

Dulcinéia Martins de Albuquerque

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

**GENOTIPAGEM E QUANTIFICAÇÃO DE
CITOMEGALOVÍRUS HUMANO EM HOSPEDEIROS
IMUNOCOMPROMETIDOS**

Profª. Drª. Sandra Cecília Botelho Costa

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Bióloga Dulcinéia Martins de Albuquerque.

Campinas, 12 de setembro de 2000.

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

Dulcinéia Martins de Albuquerque

**GENOTIPAGEM E QUANTIFICAÇÃO DE
CITOMEGALOVÍRUS HUMANO EM HOSPEDEIROS
IMUNOCOMPROMETIDOS**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia 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, 2000



2000-10-10

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: 11/154
 V. 11/154 Ex. 11/154
 TOMBO BC/ 42676
 PROC. 16/278100
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 14/10/00
 N.º CPD 14/10/00

CM-00147017-3

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

~~A114g~~

Albuquerque, Dulcinéia Martins de

Genotipagem e quantificação de citomegalovírus humano em
 hospedeiros imunocomprometidos. / Dulcinéia Martins de
 Albuquerque. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador : Sandra Cecília Botelho Costa

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

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



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

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

Membros:

1. Prof.^a Dr.^a Sandra Cecília Botelho Costa

Sandra Cecília Botelho Costa

2. Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

[Signature]

3. Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

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

Data: 12/09/2000

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.”

(Albert Einstein)

*Aos meus pais Eugênio e Amália, que através de muito
sacrifício, compreensão, incentivo, paciência e acima
de tudo do grande amor, proporcionaram a
concretização deste sonho...*

*Aos meus irmãos Marcos, Andréa e Luciana, pela
dedicação, carinho, força e bom humor...*

Aos meus tios e primos, pelo apoio ...

*À Profª. Drª. Sandra Cecília Botelho Costa, pela
orientação deste trabalho, mas principalmente pela
confiança incondicional, compreensão, amizade...e ao
Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pela primeira
oportunidade e grande incentivo...*

*A Deus, dedico este trabalho e agradeço por Ele fazer
parte da minha vida e por ter colocado no meu caminho
amigos nos quais encontrei apoio e incentivo para
poder prosseguir...*

AGRADECIMENTOS

À amiga Rosana, pela grande amizade, conselhos, incentivo e bom humor (meu anjo da guarda).

À Dr^a Carmen Bertuzzo e amiga Tereza Cristina pela oportunidade em conhecer as técnicas de Biologia Molecular.

Ao Carlos, pela paciência, amizade, conselhos, ensinamentos...valeu mestre!

Às amigas Eliana e Paula, pelos primeiros passos com vírus, pela atenção, companheirismo e amizade.

Às amigas Luciana e Ucha, pelas grandes dicas, pela dedicação, convivência, por estarem presente nas horas necessárias.

À Gláucia, companheira de graduação, amiga e irmã, pela perseverança.

Às amigas do laboratório, Andréa, Tereza, Sílvia, Sandra, pela convivência diária, risadas, café, congressos...

Às amigas de “república”, Érivan, Solange, Érica, Alessandra...pela amizade, companheirismo e momentos descontraídos.

Aos amigos Liliane, Yajaira, Dalva, Deva, Jeferson, Rose, Juliana, Jaqueline, Ângela, Lena, Simone, Dil, Mônica, Silvana, Val, Conceição, Guaracy, Sr. Luís, Maria Luíza, Viviane, Lilian, Carla, Gláucia e Ana pelo agradável convívio.

Às amigas Angélica e Bia, pela prestação de serviços essenciais para o bom andamento das pesquisas.

Às amigas Eliane e Cristiane (*Digene*), pela atenção.

À Carla e Andréia (*Ludwig*), pela colaboração.

À amiga Ana Paula, pela colaboração, atenção e apoio indispensável.

À Dr^a. Neiva, pela dedicação à pesquisa, pelos esclarecimentos científicos e amizade.

Às funcionárias do SAME, Simone, Lúcia e Dulcinéia, pela paciência e disposição em ajudar.

Às estatísticas Cleide e Andréia, pela paciência e competência.

Aos secretários Gislaine, Elizete, Wanderley e Eduardo, pela atenção, simpatia e dedicação.

Aos funcionários do departamento de Clínica Médica, Ademir, Anastácia, Sandra, Renata, Darci, Elieni, Gabriela, pela atenção, competência e sobretudo paciência.

À Sandrinha e Rosana pela competência indiscutível, paciência e bom humor na formatação de nossos trabalhos.

Ao Péricles e pessoal do Áudio Visual da FCM, pela colaboração, dedicação e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Luiz Tadeu e amigo Victor Hugo pela atenção e colaboração no início do trabalho.

Aos amigos Diego, Marinalva e Lúcia, pela lição de vida e dedicação.

Aos professores da graduação e pós-graduação, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos amigos da Turma/92 de Biologia da UNESP-RC, em especial Elaine, Claudinha, Halyê, Charuto e Jiraia, pelos momentos inesquecíveis.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela contribuição financeira através da concessão de bolsa de mestrado.

À todos os pacientes imunocomprometidos que participaram deste trabalho, cuja colaboração foi fundamental para sua conclusão.

1.6.4. Identificação de Antígenos Virais - Antigenemia.....	18
1.6.5. Métodos Moleculares	
1.6.5.a.Hibridação de Ácidos Nucleicos.....	18
1.6.5.b. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	19
1.6.5.c. Captura Híbrida.....	23
1.7. Linhagens de Citomegalovírus.....	23
1.7.1. Glicoproteína B.....	24
1.8. Determinação da Carga Viral.....	26
1.9. Profilaxia e Monitoramento da Infecção por CMV.....	28
2. Objetivos.....	30
3. Casuística	
3.1. Genotipagem.....	31
3.2. Quantificação	
3.2.1. Sistema de Captura Híbrida <i>DIGENE®</i>	31
3.2.2. Diluição Limitante.....	32
4. Métodos	
4.1. Extração do DNA	
4.1.1. Preparação das Amostras.....	33
4.1.2. Lise das Hemáceas.....	33
4.1.3. Lise dos Leucócitos.....	33
4.1.4. Precipitação do DNA.....	34
4.2. Amplificação Gênica (PCR) para o CMV	
4.2.1. Condições da Reação.....	34

4.2.2. Detecção.....	36
4.3. Amplificação Gênica (PCR) para β -Globina Humana.....	36
4.4. Normas Aplicadas para se Evitar Contaminação.....	37
4.5. Identificação das Linhagens de CMV	
4.5.1. Condições da Reação.....	38
4.5.2. Detecção.....	40
4.5.3. Análise de Restrição.....	40
4.6. SSCP (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>).....	41
4.7. Quantificação do DNA de CMV	
4.7.1. Captura Híbrida <i>DIGENE</i> [®]	43
4.7.2. Diluição Limitante.....	45
4.8. Sequenciamento do Fragmento de DNA Amplificado	
4.8.1. Purificação.....	47
4.8.2. Reação de Terminação.....	48
4.8.3. Reação de Sequenciamento.....	49
4.8.4. Eletroforese em Gel Desnaturante.....	49
4.9. Teste Estatístico.....	49
5. Resultados	
5.1. Padronização da “Nested-PCR” para Amplificação da gB.....	50
5.2. Genotipagem do CMV através da gB.....	53
5.2.1. Análise de Restrição (RFLP).....	53
5.2.2. SSCP.....	58
5.3. PCR e RFLP para gH.....	60

