa da carga viral, que é útil na diferenciação de doença pelo HCMV de outras complicações; na avaliação da eficácia da terapia antiviral e, posteriormente, na detecção precoce da resistência ao medicamento. Com relação ao valor da Antigenemia, existem relatos de que quando surgem 2 a 5 células coradas por 50.000 polimorfonucleares analisados, ocorre um risco de 10% de desenvolver doença pelo HCMV, enquanto que se houver mais de 50 células por 50.000 polimorfonucleares, o risco é superior a 70% (THE *et al.*, 1992).

A desvantagem é que a amostra deve ser processada em curto espaço de tempo, sendo recomendável até 8 horas após a coleta. Em pacientes com grave neutropenia, o exame não pode ser realizado em função da baixa contagem de granulócitos (BOECKH *et al.*, 1992; BOECKH & BOIVIN, 1998; MAYA E AZULAY, 2000).

1.6.5. Métodos moleculares

1.6.5.A - Hibridização de ácidos nucleicos

O desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante, com a conseqüente clonagem e caracterização do HCMV, tornou possível a detecção deste vírus em amostras biológicas, por meio de hibridização com sondas específicas para o HCMV (CHOU & MERIGAN, 1983; KAHAN & LAUDERS, 1985).

Os métodos de diagnósticos com base na hibridização de DNA apresentam vantagens significativas sobre as técnicas clássicas, destacando-se a precocidade no diagnóstico, a sensibilidade e especificidade. Embora represente um grande avanço na metodologia diagnóstica do HCMV, essas técnicas têm inconvenientes, devido à complexidade envolvida na sua realização (requer material e estrutura laboratorial nem sempre disponíveis), e a utilização de isótopos radioativos (MAYA & AZULAY, 2000). Além disso, embora sensível, estima-se que sejam necessárias de 30.000 a 40.000 partículas de vírus presentes na amostra para se conseguir uma detecção precisa (CHOU & MERIGAN, 1983; KAHAN & LAUDERS, 1985).

1.6.5.B - Reação em cadeia da polimerase (pcr)

Com a introdução da amplificação de DNA, por meio da reação em cadeia catalisada pela polimerase (PCR), a detecção do HCMV foi levada a efeito em amostras contendo pequeno número de cópias do vírus. A amplificação gênica pela PCR é um método de biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA, a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas (SAIKI, SCHARF, FALOONA, 1985).

Basicamente, este procedimento permite a amplificação de um fragmento específico de DNA, escolhido pelo investigador, cuja concentração final excede, em milhares de vezes, a inicial. A PCR é capaz de aumentar significativamente o número do fragmento gênico escolhido, por meio da síntese enzimática de numerosas cópias da porção original (COSTA, 1994).

De maneira sucinta, este procedimento consiste em repetidos ciclos de síntese de DNA, por meio de dois “primers” com orientações opostas, isto é, dois segmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos, com seqüências complementares às das duas extremidades do fragmento alvo, e levados a efeito por uma reação enzimática, mediada pela polimerase de atividade em elevadas temperaturas (“Taq polimerase”). Cada ciclo de reação de amplificação é constituído por três fases distintas:

- Desnaturação: separação das hélices do DNA a ser amplificado;
- Anelamento: ligação complementar entre os “primers” e o DNA a ser amplificado;
- Extensão: síntese do DNA pela “Taq polimerase”.

A orientação dos “primers” faz com que a síntese de DNA ocorra na região interna entre eles. Assim, o produto da extensão de um “primer” é utilizado como substrato para o outro, o que resulta, em cada ciclo, na duplicação da quantidade de DNA sintetizada da fase precedente. Portanto, o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial, facultando, no final de 30 ciclos, um acréscimo da ordem de 10^6 cópias, valendo-se de uma única célula (SAIKI, SCHARF, FALOONA, 1985; COSTA, 1994).

Embora a reação em cadeia da polimerase seja extremamente sensível, algumas considerações devem ser ressaltadas: a alta sensibilidade do método levanta a questão da possível detecção de genoma de partículas virais defectivas, incapazes de produzir infecção. A PCR positiva indica replicação viral, mas não é necessariamente diagnóstico de doença pelo HCMV (MAYA & AZULAY, 2000).

A técnica é muito suscetível à contaminação por produtos de amplificações prévias, podendo resultar em falsos – positivos, sendo necessários procedimentos especiais no laboratório para se evitar tal problema e a reação falso–negativa pode ser resultante da variação gênica entre as diferentes linhagens de HCMV (KWOK & HIGUSHI, 1989; MAYA & AZULAY, 2000). Além disso, por serem reações enzimáticas, várias substâncias presentes no material examinado podem inibir a reação, levando a resultados falso-negativos (BUFFONE *et al.*, 1991; KHAN *et al.*, 1991)

Com base nos trabalhos pioneiros de SHIBATA *et al.* (1988), a técnica de PCR foi introduzida na literatura para diagnóstico da infecção pelo HCMV, nos vários grupos de riscos para esta doença. A escolha de “primers” para a amplificação clínica requer o uso de seqüências genômicas que são altamente conservadas entre HCMV distintos. Esta escolha é fundamental para garantir sensibilidade e especificidade para o teste.

Vários trabalhos (OLIVE *et al.*, 1989; EVANS *et al.*, 1998) têm sugerido, que a técnica PCR para diagnóstico da infecção pelo HCMV produz resultados compatíveis à cultura clássica, atingindo 100% de especificidade e 93% de sensibilidade, sendo, no entanto, uma metodologia mais rápida. Em todos os trabalhos, os resultados foram alcançados após hibridização do produto da amplificação simples, com sondas específicas marcadas com P₃₂. Uma vantagem importante desta técnica em relação à detecção de antígeno está na maior facilidade de conservação do material (MAYA & AZULAY, 2000).

Maior sensibilidade e especificidade foram alcançadas pela técnica de “Nested-PCR” (BRYTTING *et al.*, 1991). Esta variação da PCR é uma técnica que amplifica uma seqüência alvo em dois passos: na primeira amplificação, utiliza-se um par de “primers” específicos para um fragmento alvo desejado; a partir do produto desta primeira reação, um novo par de “primers” é utilizado para uma região interna ao fragmento anterior, por isso o aumento da sensibilidade e especificidade da reação.

Além disso, “Nested-PCR” permite um diagnóstico mais rápido que a PCR simples seguida da hibridização específica (CHOU, 1990; BRAINARD, 1984).

Amplificação do DNA- CMV pela “Nested” PCR

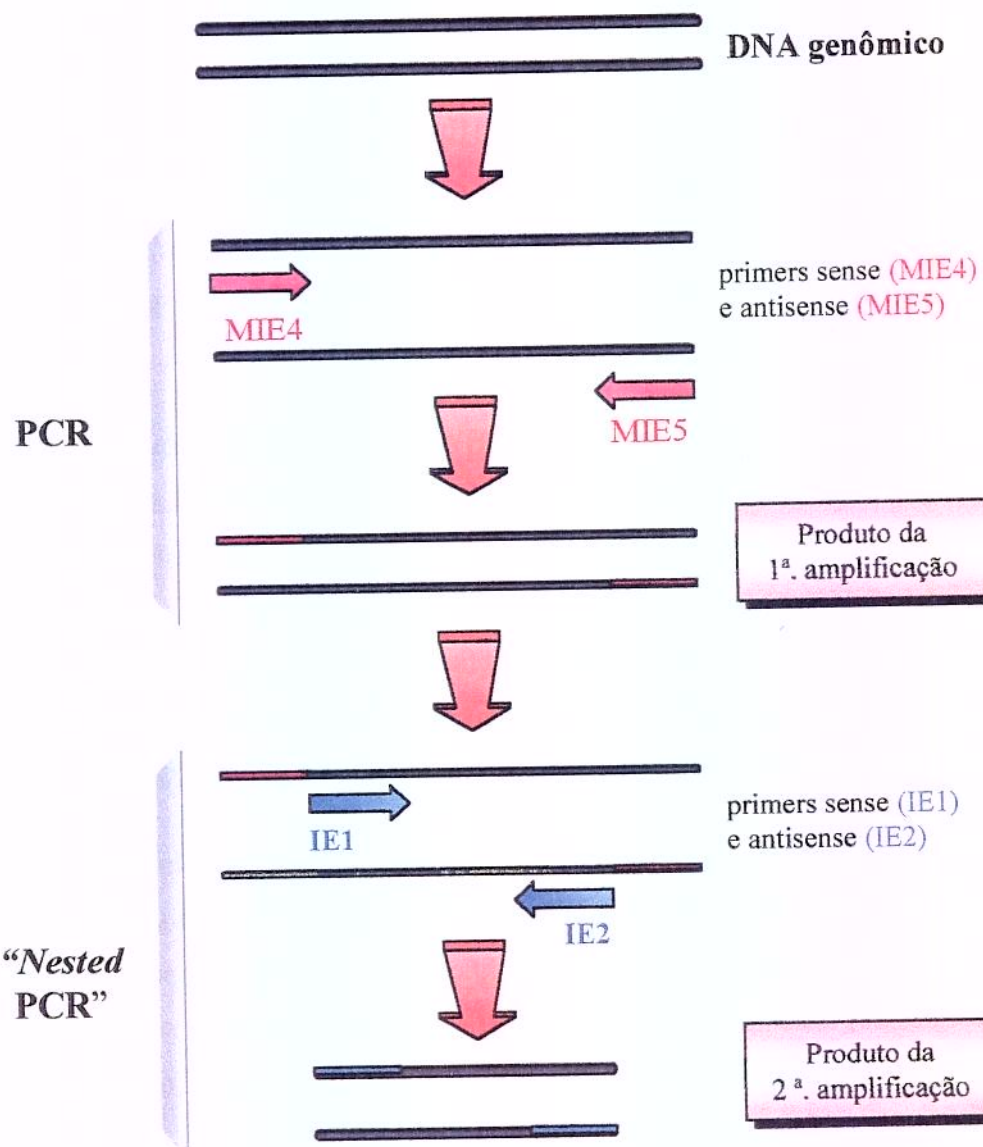


FIGURA 3: Amplificação do dna por “nested-pcr”.

Detecção de DNA- CMV pela "Nested" PCR

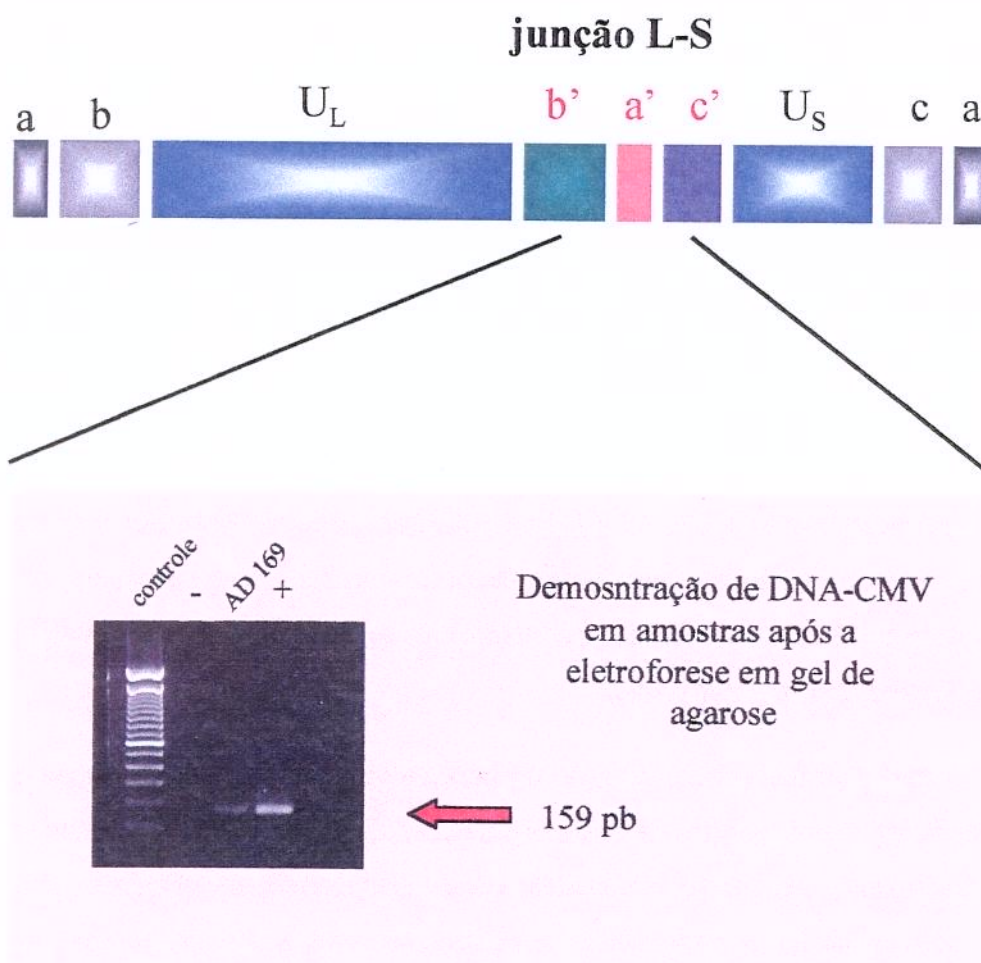


FIGURA 4: Detecção de dna-hcmv pela "nested-pcr"

1.7. PROFILAXIA E MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO PELO HCMV

A administração profilática de medicamentos antivirais tem sido efetiva em reduzir a infecção por HCMV em pacientes submetidos a transplante de órgãos (SNYDMAN *et al.*, 1993) e o efeito sinérgico do emprego de imunoglobulina com agente antiviral tem sido de relevante importância na profilaxia da infecção e doença pelo HCMV.

O tratamento da doença ativa causada pelo HCMV está, na atualidade, limitada a pacientes imunocomprometidos e restrita a dois agentes antivirais: ganciclovir e foscarnet, ambos com ação inibidora da replicação viral, enquanto administrados (BALFOUR, 1990).

O ganciclovir, análogo nucleosídeo inibidor da DNA polimerase viral, ao se incorporar ao DNA do vírus, provoca o término da duplicação do DNA e, desta forma, o da replicação viral (CRUMPACKER, 1996). Sua aplicação pode ser feita por meio de uma dose de ataque de 5 miligramas por quilograma/peso (mg/Kg) intravenoso, de 12 em 12 horas, com dose total de 10 mg/Kg/dia, por três semanas, seguido por uma dose profilática de 5mg/Kg, intravenoso, por cinco dias.

A partir do mecanismo de ação do ganciclovir, verifica-se que é capaz de inibir apenas a replicação viral, porém, os vírus latentes, os quais não sintetizam nenhum DNA durante o tratamento, não serão eliminados; conseqüentemente, os vírus não podem ser removidos do organismo e recorrências e reativações são possíveis, mesmo após um tratamento efetivo (SMITH *et al.*, 1997).

Na prevenção da infecção ativa pelo HCMV e, por conseqüência da doença associada, o ganciclovir tem se mostrado eficiente (SCHIMDT *et al.*, 1991); e com a detecção precoce da infecção, a terapia com esse medicamento reduz significativamente a evolução para doença (GERNA *et al.*, 1991; WINSTON *et al.*, 1993).

Existem duas alternativas distintas para se evitar a ocorrência da doença em um grupo de pacientes sob risco de doença pelo HCMV: a primeira é a administrar ganciclovir em todos os pacientes soropositivos, porém este tratamento expõe um número substancial de pacientes a um medicamento potencialmente tóxico; a segunda alternativa é a utilização

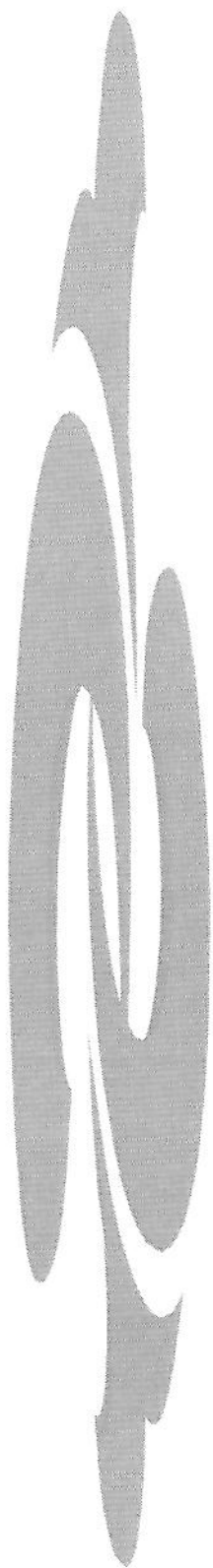
de métodos laboratoriais mais rápidos e sensíveis que permitam a detecção precoce de replicação viral ativa, evitando custos e toxicidade desnecessários de terapêutica específica e monitoramento (GOODRICH *et al.*, 1991; SCHMIDT *et al.*, 1991; WINSTON *et al.*, 1993). Cuidados profiláticos devem ser tomados com pacientes soronegativos de doadores soropositivos.

O ganciclovir pode causar granulocitopenia, trombocitopenia, azoospermia e elevação sérica da creatinina, por ser nefrotóxico (CRUMPACKER, 1996); porém estes efeitos colaterais são reversíveis com a interrupção do medicamento. Este medicamento pode também ser utilizado profilaticamente em pacientes de alto risco (doador positivo e receptor soronegativo) para a infecção ativa e a doença pelo HCMV.

O foscarnet (ácido fosfonofórmico) é um análogo do pirofosfato que inibe a síntese de DNA polimerase (BALFOUR, 1990). Apresenta dois atributos: não é mielotóxico e é efetivo em cepas de HCMV resistentes ao ganciclovir. Seu uso se faz na dose de 60mg/Kg, de 8 em 8 horas via endovenosa, por 3 semanas, e a dose de manutenção é de 120mg/Kg, uma vez ao dia via endovenosa, cinco a sete dias. Tem como efeito colateral a nefrotoxicidade, elevando os níveis da creatinina sérica e, também, causando hipercalcemia, hipofosfatemia, convulsões e úlceras penianas ou vulvares (DREW, 1992).

Novas drogas com ação anti-HCMV, como o lobucavir e o cidofovir, ainda se encontram em fase de avaliação.

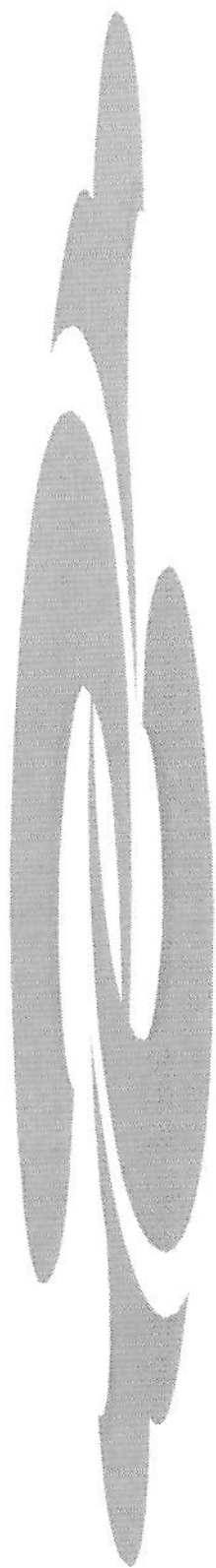
Em virtude da importância clínica do Citomegalovirus Humano nos pacientes transplantados hepáticos, a razão deste trabalho se faz presente.



2. OBJETIVOS

Baseando-se na importância clínica do Citomegalovírus Humano em imunodeprimidos, em especial os transplantados hepáticos, este trabalho, teve como objetivos principais:

1. Estudar prospectivamente pacientes submetidos a transplante hepático no Hospital de Clínicas da UNICAMP, em relação à infecção e doença causadas pelo HCMV.
2. Avaliar o método da Antigenemia na detecção e quantificação do HCMV em transplantados de fígado e comparar os resultados obtidos com o método "Nested-PCR"
3. Verificar o impacto clínico da infecção por HCMV nos transplantados hepáticos estudados.