5.4. Sequenciamento das Linhagens Encontradas.....	62
5.5. Quantificação: Captura Híbrida <i>DIGENE</i> ®.....	65
5.6. Quantificação: Diluição Limitante.....	69
5.7. Resultados Estatísticos para a Genotipagem.....	71
6. Discussão.....	82
7. Conclusões.....	88
8. Summary.....	89
9. Referências Bibliográficas.....	91
10. Apêndice.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01. Estrutura do Citomegalovírus Humano (HCMV).....	03
Figura 02. Organização do Genoma do HCMV.....	04
Figura 03. Ciclo Replicativo do HCMV.....	06
Figura 04. Amplificação Gênica através da “Nested-PCR”	22
Figura 05. Amplificação da Região da Glicoproteína B do HCMV.....	52
Figura 06. Padrões de Digestão (gB) Encontrados para as Amostras Analisadas.....	56
Figura 07. Padrão de Digestão (gB) Encontrado para a Amostra com Mistura de Linhagens.....	57
Figura 08. Padrões Conformacionais por SSCP para as Amostras dos Genotipos gB1 – gB4....	59
Figura 09. Amplificação e Digestão da Região da Glicoproteína H do HCMV.....	61
Figura 10. Sequenciamento Direto de Amostras Amplificadas através da “Nested-PCR”.....	63
Figura 11. Amplificação da Região LA do HCMV: Quantificação pela Diluição Limitante.....	70
Gráfico 01. Frequência dos Subtipos de HCMV por Grupo de Pacientes.....	53
Gráfico 02. Gravidade das Manifestações Clínicas por Grupo de Pacientes.....	55
Gráfico 03. Gravidade das Manifestações Clínicas por Subtipo de HCMV.....	55
Gráfico 04. Relação de Resultados entre PCR e Antigenemia vs Captura Híbrida.....	68
Quadro 01: Padrão de Digestão para gB de HCMV Utilizando-se as Enzimas <i>Rsa</i> I e <i>Hinf</i> I.....	41
Quadro 02: Alinhamento de Representantes das Linhagens Encontradas.....	64
Tabela 01. Pacientes Estudados para a Tipagem através da Glicoproteína B.....	106
Tabela 02. Pacientes Estudados para a Quantificação por Captura Híbrida.....	113
Tabela 03. Pacientes Estudados para a Quantificação pela Diluição Limitante.....	117
Tabela 04. Sequência dos “Primers” Utilizados para a Detecção do HCMV.....	35
Tabela 05. Sequência dos “Primers” para Amplificação do Gene da β -globina Humana.....	36

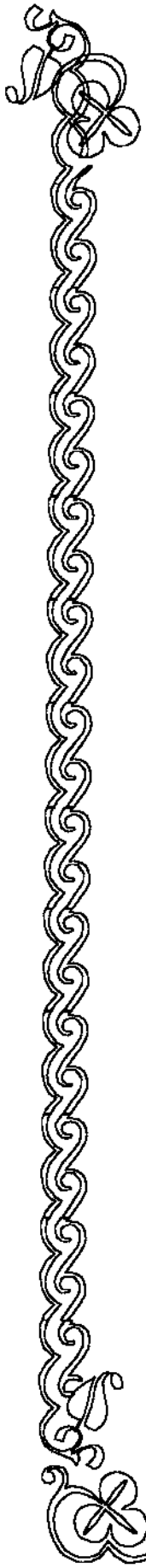
Tabela 06. Seqüência dos “Primers” para a Amplificação das regiões gB e gH do HCMV.....	38
Tabela 07. Seqüência dos “Primers” para a Amplificação do Gene “Late Antigen”	46
Tabela 08. Principais Manifestações Clínicas Observadas nos Prontuários.....	54
Tabela 09. Resumo dos Resultados Obtidos em Relação à Captura Híbrida.....	68
Tabela 10. Frequência de cada Grupo de Pacientes em Relação à População Estudada.....	71
Tabela 11. Frequência das Linhagens de HCMV em Amostras de Sangue	71
Tabela 12. Frequência das Linhagens de HCMV em Amostras de Urina	72
Tabela 13. Importância da Infecção pelo HCMV em Pacientes Imunocomprometidos.....	72
Tabela 14. Frequência das Variáveis para Pacientes HIV Positivos.....	73
Tabela 15. Frequência das Variáveis para Pacientes com Infecção Congênita pelo HCMV.....	74
Tabela 16. Frequência das Variáveis para Pacientes Transplantados Hepáticos.....	75
Tabela 17. Frequência das Variáveis para Pacientes Transplantados Renais.....	76
Tabela 18. Frequência das Variáveis para Pacientes Transplantados de Medula Óssea.....	77
Tabela 19. Frequência das Variáveis para demais Pacientes Imunocomprometidos.....	78
Tabela 20. Análise Estatística (1): Grupos de Pacientes vs Linhagens de HCMV.....	79
Tabela 21. Análise Estatística (2): Grupos de Pacientes vs Linhagens de HCMV.....	80
Tabela 22. Análise Estatística: Grupos de Pacientes vs Gravidade do Quadro Clínico.....	81

ABREVIACÕES

HCMV	Citomegalovírus Humano
AD169	Linhagem de HCMV isolada em laboratório
HHV-5	Herpes Vírus Humano tipo 5
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Kb	Kilobases
Pb	Pares de bases
Kpb	Kilo pares de bases
U_L	Seqüência única longa (“Unique Long”) do genoma do HCMV
U_S	Seqüência única curta (“Unique Short”) do genoma do HCMV
IR_L / IR_S	Seqüências invertidas repetidas do genoma do HCMV (“Inverted Repeats”)
TR_L / TR_S	Seqüências de terminações repetidas do genoma do HCMV (“Terminal Repeats”)
IE	Período de expressão gênica “Immediate Early” – imediatamente precoce
E	Período de expressão gênica “Early” – precoce
L	Período de expressão gênica “Late” – tardia
pH	Potencial hidrogeniônico
HSV	Vírus <i>Herpes simplex</i>
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TMO	Transplante de Medula Óssea
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
FC	Reação de Fixação de Complemento

IFI	Imunofluorescência Indireta
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” – teste sorológico imunoenzimático
RIA	Radioimunoensaio – método sorológico
Fc	Porção da molécula da imunoglobulina
Fab	Porção da molécula da imunoglobulina
pp65	Proteína matricial de peso molecular 65 kD
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
P₃₂	Fósforo 32
Mab	Anticorpo Monoclonal
gB e gH	Glicoproteínas do envelope do HCMV
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism” – Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
SSCP	“Single Strand Conformation Polymorphism” – Polimorfismo de conformação de fita simples
GVHD	Doença de enxerto contra o hospedeiro
PBL	Leucócitos do sangue periférico
L-DNA	LeucoDNAemia
P-DNA	PlasmaDNAemia
LA	Região gênica “Late Antigen”
CSF	Fluido cerebrospinal
CNS	Sistema nervoso central
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
rpm	Rotações por minuto
M	Molar
TKM1/ TKM2	Tampões de lise celular
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

SDS	Duodecil sulfato de sódio
dH₂O	Água destilada, deionizada e estéril
ml	Mililitros
mM	Milimolar
pmol	Picomoles
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifostato
μl	Microlitros
U	Unidades
V	Volt
V/h	Volt por hora
mA	Miliampere
mm	Milímetros
W	Watt
g	Força gravitacional
pg	Picogramas
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
(α-³³P)ddATP	Dideoxi adenosina trifostato conjugado com fósforo 33
TTE	Tampão para eletroforese (Tris, Taurina e EDTA)
TEMED	N, N, N', N' – tetrametilenodiamino
RLU	Unidade de luz relativa



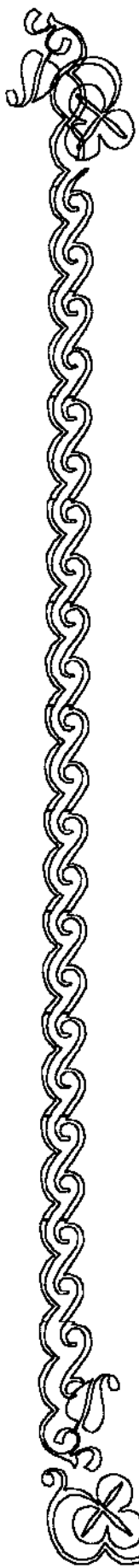
Resumo

RESUMO

O Citomegalovírus Humano (HCMV) é um dos mais importantes agentes infecciosos que acometem pacientes imunocomprometidos, causando significativa morbidade e mortalidade nesse grupo. A detecção do genoma do HCMV pela PCR (Reação em cadeia da polimerase) é específica e sensível e pode servir como uma poderosa ferramenta para o diagnóstico precoce da infecção causada por esse vírus. Variações em regiões funcionalmente relevantes do genoma do HCMV têm sido usadas como marcadores genéticos em numerosos estudos clínicos para diferenciar as linhagens e associá-las a patogênese viral e manifestação clínica no paciente. As glicoproteínas do envelope do citomegalovírus são provavelmente essenciais para a entrada e disseminação viral nas células hospedeiras; são também importantes alvos da resposta imune humana que induz a formação de anticorpos de neutralização do vírus. A PCR, combinada com análise de restrição de regiões polimórficas de produtos amplificados (PCR-RFLP), é eficaz para identificação dos genotipos de HCMV, sendo possível a distinção de pelo menos 4 padrões eletroforéticos.

Por outro lado, a determinação da carga viral em pacientes comprometidos imunologicamente, tem sido associada como marcador ou preditor para o desenvolvimento de doença órgão-específica pelo HCMV, sendo de fundamental importância para a monitorização da terapêutica. Além disso, o valor da carga viral está relacionado com o grupo de paciente e/ou tipo de transplante, patogênese do HCMV e níveis de imunossupressão e pode indicar o início da terapia antiviral.

Sabendo-se da importância da identificação das linhagens de HCMV em pacientes imunocomprometidos, sua possível relação com a infectividade e apresentação clínica, e a relevância da determinação da carga viral nos diversos grupos, este trabalho, avaliando diferentes populações imunologicamente comprometidas atendidas no HC-UNICAMP, teve como objetivos principais: determinar a prevalência dos genotipos de HCMV e avaliar uma possível associação do subtipo com



Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

O Citomegalovírus humano (HCMV), identificado em 1904 por Ribbert, é o agente etiológico da “doença de inclusão citomegálica” e cuja denominação deriva-se do efeito citopático característico, representado pelo aumento do volume celular por inclusões intranucleares e citoplasmáticas observadas no tecido infectado (MURRAY, 1997; MAYA & AZULAY, 2000). Células com características semelhantes têm sido descritas desde 1881 e em 1921, Goodpasture e Talbot reportaram um caso fatal associado a esse vírus envolvendo pulmão, fígado e rim de uma criança recém-nascida (DREW, 1988). Inclusões pequenas mas similares àsquelas encontradas foram observadas por Tyzzer em biópsia de lesão de pele causada por varicela e Lipschutz foi quem primeiro reconheceu esta similaridade e postulou uma etiologia viral para a “Doença de Inclusão Citomegálica” (ALFORD & BRITT, 1990).

Cole e Kuttner, em 1926, puderam demonstrar que o vírus estava presente em glândulas submaxilares de cobaia e que a sua presença estava associada com células que continham corpúsculos de inclusão. O primeiro estudo sistemático sobre prevalência desta infecção em crianças foi realizado por Farber e Wolbach em 1932, encontrando células citomegálicas típicas nas glândulas salivares de 14% das crianças analisadas (PLACHTER, SINZGER & JAHN, 1996). Fetterman, em 1952, diagnosticou “Doença de Inclusão Citomegálica” por exame citológico de urina e Minder (1953), utilizando a microscopia eletrônica, identificou a partícula viral de 105 nm de diâmetro (DREW, 1988; MAYA & AZULAY, 2000). Margaret Smith conseguiu, em 1954, isolar o vírus em cultura de tecido, usando a infecção de glândula salivar de cobaia como modelo (COSTA, 1999).

Através das técnicas de cultura celular, o HCMV foi independentemente isolado por três laboratórios distintos, em amostras de urina e tecido de crianças com manifestações clínicas de

provável infecção pelo vírus (PLACHTER, SINZGER & JAHN, 1996; DREW, 1988; COSTA, 1999). Smith conseguiu isolar o vírus das glândulas salivares de 2 crianças - uma morreu de infecção citomegálica generalizada; no mesmo ano, Rowe *et al.* isolaram três linhagens de HCMV de tecido adenoidal de crianças submetidas a adenoidectomia e a partir destes estudos, conseguiram adaptar uma linhagem de HCMV em laboratório (AD169), replicando em culturas de fibroblastos humanos. Weller *et al.* reconheceram o vírus em amostras de urina e pulmão de crianças com doença de inclusão citomegálica generalizada. Em cada laboratório foi detectado um efeito citopático idêntico (ALFORD & BRITT, 1990).