3. CASUÍSTICA

No Hospital de Clínicas da UNICAMP, no período de setembro de 1998 a janeiro de 2000, foram estudados prospectivamente 51 pacientes com transplante hepático ortotópico. Destes 11 evoluíram a óbito no transoperatório ou no pós-operatório imediato, 13 foram excluídos do estudo por não se enquadrarem nos critérios de inclusão de estudo abaixo descritos, devido a seguimento clínico-laboratorial inadequado, restando 27 pacientes que fazem parte deste estudo, e 3 (11%) deles foram retransplantados, devido à evolução clínica no pós-operatório tardio.

Nestes pacientes estudados foram coletadas amostras de sangue em tubos com EDTA para a Antigenemia e PCR e em tubos secos para as análises sorológicas.

Os exames laboratoriais de confirmação diagnóstica foram realizados no “Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas Por Técnicas de Biologia Molecular” do Departamento de Clínica Médica – FCM-UNICAMP. Os dados clínicos apresentados resultam de pesquisas de prontuários no “DAME” – Divisão de Arquivo Médico, do HC-UNICAMP

Neste trabalho foram realizados três tipos de métodos para a detecção do HCMV:

- 1) Técnica sorológica tipo ELISA para detecção de anticorpos da classe IgM e IgG contra o HCMV;
- 2) Reação em cadeia da polimerase tipo “nested” (“NESTED-PCR”) para detecção de DNA viral no sangue; e
- 3) Antigenemia, para detecção e quantificação de antígenos do HCMV no sangue periférico.

3.1. CRITÉRIOS PARA DEFINIÇÃO DE INFECÇÃO ATIVA POR HCMV:

A presença de pelo menos um dos itens abaixo foi considerada como indicativa de infecção ativa por HCMV:

1. Infecção Primária: soroconversão após o transplante, com o aparecimento dos anticorpos IgM e IgG anti-HCMV, detectados por ELISA.

2. Infecção Secundária: aumento significativo dos títulos de anticorpos IgG ANTI-HCMV, comparados com os títulos pré-transplante, detectados por ELISA.
3. PCR: duas ou mais reações de PCR positivas no sangue para HCMV.
4. Antigenemia: uma ou mais células antígeno-positivas encontradas nas lâminas dos pacientes estudados

3.2. CRITÉRIOS PARA CARACTERIZAR PROVÁVEL DOENÇA POR HCMV:

Para caracterização de provável doença por HCMV, além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas anteriormente, faz-se necessário à presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo HCMV (LJUNGMAN & PLOTKIN, 1995), a saber:

1. Febre maior ou igual a 38°C, por três dias, no mínimo;
2. Pneumonite: com sintomatologia respiratória e achados radiológicos, junto com o HCMV, detectado em lavado brônquico-alveolar ou biópsia de pulmão;
3. Doença Gastrointestinal: com sintomatologia compatível com colite, gastrite ou esofagite, associado com histologia ou imuno-histoquímica positiva para HCMV de biópsias de lesões macroscópicas de trato gastrointestinal;
4. Hepatite ou Colangite: o vírus deve ser demonstrado em biópsias hepáticas, em combinação com aumento de duas vezes o valor normal de alanina-amino-transferase (ALT) e achados histopatológicos consistentes com hepatite ou colangite;
5. Doenças Neurológicas: sintomatologia compatível com quadro de encefalite, mielite ou doença difusa no sistema nervoso central, juntamente com a detecção do HCMV por PCR em líquido cefalorraquidiano, por cultura ou detecção do antígeno;
6. Leucopenia: leucócitos abaixo de 3.000/milímetro cúbico, ou trombocitopenia inferior a 100.000/milímetro cúbicos, afastados outras causas;
7. Retinite: com lesões oftálmicas típicas com ou sem provas virológicas.

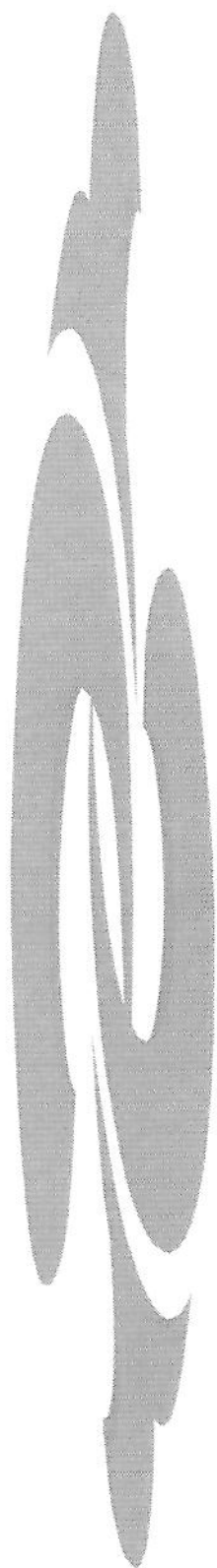
3.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO NO ESTUDO:

1. Qualquer paciente com transplante hepático recente;
2. Consentimento do paciente para coleta de amostras de sangue para análise;
3. Sobrevida ao transplante e acompanhamento do receptor por pelo menos um mês após o transplante;
4. Disponibilidade do soro do receptor e se possível também do doador antes da realização do transplante hepático.
5. Disponibilidade do sangue do receptor durante o seguimento pós-transplante proposto.

3.4. CRITÉRIOS DE SUSPENSÃO OU ENCERRAMENTO:

1. Foram excluídos os pacientes que evoluíram a óbito no ato cirúrgico ou que não sobrevivam ao primeiro mês pós-transplante;
2. Foram excluídos os pacientes que não tiveram um seguimento adequado no pós-transplante;
3. O estudo deu-se por encerrado quando houve um número suficiente de pacientes , aproximadamente vinte e sete, para análises conclusivas sobre o proposto inicial.

A indicação do transplante hepático seguiu as normas do protocolo estabelecido pelo Grupo de Transplante Hepático do Hospital de Clínicas da UNICAMP.



4. MÉTODOS

4.1. MÉTODO SOROLÓGICO ELISA:

Determinação de IgM e IgG anti-HCMV

Para as reações sorológicas, foram colhidos 8ml de sangue em tubo estéril seco. Após a separação dos soros, os mesmos foram armazenados a menos 20° C até sua utilização. As determinações de anticorpos IgM anti-HCMV por ELISA foram realizadas com a utilização de Kits comerciais “ETI-CYTOK-M” reverse (Sorin Biomédia, Itália). Resumidamente, 100 microlitros de amostras de soros diluídas a 1:101, foram adicionadas a orifícios de placas de ELISA, sensibilizados com anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-IgM humana. Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas quatro vezes com solução salina tamponada com fosfatos (SST), contendo Tween 20 (TW). A seguir, concentrações apropriadas de antígeno de HCMV de conjugado (anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-HCMV marcado com peroxidase) foram misturados, e 100µl dessa solução foram adicionados aos orifícios e as placas foram deixadas em repouso por 1 hora a 37°C. As placas foram, então, lavadas com SST-TW, como já descrito, e 100µl do sistema substrato (tetrametilbenzidina-peróxido de hidrogênio) adicionados aos orifícios. Trinta minutos após a adição do sistema substrato, as reações foram bloqueadas adicionando-se aos orifícios 200µl de ácido sulfúrico 1 N. As absorbâncias foram lidas a 450 e 630 nm, utilizando-se de uma leitora de ELISA (ETI-SYSTEM READER, SORIM BIOMÉDICA, Itália). Os cálculos foram realizados automaticamente, em um programa de computação específico (ETI-SYSTEM SOFTWARE). Todas as reações foram realizadas em duplicata e as médias das densidades ópticas (DO) foram consideradas. Em cada ensaio, soros-controle foram incluídos para o cálculo de “cut-off”. Amostras com absorbâncias maiores que o valor do “cut-off” foram consideradas reagentes.

4.2. “NESTED-PCR”:

4.2.1. Extração de dna:

A extração de DNA foi feita por meio de aquecimento. A extração de DNA genômico de leucócitos é feita a partir de 10-20 ml no sangue periférico em frasco estéril, utilizando-se como anticoagulante EDTA, na concentração de 1,5mg/ml. A amostra é centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos para separação do plasma, o qual foi descartado.

Após o descarte, os eritrócitos foram lisados com uma mistura de soluções de cloreto de amônio (NH_4Cl), a 0,0114 M (5 vezes o volume de células) e bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3), 0,01 M (0,5 vezes o volume de células). Após 15 minutos em repouso a temperatura ambiente, o hemolisado foi centrifugado duas vezes a 2500 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado de leucócitos lisado em solução TKM1 (Tris-HCL 10mM (pH 7,6), KCl 10 mM; MgCl_2 10 mM e EDTA 20 mM), sendo centrifugados por 10 minutos a 2.500 rpm, por duas vezes sucessivas, quando foram adicionados, 3 gotas de Triton X-100 (Nuclear), na primeira lavagem. A segunda lavagem não continha nenhum desses dois últimos especificados; o sobrenadante foi descartado e após a esta etapa, foi acrescentado, ao precipitado, a solução TKM2 (0,8ml da solução contendo Tris – HCl 10 mM (pH = 7,6); KCl 10 mM; NaCl 0,4M; MgCl_2 10 mM; EDTA 2 mM; 0,025 ml de duodecil sulfato de sódio (SDS) 20%). Em seguida, o material foi incubado durante 40 minutos a uma temperatura de 56°C e então foram adicionados 0,3ml de NaCl 5 M. Nessa etapa, o precipitado foi descartado e sobrenadante transferido para um tubo estéril. Ao sobrenadante, foram adicionados 4,0ml de etanol absoluto gelado (EtOH), ocorrendo a precipitação do DNA. O precipitado foi lavado em 1,0 ml de álcool a 70% gelado e a seguir foi centrifugado. Descartado o sobrenadante, o DNA foi seco à temperatura ambiente e solubilizado em água destilada, deionizada e estéril (dH_2O); sendo deixado por 8 horas em banho-maria a 37°C, ou levado a uma temperatura de aproximadamente 4°C, por 16 horas e sua concentração foi estimada em espectrofotômetro, por meio do valor da densidade óptica em comprimento de onda de 260 nm (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATS, 1989).

4.2.2. Amplificação Gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.2.2.A.- Condições de reação:

Para reação em cadeia da polimerase foi seguido o método descrito por SAIKI *et al.*, 1985, SHIBATA *et al.*, 1988, com algumas modificações. Cada reação de amplificação contém 0,5 a 1µg do DNA a ser estudado, (obtido das amostras de sangue periférico, nas quais foram feitas a extração de DNA pelo método já descrito) em volume

total de 20 µl, contendo 50mM de cloreto de potássio, 10mM de Tris (pH 8,4) 2,5 mM de cloreto de magnésio, 0,1 mM de cada “primer”, 200 mM da mistura desoxiribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 2 unidades de Taq DNA polimerase. Foram completados 30 ciclos de amplificação para cada amostra e cada ciclo constitui de:

- Separação das hélices de DNA por aquecimento a 94°C durante 1 minuto;
- Ligação complementar entre os “Primer” e o DNA em temperatura de 55°C por 1 minuto;
- Síntese do DNA pela Taq polimerase, em temperatura de 72°C por 1 minuto.

Trinta ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA). As amostras foram aquecidas inicialmente a 94° C por 7 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que pudessem interferir com a reação enzimática e, no último ciclo, o período de extensão (72° C) foi de 7 minutos.

4.2.2.B. Iniciadores (“Primers”):

Foram usados dois iniciadores que flanqueiam uma região conservada nas diversas cepas de vírus, sendo específicas para o HCMV, não amplificando DNA de outros herpes-vírus (Tabela 1):

TABELA 1: Sequência de nucleotídeos dos iniciadores “primers” para a PCR

“primers”	Sequência	Sentido
MIE 4	CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C localização no genoma: 731 -755	“sense”
MIE 5	CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTG G“ localização no genoma: 1165 - 1150	“anti-sense”

OBS: O primeiro par de de “primers” (MIE4/MIE5) amplifica um fragmento de 435 pb; MIE – “Major immediate early antigen of HCMV strain Towne” (DEMMLER et al, 1988).

4.2.2.C. “Nested-pcr”:

Utilizando-se do mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação é reamplificado com o par de “primer” interno (tabela 2).

TABELA 2: Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores “primers” para a “NESTED-PCR”

“primers”	Seqüência	Sentido
IE 1	CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC localização no genoma: 926 -945	“sense”
IE 2	CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC localização no genoma: 1087 – 1067	“anti-sense”

OBS: O segundo par de “primers” (IE1/IE2) amplifica um fragmento de 159 pb;

IE – “Immediate early” (SHIBATA et al, 1988)

As condições da reação são as mesmas usadas para fazer a primeira amplificação (PCR).

4.2.3. Detecção do Fragmento Amplificado

Após as duas reações de amplificação e reamplificação, 5µl do “Nested PCR” foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio, para visualização do fragmento com luz ultravioleta. Nas amostras positivas, foi observado um fragmento de DNA de 159 pares de bases, passo que não foi amplificado nenhum fragmento nas amostras negativas.

Em todos os experimentos feitos, foi usada, como controle positivo da reação, a cepa AD-169 do HCMV e, como controle negativo, a água, (BRAINARD *et al.*, 1994) para o “NESTED-PCR”.

4.2.4. Amplificação Gênica Pela Reação em Cadeia da Polimerase com Controle Interno da Reação (utilização de “primers” que detectam o gene da beta-globina)

4.2.4.A. Condições da Reação:

A reação em cadeia da polimerase com controle interno da reação seguiu o método de SAIKI *et al*, 1985, para PCR simples e seguiu o método descrito por BRAINARD *et al*, 1984, para o PCR duplo.

4.2.4.B. Iniciadores (“Primers”):

Foram utilizados dois iniciadores que flanqueiam uma região constante do gene da beta-globina (tabela 3).

TABELA 3: Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores para a PCR da beta globina

“primers”	Seqüência 5' - 3'	Sentido
P3	AGACAGAGAAGACTCTTG	“sense”
P5	TCATTCGTCTGTTTCCCATTC	“anti-sense”

“Homo sapiens genomic beta globin region (HBBC) on cromossome 11”

NG. 000007/13907843

4.2.4.C. “Nested-PCR”:

Utilizando-se do mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação foi reamplificado com o par de “primers” internos (tabela 4).

TABELA 4: Sequência de nucleotídeos dos iniciadores para a “NESTED-PCR da beta globina

“primers”	Sequência 5' - 3'	Sentido
110	CGTCCTATTGGTCTATTTT	“sense”
109	CCCTTCTTCCTATGACATGAA CTTAACCAT	“anti-sense”

“Homo sapiens genomic beta globin region (HBBC) on cromossome 11”

NG. 000007/13907843

As condições da reação foram às mesmas para fazer a primeira amplificação (PCR) e as condições de detecção também foram às mesmas. Nas amostras positivas para o HCMV foram observado um fragmento de DNA de 159 pb, ao passo que não foi amplificado nenhum fragmento nas amostras negativas, enquanto que todas as amostras foram observadas um fragmento de 357 pb correspondentes ao gene da beta-globina.

4.2.5. Cuidados Especiais para se evitar contaminação das amostras durante a reação da PCR:

1. As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em salas diferentes (sala pré-PCR) daquelas onde a amplificação foi feita (sala pós PCR).
2. Todos os reagentes e materiais pré-PCR e pós-PCR foram preparados e utilizados em ambientes diferentes.
3. Antes da abertura de tubos de microcentrifuga, é efetuada rápida centrifugação para concentrar o líquido contido no tubo, na região inferior e evitar sua dispersão por aerossol.
4. Todo material plástico (ponteiras e ependorffs) utilizado foi novo e não autoclavado.
5. Trocas constantes de luvas foram feitas durante todo o procedimento.

4.3. ANTIGENEMIA:

Para o teste de Antigenemia, seguiu-se o descrito por van der BIJ *et al.*, 1988; van der BIJ *et al.*, 1989; e JIWA *et al.*, 1989; com algumas modificações:

1. Extração de polimorfonucleares: as amostras de sangue foram enviadas ao laboratório, no máximo, até seis horas após a coleta, em que foram coletados de 0,5 a 10 ml de sangue.
2. Após a recepção do sangue em tubo com EDTA, este material foi transferido para um plástico tipo Falcon, adicionado de 02 ml da solução de Dextran 5% diluído em PBS, pH 7,4, em proporção 4:1, ou seja, a cada 4 ml de sangue foi adicionado 1 ml de Dextran 5%, homogeneizado por inversão e colocado em estante inclinada para tubos em ângulo de 45° por 30 minutos em estufa a 37°C.
3. A seguir, o sobrenadante foi transferido com pipeta Pasteur para outro tubo de plástico de 15 ml e centrifugado por 10 minutos a 1.200 rpm; o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” foi agitado no vórtex vigorosamente.

Para remover as células vermelhas persistentes, o “pellet” foi ressuspenso com 10 ml de solução de Cloreto de Amônio, pH 7,4, homogeneizado e mantido a temperatura de 4°C por 10 minutos; a seguir, foi centrifugado a 1.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet lavado por duas a três vezes com PBS e centrifugado por 10 minutos a 1.200 rpm. O sedimento celular foi ressuspenso em 200 a 1000 microlitro de PBS, dependendo da quantidade de “pellet”.

1. Preparação das lâminas: foi preparada uma suspensão com $1,5$ a $2,0 \times 10^6$ células/ml, colocados 100 microlitros desta solução por “cup” da centrifugado (Marca Reva – modelo Citociclo) e centrifugados por 05 minutos a 970 rpm, com lâminas feitas em duplicatas. A seguir, as lâminas foram secas, fixadas com paraformaldeído por 10 minutos, lavadas 03 a 04 vezes PBS e soro fetal bovino e permeabilizadas com Nonidet P-40 por 05

minutos; após nova lavagem, as lâminas foram secas, embrulhadas em papel manteiga e papel alumínio e estocadas à temperatura de menos 80°C, até o momento da revelação. Após a preparação das lâminas, o precipitado de leucócitos remanescente foi utilizado para o teste da PCR.

2. Coloração das lâminas: as lâminas foram secas por 10 minutos à temperatura ambiente e a área da reação foi delimitada com esmalte.

O anticorpo monoclonal utilizado foi o CLONAB HCMV do laboratório BIOTEST AG (Dreieck-W – Germany), contendo uma combinação de anticorpos monoclonais C-10 e C-11, que reconhecem o antígeno pp65.

As lâminas foram rinsadas com PBS e escorridas. A seguir, foram aplicados 35 microlitros de monoclonal diluído 1:10 em PBS por área de reação, incubados por 45 minutos em câmara úmida em temperatura ambiente. A área de reação na lâmina, a partir deste ponto, não poderá mais secar. A seguir, as lâminas foram lavadas por 03 vezes, em PBS, 05 minutos cada. O conjugado utilizado foi o “antimouse” marcado com peroxidase do Laboratório BIOTEST – AG. Foram utilizados 35 microlitros do conjugado “anti-mouse” peroxidase diluído a 1:40 em PBS na área da reação, a seguir, as lâminas foram incubadas em temperatura ambiente, em câmara úmida e, após, foram lavadas por 03 vezes com PBS, 05 minutos cada lavagem.

As lâminas foram cobertas com solução de AEC (amino-eatil-carbazol – SIGMA), recém preparada (20 microlitros de AEC dissolvida em 05 ml de dimetilformamida – Sigma e 100 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,9). Filtrado, se necessário, e adicionado 50 microlitros de água oxigenada a 30%, mantida na escura até o uso. As lâminas foram deixadas na solução de AEC, no escuro, por 08 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas por 10 minutos, com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,9. Finalmente, foram lavadas 3 vezes com água destilada, em 1 minuto, 2 minutos e 5 minutos.

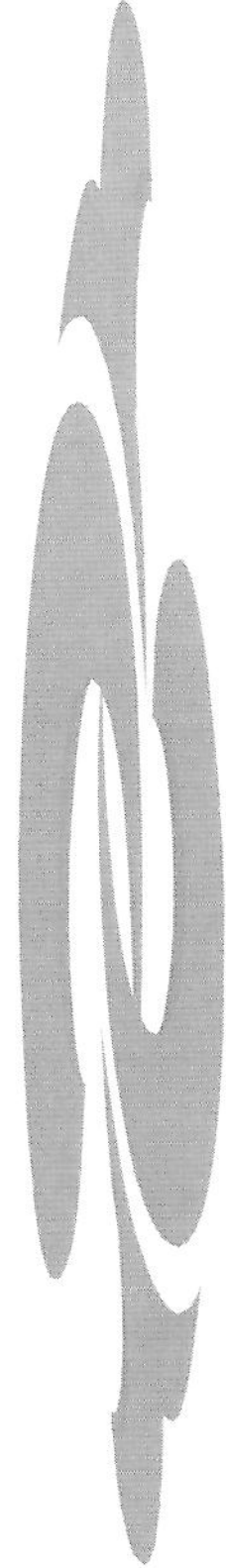
3. As lâminas foram coradas com hematoxilina de Mayer, marca MERCK, na diluição de 1:10, por 20 a 30 segundos e, a seguir, foram lavadas com água destilada até eliminar todo o corante e montadas com glicerina tamponada.
4. Leitura das lâminas: foi utilizado um microscópio ótico, marca NIKON, e foram observadas: células positivas, com núcleo marrom, com coloração total ou perinuclear em polimorfonucleares e ocasionalmente em monócitos e células negativas, com núcleo azul.

4.4. ANÁLISES DE DADOS

Nas análises dos dados obtidos foi tomado como padrão a “Nested-PCR” (*Gold Standard*), em relação a Antigenemia e as manifestações clínicas pelo HCMV, e então realizada uma análise descritiva por meio de tabelas de frequência e medidas de posição e dispersão.

Foram avaliados:

- Sensibilidade é definida como sendo a proporção dos indivíduos com a doença que tem um teste positivo para a mesma, ou ainda, como a capacidade do método de identificar corretamente os indivíduos com doença;
- Especificidade é definida como a proporção dos indivíduos sem a doença que tem um teste negativo, ou ainda, como a capacidade do teste diagnóstico de identificar corretamente a ausência da doença;
- Acurácia é definida como sendo a proporção de todos os resultados corretos dos testes, tanto positivos quanto os negativos, ou seja, a fração dos casos em que o teste concorda com o padrão;
- valor preditivo positivo e negativo são definidos como resultados positivos e negativos sem doença, respectivamente (FILHO & MARCOPITO, 1984).



5. RESULTADOS

5.1. PRÉ-TRANSPLANTE:

No período pré-transplante foram obtidos dados que revelam as características gerais dos pacientes submetidos a transplante hepático, dos 27 pacientes receptores, 22 (81,5%) destes eram do sexo masculino e 5 (18,5%) do sexo feminino. As idades variaram de 16 a 64 anos, com média de 43,6 anos (tabela 5).

TABELA 5: Características dos receptores de transplante hepático

Total de receptores	27
Idade (anos)	43,59 (16 –64)
Sexo (M / F)	22 / 5

Os dados relacionando o número de receptores, a idade na qual cada paciente foi submetido ao transplante, o sexo, a doença de base que evolui ao transplante e a data no qual foi realizado o ato cirúrgico no HC-UNICAMP encontram-se detalhados no Apêndice 2.

A tabela 6 mostra o número de pacientes receptores acometidos pelas diferentes doenças, entre as principais estão: a Cirrose por vírus C, Cirrose Alcoólica, Neoplasia Hepática, Cirrose Biliar Primária, Hepatite Autoimune, sendo que a predominância se faz pela Hepatite C.

TABELA 6: Principais doenças dos receptores hepáticos

Doença Base	Pacientes	%
Cirrose Hepática por Vírus C isoladamente	11	40,74
Cirrose Alcoólica e Vírus C	5	18,52
Cirrose Alcoólica isoladamente	4	14,81
Cirrose Hepática por Vírus B	2	7,41
Colangite esclerosante	2	7,41
Cirrose Hepática e Neoplasia	1	3,7
Cirrose Biliar Primária e Histiocitose	1	3,7
Cirrose Auto-imune	1	3,7

Neste período foi feita a determinação do *status* sorológico (IgG e IgM anti HCMV por ELISA) do doador e do receptor do transplante hepático, o qual é importante na distinção subsequente de infecção primária da secundária. A tabela 7 mostra os dados comparativos quanto à sorologia por IgM e IgG.

Quanto aos resultados obtidos, observa-se que, em relação aos anticorpos da classe IgG obteve-se entre os doadores, 10/12 (83%) de positividade e 24/26 (92%) entre os receptores. Dos doadores, 0/11 (0%) apresentaram anticorpos da classe IgM negativos e 2/19 (10%) receptores foram negativos.

TABELA 7: *Status* sorológico (ELISA) do doador e receptor no pré-transplante quanto à sorologia por IgM e IgG

	IgM		IgG	
	Positivo	Porcentagem	Positivo	Porcentagem
Doador	0/11	0	10/12	83
Receptor	2/19	10	24/26	92

A seguir tem-se os dados comparativos da Reação em Cadeia da Polimerase (“Nested-PCR”) e da Antigenemia do doador e do receptor no pré-transplante (tabela 8)

Pela “Nested-PCR”, detectou-se no pré-transplante, 3/15 (20%) doadores positivos, e 3/20 (15%) receptores positivos; em relação a Antigenemia, nenhum doador apresentou resultado positivo. Entre os receptores somente um paciente (5%) apresentou resultado positivo de Antigenemia no pré - transplante.

TABELA 8: Resultados da “Nested-PCR” e da Antigenemia para o HCMV no pré-transplante hepático

	PCR				Antigenemia			
	Positivo	%	Negativo	%	Positivo	%	Negativo	%
Doador	3/15	20	12/15	80	0/11	0	11/11	100
Receptor	3/20	15	17/20	85	1/19	5	18/19	95

A Figura 5 ilustra os resultados da amplificação dos fragmentos do HCMV e da beta globina humana.

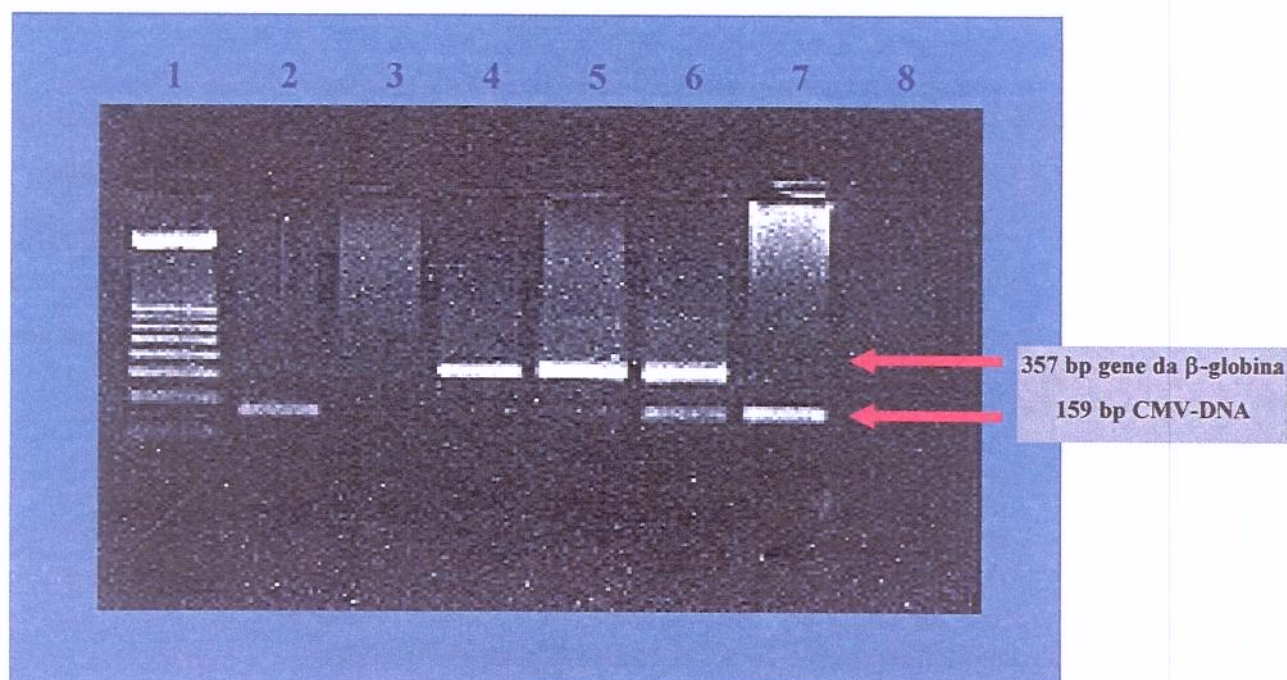


FIGURA 5 - Análise direta do fragmento, após eletroforese em minigel de agarose 2%
 Linha 1, marcador de peso molecular Ladder; linha 2, controle positivo (cepa AD169) do HCMV; linha 3, controle negativo (água); linhas 4 e 5, amostras de DNA de sangue positivas para o gene da β -globina; linha 06, amostra de DNA de sangue positiva para o gene da β -globina e para o HCMV; linha 07, controle positivo (cepa AD169) do HCMV.

A Figura 6 ilustra células antígeno-positivas e negativas para a reação de Antigenemia do HCMV.



FIGURA 6 - Reação de Imunoperoxidase (Antigenemia). Células antígeno- positivas pp65, identificadas pela coloração castanho-avermelhada nuclear ou perinuclear em leucócitos polimorfonucleares; células negativas – núcleo azul. Os leucócitos foram preparados em lâminas microscópicas, fixados com Paraformaldeído/NP40 e submetidos à coloração com imunoperoxidase com o uso de anticorpos monoclonais C10/C11.

5.2. PÓS-TRANSPLANTE:

5.2.1. INFECÇÃO ATIVA POR CITOMEGALOVIRUS HUMANO

De acordo com os critérios para constatação de infecção ativa, a mesma foi identificada em 25/27 (92%) dos pacientes monitorados, sendo que 2/25 (8%) foram constatadas infecções primárias e 23/25 (92%) foram infecções secundárias. Em dois pacientes não foi diagnosticado infecção ativa por nenhum dos métodos utilizados, e ambos se mostraram assintomáticos durante o seguimento estudado.

Entre os 25 receptores com infecção ativa, 2/25 (8%) receptores soronegativos para o HCMV receberam órgãos de doadores soropositivos (infecção primária); 8 (35%) receptores soropositivos receberam órgãos de doadores soropositivos, 2 (9%) receptores soropositivos receberam órgãos de doadores soronegativos, e 13 (56%) receptores soropositivos receberam órgãos de doadores com *status* sorológico não determinado (infecção secundária). Esses dados são relatados na tabela 9.

TABELA 9: Porcentagem de infecção ativa por HCMV detectada nos receptores

Taxa global de infecção ativa	92%	(25/27)
Infecção primária	8%	(2/25)
Doador + / Receptor -	100%	(2/2)
Infecção secundária	92%	(23/25)
Doador + / Receptor +	35%	(8/23)
Doador - / Receptor +	9%	(2/23)
Doador ? / Receptor +	56%	(13/23)
(?) status sorológico indeterminado, (+) positivo, (-) negativo		

Entre os receptores com infecção ativa 25/27 (92%), 25/25(100%) apresentaram duas ou mais reações de “Nested-PCR” positiva, em quanto que a Antigenemia foi positiva em 20/25 (80%) receptores. Deste modo em 5 pacientes somente a “Nested-PCR” foi capaz de identificar a infecção ativa pelo HCMV.

No período pós-transplante foram realizados os testes “Nested-PCR” e a Antigenemia, e feitas análises comparativas entre estes e as manifestações clínicas pelo HCMV.

A tabela 10 mostra o número de receptores e os resultados do primeiro dia de positividade pós-transplante para cada teste realizado neste estudo.

TABELA 10: Primeiro dia pós-transplante hepático em que ocorreu positividade dos testes “Nested-PCR” e Antigenemia.

PCR Antigenemia			PCR (1º Antigenemia		
Paciente	(1º dia)	(1º dia)	Paciente	dia)	(1º dia)
1	19	45	15	39	241
2	40	40	16	7	26
3	136	N P	17	21	28
4	15	30	18	14	N P
5	206	206	19	99	154
6	43	56	20	189	189
7	25	25	21	40	40
8	22	22	22	47	137
9	13	20	23	22	22
10	10	10	24	43	93
11	36	203	25	7	96
12	130	130	26	33	N P
13	22	N P	27	8	N P
14	28	N P			

N P : não positivou o teste no período estudado

O gráfico 1 faz a representação gráfica comparativa do primeiro dia pós-transplante de positividade dos testes "Nested-PCR" e Antigenemia para os pacientes 1 a 14.

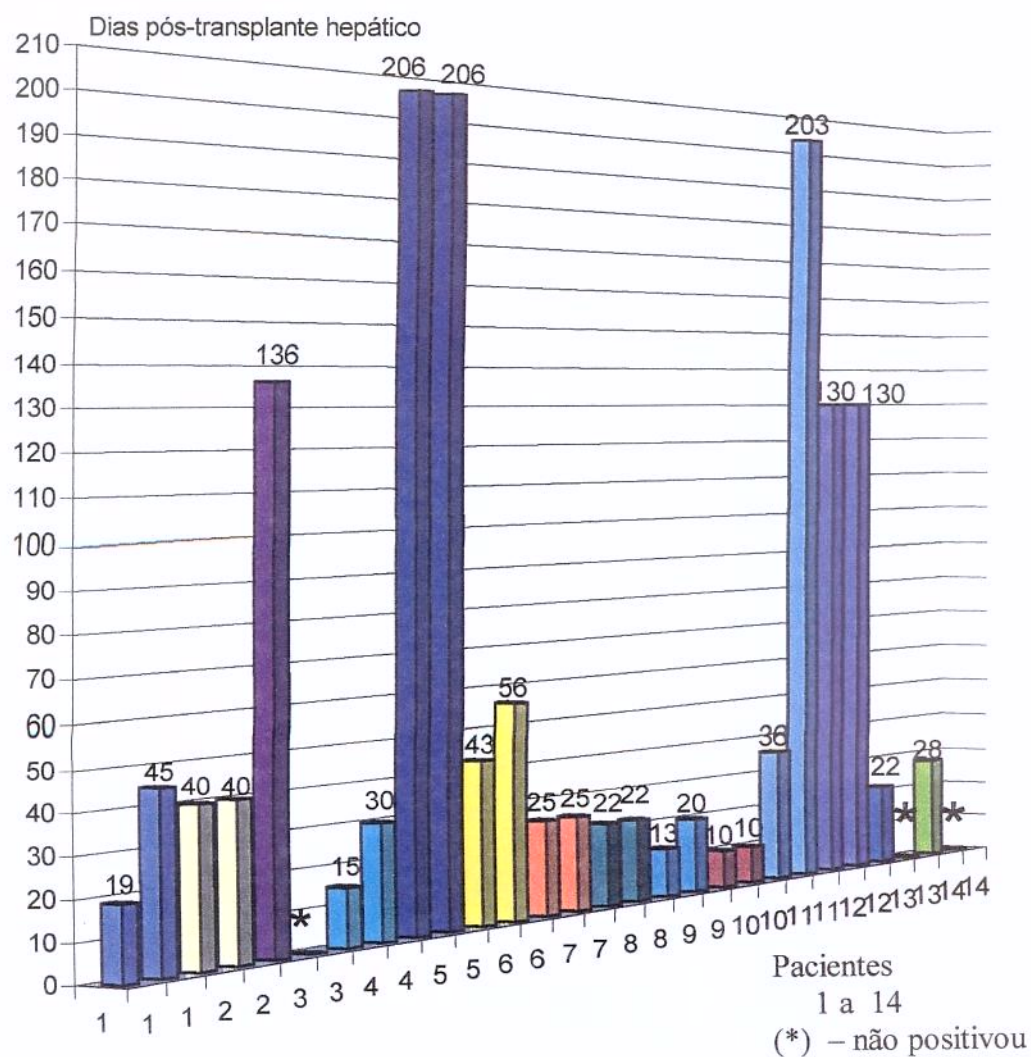


GRÁFICO 1: Primeiro dia pós-transplante hepático em que ocorreu positividade dos testes "Nested-PCR" (1ª coluna) e Antigenemia (2ª coluna) para os pacientes 1 a 14.

O gráfico 2 faz a representação gráfica comparativa do primeiro dia pós-transplante de positividade dos testes "Nested-PCR" e Antigenemia para os pacientes 15 a 27.

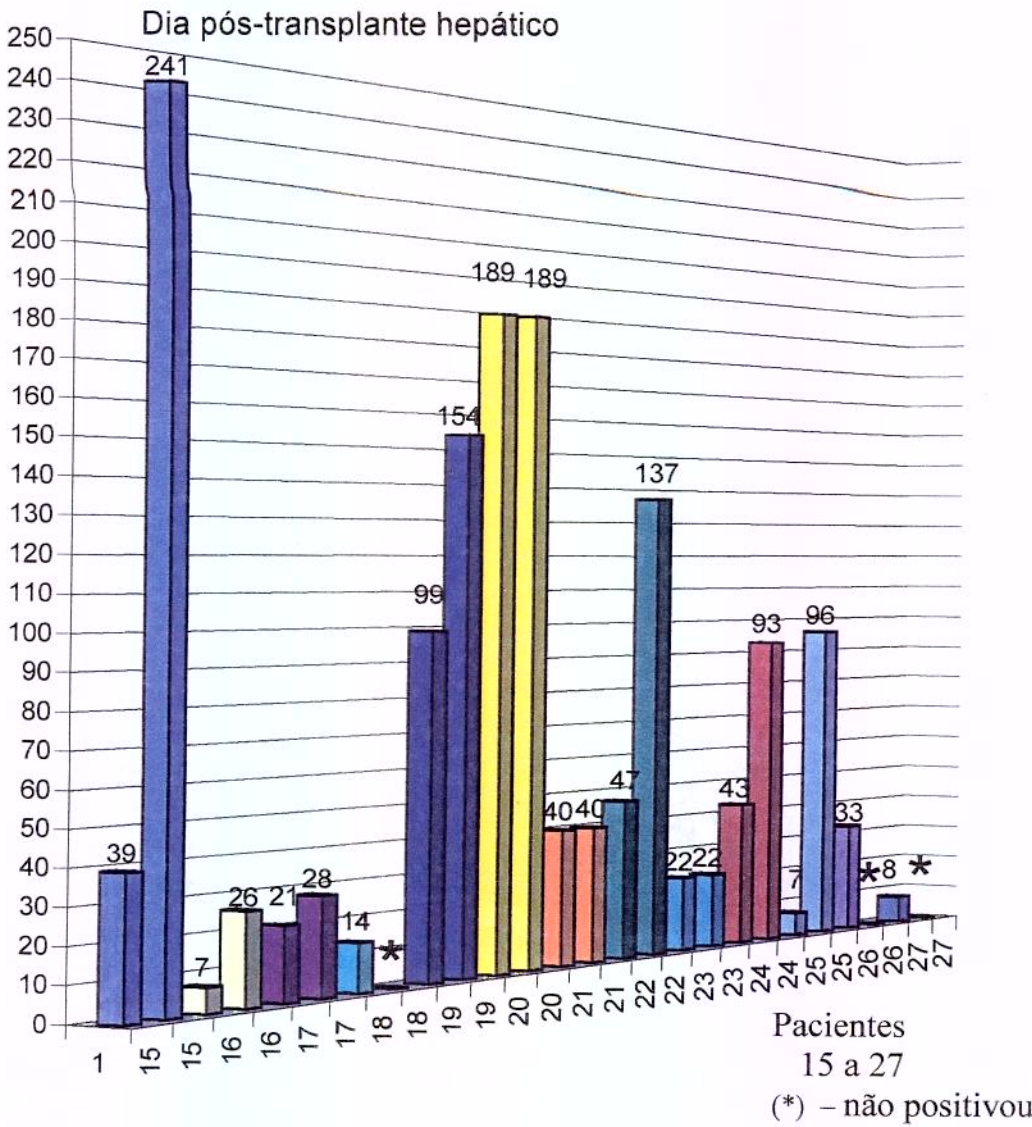


GRÁFICO 2: Primeiro dia pós-transplante hepático em que ocorreu positividade dos testes "Nested-PCR" (1ª coluna) e Antigenemia (2ª coluna) para os pacientes 15 a 27.