A partir de 1960, com a evolução nos processos cirúrgicos para transplantes, a infecção pelo HCMV começa a ser reconhecida como uma patologia de importância clínica, sendo considerado o principal agente patogênico em hospedeiros com o sistema imunológico comprometido. Na década seguinte, foram organizados grupos de estudo para avaliar o impacto da infecção nos pacientes imunocomprometidos e propor medidas para manter a infecção sob controle. Foi iniciada, em 1980, a utilização de medidas para o controle do vírus com agentes antivirais e intervenções imunológicas, e 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 Citomegalovírus Humano

O HCMV pertence à família *Herpesviridae*, sub-família *Betaherpesvirinae* e gênero *Cytomegalovirus*. É considerado o maior membro da família e possui ultra-estrutura semelhante à de outros Herpes vírus, comprovada por microscopia eletrônica, por isso é também conhecido como Herpes Vírus Humano tipo 5 (HHV-5) (MOCARSKI *et al.*, 1990; BROWN & ABERNATHY, 1998; COSTA, 1999). Essa classificação é baseada nas propriedades biológicas de especificidade ao hospedeiro, ciclo de replicação e efeitos citopáticos e em geral, os CMVs são viroses espécie-

específicas para replicação e patogênese (STINSKI, 1990). Têm sido isolados de muitos vertebrados diferentes - entre eles: camundongos, porquinhos-da-índia, macacos, inclusive o homem (MUSTAFA, 1994; ALFORD & BRITT, 1990).

A partícula viral consiste de um núcleo de 64 nm, no interior do qual se encontra o material genético; um capsídeo icosaédrico de 110 nm de diâmetro e composto por 162 capsômeros que envolve o núcleo. O vírion completo é cercado por um envelope lipídico e tem um diâmetro final de 200nm (MUSTAFA, 1994; COSTA, 1999) (*Figura 01*).

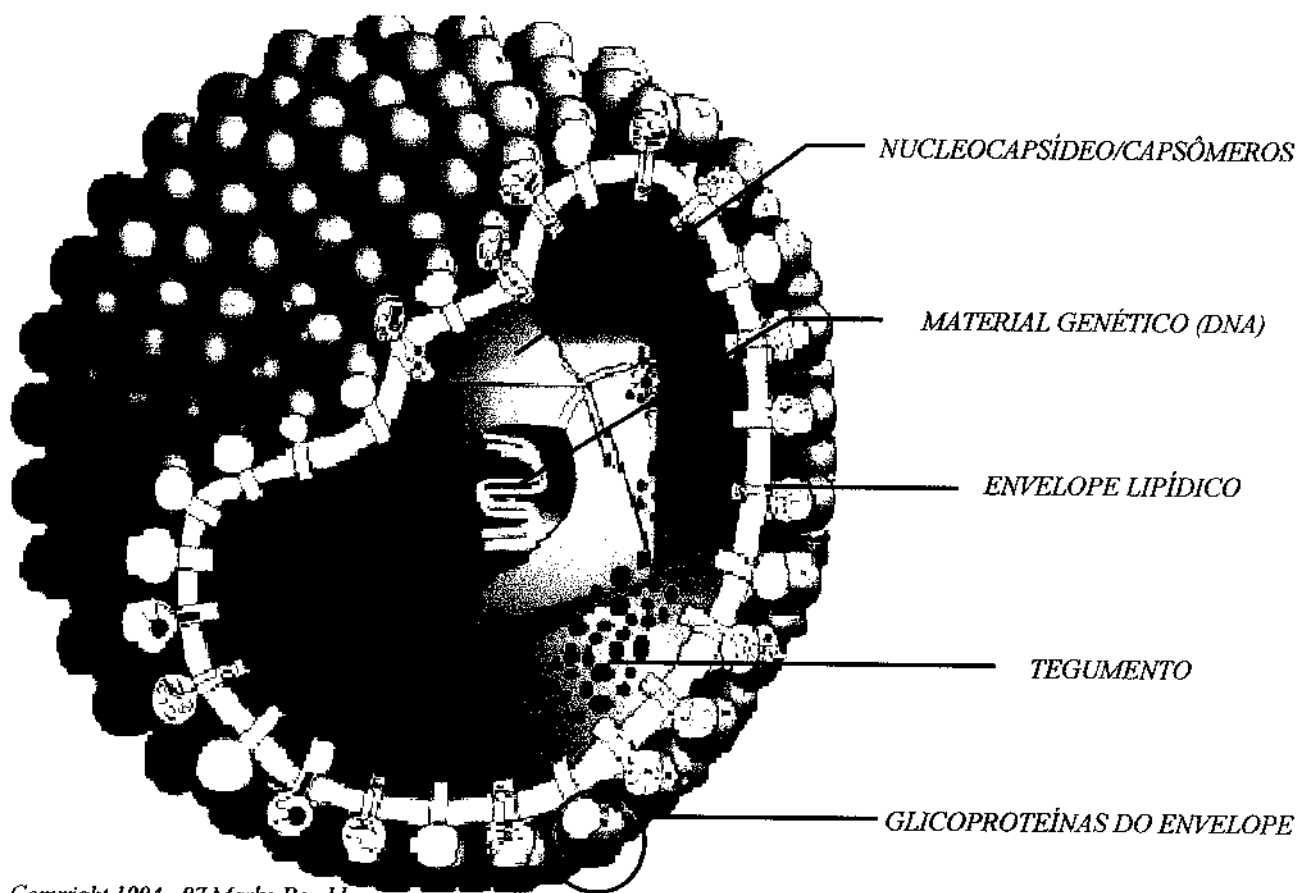


Figura 01 – Estrutura do CMV (www.biografix.de/hcmv/html/metaframe/htm)

O genoma do HCMV é constituído de uma cadeia dupla de DNA linear, com aproximadamente 240 kb (COSTA, 1999). Quando denaturadas, as fitas de DNA do CMV tendem a se anelar e formar “loop”, indicativo de que as moléculas possuem dois pares de repetições invertidas que subdividem o genoma em um segmento grande, correspondente a uma única região (U_L , 174 kpb) que está inserida entre repetições invertidas (IR_L / TR_L) e um segmento pequeno (U_S), que é uma sequência única de 35,6 kpb flanqueada por repetições curtas invertidas (IR_S / TR_S) (**Figura 02**) (RÜGER, BORNKAMM & FLECKENSTEIN, 1984; SPECTOR *et al.*, 1990).

Recentemente, foi observado que RNA era purificado das partículas virais. Este mecanismo da expressão gênica dos herpesvírus permite que os genes virais sejam expressos no interior da célula infectada imediatamente após a entrada viral e na ausência de transcrição do genoma viral. Não se sabe ainda a função das proteínas codificadas por esse RNA (BRESNAHAN & SHENK, 2000).