Dos receptores que apresentaram infecção ativa, em sua maioria, tiveram resultados positivos para as técnicas de “Nested-PCR” e Antigenemia durante os dois primeiros meses pós-transplante.

O Gráfico 3 mostra o número de receptores com infecção ativa e os resultados do primeiro dia de positividade para cada teste utilizado neste estudo, com intervalos em dias. Pela análise deste gráfico, pode-se observar que os receptores com infecção ativa apresentaram, em sua maioria, resultados positivos para as técnicas “Nested-PCR” e Antigenemia durante os dois primeiros meses pós-transplante

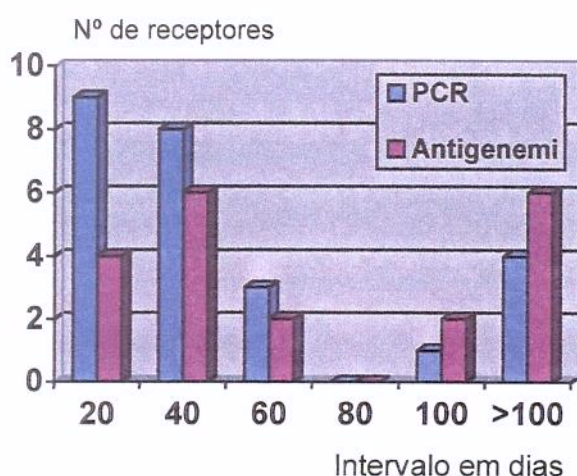


GRÁFICO 3: Distribuição por números de receptores e o primeiro resultado positivo para as técnicas de “Nested-PCR” e Antigenemia.

A tabela 11 mostra os resultados dos dias de positividade da “Nested-PCR” e Antigenemia, indicativos de infecção ativa pelo HCMV, nos transplantados hepáticos estudados

TABELA 11: Dias de positividade para testes “Nested-PCR” e Antigenemia nos transplantados hepáticos estudados, os números entre parênteses, na coluna da Antigenemia, demonstram o número de células positivas observadas.

Paciente	PCR	Antigenemia
1	19, 25, 33, 45, 59, 77, 180	45(8) 59(3) 77(5)
2	40, 54, 68, 81, 147, 185	40(4) 81(5)
3	136, 164, 252	N P
4	15, 22, 30, 44, 55	30(4) 55(7)
5	206, 262	206(3)
6	43, 49, 56, 73, 226	56(6) 77(3) 226(4)
7	25, 39, 53, 80, 153, 259	25(12), 39(3), 53(1)
8	25 50, 78	25(5) 78(33)
9	13, 20, 75, 103, 139, 230	20(41) 75(20) 230(3)
10	10, 46, 67, 176	10(12), 46(25)
11	36, 67, 203, 235	203(1)
12	130	130(94)
13	22, 57, 98	N P
14	28, 35, 48, 64, 92, 148	N P
15	39, 74, 91	241 (40)
16	7, 18, 26, 109	26(5), 57(82)
17	21, 28, 66	28(70)
18	14, 21	N P
19	99, 154	154(5)
20	189	189 (8)
21	19, 40	19(5), 40(7)
22	47, 137, 194	137(4), 194(1)
23	22, 84, 130	22(59), 111(7)
24	43, 93, 142	93(14), 142(2)
25	7, 96	96 (5)
26	33	N P
27	8, 14, 44, 48, 55	N P

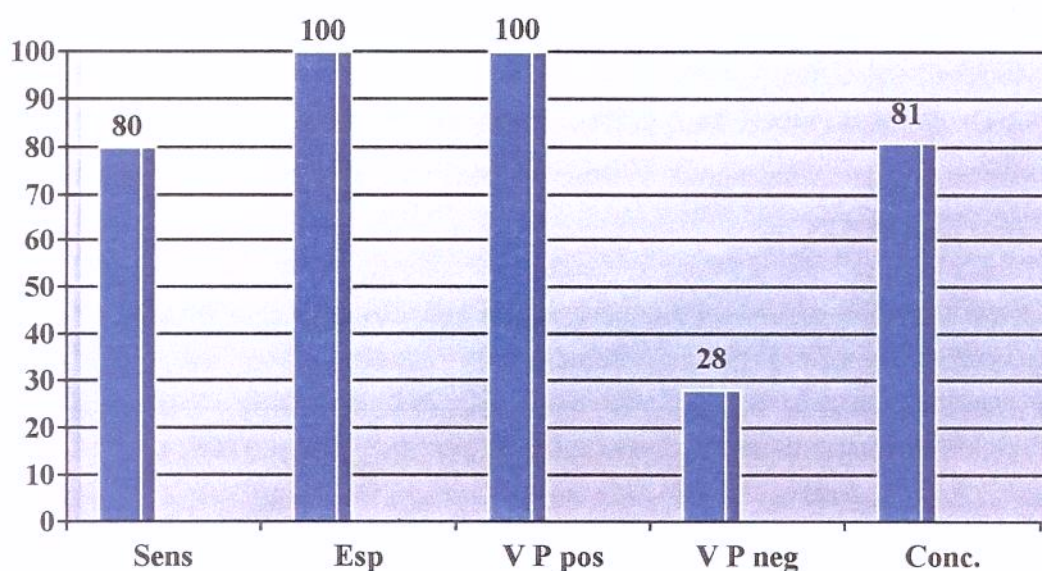
N P : não positivou o teste

Os dados da tabela 12 e gráfico 4 apresentam comparações entre os resultados obtidos comparando as duas técnicas laboratoriais utilizadas neste trabalho.

TABELA 12: Comparação entre os resultados obtidos por meio da Antigenemia em relação à “Nested-PCR” nos transplantados hepáticos estudados.

ANTIGENEMIA	“NESTED-PCR”	PACIENTES
POS	POS	20
POS	NEG	0
NEG	POS	5
NEG	NEG	2

Porcentagem



OBS: Sens:sensibilidade, Esp:especificidade, VPpos: valor preditivo positivo

VPneg: valor preditivo negativo, Conc: concordância

GRÁFICO 4: Valores em porcentagem da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo da Antigenemia em relação ao “Nested-PCR” nos transplantados hepáticos estudados.

Os dados da tabela 13 apresentam comparação entre os resultados obtidos por meio da “Nested-PCR” e aqueles obtidos pelas manifestações clínicas da infecção ativa pelo HCMV.

TABELA 13: Comparação entre a “Nested-PCR” e a infecção ativa pelo HCMV

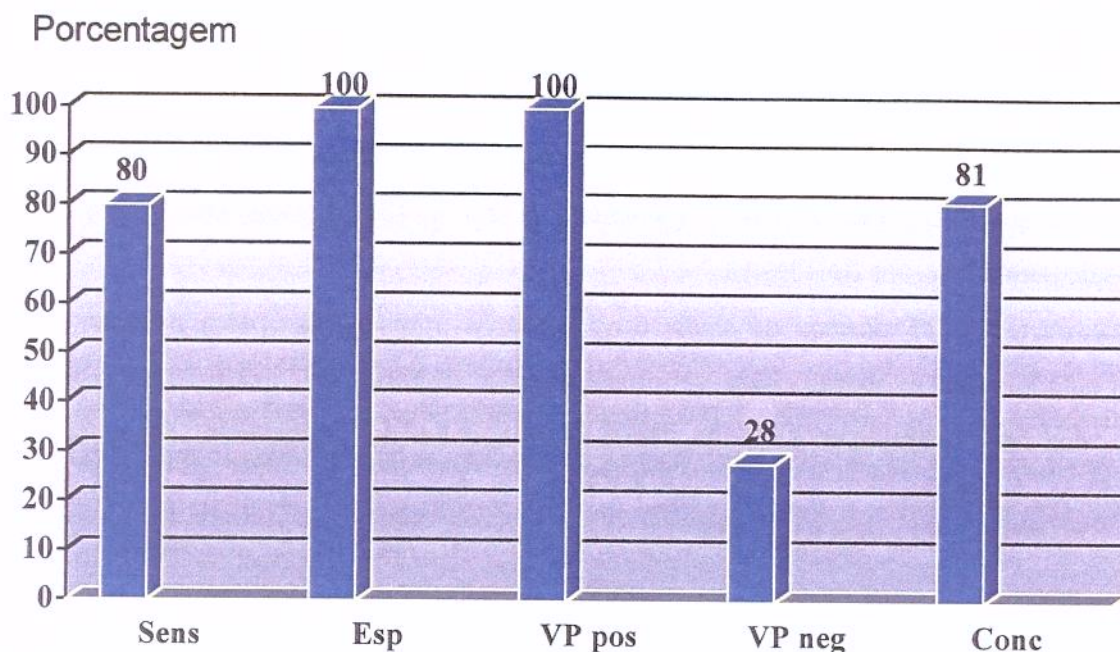
PCR	INFECÇÃO ATIVA	PACIENTES
POS	POS	25
POS	NEG	0
NEG	POS	0
NEG	NEG	2

Os valores em porcentagem de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo da “Nested-PCR” em relação à infecção ativa pelo HCMV nos transplantados hepáticos estudados, foram todos de 100%.

Os dados da tabela 14 e gráfico 5 apresentam comparação entre os resultados obtidos por meio da Antigenemia e aqueles obtidos pelas manifestações clínicas da infecção ativa pelo HCMV.

TABELA 14: Comparação entre a Antigenemia e a infecção ativa pelo HCMV

ANTIGENEMIA	INFECÇÃO ATIVA	PACIENTES
POS	POS	20
POS	NEG	0
NEG	POS	5
NEG	NEG	2



OBS: Sens:sensibilidade, Esp:especificidade,VPpos: valor preditivo positivo VPneg: valor preditivo negativo, Conc: concordância

GRÁFICO 5: Valores em porcentagem da sensibilidade,especificidade, valor preditivo positivo e negativo da Antigenemia em relação à infecção ativa pelo HCMV nos transplantados hepáticos.

5.2.2. PROVÁVEL DOENÇA POR CITOMEGALOVIRUS HUMANO

Entre os 27 pacientes estudados, em 12 (44%) foram observados manifestações clínicas sugestivas de serem secundárias a replicação viral, (provável doença pelo HCMV) com início de sintomatologia já a partir do primeiro mês; em 15 (56%) pacientes não foram observados manifestações clínicas sugestivas de doenças pelo HCMV.

Dos 12 pacientes com provável doença pelo HCMV, 1 (8%) pertence ao sorogrupo doador positivo / receptor negativo desenvolvendo quadro de doença por infecção primária, em 11 (92%) pacientes observou-se quadro por infecção secundária.

Entre os pacientes com doença pelo HCMV, a “Nested-PCR” e a Antigenemia foi positiva para todos os pacientes.

Entre os 27 pacientes estudados observou-se que a “Nested-PCR” positivou-se antes da Antigenemia em 18 (66%) pacientes, e em 9 (33%) pacientes ocorreu a positividade simultânea dos dois testes.

A tabela 15 destaca os sinais e os sintomas apresentados pelos pacientes, e também aqueles que evoluíram sem sintomas, mostra o início do quadro clínico e o primeiro dia de positividade de cada técnica empregada no seguimento clínico dos transplantados hepáticos

TABELA 15: Início das manifestações clínicas de provável doença pelo HCMV com a de positividade dos testes “Nested-PCR” e Antigenemia (em dias pós-transplante),

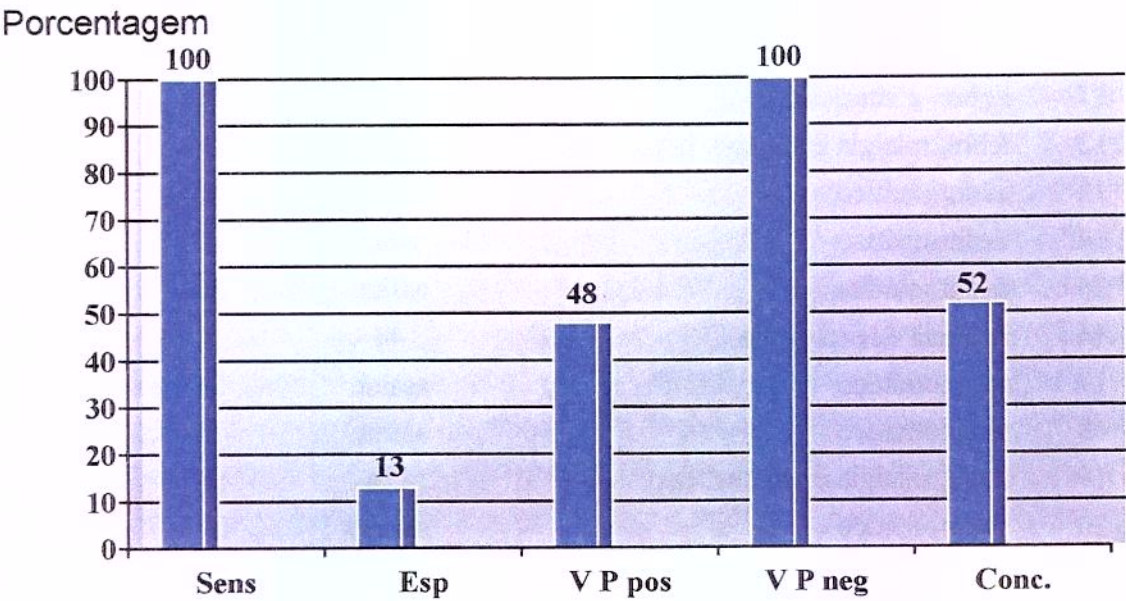
Paciente	Sinais e Sintomas e Alterações Laboratoriais	Início do quadro	“Nested-PCR” +	Antigenemia+
1	icterícia, retinite, leucopenia e alt. enz. hep.	73	19	45
2	febre e mialgia	146	40	40
3	mialgia e alt. enz. hep.	234	136	negativo
4	febre, leucopenia e alt. enz. hep.	58	15	30
5	assintomático	assint.	206	206
6	febre e Herpes zooster	50	43	56
7	assintomático	assint.	25	25
8	febre, mialgia e alt. enz. hep.	35	22	22
9	febre, mialgia e diarreia.	229	13	20
10	febre e colangite	83	10	10
11	Febre e icterícia	10	36	203
12	febre, mialgia e alt. enz. hep.	163	130	130
13	assintomático	assint.	22	negativo
14	assintomático	assint.	28	negativo
15	assintomático	assint.	39	241
16	icterícia e leucopenia	44	7	26
17	assintomático	assint.	21	28
18	assintomático	assint.	14	negativo
19	febre, mialgia e alt. enz. hep.	154	99	154
20	assintomático	assint.	189	189
21	assintomático	assint.	19	19
22	assintomático	assint.	47	137
23	febre e alt. enz. hep.	52	22	22
24	alt. enz. hep.	94	43	93
25	assintomático	assint.	0	96
26	assintomático	assint.	33	negativo
27	assintomático	assint.	8	negativo

* alt. enz. hep.:alterações de enzimas hepáticas; assint.:assintomático

Os dados da tabela 16 e o gráfico 6 apresentam resultados comparativos entre a ocorrência de provável doença por HCMV com a “Nested-PCR”.

TABELA 16: Comparação entre os resultados de provável doença pelo HCMV com a “Nested-PCR”.

PROVÁVEL DOENÇA	“NESTED-PCR”	PACIENTES
POS	POS	12
POS	NEG	0
NEG	POS	13
NEG	NEG	2



OBS: Sens:sensibilidade, Esp:especificidade,VPpos: valor preditivo positivo VPneg: valor preditivo negativo, Conc: concordância

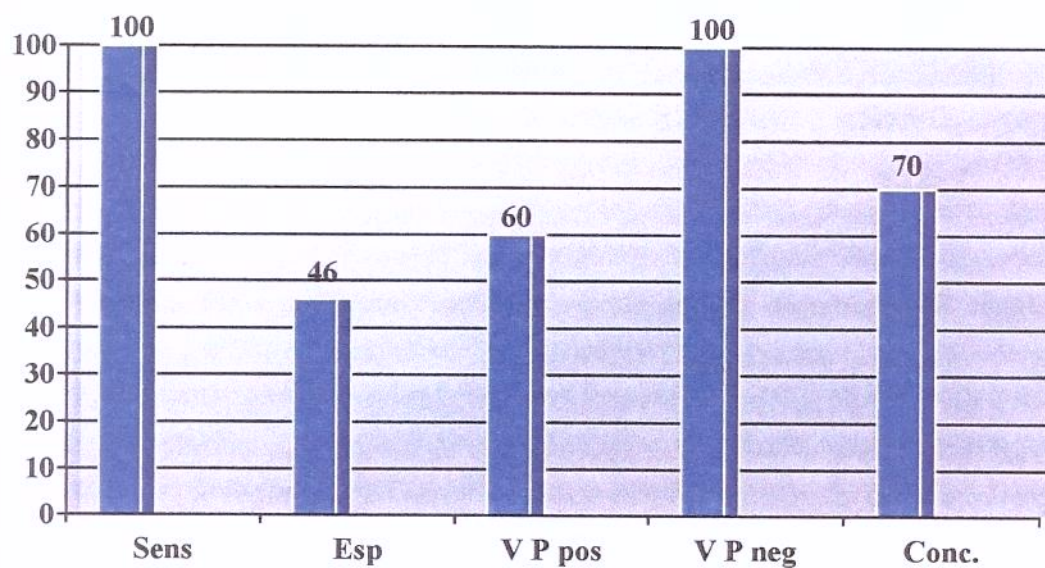
GRÁFICO 06: Valores em porcentagem da sensibilidade,especificidade, valor preditivo positivo e negativo de provável doença pelo HCMV em relação ao “Nested-PCR” nos transplantados hepáticos estudados.

Os dados da tabela 17 e o gráfico 7 apresentam resultados comparativos entre a ocorrência de provável doença por HCMV com a Antigenemia.

TABELA 17: Comparação entre os resultados de provável doença pelo HCMV com a Antigenemia.

PROVÁVEL HCMV - DOENÇA	Antigenemia	PACIENTES
POS	POS	12
POS	NEG	0
NEG	POS	8
NEG	NEG	7

Porcentagem



OBS: Sens:sensibilidade, Esp:especificidade,VPpos: valor preditivo positivo VPneg: valor preditivo negativo, Conc: concordância

GRÁFICO 7 : Valores em porcentagem da sensibilidade,especificidade, valor preditivo positivo e negativo de provável doença pelo HCMV em relação ao Antigenemia nos transplantados hepáticos estudados.

O gráfico 8 mostra a importância de se determinar o perfil sorológico do receptor e doador do transplante hepático, e suas implicações em uma provável doença pelo HCMV. O sorogrupo D+/R- com 2 pacientes, apresentou infecção ativa em 100% dos casos e provável doença em 5% dos casos.

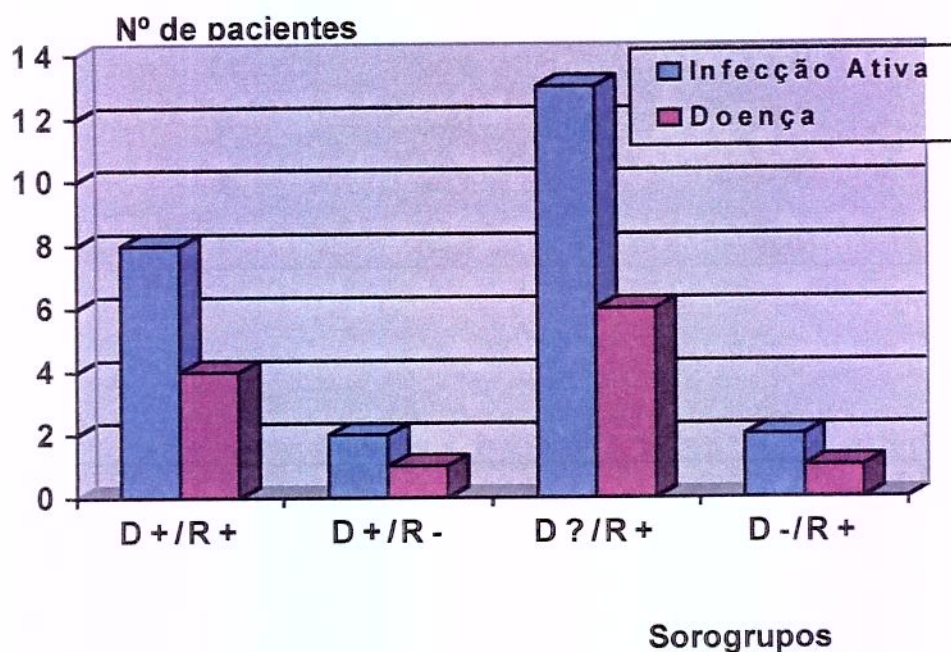


GRÁFICO 8: Representação gráfica comparativa por sorogrupo entre infecção ativa e provável doença pelo HCMV.

O gráfico 9 mostra uma comparação dos números de pacientes que apresentaram infecção ativa e aqueles que apresentaram provável doença pelo HCMV, com as técnicas “Nested-PCR” e Antigenemia.

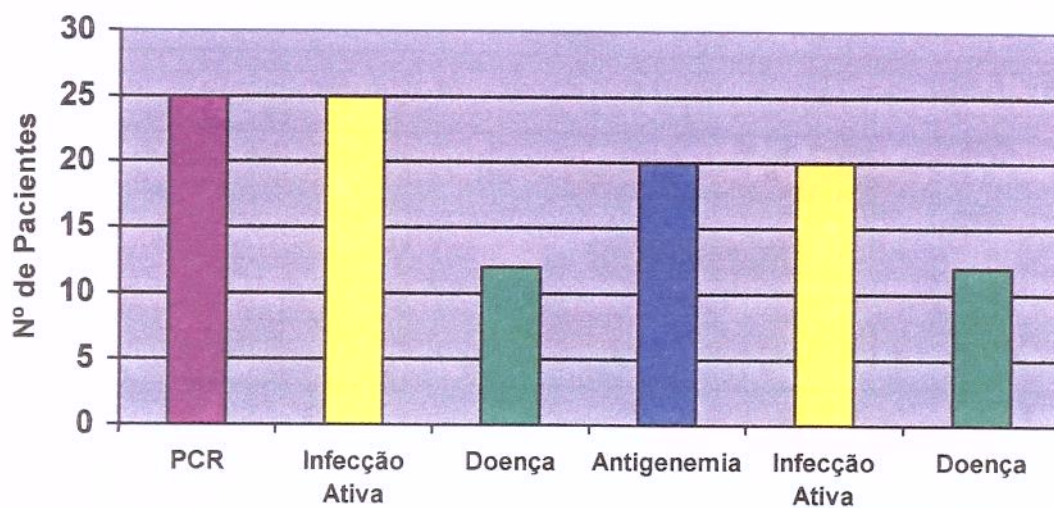
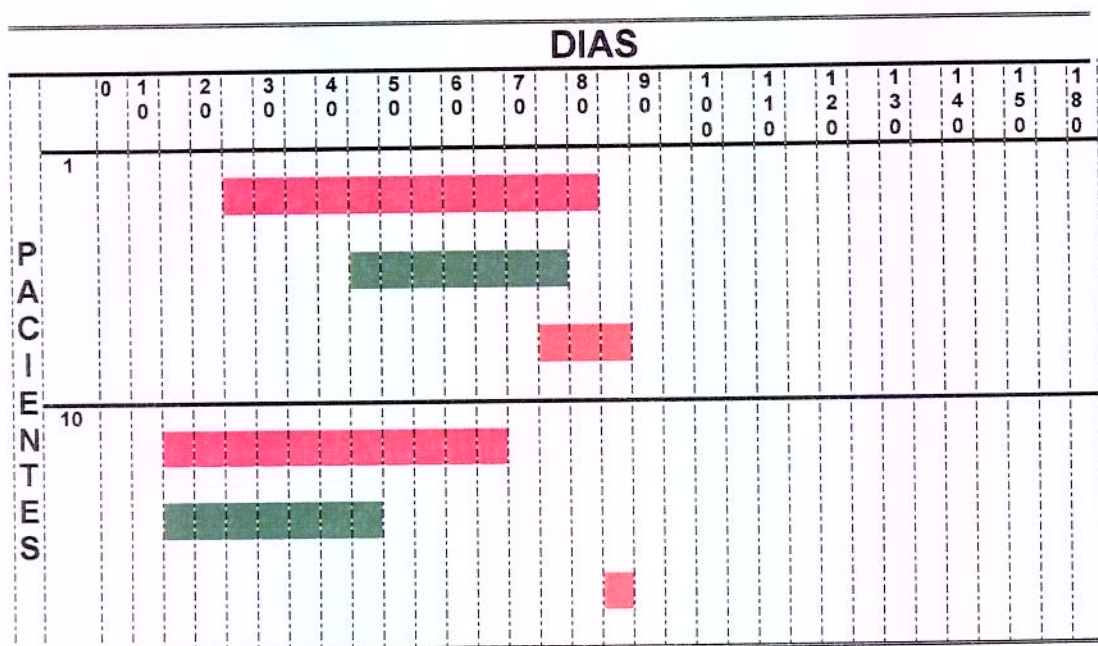


GRÁFICO 9: Representação gráfica comparativa entre as técnicas “Nested-PCR” e Antigenemia com a infecção ativa e provável doença pelo HCMV.

A representação gráfica abaixo correlaciona os períodos de positividade para os testes “Nested-PCR” , a Antigenemia e as manifestações clínicas da doença pelo HCMV, tomando como exemplo os paciente de números 1 e 10, onde ocorreu diferente evolução clínica.



LEGENDA

REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE

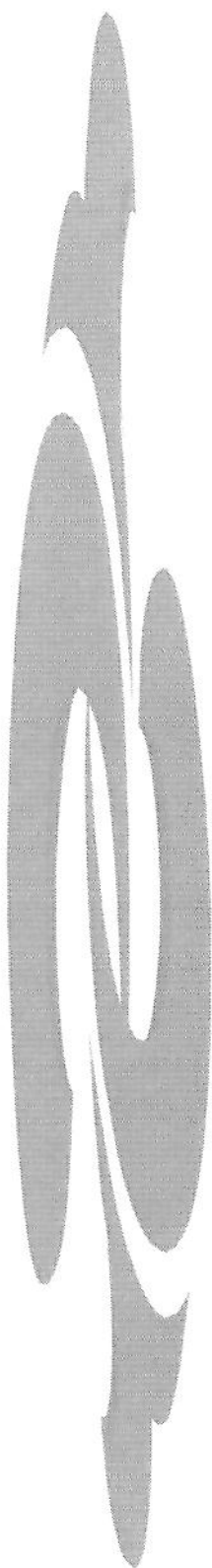
ANTIGENEMIA

MANIFESTAÇÕES
CLÍNICAS

GRÁFICO 10: Representação gráfica comparativa entre os períodos de detecção do HCMV pelas técnicas de Antigenemia e "Nested-PCR" e o início das manifestações clínicas para os pacientes 1 e 10

TABELA 18: Resultados gerais dos transplantados hepáticos estudados em relação aos testes empregados para a detecção de infecção pelo HCMV (“Nested-PCR”, Antigenemia e Sorologia).

Resultados	pacientes	%
“Nested-PCR” positivo pelo menos uma vez	25	93
“Nested-PCR” positivo duas vezes sucessivas	24	88,9
Antigenemia positiva pelo menos uma vez	20	74
Somente “Nested-PCR” positivo	5	18,5
“Nested-PCR” e Antigenemia positivos juntos	9	33,3
“Nested-PCR” positivo antes da Antigenemia	16	59
nenhum dos métodos positivos	2	7
IgG positivo no pré-transplante	24	88
Manifestações clínicas de doença por HCMV	12	44



6. DISCUSSÃO

O citomegalovírus é um dos mais importantes patógenos que acometem pacientes transplantados e é responsável pela significativa morbidade e mortalidade apresentada pelos receptores de órgãos. A maioria da população humana é soropositiva para o citomegalovírus. Com o advento e desenvolvimento de medicamentos eficazes para o tratamento das infecções causadas pelo HCMV, o diagnóstico precoce da infecção, com o objetivo de reduzir seu impacto clínico, tornou-se imperativo (LJUNGMAN, 1996; PATEL & PAIVA, 1997; BLOCK *et al.*, 2000; GRIFFITHS & WITLEY, 1993).

Neste trabalho foi comparado as técnicas de reação em cadeia da polimerase tipo “Nested-PCR” com a Antigenemia em granulócitos no sangue periférico com o objetivo de identificar a infecção ativa pelo HCMV em receptores de transplante hepático; a sorologia IgG anti-HCMV por ELISA foi utilizada para determinar o *status* sorológico pré-transplante dos receptores monitorados e de seus respectivos doadores.

Nos transplantados hepáticos, a infecção pelo HCMV pode ocorrer sob a forma de infecção primária, em que o transplante de órgão de doador soropositivo para receptor soronegativo é a causa mais freqüente de infecção e, geralmente, evolui para doença, por reativação do vírus latente, em receptores soropositivos para o HCMV antes do transplante, o vírus latente pode ser reativado em situações de grave imunossupressão e por reinfeção com uma nova linhagem viral presente no órgão transplantado (HIBBERD & SNYDMAN, 1995).

Os mais potentes reativadores da infecção latente pelo HCMV são a terapia imunossupressora, que tem particular efeito na imunidade mediada por células e a rejeição do órgão transplantado (RUBIN, 1990). A reativação do vírus latente tem papel fundamental na patogenicidade do HCMV em receptores de órgãos. O local de permanência do vírus durante a fase de latência não é conhecido, embora dados epidemiológicos demonstrem claramente a transmissão do HCMV após transplante de órgãos ou após transfusão de produtos sanguíneos contendo leucócitos viáveis (SAYERS *et al.*, 1992). Além disso, é conhecido que, durante a infecção sistêmica pelo HCMV, os granulócitos, linfócitos e monócitos abrigam os vírus, e que não exista tecido ou célula especial que abrigue o HCMV em estado latente, mas sim que o vírus permaneça presente em vários locais podendo ser reativado por estímulos diversos. O principal fator exógeno

que influencia a reativação viral é o tipo e a intensidade da terapia imunossupressora para controle da rejeição do órgão transplantado (RUBIN, 1990). Os corticosteróides têm efeito muito pequeno na reativação do HCMV latente. Entre as drogas imunossupressoras usadas para controle da rejeição, aparentemente a ciclosporina tem pouca ação na reativação do vírus latente, mas, por outro lado, apresenta importante efeito no hospedeiro, bloqueando a resposta imunológica contra a replicação viral. A globulina antilinfocitária, por sua vez, apresenta maior ação na reativação do vírus latente. Assim, é previsível que a combinação de globulina antilinfocitária e ciclosporina seja particularmente perigosa em termos de infecção pelo HCMV, pois combina uma droga que atua na reativação do vírus e outra que interfere no controle da infecção viral pelo receptor do órgão transplantado.

O diagnóstico clínico da infecção pelo HCMV torna-se dificultado quando baseado exclusivamente na sintomatologia, pois quadros febris não infecciosos e alterações hematológicas, tais como leucopenia e o aumento das enzimas hepáticas, podem ocorrer diante de um processo de rejeição do transplante ou de efeitos colaterais de medicamentos imunossupressores, o que torna importante a realização de exames laboratoriais para a confirmação, ou a detecção precoce, tanto da infecção como da doença pelo HCMV. Sob o ponto de vista clínico, é de fundamental importância o diagnóstico da infecção pelo HCMV, associando os dados laboratoriais com a análise das manifestações clínicas, pois a associação destes dados permite caracterizar a doença pelo HCMV (COSTA, 1999).

A alta prevalência de anticorpos anti-HCMV documentada no período pré-transplante estudado é de suma importância na determinação da morbimortalidade, visto que a maior incidência e gravidade da doença pelo HCMV ocorrem em receptores soronegativos, que recebem o transplante de doadores soropositivos. Em geral, a detecção de anticorpos contra o HCMV em pacientes que pela primeira vez entram em contato com este vírus pode ser efetuada em poucas semanas após a infecção e essa sorologia persiste positiva indefinidamente. A presença pregressa de anticorpos confere certo grau de proteção contra subsequente doença por HCMV, mas não protege contra reativação endógena do vírus latente ou de reinfeção por cepa exógena. Duas importantes razões para o uso clínico de testes sorológicos detectores de anticorpos contra HCMV incluem a identificação de indivíduos susceptíveis à infecção primária e rastreamento de doadores de

sangue e órgãos, pelo risco da transmissão acarretada por portadores do HCMV latente (MOORE *et al.*, 1985; MILLER *et al.*, 1989).

A reação em cadeia da polimerase introduzida por SAIKI *et al.*, 1985, para a amplificação seletiva de seqüências de ácido nucléico tem mostrado grande utilidade em um número cada vez maior de situações clínicas, incluindo diagnóstico de doenças infecciosas variadas.

Neste trabalho empregou-se a “Nested-PCR”, que é uma técnica de dupla PCR, desenvolvida para alcançar resultados mais rápidos quando comparadas a PCR simples seguida de hibridização (PORTER-JORDAN *et al.*, 1990, XU *et al.*, 1993, BRAINARD, 1994; FOX *et al.*, 1995; EHRNST, 1996.). Neste caso, a detecção do fragmento amplificado ocorreu por visualização direta; as vantagens deste procedimento são óbvias, tanto do ponto de vista de rapidez e praticidade, quanto do ponto de vista econômico.

Em associação à “Nested-PCR”, utilizou-se a técnica de Antigenemia, que foi inicialmente descrita por van der BIJ *et al.*, 1988 e tem representado um avanço para o diagnóstico de infecções e doença por HCMV em pacientes com transplante de órgãos sólidos. O teste da Antigenemia é um método sensível para a estimativa da carga viral sistêmica do HCMV e pode ser detectado de vários dias a uma semana antes do aparecimento dos sintomas. (THE *et al.*, 1990).

O teste apresenta muitas vantagens do ponto de vista clínico e pode ser facilmente quantificado, revelando uma estimativa da carga viral que é útil na diferenciação de doença pelo HCMV de outras complicações; na avaliação da eficácia da terapia antiviral e, possivelmente, na detecção precoce da resistência ao medicamento e também possui vantagens em termos de práticas laboratoriais. É uma técnica rápida, permitindo a detecção do antígeno viral após 4 a 5 horas da amostragem de sangue, quando comparada à cultura convencional e ao “shell vial” (NIUBO *et al.*, 1996). Tomando-se a técnica de cultura como referência, a sensibilidade da Antigenemia foi reportada na literatura, variando de 85 a 100% (THE *et al.*, 1992; LANDRY & FERGUSON, 1993; BAILEY *et al.*, 1995; BLOCK *et al.*; 2000).

Os dados da literatura mostram que a Antigenemia é tão sensível quanto a “Nested-PCR” (HEBART *et al.*, 1996) ou menos que a PCR (THE *et al.*, 1992, GERNA *et al.*, 1994), dependendo do método que se usar para cada técnica.

Com relação à epidemiologia do HCMV, nos países em desenvolvimento ocorrem altas taxas de soroprevalência do vírus na população de adultos, devido aos diferentes mecanismos de transmissão envolvidos. Esse fato exerce influência na morbimortalidade associada a infecções pelo HCMV após transplante de órgãos, uma vez que nos transplantes em adultos reduz-se, consideravelmente, o risco de infecção primária (BRUGEMMAN, 1993).

Os dados obtidos nesta casuística, no período pré-transplante, confirmam a alta prevalência da infecção pelo HCMV em nosso meio; foi observado que dos 27 pacientes estudados, 10 deles (37%) receberam órgãos transplantados, cujos doadores já haviam tido contato anterior com o HCMV, mostrando sorologia positiva para IgG, em apenas 2 deles (7,4%), os pacientes 19 e 20, apresentaram resultados de sorologia negativos para o HCMV. Em 15 dos doadores (55%) não foi possível a avaliação sorológica pelo fato de o órgão transplantado ter sido enviado por fontes diversas, que não o HC – UNICAMP. Em 11 doadores (40,%) foi realizada a sorologia para IgM a qual mostrou-se negativa em todos.

Quanto aos receptores de transplante hepático, foi observado que dos 27 pacientes, apenas 2 (7,4%) apresentaram resultados de sorologia negativos para IgG dos 26 pacientes (96%) testados, revelando que o HCMV pré-existia na maioria dos pacientes transplantados; também 2 pacientes (7,4%) revelaram resultados de sorologia positivos para IgM, dos 12 pacientes (44%) testados.

Em relação aos testes da “Nested-PCR” e da Antigenemia, no pré-transplante, foi demonstrado que, em relação aos 27 doadores hepáticos, em 15 deles (55%) foi realizada a “Nested-PCR” e, entre eles, 3 pacientes (11%) apresentaram-se positivos; em 11 deles (40%) foi realizado a Antigenemia sendo que, destes, nenhum paciente apresentou resultado positivo.

Nos receptores hepáticos, foram realizados no pré-transplante 20 análises (74%) quanto à “Nested-PCR” e, destas, em 3 pacientes (11%), revelou-se positiva; em 19 deles (70%) foi realizado a Antigenemia e, em apenas um receptor revelou-se positiva.

A doença de base mais freqüente para pacientes serem submetidos a transplante hepático foi a cirrose hepática provocada pelo Vírus C, que ocorreu em 16 pacientes (59%), sendo 11 (40%) de forma isolada, com um caso do sexo feminino (paciente 9). A cirrose alcoólica aparece como segunda maior prevalência, em 9 pacientes (33%), e 4 (14%) de forma isolada, todos do sexo masculino.

A hepatite pelo vírus C (HCV) é o maior problema de saúde pública na Europa e nos Estados Unidos, sendo estimado que aproximadamente 150 milhões de pessoas estão infectadas com esse vírus no mundo; em países industrializados, o HCV é o responsável por 20% dos casos de hepatite aguda, 70% dos casos de hepatite crônica, 40% dos casos de cirrose terminal, 60% dos casos de carcinoma hepatocelular e 30% dos casos de transplante hepático (EASL International Consensus Conference on Hepatite C, 1999; TEIXEIRA *et al.*, 2000).

Não se utilizou a análise sorológica para o diagnóstico de infecção ativa por HCMV no período pós-transplante, pela limitação desse método em transplantados, devido à significativa imunossupressão a que estes pacientes são submetidos, o que pode interferir na produção de imunoglobulinas e resultar em dados incorretos (DRAGO, *et al.*, 2000).

Neste estudo observa-se que a infecção ativa por HCMV ocorreu em 25 (92%) dos 27 pacientes estudados, em 25/25 (100%) pacientes foi encontrado duas ou mais reações positivas para a “Nested-PCR”; e a Antigenemia apresentou-se positiva em 20/25 (80%) dos receptores.

Em 2 (7,4%) pacientes não foi diagnosticado infecção ativa por nenhum dos métodos em estudo e, eles se mostraram assintomáticos durante o seguimento. Um desses pacientes era soropositivo para o HCMV no pré-transplante e, portanto, o HCMV permaneceu latente.