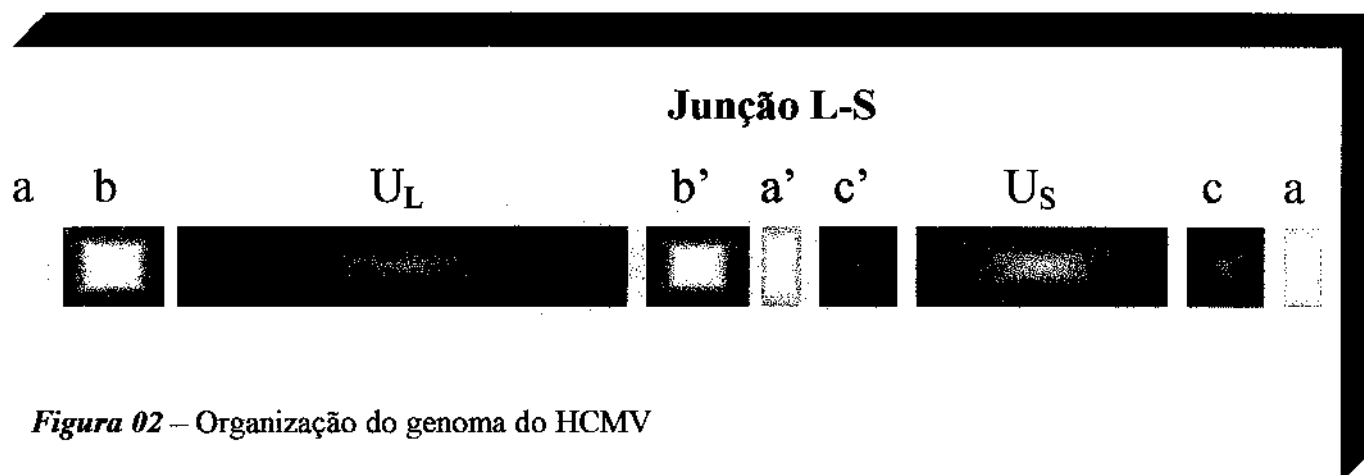


Figura 02 – Organização do genoma do HCMV

Os genes virais são expressos nos períodos: imediatamente precoce (0 - 2h), precoce (2 - 24h), e tardio (após 24h) pós-infecção e as proteínas são classificadas como α , β ou γ , respectivamente. As proteínas que são sintetizadas durante os períodos IE (“immediate early”) e E (“early”) são geralmente associadas com regulação da replicação do vírus, enquanto as sintetizadas no período L (“late”), as proteínas γ , são elementos estruturais (RASMUSSEN, 1990).

Apesar da especificidade, é notável a similaridade de muitos genes e elementos regulatórios entre os vírus que infectam humanos e animais (MUSTAFA, 1994; ALFORD & BRITT, 1990; STINSKI, 1990). O CMV é um vírus extremamente lábil a 37°C, é inativado a 56°C durante 30 minutos, baixo pH (<5), exposição ao éter 20% por 2 horas, luz ultravioleta por 5 minutos e ciclos de congelamento e descongelamento; é mais estável na urina a 4°C (DREW, 1988; BROWN & ABERNATHY, 1998; COSTA, 1999).

1.3. Mecanismos de Replicação e Regulação Gênica do HCMV

Apesar do tamanho e complexidade do genoma e capacidade de expressar muitos genes, os betaherpesvírus mostram uma forte associação e dependência pelas células hospedeiras. No hospedeiro natural, algumas células são mais susceptíveis à infecção que outras. (STINSKI, 1990). Os mecanismos moleculares que determinam a permissividade das células para a replicação do HCMV não são entendidos, mas sabe-se que o vírus pode penetrar uma variedade de células humanas e não-humanas sem que ocorra a replicação. Concluiu-se, desse modo, que fatores celulares determinam as consequências da infecção pelo HCMV após a entrada viral (MOCARSKI *et al.*, 1990; PLACHTER, SINZGER & JAHN, 1996).

A replicação do HCMV em cultura celular e após infectar o hospedeiro é lenta, e o período de possível doença pelo vírus é prolongado, podendo a partir daí, permanecer latente. Para iniciar a infecção, é necessário que o vírus seja adsorvido aos receptores de superfície celular, seguido da fusão do envelope viral com a lamela externa da membrana citoplasmática. A partir daí, o capsídeo é transportado para os poros nucleares e o DNA é liberado no núcleo celular, onde ocorrem a transcrição, replicação do DNA viral e produção de novos capsídeos (SILVA, 2000).

O padrão de replicação do HCMV é similar ao do HSV (vírus *Herpes simplex*) e o ciclo replicativo pode ser dividido em três períodos (www.science.mcmaster.ca/biology/virology/)

- IE (α)- período em que os genes são transcritos através de enzimas nucleares, os mRNAs são transportados para o citoplasma e são traduzidos; ocorre a produção de certas proteínas regulatórias que são transportadas para o núcleo e que permitem ao vírus ter controle da síntese macromolecular da célula hospedeira. Os genes transcritos nesse período podem ter influência na expressão de outros genes virais, seus próprios genes, e possivelmente genes celulares;
- E (β) - começa após o período IE e é caracterizado pela replicação do DNA viral, produção de proteínas nas células infectadas e produção da progênie;
- L (γ), período em que componentes estruturais do vírus são produzidos e o vírus infectante é eliminado da célula (STINSKI, 1990; MUSTAFA, 1994; MURPHY, 1996).

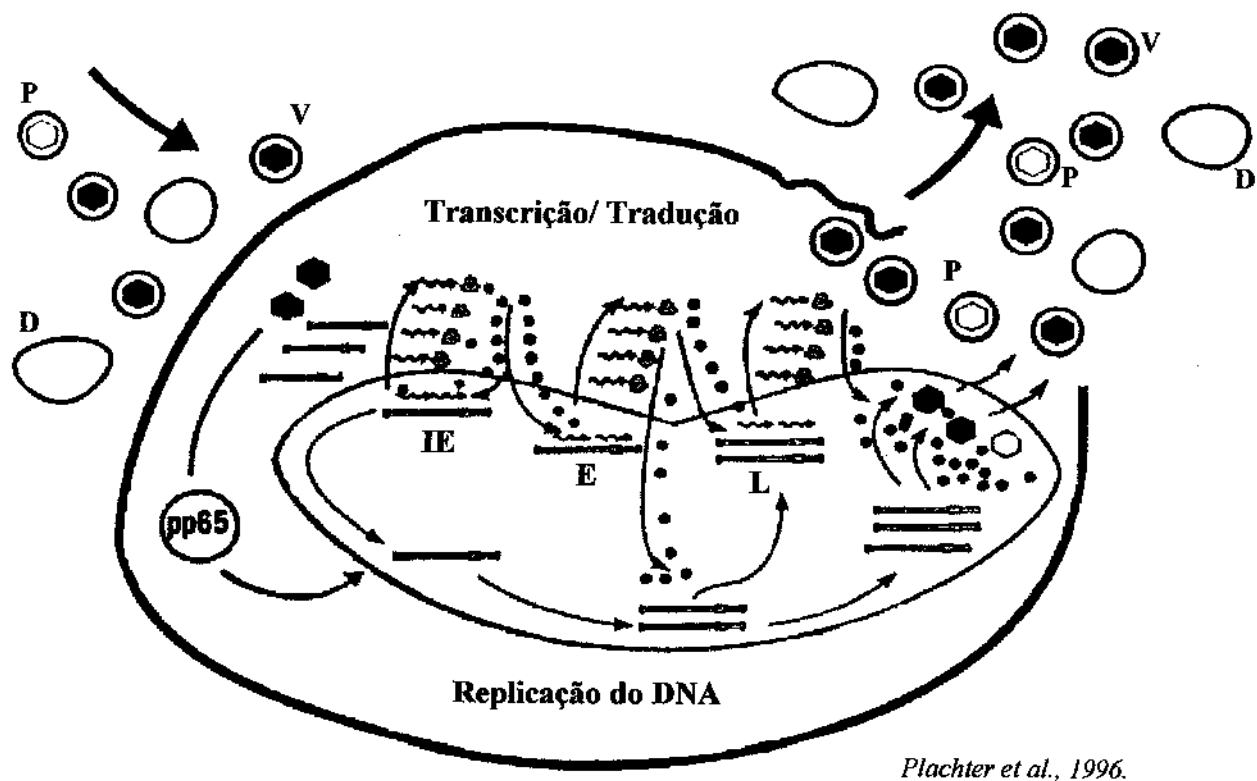


Figura 03 – Ciclo Replicativo do HCMV – Vírus (V), Partículas Virais não-infectantes (P), Corpos Densos (D), Períodos de replicação do CMV: “Immediate early” (IE), “Early” (E), “Late” (L).

1.4. Epidemiologia e Transmissão

Um dos mais intrigantes aspectos da biologia do CMV é a distribuição altamente eficiente do vírus em toda a população, enquanto a associação com sintomas graves causados pela infecção é um evento relativamente raro. Em adultos, de 40 – 100% dos indivíduos são infectados, indicado pela presença de anticorpos contra o HCMV (MUSTAFA, 1994; PLACHTER, SINZGER & JAHN, 1996).

Acredita-se que os seres humanos sejam os únicos reservatórios para o HCMV, e a transmissão ocorre por contato direto ou indireto entre pessoas. A transmissão horizontal e vertical do vírus se dá por contato próximo e/ou íntimo e inclui: secreções orofaríngeas, urina, excreções cêrvica e vaginal, fluidos espermáticos, leite materno, lágrimas, fezes, e sangue; o que inclui transfusões sanguíneas e órgãos transplantados (ALFORD & BRITT, 1990; BRUGGEMAN, 1993; BROWN & ABERNATHY, 1998).

Existe uma correlação aproximada entre a prevalência do anticorpo para o vírus e as condições sócio-econômicas da população. Quando utiliza-se detecção do anticorpo como marcador da infecção, a prevalência da infecção pelo HCMV é maior em situações de pobreza. Análises de estudos de prevalência da infecção relacionada à idade sugerem pelo menos 2 períodos de aumento da infecção durante o tempo de vida: o primeiro é o período perinatal, demonstrado pela virúria; e o segundo ocorre durante os anos de maturidade sexual (hetero e homossexual) (DREW, 1988(b); MUSTAFA, 1994; BROWN & ABERNATHY, 1998).

A fonte mais comum para infecção primária pelo HCMV em mulheres adultas em idade reprodutiva é a propagação intrafamiliar do vírus de uma pessoa infectada para outra. Os vírus geralmente entram na família por uma criança com HCMV, comumente infectada durante a pré-escola ou primário; o vírus é excretado pela criança por um período prolongado através da urina e pode contaminar objetos plásticos como brinquedos, daí a alta frequência do vírus nessa faixa etária.

Após a puberdade, a transmissão do HCMV ocorre principalmente por contato sexual (BRUGGEMAN, 1993; BROWN & ABERNATHY, 1998).

Após a infecção, o CMV não é eliminado; ao invés disso, o vírus pode escapar do sistema imunológico do hospedeiro e pode permanecer em estado latente (como outras herpesvíroses), podendo ser reativado intermitentemente, ou persistir com baixa viremia. Estas condições permitem a transmissão do vírus a novos hospedeiros (SHEN *et al.*, 1996; BRUGGEMAN, MARJORIE, NELISSEN-VRANCKEN, 1999).

A doença clínica pelo HCMV pode ser resultante de três padrões epidemiológicos: infecção primária em indivíduos previamente soronegativos; secundária por reativação da infecção latente e ainda secundária por reinfecção por outras linhagens do vírus (HIBBERD & SNYDMAN, 1995; MURRAY, 1997; PATEL & PAYA, 1997; MAYA & AZULAY, 2000). A incidência de doença sintomática é diferente nestas três formas de apresentação da infecção pelo HCMV. Cerca de dois terços dos pacientes com infecção primária desenvolvem sintomas; por outro lado, menos de 20% dos que apresentam reativação viral tornam-se sintomáticos e por volta de 40% dos reinfectedos têm sintomatologia atribuíveis ao CMV (COSTA, 1999).

1.5. Patogênese e Manifestações Clínicas

O HCMV possui baixa patogenicidade; é um vírus citopático e conseqüentemente pode produzir destruição do tecido (ALFORD & BRITT, 1990). Os problemas relacionados aos mecanismos pelos quais os vírus escapam das defesas do hospedeiro e invadem as células, a habilidade em infectar vários tipos celulares, o dano imunológico induzido pela infecção, os sítios de latência e os mecanismos que regulam a reativação viral têm sido alvo de estudos (CHOU, 1992).

Em geral, a patogênese do CMV é semelhante à de outras herpesvíroses, com a capacidade de: propagação de uma célula a outra sempre na presença do anticorpo circulante; estabelecimento de

infecção latente no hospedeiro; reativação em condições de imunossupressão; e indução de imunossupressão, mesmo passageira, no receptor (DREW, 1988(b)).

A infecção pelo Citomegalovírus é comum e na grande maioria dos casos, subclínica, portanto a associação com doença é um acontecimento raro. Entretanto, a distinção entre infecção ativa e doença por HCMV é fundamental. Infecção é definida como soroconversão (um aumento de 4 vezes ou mais no título de anticorpos para HCMV em pacientes soronegativos ou soropositivos) ou circulação do vírus por qualquer fluido corporal como urina, sangue ou secreções nasofaríngeas; pode ser primária ou secundária (ativação da infecção latente ou reinfecção). Para a caracterização de doença clínica pelo HCMV, além das evidências laboratoriais de infecção ativa, faz-se necessária a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas por esse vírus (MUSTAFA, 1994; TONG, 1997).

Estudos com animais têm demonstrado que a fase virêmica (desde alguns dias a várias semanas dependendo do estado imunológico do hospedeiro) resulta na disseminação do vírus a muitos órgãos como pulmão, coração, baço, fígado, rim, glândulas adrenais, pele e medula óssea (BRUGGEMAN, 1993). As manifestações clínicas e a gravidade da infecção pelo HCMV é maior nas infecções primárias embora possam variar de assintomáticas a grave, envolvendo risco de vida, além disso, é um fator de risco para superinfecção com outros patógenos oportunistas (MURRAY, 1997; ROSEN *et al.*, 1997).

Pessoas saudáveis com infecção pelo HCMV geralmente são assintomáticas ou têm uma leve manifestação da doença semelhante à mononucleose, caracterizada por quadro febril prolongado, astenia, sudorese e hepatoesplenomegalia. (KRAUSE & STRAUS, 1999; COSTA, 1999).

Contudo, nas diferentes condições relacionadas à imunodepressão, o HCMV pode provocar doença grave e os grupos de maior risco são: recém-nascidos (infecção congênita), receptores de

transplante de órgãos, pacientes com câncer submetidos à quimioterapia, e os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (MAYA & AZULAY, 2000; COSTA, 1999).