A análise dos sorogrupos em relação à infecção ativa por HCMV mostrou que todos os receptores soronegativos com doador soropositivo (D+/R-) apresentaram infecção ativa; o sorogrupo D+ / R+ apresentou 35% de infecção ativa; no sorogrupo D- / R+, 9% dos pacientes desenvolveram infecção ativa; e no sorogrupo D? / R+, obteve-se 56% com infecção ativa, mostrando que, de acordo com os dados da literatura, a infecção pelo HCMV nos transplantados, geralmente está relacionado à presença do vírus latente no órgão transplantado (COSTA, 1999).

A maioria das infecções, tanto nos pacientes com infecção primária, quanto nos pacientes previamente soropositivos, ocorreu nos três primeiros meses pós-transplante. Estes achados confirmam as observações de outros pesquisadores (THE *et al.*, 1992; BOECK & BOIVIN, 1998), que dizem serem raras as infecções a partir do quarto mês pós-transplante.

Em relação à infecção ativa pelo HCMV, os resultados foram de 96% de sensibilidade e 100% de especificidade da “Nested-PCR” e os da Antigenemia foram de 100% e 28%, respectivamente. Esses dados foram similares aos encontrados na literatura (THE *et al.*, 1992; FREYMUTH *et al.*, 1994). Por ser uma técnica mais sensível, a “Nested-PCR” detectou a infecção ativa em pacientes assintomáticos, os quais não evoluíram para doença.

Com relação às manifestações clínicas de provável doença pelo HCMV, os resultados foram de 48% de sensibilidade e 100% de especificidade da “Nested-PCR” e os da Antigenemia foram de 60 e 100%, respectivamente, resultados estes similares à literatura (NIUBO *et al.*, 1996).

Estratégias profiláticas para prevenção da doença pelo HCMV, em transplantados de órgãos sólidos, são particularmente apropriadas a receptores do sorogrupo D+ / R-, já que além de apresentarem risco maior que 70% de desenvolverem doença por HCMV, esta é com frequência mais grave que nos pacientes com infecção secundária (PATEL & PAYA, 1997; NICHOLS & BOECKH, 2000).

Poucos são os estudos que compararam os resultados quantitativos da Antigenemia entre diferentes laboratórios. Uma vez que cada laboratório utiliza uma metodologia diferente, torna-se cada vez mais necessário uma padronização destas medidas. Existem algumas etapas dos procedimentos técnicos da Antigenemia que poderiam interferir significativamente na diminuição do número de células positivas, ou seja, na sensibilidade do teste, como a perda de leucócitos (35 a 65%) durante os procedimentos de centrifugação ou em outra etapa da técnica (THE *et al.*, 1990).

Quanto aos anticorpos monoclonais utilizados, eles devem ser específicos contra a proteína pp65; recomenda-se usar diferentes anticorpos monoclonais contra diferentes epítomos para se obter uma melhor sensibilidade do método. GERNA *et al.*, (1991) demonstraram um número maior de células positivas usando os anticorpos 2AC/1C3 ao invés dos anticorpos C10/C11. Também a técnica de coloração por imunofluorescência poderia apresentar melhores resultados que a imunoperoxidase usada neste trabalho.

Quanto ao número de células positivas na lâmina para considerar a Antigenemia positiva ainda é controverso na literatura e existem informações conflitantes a este respeito. Com técnica rigorosa, a presença de apenas uma célula corada não deve ser desconsiderada e daí a necessidade da realização sequencial deste exame (GERNA *et al.*, 1998).

O valor preditivo positivo da Antigenemia e da "Nested-PCR" foi de 100% para provável doença pelo HCMV, mostrando que é relevante o número de pacientes que evoluem para infecção sintomática. O valor preditivo negativo da Antigenemia foi de 46%, enquanto que da "Nested-PCR" foi de 13% para provável doença para o HCMV.

A manifestação clínica mais freqüente detectada entre os pacientes com evidencia de infecção sintomática foi a febre (72%), seguida de mialgia (43%) e icterícia (21%). As alterações laboratoriais foram: aumento das enzimas hepáticas, tais como a alanina-amino transferase, aspartato-amino transferase, gama glutamil transferase e fosfatase alcalina (57%) e leucopenia (11%).

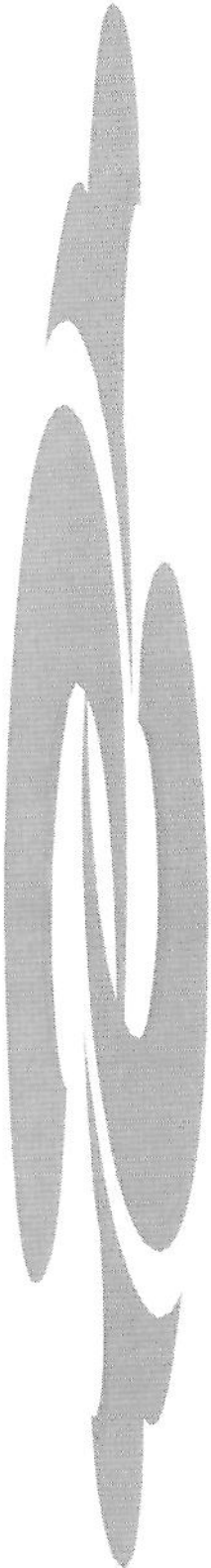
Os desenvolvimentos de testes de diagnósticos rápidos e sensíveis são de grande interesse prático por fornecer uma detecção precoce da infecção ativa pelo HCMV. Alguns pesquisadores avaliaram a precocidade da “Nested-PCR” e da Antigenemia com relação aos sintomas clínicos e concluíram que essas técnicas precederam as manifestações clínicas de vários dias a uma semana (GOOSSENS *et al.*, 2000).

Neste estudo foi verificado que a “Nested-PCR” se tornou positiva em média 47,6 dias após o transplante hepático, enquanto que a Antigenemia levou em média 85,3 dias para se tornar positiva. Em 9 (45%) pacientes houve a positividade simultânea e em 6 (30%) pacientes houve positividade da Antigenemia com tempo inferior a 30 dias. A análise conjunta dos dois testes em estudo revela uma precocidade de ambas em relação às manifestações clínicas de provável doença pelo HCMV.

Dos 27 pacientes estudados, 3 deles (11,11%) necessitaram um retransplante (pacientes 1, 18, 19) e um deles com um segundo retransplante (paciente 1), 5 receptores evoluíram a óbito, neste tempo estudado, sendo 3 deles (2, 8 e 19) com manifestações clínicas de provável doença pelo HCMV. A maioria dos óbitos ocorreu no primeiro ano pós-transplante, com média de 10,6 meses.

O desenvolvimento de técnicas que possibilitam o diagnóstico rápido da infecção pelo HCMV como a “Nested-PCR” e Antigenemia, utilizadas neste trabalho propiciam a implementação precoce de medidas terapêuticas, como por exemplo, o uso de medicamentos antivirais. Os resultados deste trabalho, de acordo com outros desenvolvidos na literatura, sugerem que a infecção pelo HCMV é um problema relevante após o transplante hepático no Brasil.

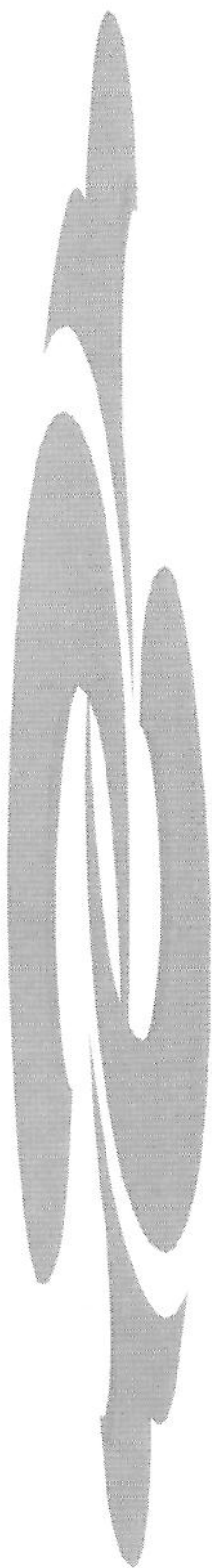
Embora uma comparação exata entre este trabalho e os anteriormente relatados seja dificultada pelos diferentes métodos utilizados, pode-se ressaltar que, em linhas gerais, estes resultados não são significativamente diferentes dos descritos em estudos relatados anteriormente.



7. CONCLUSÕES

De acordo com os dados demonstrados, pode-se concluir que:

1. Foi observada uma soroprevalência de 92% nos receptores de transplante hepático, confirmando dados de alta soroprevalência da infecção pelo HCMV, na população brasileira.
2. Com o emprego da “Nested-PCR” foi possível identificar o DNA viral do HCMV, indicando infecção ativa em 92% dos pacientes transplantados hepáticos, estudados prospectivamente.
3. Com o emprego da Antigenemia, pesquisada neste trabalho foi possível detectar 80% de infecção ativa pelo HCMV.
4. A técnica da Antigenemia mostrou menor sensibilidade que a “Nested-PCR” para a infecção ativa pelo HCMV (80% / 100%).
5. A técnica da Antigenemia mostrou maior especificidade que a “Nested-PCR” para provável doença pelo HCMV (46% / 13%).
6. Este trabalho demonstra que a “Nested-PCR” se positiva, em média, com 47 dias pós-transplante, precedendo em 20 dias as manifestações clínicas, enquanto que a Antigenemia, 85 dias.
7. A partir de uma análise global, os dados relatados neste trabalho confirmam a importância da infecção ativa e provável doença pelo HCMV, como sendo altamente preocupantes na evolução de pacientes que receberam transplante hepático.



8. *SUMMARY*

The human cytomegalovirus (HCMV) is one of the most important pathogens that undertakes hepatic transplantation patients, with a high mortality and morbidity, being its early diagnosis by means laboratorial tests such as PCR and Antigenemia, a primary issue.

In our study we assisted 27 patients from September 1988 to January 2001, performing serological techniques (ELISA), PCR and Antigenemia in the pre-transplantation patients and two last tests in the follow up at least, 150 days in the post-transplantation.

It was observed that among the 27 patients, 92% had already had a previous contact with HCMV (IgG positive in the pre-transplantation). Also 15% presented a positive PCR, and only 5% presented a positive Antigenemia before transplantation.

According to previous data, and confirmed by this research, the hepatic cirrhosis caused by the virus C was the main cause (59%) for hepatic transplantation, from which 40% appears as an isolated form, including that the alcoholic cirrhosis appearing as the second highest incidence (33%), 14% as an isolated form.

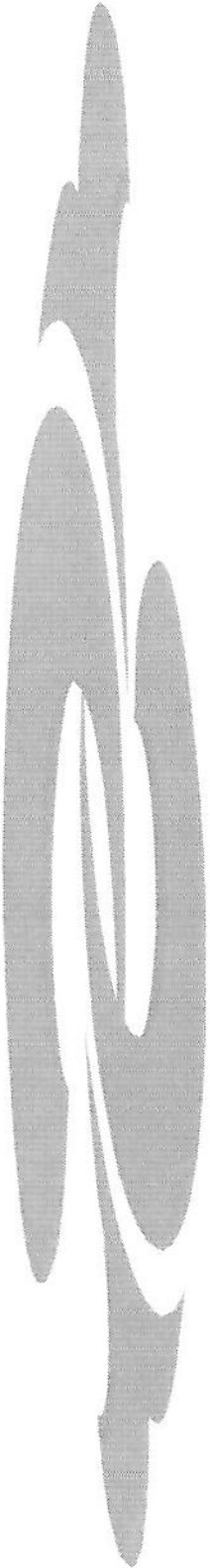
Our research shows that PCR test becomes positive it takes around 47 days after transplant, as the Antigenemia test takes nearly 85 days.

In accordance with active infection standards, 92% (25/27) of the patients presented an active infection course, by of which 44% (12/27) were followed by clinical manifestations consistent with the HCMV disease. The most common clinical symptoms were fever (72%) and myalgia (43%), followed by hepatic enzymes alterations (57%) and leukopenia (11%).

Among the analysed patients, 05 deceased and with, 03 of them (60%) had clinical manifestation of the HCMV disease.

In conformity with previous data, the HCMV disease in hepatic transplantation patients occurred in the first 3 months after transplantation.

Thus we have demonstrated the clinical importance of the early detection of HCMV in hepatic transplantation patients and that HCMV infection is a frequent problem in hepatic transplant patients in Brazil, with significant clinical complications.



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABECASSIS, M.M.; KOFFRON, A.J.; KAPLAN, B.; BUCHINGHAM, M.; MULDOON, J.P.; CRIBBINS, A.J.; KAUFMAN, D.B.; FRYER, J.P.; STUART, J.; STUART, F.P. – The role of PVR on the diagnosis and management of CMV in solid organ recipients. **Transplantation**, **27**: 275-279, 1997.
- AGHA, S.A.; COLEMAN, J.C.; SELWYN, S.; HAHMOUD, L.A.; ABD-ELAAL, A.M. - Combined use of sonication and monoclonal antibodies for the detection of early and late cytomegalovirus antigens in centrifugation cultures. **J Virol Methods**, **22**: 41-50, 1988.
- ALFORD, C.A. & BRITT, W.J. – Cytomegalovirus. In: FIELDS, BN, KHIFE, DM. **Virology**, **2^a ed.** New York, Raven Press Ltda.: 1981–2010, 1990.
- BAILEY, T.C.; BULLER, R.S.; ETTINGER, N.A.; TRULOCK, E.P.; GAUDREALT-KEENER, M.; LANGROIS, T.M.; FORNOFF, J.E.; COOPER, J.D.; STORCH, G.A. – Quantitative analysis of Cytomegalovirus viremia in Lung Transplant Recipients. **Jour Infect Dis**, **171**: 1006-1010, 1995.
- BALFOUR, H.H. Jr – Management of cytomegalovirus disease with antiviral drugs. **Rev Infect Dis**, **12**: 849-60, 1990.
- BARKHOLT, L.M.; EHRNST. A.; VERESS, B.; JOHANSSON, B.; ANDERSON, J.; GROTH, C.G. – New criteria for diagnosing cytomegalovirus hepatitis in liver transplant patients. **Transplantation Proceeding**, **27**: 1224–1225, 1995.
- BECKWITH, D.G.; HALSTEAD, D.C.; ALPAUGH, K.; SCHWEDER, A.; FRONEFIELD, D.A.; TOTH, K. – Comparison of a latex agglutination test with live others methods for determining presence of antibody against cytomegalovirus. **J Clin Microbiol**, **21**: 328-31, 1985.
- BLOCK, M. J.; LAUTENSCHLAGER, I.; CHRISTIAANS, M.H.L.; VAN HOOFF, J.P.; GOOSSENS, V.J.; MIDDELDORP, J.M.; SILLEKENS, P.; HOCKERSTEDT, K.; BRUGEMAN, C.A – Sensitive Detection of Cytomegalovirus Infection in Transplant Recipients Using Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. **Transp Proc**, **32**: 149-151, 2000.

- BOECKH, M.; & BOIVIN, G. - Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications. **Clin Microbiol Rev**, **11** (3): 533-554, 1998.
- BOECKH, M.; BOWDEN, R.A.; GOODRICH, J.M.; PETTINGER, M.; MEYERS, J.D. - Cytomegalovirus Antigem Detection in Peripheral Blood Leukocytes After Allogeneic Marrow. **Transplantation Bood**, **80** (5): 1358-1364, 1992.
- BOECKH, M.; HAWKINS, G.; MYERSON, D.; ZAIA, J.; BOWDEN, R.A.; - Plasma PCR for Cytomegalovirus DNA after Allogeneic Marrow Transplantation: Comparison with PCR using peripheral blood leukocytes, pp65 Antigenemia and Viral Culture. **Transp**, **64**: 108-113, 1997.
- BOWDEN, R.A. - Cytomegalovirus infections in transplant recipients: methods of prevention of primary cytomegalovirus. **Transplantation Proc**, **23** (Supp3): 136-8, 1991.
- BRAINARD, J. - A detection of cytomegalovirus in liver transplant biopsy. **Transplantation**, **57**: 1753-1757, 1994.
- BRUGGEMAN, C.A. - Cytomegalovirus and Latency: an overview. *Virchows Avchiv B: Cel. I. Pathology*, 325-333, 1993.
- BRUGGEMAN, C.A.; MARJORIE, H.J.; NELISSEN; VRANCKEN, G. - Cytomegalovirus. **Antiviral Research**, **43**: 135-144, 1999.
- BROWN, H.L. & ABERNATHY, M.P. - Cytomegalovirus Infections. **Seminars in Perinatology**, **22** (4): 260-266, 1998.
- BRYTTING, M.; SUNDQUIST, V.; STALHANDSKE, P.; LINDE; WAHREN, B. - Cytomegalovirus detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. **J Virol Meth**, **32**: 127-138, 1991.
- BUFFONE, G.J.; DEMLER, G.J.; SCHIMBOR, C.M.; GREER, J. - Improved amplification of cytomegalovirus DNA from urine after purification of DNA with glass beads. **Clinic Chem**, **37**: 1945-9, 1991.

- CHOU, S. - Comparative analysis of sequence variation in gp 116 and gp 55 components of glycoprotein B of human cytomegalovirus **Virology**, **188**: 388, 1992.
- CHOU, S. – Newer Methods for Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. **Rev Infect Dis** **12 (7)**: 727-735, 1990.
- CHOU, S.; & MERIGAN, T.C. - Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization. **N Engl J Med**, **308**: 921-925, 1983.
- CLARKE, L.M.; DUERR, A.; FELDMAN, J.; SIERRA, M.F.; DAIDONE, B.J.; LANDESMAN, S.H. - Factors associated with cytomegalovirus infection among human immunodeficiency virus type 1 seronegative and seropositive women from an urban minority community. **J Infect Dis**, **173 (1)**: 77-82, 1996.
- COLE, R.S.; & KUTTNER, A.B.; - Filterable virus present in the salivary glands of guinea pigs. **J Exp Med**, **44**: 855-73, 1926.
- COLIMON, R. & MICHELSON, S. – Human Cytomegalovirus: pathology, diagnosis, treatment. **Adv Nephrol**, **19**: 333-356, 1990.
- COPE, A.V.; SABIN, C.; BORROUGHS, A.; ROLLES, K.; GRIFFITHS, P.D.; EMERY, V.C.; – Interrelationships among quantity of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in blood donor – recipient serostatus, and administration of Methylprednisolone as risk factors for HCMV disease following liver transplantation. **J Infect Dis**, **176**: 1484–1491, 1997.
- COSTA, S.C.B. – Infecções por Citomegalovirus (CMV): Epidemiologia, e Tratamento. **Rev Bras de Clín Ter**, **25 (1)**: 18–28, 1999.
- COSTA, F.F.; & COSTA, S.C.B. – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): Princípios e aplicações clínicas. **Rev Bras Reumatol**, **32**: 142–146, 1992.