1.6.1. Infecção Congênita pelo HCMV

A infecção congênita pelo HCMV é adquirida pela transmissão vertical e geralmente é assintomática. A incidência varia de 0,5% a 2,0% de todos os nascimentos vivos e cerca de 10% das crianças infectadas são sintomáticas ao nascimento. Dentre as anormalidades sintomáticas observadas estão: microcefalia, hepatoesplenomegalia, hiperbilirrubinemia, coriorretinite, calcificações periventriculares, pneumonia, restrição do crescimento intrauterino e ventriculomegalia. A taxa de mortalidade entre as crianças sintomáticas é de 20% a 30% e aproximadamente 90% dos sobreviventes desenvolvem sérias seqüelas neurológicas, como retardo mental, perda da audição, comprometimento da visão, entre outras. Além disso, de 5% a 15% das crianças infectadas que são assintomáticas podem, durante a vida, sofrer perda da audição, como consequência da infecção congênita pelo HCMV (DREW, 1988(b); ALFORD & BRITT, 1990; MUSTAFA, 1994; SCOTT *et al.*, 1997; MAYA & AZULAY, 2000).

Infecções perinatais podem ocorrer por contaminação durante o parto, pela ingestão de leite contaminado e por eventuais transfusões sanguíneas; a maioria dos casos é assintomática, mas podem ser observados quadro de hepatite ou pneumonite e ainda síndrome do tipo mononucleose com anemia hemolítica e trombocitopenia (MAYA & AZULAY, 2000).

1.6.2. Infecção por HCMV em Pacientes Transplantados

A infecção pelo HCMV vem sendo caracterizada como uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos, e os principais alvos para este patógeno são os

receptores de órgãos como: rim, coração, fígado e medula óssea) (LJUNGMAN, 1996; PATEL & PAYA, 1997; COSTA *et al.*, 1999).

O risco da infecção pode estar relacionado com o estado sorológico tanto do doador quanto do receptor. É fundamental considerar o papel de imunossupressão iatrogênica no desenvolvimento da infecção, e drogas como a ciclofosfamida, azatioprina e ciclosporina têm sido implicadas como facilitadoras da doença pelo HCMV (ZAIA & FORMAN, 1995; KONTOYIANNIS & RUBIN, 1995; MAYA & AZULAY, 2000), podendo levar à replicação viral descontrolada e conseqüente infecção sintomática (PATEL & PAYA, 1997).

Além das manifestações próprias da doença viral, o HCMV parece ser imunossupressor, e a infecção por este agente foi considerada um fator de risco independente para o desenvolvimento de superinfecções com patógenos oportunistas (bactérias e outros vírus), além da relevância na participação do processo de rejeição aos órgãos transplantados (HIBBERD & SNYDMAN, 1995; ROSEN, *et al.* 1997; MAYA & AZULAY, 2000).

Nesse grupo de pacientes, a infecção pode ser primária com origem em fontes diversificadas, incluindo o próprio enxerto, ou secundária, quando o indivíduo tem infecção latente (MAYA & AZULAY, 2000), sendo que as infecções primárias geralmente são mais graves (MUSTAFA, 1994).

A onipresença deste vírus, sua tendência a ser reativado quando as defesas do hospedeiro estão comprometidas e sua capacidade para disseminar a vários órgãos são características que podem ajudar a explicar sua ocorrência freqüente na população transplantada (COSTA *et al.*, 1999).

Dentre as complicações clínicas associadas à infecção pelo HCMV estão: pneumonia intersticial, doença gastrointestinal, retinite, pancitopenia, febre, demora na pega do enxerto em receptores de medula óssea (TMO) e rejeição do enxerto entre os receptores de órgão sólido (WALTER & BOWDEN, 1995; LJUNGMAN, 1996).

Evidências de replicação viral e sintomas clínicos nos transplantados são vistos dentro de um a quatro meses após a intervenção cirúrgica (COSTA, 1999).

1.6.3. Infecção por HCMV em Pacientes com HIV

Estudos sorológicos e de isolamento viral têm documentado uma prevalência extremamente alta da infecção por HCMV na população HIV-infectada (MUSTAFA, 1994). Uma vez que o sistema imunológico esteja prejudicado pelo HIV, as herpesviroses podem ser reativadas e causar doenças oportunistas ou ainda interagir com o HIV à nível celular ou molecular, como um cofator, para acelerar a replicação do vírus, causando a AIDS e/ou morte (GRIFFITHS, 1996; ROSEN *et al.*, 1997).

O HCMV pode induzir a retinite, podendo levar ao comprometimento ocular ou cegueira (DREW, 1988). Além disso, pode causar manifestações graves como: enterite, colite, pneumonite e envolvimento do sistema nervoso central (GRIFFITHS, 1996; MAYA & AZULAY, 2000). Nesse grupo de pacientes, o HCMV causa, frequentemente, doença disseminada e co-infecção com outros patógenos é muito comum (COSTA, 1999).

1.7. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico de infecção ativa pelo HCMV requer complementação laboratorial que demonstre o vírus, seus componentes, ou a presença de anticorpos específicos (MAYA & AZULAY, 2000). Os métodos diagnósticos, utilizados para detecção do HCMV, podem ser agrupados em 5 categorias: 1) isolamento viral; 2) métodos sorológicos; 3) exames citológicos e histopatológicos; 4) identificação de antígenos virais e 5) identificação de ácidos nucleicos.

1.7.1. Isolamento Viral

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

1.7.1.a.Cultura Clássica

O método habitualmente empregado para a detecção do vírus consiste em isolamento através da cultura de fibroblastos humanos, onde 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 suficientemente característico para identificação e pode ser confirmado pela técnica de imunofluorescência, utilizando-se anticorpos poli ou monoclonais específicos (PANNUTI *et al.*, 1987; DREW, 1988(a)).

1.7.1.b.Cultura com Isolamento Rápido

A utilização das técnicas de cultura rápida representa um grande avanço ao diagnóstico da infecção pelo HCMV. Com o emprego de anticorpos monoclonais, os antígenos virais precoce 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 da 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; 1986; DEGIROLAMI *et al.*, 1987; AGHA *et. al.*, 1988; LELAND, HANSING, FRENCH, 1989; LEE & HALSWORTH, 1990).

Esta metodologia tem suas limitações, ligadas principalmente à variação antigênica do vírus, o que torna recomendável a utilização de um conjunto de anticorpos monoclonais. A detecção do vírus

no sangue parece ter significado prognóstico e anteciparia o desenvolvimento de doença pelo HCMV (MAYA & AZULAY, 2000).

1.6.2. Métodos Sorológicos

Estes métodos detectam anticorpos produzidos contra os HCMV e não apresentam grande complexidade de execução. O requisito principal para a obtenção de resultados positivos é a capacidade do paciente apresentar resposta imunológica humoral adequada contra os 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 o meio mais acurado 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 pelos HCMV podem ser divididos em clássicos e modernos; os clássicos não discriminam anticorpos IgM e IgG e, dentre estes, são mais comuns o de neutralização viral e o de fixação de complemento e os modernos, por sua vez, discriminam anticorpos IgM e IgG, sendo comumente utilizados os de imunofluorescência, radioimunoensaio e imunoensaios enzimáticos (CLEWLEY, 1989; 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, o vírus é cultivado. Devido à demora no cultivo celular, a neutralização viral vem sendo abandonada como método diagnóstico (SUASSUNA & MACHADO, 1992).