- COSTA, S.C.B.; MIRANDA, S.R.P.; ALVES, G.; ROSSI, C.L.; FIGUEIREDO, L.T.M.; COSTA, F.F.; – Detection of citomegalovirus infections by PCR in renal transplant patients. *Braslian. J Med Biol Res*, **32**: 953–959, 1999.
- CRUMPACKER, C.S. - Ganciclovir. *N. Engl. J Med*, **335** (10): 721-729, 1996.
- DEGIROLAMI, P.C.; DAKOS, J.; EICHELBERGER, K.; MILLS, L.S.; DELUCA, A.M. - Rapid detection of cytomegalovirus in clinical specimens by immnofluorescent staining of shell vial cultures. *Am J Clin Pathol*, **89**: 528-32, 1987.
- DEMMLER, G.J.; BUFFONE, G.J.; SCHIMBOR, C.M. & MAY, R.A. -Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by Using Polymerase Chain Reaction DNA Amplification. *J Infect Dis* **158**: 1177-1184, 1988.
- DRAGO, F.; ARAGONE, M.G.; LUGANI, C.; REBORA, A. – Cytomegalovirus infection in normal and immunocompromised humans. *Dermatology*, **200**: 189-195, 2000.
- DREW, W.L. – Herpesviridae: Cytomegalovirus. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles an Practice*, **II**: 247–260, 1988.
- DREW, W.L. – Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. *Rev Infect Dis*, **10** (suppl 3): 468-476, 1988.
- DREW, W.L. – Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin Infec Dis*, **14**: 608-15, 1992.
- DROUET, E.; COLIMON, R.; MICHELSON, S.; FOURCADEN; NIVELEAU, A.; DUCERF, C.; BOIBIEUL, A.; CHEVALIER, M.; DENOYEL, G. – Monitoring levels of cytomegalovirus DNA in blood after liver transplantation. *J Clin Microbiol*, **33**: 389-394, 1995.
- EHRNST, A. – The Clinical relevance of diffrent laboratory test in CMV Diagnosis. *The Jour Infec Dis, Supll 100*: 64-71, 1996.

- ERLICH, H.A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.J. - Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, **252**: 1643-50, 1991.
- EVANS, P.C.; SOIN, A.; WREGHITT, T.G.; ALEXANDER, G.J.M. - Qualitate and semiquantitative polymerase chain reaction testing for cytomegalovirus DNA in serun allows prediction of CMV related disease in liver transplant recipients. **J Clin Pathol**, **52 (12)**: 914-921, 1998.
- EVANS, P.C.; SOIN, A.; WREGHITT, T.G.; TAYLOR, C.J.; WIGHT, D.G.; ALEXANDER, G.J. - An association between cytomegalovirus infection and chronic rejection after lives transplantation **Transplantation**, **69 (1)**: 30-5, 2000.
- FARBER, S. & WOLBACH, S.B. - Intranuclear and cytoplasmic inclusion "protozoan like bodies" in the salivary glands and others organs of infants. **Am J Patthol Child**, **8**:123-6, 1932.
- FILHO, A.C. & MARCOPITO, L.F. - A interpretação dos testes diagnósticos. **Rev Assoc Méd Bras**, **30**: 64-66, 1984
- FORMAN, S.J.; & ZAIA, J.A. - Treatment and prevention of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: where do you stand. **Blood**, **83**: 2392, 1994.
- FOX, J.D.; BRINK, N.S.; ZUCKERMAN, M.A.; NEILD, P.; GAZZARD, B.G.; TEDDER, R.S.; MILLER, R.F. - Detection of herpesvirus DNA by Nested Polymerase Chain Reaction in Cerebrospinal fluid of Human Immunodeficiency virus - infected persons with neurologic disease a prospective evaluation. **The Jour Infec Dis**, **172**: 1087-1090, 1995.
- FREYMUTH, F.; GEMMETAY, E.; PETITJEAN, J.; EUGENE, G.; LIGNY, B.H.; RYCKELINCK, J.P.; LEGOFF, C.; HAZERA, P.; BAZIN, C. - Comparison of "Nested-PCR" for detection of DNA in plasma with pp65 leukocytic Antigenemia procedure for diagnosis of human Cytomagalovirus infection. **Jour Clin Mibrobiol**, **32**: 1614-1618, 1994.

- FRYD, D.S.; PETERSON, P. K.; FERGUSON, R.M.; SIMMONS, R.L.; BALFOUR Jr, H.H.; NAJARIAN, J.S. – Cytomegalovirus as a risk factor in a renal transplantation. **Transplantation**, **30** (6): 436-439, 1980.
- GANE, E.; SALIVA, F.; VALDECASAS, G.J.C.; O'GRADY, J.; PESCOVITZ, M.D.; LYMAN, S.; ROBINSON, C.A. – Randomized trial of efficacy and safety of oral ganciclovir the prevention of cytomegalovirus diseases in liver transplantation recipients. **Lancet**, **350**: 1729–1733, 1997.
- GERNA, G.; FURIONE, M.; BALDANTI, F.; SARASINI, A. – Comparative Quantitation of Human Cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and AIDS patients. **Jour Clin Microbiol**, **32**: 2709-2717, 1994.
- GERNA, G.; ZAVATTONI, M; PERCIVALLE, E.; GROSSI, P.; TOSSELINI, M.; REVELLO, M.G. – Rising levels of Human Cytomegalovirus (HCMV) Antigenemia during initial antiviral treatment of solid-organ Transplant recipients with primary HCMV infection. **Jour Clin Microbiol**, **36**: 1113-1116, 1998.
- GERNA, G.; ZIPETO, D.; PAREA, M.; REVELLO, M.G.; SILINI, E.; PERCIVALLE, E.; ZAVATTONI, M; GROSSI, P.; MILANESI, G. – Monitoring of Human Cytomegalovirus infections and Ganciclovir treatment in Heart Transplant recipients by Determination of viremia, Antigenemia and DNAemia. **Jour Infect Dis**, **164**: 488-498, 1991.
- GOODRICH, J.M.; MORI, M.; GLEAVES, C.A.; MOND, C.D.; GAYS, M.; EBELING, D.F.; BUHLES, W.C.; DEARMOND, B.; MEYERS, J.D. – Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. Ganciclovir. **New Engl Jour Med**, **325** (23): 1601-07, 1991.
- GOOSSENS, V.J.; BLOCK, M.J.; CHRSTIAANS, M.H.L.; SILLEKENS, P.; MIDDELDORP, J.M.; BRUGGEMAN, C.A. – Early Detection of Cytomegalovirus in Renal Transplant recipients: Comparison of PCR, NASBA, pp65 Antigenemia and Viral culture. **Transplantation Proceedings**, **32**: 155-158, 2000.

- GRIFFITHS, P.D & WHITLEY, R.J. Viral Infections in the immunocompromised host. **Curr Opin Infect Dis** 6: 417-421, 1993.
- GRUNDY, J.E. - Virologic and pathogenetic aspects of cytomegalovirus infection. **Rev Infect Dis** 12 (Suppl 7): 711-9, 1990.
- HALME, L.; HOCKERSTEDT, K.; SALMELA, K .; LAUTENSCHLAGER, I. - Cytomegalovirus detected in the upper gastrointestinal tract parallel with CMV-Antigenemia in liver transplant recipients. **Transplan Proc**, 31: 487, 1998.
- HARDY, A.M.; ALLEN, J.R.; MORGAN, W.M.; CURRAN, J.W. – The incidence rate of acquired immunodeficiency syndrome in selected populations. **Jama**, 253: 215-220, 1985.
- HEBART, H.; MULLER, C.; LOFFER, J.; JAHN, G.; EINSELE, H. – Monitoring of CMV infection: a Comparison of PCR fro whole blood, plasma-PCR, pp65 – Antigenemia and virus culture in Patients after Bone Marrow Transplantation. **Bone Marrow Transp**, 17: 861-868, 1996.
- HIBBERD, P.L.; & SNYDMAN, D.R. – Cytomegalovirus Infection In Organ Transplant Recipients. **Infec Dis Clin of Nor Am**, 9 (4): 863–877, 1995.
- HILLYER, C.D.; SNYDMAN, D.R.; BERKMAN, E.M. - The risk of cytomegalovirus infection in sond organ na bone marrow transplant recipients: transfusion of blood products. **Transfusion**, 30: 659-60, 1990.
- HO, M. – Cytomegalovirus: Biology and Infection, 2º ed. New York. **Plen Publis Corp**: 1-440, 1991.
- HO, M. – Epidemiology of Cytomegalovirus Infections. **Rev Infect Dis**, 12 (Suppl 7): 701–710, 1990.
- HO, M.; MANDELL, G.L.; DOUGLAS, J.R.; R.G; BENNETT, J.E.; - Principles and Practice of Infectious Disease. 3º ed., New York, **Churchill Livingstone**: 1159-72, 1990.

- HUANG, E.S.; HUONG, S.M.; TEGMEIE, G.E.; ALFORD, C.A.; J.R. - Cytomegalovirus: Genetic Variation of viral Genomes. **Ann N Y Acad Sci**, **354**: 332-346, 1980.
- HUMAR, A.; GREGSON, D.; CALIENDO, A.M.; MGGEER, A.; MALKAND, G.; KRAJDEN, M.; COREY, P.; GREIG, P.; WALMSLEY, S.; LEVY, G.; MAZZULLI, T.; - Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination of precting diseases in liver transplant recipients. **Transplantation**, **68 (9)**: 1305-1311, 1999.
- HUNTER. K. - Prenatal screaming of pregnant women for infections caused Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, Herpes virus, Rubella, and Toxoplasma gondii. **Amer J Obstet Gynaec**, 145-269, 1983.
- JESIONEK, K.; & KIOLEMENOGLOW, M. - Uber einen befund von protozoenartigeh Geviden in den organen eines hereditarleystiocen fetus. **Muench Med**, **51**: 904-1907, 1904.
- JIWA, N.M.; VAN DER RIJKE, F.M.; MULDER, A.; VAN DER BIJ W, THE, T.H.; ROTHBARTH, P.H.H.; VELZING, J.; VAN DER PLOEG, M.; RAAP, A.K.; - Na improved immunocytochemical metod for the detection of human cytomegalovirus antigens in peripheral blood leukocytes. **Histochemistry**, **91**: 345-349, 1989.
- JIWA, N.M.; VAN GEMERT, G.W.; RAAP, A.K.; VAN DER RIJKE, F.M.; MULDER, A.; LENS, P.F.; SALIMANS, M.M.M.; ZWAAN, F.E.; VAN DER PLOEG, M. - Rapid detection of human citomegalovirus DNA in Peripheral Blood Leukocytes of Viremic Transplant Recipients by the Polimerase Chain Reaction. **Transplantation**, **48**: 72-76, 1989.
- KANJ, S.S.; SHARARA, A.I.; CLAVIEN, P.A.; HAMILTON, J.D. - Cytomegalovirus infection following liver transplantationm: review of the literature. **Clin Infect Dis**, **22(3)**: 537-49, 1996.
- KAHAN, B.D.; & LAUNDERS, T.A.; - Rapid detection of cytomegalovirus infection using DNA probe. **Transplantation Proc**, **17**: 989-992, 1985.

- KHAN, G.; KANGRO, G.K.; COATES, P.J.; HEATH, R.B.; – Innibitory effects of urine on the polymerase chain reation of cytomegalovirus DNA. **J Clin Pathol**, **44**: 360-5,1991.
- KRECH, U. – Complement – fixing antibodies against cytomegalovirus in differents parts of the world. **Bull Wld Hlth Org**, **49**: 103, 1973.
- KWOK, S.; & HIGUSHI, R.- Avoiding false positivo with PCR. **Nature**, **339**: 238, 1989.
- LAMPS, L.W.; PINSON, C.W.; RAIFORS, D.S.; SHYR, V.; SCOTT, M.A.; WASHINGTON, M.K. – The significance of microabscess in liver transplant biopsies: a clinicapathological study. **Hepathology**, **28 (6)**: 1532–1537, 1988.
- LANDRY, M.; & FERGUSON, D. – Comparison of Quantitative Cytomegalovirus Antigenemia with Culture Methods and Correlation with Clinical Disease. **Jour Clin Mibroiol**, **31**: 2851 – 2856, 1933.
- LAO, W.C.; BURROUGHS, A.K.; LANZINI, G.; ROLLES, K.; EMERY, V.C.; GRIFFITHS, P.D. Use of Polymerase Chain Reaction to provide prognostic information on human cytomegalovirus disease after liver transplantation. **J Med Virology**, **51**: 152–158,1997.
- LEE, P.C.; & HALSWORTH, P. – Rapid viral diagnosis in perspective. **British Med J**, **300**: 1413-8,1990.
- LELAND, D.; HANSING, R.L.; FRENCH, M.L.V. – Clinical experience with cytomegalovirus isolation using convencional cell cultures and early antigen detection in centrifugation – enhanced shell vial cultures. **J Clin Microbiol**, **27**: 1159-62, 1989.
- LJUNGMAN, P. – Cytomegalovirus Infections in Transplant Patientes. **Scan Jour Infect Dis, Suppl 100**: 59 – 63, 1996.
- LJUNGMAN, P.; & PLOTKIN, S.A. - Workshop on CMV Disease, Clinical Severity Scores, and Syndromes. **Scand. J Infect Dis, (Suppl.) 99**: 87-89, 1995.

- LOCHE, M.; & MARCH, B. - Identification of HIV - Infected soronegative individuals by a direct diagnostic test based on hybridisation to amplified viral DNA. **Lancet**, **2**: 418-21, 1988.
- MADALOSSO, C.; SOUZA, J.R.; NILSTRUP, D.M.; WIESNER, R.H.; KROM, R.A.F.; - Cytomegalovirus and its association with hepatic artery thrombosis after liver transplantation. **Transplantation**, **66** (3): 294-297, 1998.
- MAYA, T.C.; & AZULAY, D.R. - Infecção pelo Citomegalovírus. In: LUPI, O.; Clínica, Diagnóstico e Tratamento, 1º ed., **Medsi Ed Med e Cien Ltda**: Cap. 8, p. 135-156., 2000.
- MCDONALD, G.A.; GREENSON, J.K.; DELBUONO, E.A.; GRADY, W.M.; MERION, R.M.; GRANK, T.S.; LUCEY, M.R.; - Mini-microabscess syndrome in liver transplant recipients. **Hepatology**, **26**: 192-167, 1997.
- MCKEATING, J.A.; STAGNO, S.; STIRK, P.R.; GRIFFITHS, P.D. - Detection of cytomegalovirus in urine by enzyme - linked immunosorbent assay. **J Med Virol**, **16**: 367-373, 1985.
- MENDEZ, J.; ESPY, M.; SMITH, T.F.; WILSON, J.; WIESNER, R.; PAYA, C.V. - Clinical significance of viral load in the diagnosis of cytomegalovirus diseases after liver transplantation. **Transplantation**, **65** (11): 1477-81, 1998.
- MERIGAN, T.C.; & RESTA, S. - Cytomegalovirus: Where Have We Been and Where Are We Going. **Rev Infect Dis**, **12**(7): 693- 700, 1990.
- MEYERS, J.D.; FLOURNOY, N.; THOMAS, E.D.; - Risk for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. **J Infect Dis**, **152**: 478-88, 1986.
- MEYERS, J.D.; LJUNGMAN, P.; FISCHER, L.D. - Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplant: importance of cytomegalovirus viremia. **J Infect Dis**, **162**: 373-380, 1990.

- MILLER, H.; MCCULLOCH, B.; LANDINI, M.P.; ROSSIER, E. – Compararison of immnoblotting with other serological methods and virus isolation for the early detection of primary cytomegalovirus infection in allograft recipients. **J Clin Microbiol**, **27**: 2672-7,1989.
- MILLIS, J.M.; ALONSO, E.M.; PIPER, J.B.; BRUCE, D.S.; NEWELL, K.A.; WOODLE, E.S.; BAKER, A.L.; WHITINGTON, P.F.; THISTLETHWAITE, J.R. – Liver transplantation at the University of Chicago. **Clin Transpl**: 187-97, 1995.
- MOORE D.G.; DAVIS, B.G.; OEFINGER P.E.; CARLSON, J. – Reactivity of serologic tests for the detection of antibody specific to cytomegalovirus. **Am J Clin Pathol** **83**: 622-625, 1985.
- MURRAY, B. M. – Management of Cytomegalovirus Infection in Solid Organ tranplant Recipients. **Imm Invest**, **26**: 243–255, 1997.
- MUSTAFA, M.M. - Cymegalovirus Infection and Disease in the Immunocomprimesed Host. **The Ped Inf Dis J**, **13**: 249-259,1994.
- MUTIMER, D.; MIRZA, D.; SHAW, J.; O'DONNELL, K.; ELIAS, E. - Enhanced (cytomegalovirus) viral replication associated with septic bacterial complications in liver transplant recipients. **Transplantation**, **63**: 1411–1415, 1997.
- MUTIMER, D.; TOTH, A.M.; SHAW, J.; ELIAS, E.; O'DONNELL, K.; STALHANDSKE, P. – Patterns of viremia in liver transplantation recipients with symptomatic cytomegalovirus infection **Transplantation**, **63**: 68–73, 1997.
- MYERS, J.B.; & DAMSTERDAM. - The laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections. **Immunol Invest**, **26 (3)**: 383-394, 1997.
- NDRY, M.L.; & FERGUSON, D. - Comparison of Quantitative Cytomegalovirus Antigenemia Assay with Culture Methods and Correlation with Clinical Disease. **J Clin Microbiol**, **31 (11)**: 2851-2856, 1993.
- NICHOLS, W.G. & BOECKH, M. – Cytomegalovirus. **Jour Clin Virol**, **16**: 25-40, 2000.

- NIUBO, J.; PEREZ, J.L.; MARTINEZ-LACASA, J.T.; GARCIA, A.; ROCA, J.; FABREGAT, J.; GIL-VERNET, S.; MARTIN, R. – Association of Quantitative Cytomegalovirus Antigenemia with Symptomatic Infection in Solid Organ Transplant Patients. **Diag Microbiol Infect Dis**, **24**: 19-24, 1996.
- O'GRADY, J.G.; ALEXANDER, G.J.M.; SUTHERLANDS, S.; DONALDSON, P.T.; HARVEY, F.; PORTMANN, B.; CALNE, R.Y.; WILLIAMS, R. - Cytomegalovirus infection and donor / recipient HLA antigens: interdependent co-factors in pathogenesis of vanishing bile duct syndrome after liver transplantation. **Lancet**, **2**: 302-305, 1988.
- OLIVE, D.M.; SIMSEK, M.; AL-MUFTI, S. - Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. **J Clin Microbiol**, **27**: 1238-1442, 1989.
- PANNUTI, C.S. - Infecção por CMV. Revisão e Ensaios. **Pediat (São Paulo)**, **6**: 144-153, 1984.
- PANNUTI, C.S.; VILAS BOAS, L.S.; NETO, V.A.; ANGEL0, M.J.O.; SABBAGA, E. – Detecção de Anticorpos IgM nas Infecções Primárias e Secundárias pelo Citomegalovírus em Pacientes Submetidos a Transplante Renal. **Rev do Inst de Méd Trop**, **29**: 317– 322, 1987
- PAPEL, R.; SMITH, T.F.; ESPY, M.; PORTELA, D.; WIESNER, R.H.; KHOM, R.A.F.; PAYA, C.V.; – A prospective comparison of molecular diagnostic techniques for the early detection of cytomegalovirus in liver transplant recipient. **J Infectious D**, **171**: 1010-4, 1995.
- PASS, R.F.; GRIFFITHS, P.D; AUGUST, A. M. – Antibody response to cytomegalovirus after renal transplantation : comparison of patients with primary and recurrent infections. **J Infect Dis**, **147 (1)** : 40-46, 1983.
- PATEL, R.; & PAYA, C.V. – Infections in Solid. Org. Trans. - **Clin Microbiol Rev**, **10**: 86–124, 1997.

- PETERSON, P. K.; BALFOUR Jr, H. H.; MARKER, S. C.; FRYD, D.S.; HOWARD, R. J.; SIMMONS, R.L. – Cytomegalovirus diseases in renal allograft recipients: a prospective study of the clinical features, risk factors and impact on renal transplantation. **Medicine**, **59** (4): 283-300, 1980.
- PORTE-JORDAN, K.; ROSEMBERG, E.I.; KEISER, J.F.; GROSS, J.D.; ROSS, A.M.; NASSIM, S.; GARRET, C.T. – Nested Polimerase chain reation assay for the Detection of Cytomegalovirus overcomes false-positive caused by contamination with fragmented DNA. **The Jour of Med Virol**, **30**: 850-91, 1990.
- RASMUSSEN, C.S.; KENSAL, D.; NELSON, R.; CARNEY, W.; HIRSH, M.; WINSTON, D.; PREIASAITIS, J.; MERICAW, T.C. - Virus specific IgG and IgM antibodies in normal and immunocompromised subjects infected with cytomegalovirus. **J Infect Dis**, **145**: 119-9, 1982.
- REVELLO, M.G.; PERCIVALE, E.; DI MATTEO, A.; MORINI, F.; GERNA, G. - Nuclear expression of the lower matrix protein of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of immunocompromised viraemic patients. **J Gen Virol**, **73**: 437-442, 1992.
- REYNOLDS, D.W.; STAGNO, S. E; ALFORD, C.A. – Laboratory diagnosis of cytomegalovirus. In: LENNETTE, E.H. & SHIMIDT, N.J. (eds.). **Diagnosis procedures for viral, Rickettsial and Chlamydial Infection**. 5^a ed., American Public Health Association Inc, New York, p. 399-439, 1979.
- RIBBERT, H. - Uber protozoenartige zeller in der nireeiness syphilitshen neuge boren und in der parotis von kindren. **Allg Pathol**, **15**: 945-8, 1904.
- ROWE, W.P.; HARTLEY, J.W.; WATERMAN, S.; - Cythopathogenic agent resemblig human salivary gland virus recoured from tissue cultures human adenoids. **Proc Soc Exp Biol Med**, **92**: 418-424, 1956.
- RUBIN, R.H. – Introduction to the Symposiun. **Rev of Inf Dis**, **12** (Suppl.): 691–692, 1990.

- RUBIN, R.H.; LEAVIN, M.; COHEN, C. – Summary of a Workshop on Cytomegalovirus Infections During Organ Transplantation. **J Infect Dis**, **139**: 728–734, 1979.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. – Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, **239**: 487-491, 1988.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIN, N. - Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle-cell anemia. **Science**, **230**: 1350-1354, 1985.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. - Molecular Cloning – **A Laboratory Manual**. (2° ed.) Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SAYAGE, L.H.; GONWA, T.A.; GOLDSTEIN, R.M.; HUSBERG, B.S.; KLINTMALN, G.B. – Cytomegalovirus infection in orthotopic liver transplantation. **Transplant Int**, **2**: 96-101, 1989.
- SAYERS, M.H.; ANDERSON, K.V.; GOODNOUGHT, L.T.; KURTZ, S.R.; LANE, T.A.; PISCIOTTO, P. & SILBERSTEIN, L.E. Reducing the Risk for Transfusion, transmitted Cytomegalovirus Infection. **Ann Internal Med** **116**: 55-62, 1992.
- SCHMIDT, G.M.; HORACK, D.A.; NILAND, J.C.; DUNCAN, S.R.; FORMAN, J.F.; ZAIA, J.A. – A randomized trial of prophylatic ganciclovir for Cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplant. Ganciclovir. **New Engl Jour Med**, **324 (15)**: 1005-11, 1991
- SCHMIDT, C.A.; OETTL, H.; PENG, R.; NEUHAUS, P.; BLUMHARDT, G.; LOHMANN, R.; WILBORN, F.; OSTHOFF, K.; OERTEL, J.; TIMM, H.; SIEGERT, W. – Comparison of polymerase chain reaction from plasma and buffy coat with antigen detection and occurrence of immunoglobulin in for the demonstration of cytomegalovirus infection after liver transplantation. **Transplantation**, **59 (27)**: 1133–1138, 1995.

- SHEN, C.; CHANG, B.; CHANG, S.; YANG, S.; TSENG, S.; SHEN, C.; WU, C. - Molecular Epidemiology Cytomegalovirus Infection in Kindergarten Children. **Joun Med Vir**, **48**: 33–37, 1996.
- SHIBATA, D.; MARTIN, W.J.; APPLEMAN, M.D.; CAUSEY, D.M.; LEEDOM, J.M.; ARNHEIM, N. - Detection of Cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood of Patients Infected with Human Deficiency Virus. **J Infect Dis**, **158**: 1185-1192, 1988.
- SHIFFER, V.; MENTHA, G.; GIOSTRA, E.; BELLI, D.; LE COULTRE, C.; ROHNER, A. - Cytomegalovirus in liver transplantation: incidence and groups at risk. **Schweiz Med Wochenschr**, **124(15)**: 631-6, 1994.
- SILVA, A.G. - Propriedades Gerais dos Herpes vírus. In: Lupi, O., Silva, A.S., Pereira Jr., A.C. - **Herpes - Clínica Diagnóstico e Tratamento**, 1ª ed., Medsi Ed Méd e Cient Ltda, Cap. 8, p. 135–156, 2000.
- SMITH, M.G. - Propagation of salivary gland virus of mouse in tissue culture. **Proc Soc Exp Biol Med**, **86**: 435 –40, 1954.
- SMITH, M.G. - Propagation in tissue cultures of cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) diseases. **Proc Soc Exp Biol Med**, **92**: 424–30, 1956.
- SMITH, I.L.; CHERRINGTON, J.M.; JILES, R.E.; FULLER, W.R.; FREEMAN, W.R.; SPECTOR, S.A. - High-level resistance of Cytomegalovirus to Ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA Polymerase genes. **Jour Infec Dis**, **176**: 69-77, 1997.
- SNYDMAN, D.R.; RUBIN, R.H.; WERNER, B.G.; - New developments in cytomegalovirus prevention and management. **Am J Kidney Dis**, **21**: 217-28, 1993.
- SPAN, A.H.M.; GRAULS, G.; BOSNAN, F.; VAN BOVEN, C.P.A.; BRUGGEMAN, C.A.; - Cytomegalovirus infection induces injury in the rat. **Atherosclerosis**, **93**: 41, 1992.

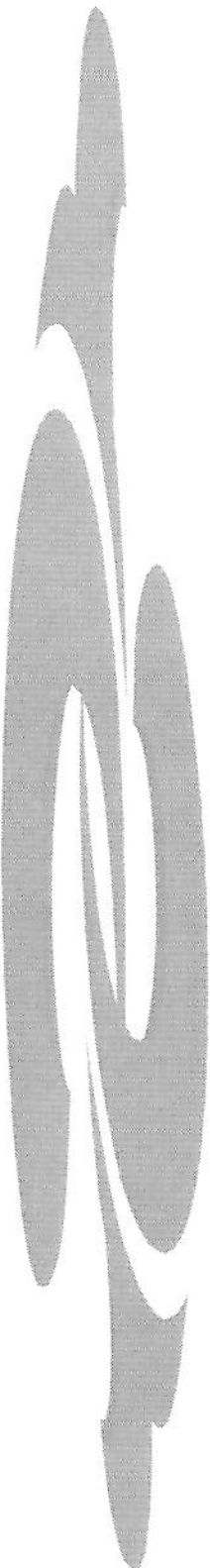
- SPECTOR, S.A.; RUA, J.A.; SPECTOR, D.H.; MCMILLAN, R. - Detection of human cytomegalovirus in clinical specimens by DNA-DNA hybridization. **J Infect Dis**, **150**: 121, 1984.
- STAGNO, S.; CLOUD, G.; BRITT, W.J.; HENDERSON, R.E.; WALTON, P.D.; VEREN, D.A.; PAGE, F.; ALFORD, C.A.;- Primary cytomegalovirus infection in pregnancy: incidence, transmission to fetus and clinical outcome. **JAMA**, **256**, **10**: 1904-8, 1986
- STAGNO, S., TINKER, M.K.; ELROD, C.; FUCCILLO, D.A.; CLOUD, G.; O'BELRENE, A.J. - Immunoglobulin Antibodies detected by enzyme linked immunosorbent assay and radioimmunoassay in the diagnosis of cytomegalovirus infection in pregnant women and newborn infants. **J. Clin Microbiol**, **21**: 930-35, 1985.
- STAGNO, S.; & WHITNEY, J.R.; - Herpes virus infections of pregnancy. **New Engl J Med**, **14**: 1270-72, 1985.
- STINSKI, M.F. - Cytomegalovirus and Its Replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D.M. - **Virology**, 2^o ed. New York, Raven Press, Ltda, p. 1959-1980, 1990.
- STRAUS, S.E. - Introduction to Herpesviridae. In: MANDELL, G.L.; DOUGLAS Jr, R.G.; BENETT, J.E. - Principles and practice of infectious diseases. **Churchill Livingstone**, 3^a ed., New York, 1139-44, 1990.
- SUASSUNA, J.H.R.; & MACHADO, R.D. - Diagnóstico das infecções por citomegalovirus (CMV) em pacientes com deficiência imunológica. **Rev Assoc Med Brasil**, **38**: 33-47, 1992.
- SUTHERLAND, S.; BRAKEN, P.; WREGHITT, T.G.; O'GRADY, C.; CALNE, R.Y.; WILLIAMS, R. - Donated organ as a source of cytomegalovirus in orthotopic liver transplantation. **J Med Virol**, **37**: 170-173, 1992.
- TEIXEIRA, R.; PASTACALDI, S.; PAPTAEODORIDIS, G.V.; BURROUGHS, A.K. - Recurrent hepatitis C after liver transplantation. **J Med Virol Aug**, **61** (4): 443-54, 2000.

- THE, T.H.; VAN DER BIJ, W.; VAN DER BERG, A.P.; VAN DER GIESSEN, M.; WEITS, J.; SPRENGER, H.G.; VAN SON, W.J. - Cytomegalovirus Antigenemia. **Rev Infect Dis**, **12**(7): 737-744, 1990.
- THE, T.H.; VAN DER PLOEG, M.; VAN DER BERG, A.P.; VLIETGER, A. M.; VAN DER GIESSEN, M.; VAN SON, W.J. - Direct Detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes: a review of antigenemia assay and polimerase chain reaction. **Transplantation**, **54** (2) 193-198, 1992.
- van dan MIERAS, M.C.E.; MULLER, A.D.; VAN HINSBERGH, V.W.M.; MULLERS, W.J.H.A.; BOMANS, P.H.H.; BRUGGEMAN, C.A. – The procoagulant response of cytomegalovirus infected endothelial cells. **Thromb Haemost**, **68**: 364, 1992.
- van der BERG, A.P.; KLOMPMAKER, I.J.; HAAGSMA, E.B.; SHOLTEN; SAMPSON, A.; BIJLEVELD, C.M.A.; SHIRM, J.; VAN DER GIESSEN, M.; SLOOFF, M.J.H.; THE, T.H. – Antigenemia in the diagnosis and monitoring active cytomegalovirus infection after liver transplantation. **J Infect Dis**, **164**: 264-70, 1991.
- van der BIJ, W.; TORENSMA, R.; VAN SON, W.J.; TEGZESS, A.M.; THE, T.H. - Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody mistaining of blood leukocytes. **J Med Virol**, **25**, 179-188, 1988.
- van der BIJ, W.; VAN SON, W.J.; VAN DER BERG, A.P.; TEGZESS, A.M.; TORENSMA, R.; THE, T.H. - Cytomegalovirus (CMV) Antigenemia: rapid diagnosis and relationship with CMV- associated clinical syndromes in renal allografts recipients. **Transplant Proc**, **21** (1): 2061-2064, 1989.
- van GELEN, A.G.M.; SLOOBE VAN DURNEN, M.E.P.; MULLER, A.D.; BRUGGEMAN, C.A.; VAN DAM MIERAS, M.C.E.– Membrane related effects in endotelial cells. induced by human cytomegalovirus. **Arch Virol**, **140**: 1601, 1995.
- VERONESI, R.D. M. - D C Citomegalia. **Doen Infec e Paras**, **8º ed.**: 206 - 211, 1991.

- VIVARELLI, M.; DE RUVO, N.; LAZAROTTO, T.; BELLUSCI, R.; LANDINI, M.P.; VARANI, S.; CAVALLARI, A. – Abstension from treatment of low – level pp65 cytomegalovirus antigenemia after liver transplantation: a prospective study. **Transp**, **70 (8)**: 1183–7, 2000.
- VLIEGER, A.M.; BOLAND, G.J.; JIWA, N.M.; WEGWR, R.A.; WILLENZE, R.; de GAST, G.C.; FALKENBURG, J.H. – Cytomegalovirus Antigenemia Assay or PCR can be used to Monitor Ganciclovir Treatment in Bone Marrow Transplant Recipients. **Bone Marrow Transp**, **9**: 247-253, 1992.
- XU, W.; SUNDQVIST, V.A.; BRYTTING, M. And LINDE, A. – Diagnosis of Cytomegalovirus Infections using Polymerase Chain reaction, virus isolation and serology. **Scan Jour Infec Dis**, **25**: 311-316, 1993.
- WARREN, W.P.; BALKAREK, K.; SMITH, R.; PASS, R.F. - Comparison of rapid methods of detection of cytomegalovirus isolation in tissue culture. **J Clin Microbiol**, **30**, **4**: 786-9, 1992.
- WELLER, T.H. - Virologic and clinical observations on cyromegalicinclusion disease. **N Engl J Med**, **14**, **24**: 1231-43, 1962.
- WELLER, T.H. - Cytomegaloviruses: the difficult years. **J Infect Dis**, **122**, **6**: 532-9, 1970.
- WELLER, T.H. – The Cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations (First of two parts). **New Engl J Med**, **285**: 203-214, 1971.
- WELLER, T.H. – The Cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations (Second of two parts). **New Engl J Med**, **285**: 267-274, 1971.
- WELLER, T.H.; & HANSHAW, J.B. - Virological and clinical observations on cytomegalic inclusion disease. **New England J Med**, **266(14)**: 1233-1244, 1962.
- WELLER, T.H.; MACAULEY, J.C.; CRAIG, J.M.; WIRTH, P. - Isolation of intranuclear producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion diseases. **Proc Soc Exp Biol Med**, **94**: 4–12, 1957.

WINSTON, D.J.;HI, W.G.; LIN, C.H.; BARTONI, K.; BUDINGER, M.D.; GALE, R.P.;
CHAMPLIM, R.E. - Intravenous Immune Globulin for Prevention of Cytomegalovirus
Infection and Interstitial Pneumonia after Bone Marrow Tranplantation. **Ann Inter
Med**, **106**: 12-18,1993.

WRIGHT, P.A.;& WYNFORD, T.D. - The polymerase chain reaction: miracle on mirage?
A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. **J Patho**, **162**:
99-117, 1990.



10. APÊNDICE

Apêndice 1: “CONSENTIMENTO PÓS - INFORMAÇÃO”

Eu, _____,

R.G. : _____, aceito colaborar com um estudo que será realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para pesquisa do citomegalovirus, por três diferentes métodos de análises. Para isso, sei que colherão 04 a 08 mL do meu sangue, uma vez por semana no primeiro mes, e quinzenais nos cinco meses posteriores após a cirurgia, para a realização dos referidos exames. Estou ciente de que poderei desistir de participar deste estudo a qualquer hora, e que isto nada irá prejudicar meu tratamento, e a minha colaboração em muito auxiliará o tratamento de pacientes transplantados hepáticos que vierem a ser também transplantados, sei também que esses dados possuem caráter sigiloso, e que meu nome não sairá em nenhuma publicação.

Campinas, ____ de _____ de 199__ .

Paciente: _____

Médico: A) Assinatura : _____

B) Nome/CRM: _____

Testemunha: A) assinatura: _____

B) Nome/RG: _____

Apêndice 2: Características gerais dos 27 pacientes estudados submetidos a transplante hepático no HC – UNICAMP, mostrando suas iniciais, idade, sexo, doença de base, e a data na qual foi realizado o transplante.

	Iniciais	Idade	Sexo	Doença de Base	Data T X H
1	LAB	33	MASC	Cirrose vírus C	25/09/1998
2	DM	64	MASC	Cirrose e neoplasia	16/10/1998
3	NAS	33	FEM	Colangite esclerosante 1ª	24/10/1998
4	VP	38	MASC	Cirrose vírus C	26/10/1998
5	CFS	16	FEM	Cirrose hepato-biliar e histiocitose	28/11/1998
6	AO	57	MASC	Cirrose alcoólica e vitiligo	08/12/1998
7	ESC	43	MASC	Cirrose vírus C e colelitíase	15/01/1999
8	CHO	34	MASC	Cirrose vírus C	19/01/1999
9	JGM	62	FEM	Cirrose vírus C	22/01/1999
10	JCMF	54	MASC	Cirrose alcoólica	31/01/1999
11	DGR	51	MASC	Cirrose alcoólica e vírus C	04/02/1999
12	JVB	43	MASC	Cirrose alcoólica e vírus C	01/04/1999
13	DAQL	52	MASC	Cirrose alcoólica	28/04/1999
14	JAA	45	MASC	Cirrose alcoólica e vírus C	05/05/1999
15	SRB	49	MASC	Cirrose vírus C	25/06/1999
16	GRS	62	MASC	Cirrose alcoólica	24/07/1999
17	LC	54	MASC	Cirrose vírus B	22/08/1999
18	EBR	50	MASC	Insuficiência hepática vírus B	17/09/1999
19	SJ	39	FEM	Cirrose alcoólica e vírus C	27/09/1999
20	JCAF	43	MASC	Cirrose vírus C	29/09/1999
21	JLS	54	MASC	Cirrose vírus C	16/10/1999
22	ABZ	51	MASC	Cirrose vírus C	20/10/1999
23	RRS	18	FEM	Cirrose +hepatite autoimune.	15/11/1999
24	CDP	21	MASC	Cirrose, colangite e talassemia	23/11/1999
25	EOD	39	MASC	Cirrose vírus C	12/01/2000
26	AAB	36	MASC	Cirrose vírus C	15/03/2000
27	ETG	36	MASC	Cirrose alcoólica e vírus C	16/03/2000

Apêndice 3: Tabela geral dos testes realizados e manifestações clínicas em cada paciente estudado

Paciente	Infecção/ Doença	Pré-transplante						Pós-transplante		
		Sorologia		"Nested-PCR"		Antigenemia		N-PCR	AgM	HCMV
		Doador	Receptor	Doador	Receptor	Doador	Receptor	Receptor	Receptor	Receptor
1	I/D	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	sim
2	I/D	nf	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	sim
3	I	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	não
4	I/D	pos	pos	nf	pos	nf	pos (5)	pos	pos	sim
5	I	pos	neg	nf	neg	neg	neg	pos	pos (3)	não
6	I/D	nf	pos	nf	pos	nf	neg	pos	pos (6)	sim
7	I	nf	pos	nf	neg	nf	neg	pos	pos (12)	não
8	I/D	pos	pos	nf	neg	nf	neg	pos	pos (33)	sim
9	I	nf	pos	neg	neg	nf	neg	pos	pos (41)	não
10	I/D	nf	pos	nf	neg	nf	neg	pos	pos (25)	sim
11	I/D	nf	pos	nf	neg	nf	neg	pos	pos (1)	sim
12	I/D	nf	pos	pos	neg	nf	neg	pos	pos (94)	sim
13	I	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	não
14	I	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	não
15	não	nf	nf	pos	neg	neg	neg	neg	neg	não
16	I/D	pos	neg	pos	neg	nf	nf	pos	pos (32)	sim
17	I	nf	pos	neg	neg	nf	nf	pos	pos (10)	não
18	I	pos	pos	neg	neg	nf	nf	pos	neg	não
19	I/D	neg	pos	neg	nf	neg	nf	pos	pos (5)	sim
20	I	neg	pos	neg	nf	neg	nf	pos	pos (8)	não
21	I	nf	pos	nf	nf	nf	nf	pos	pos (7)	não
22	I	nf	pos	nf	nf	nf	nf	pos	pos (4)	não
23	I/D	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos (7)	sim
24	I/D	nf	pos	nf	nf	nf	nf	pos	pos (14)	sim
25	I	nf	pos	neg	pos	neg	neg	pos	pos (5)	não
26	não	nf	pos	nf	nf	nf	neg	neg	neg	não
27	I	nf	pos	nf	nf	nf	neg	pos	neg	não

Obs.: I: Infecção Ativa, D: Provável Doença, Não: Sem infecção/doença
 pos: positivo, neg: negativo, nf: não feito, N-PCR: "Nested-PCR"
 AgM: Antigenemia, HCMV: manifestações clínicas pelo HCMV