A reação de fixação de complemento (FC) para diagnóstico da infecção pelo HCMV é uma técnica muito difundida e as suas principais vantagens são: a facilidade de execução, disponibilidade de antígenos no comércio e amplo espectro de reatividade cruzada entre cepas diferentes de HCMV, além da não-reatividade com antígenos da *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; SUASSUNA & MACHADO, 1992; DREW, 1988(a)).

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

1.6.2.b. Métodos Sorológicos Modernos

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

❖ Imunofluorescência Indireta (IFI)

A IFI apresenta maior sensibilidade do que a FC, 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 pelos 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 falsos positivos. Uma modificação técnica para superar este problema é a utilização da IFI com anticorpos anti-complemento marcados com fluoresceína. Nesta situação, uma fonte de complemento (soro de cobaia) é adicionado ao soro do paciente. Somente anticorpos que se ligaram especificamente (pela porção Fab e não via receptor Fc) ao seu antígeno são capazes de ativar o sistema complemento. O anticorpo fluorescente secundário é dirigido

contra componentes do sistema complemento. Portanto, a fluorescência só será observada onde houver reação específica (REYNOLDS, 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 falsos positivos, quando existe a presença de fator reumatóide nos soros testados, sendo necessária a adsorção desses soros com látex visando minimizar este problema. Assim, a IFI é um método simples, com aplicação clínica confiável e com razoável sensibilidade e especificidade (REYNOLDS, STAGNO, ALFORD, 1979).

❖ Imunoensaios de Ligação

- Radioimunoensaio (RIA)
- Imunoensaio enzimático (ELISA)

Ambos utilizam os mesmos princípios analíticos, mudando apenas o tipo de substância reveladora empregada na leitura. Os RIA utilizam substâncias radioativas. Para o ELISA, emprega-se uma enzima (DEMMLER, 1986). O antígeno purificado é imobilizado numa placa de plástico, na 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 (anti-imunoglobulina 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 imunoenaios de desenvolvimento mais recentes 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, porém o alto custo do equipamento necessário para sua realização limita o uso do mesmo (BECKWITH *et al.*, 1985), finalmente, o ensaio com antígeno imobilizado em membrana (CMV CUBE). Este teste é rápido, com leitura visual de bom rendimento, porém, de alto custo para utilização em escala (MATHIESEN *et al.*, 1992; SUASSUNA & MACHADO, 1992).

1.6.3. Exames Citológicos e Histopatológicos

1.6.3.a.Citológicos

Os métodos citológicos para identificação do HCMV podem ser realizados em lavados, secreções e aspirados de tecidos (DREW, 1988(a); MAYA & AZULAY, 2000). Foi o primeiro método utilizado para se detectar a infecção pelo HCMV em pacientes vivos, por meio da pesquisa de células esfoliadas no material examinado. 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 tecido é feito por meio da visualização das inclusões virais. 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 hibridação *in situ* associados 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 sua realização (MAYA & AZULAY, 2000).

1.6.4. Identificação de Antígenos Virais - Antigenemia

A antigenemia é um método alternativo para a detecção rápida de viremia e que não requer cultura viral (CHOU, 1992). Estes testes podem ser realizados em citocentrifugados ou cortes de tecidos (SUASSUNA & MACHADO, 1992). Após fixar a preparação, é utilizado um anticorpo monoclonal de camundongo contra o antígeno precoce imediato do HCMV (pp65), como anticorpo primário. Em geral, o secundário é uma anti-imunoglobulina de camundongo conjugada a uma sonda enzimática ou fluorescente (imunofluorescência ou imunoperoxidase). A leitura, dependendo do conjugado, é feita no microscópio apropriado, observando-se a presença do substrato enzimático ou de fluorescência no núcleo das células infectadas. O tempo total do exame é inferior a 6 horas e a sensibilidade da técnica é boa (THE *et al.*, 1992).

Encontra limitação na especificidade do anticorpo empregado, na necessidade de rápido processamento do material colhido e em resultados falso-negativos em pacientes neutropênicos (MAYA & AZULAY, 2000).

1.6.5. Métodos Moleculares

1.6.5.a. Hibridação de ácidos nucléicos

O desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante, com a conseqüente clonagem e caracterização dos HCMV, tornou possível a detecção destes em amostras biológicas, por meio de

hibridação com sondas específicas que reconhecem exclusivamente a sequência dos genes virais (CHOU & MERIGAN, 1983; KAHAN & LAUNDERS, 1985; GLEAVES *et al.*, 1989).

Os métodos de diagnóstico com base na hibridação 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, essa técnica tem inconvenientes, devido à complexidade envolvida na sua realização (requer material e estrutura laboratorial nem sempre disponíveis), e à 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 & LAUNDERS, 1985; GLEAVES *et al.*, 1989).

1.6.5.b.Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Com o início 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. Todos os métodos anteriormente empregados no estudo de uma determinada porção de DNA tinham, como objetivo comum, aumentar a sensibilidade na detecção do fragmento alvo, que está presente em baixa concentração na amostra. Contrastando com esta orientação, 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, 1999) (*Figura 04*).

De fato, é possível conseguir expressiva amplificação do fragmento de DNA originário de uma única célula. 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 na fase precedente. Portanto, o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial (2^n), 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, 1999).

Embora a reação em cadeia da polimerase seja extremamente sensível, algumas considerações devem ser ressaltadas (GRIFFITHS & WHITLEY, 1993). A alta sensibilidade do método levanta a questão da possível detecção de genoma de partículas virais defectivas, incapazes de produzir infecção, limitando o seu valor no diagnóstico da infecção ativa. 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 resultados falso-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, trata-se de uma reação enzimática e várias substâncias presentes no material examinado podem inibir a reação, levando a resultados falsos negativos (BUFFONE *et al.*, 1991; KHAN *et al.*, 1991).

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

Vários trabalhos (DEMMLER *et al.*, 1988; CASSOL, 1989; HSIA *et al.*, 1989; OLIVE *et al.*, 1989; EVANS *et al.*, 1997) 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, no entanto, é uma metodologia mais rápida. Em todos estes trabalhos, os resultados foram alcançados após hibridação 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 foi alcançada pela técnica de “Nested PCR” (*Figura 04*), utilizada por PORTER-JORDAN *et al.* (1990) e, BRYTTING *et al.* (1991). Esta variação da PCR é uma técnica que amplifica uma sequência alvo em dois passos: na primeira amplificação, utiliza-se um par de “primers” específicos para um fragmento alvo desejado; a partir do produto desta 1ª 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, a “Nested-PCR” permite um diagnóstico mais rápido que a PCR simples seguida da hibridação específica (XU *et al.*, 1993; BRAINARD *et al.*, 1994; FOX *et al.*, 1995; EHRNST, 1996).

Amplificação do DNA por “Nested-PCR”

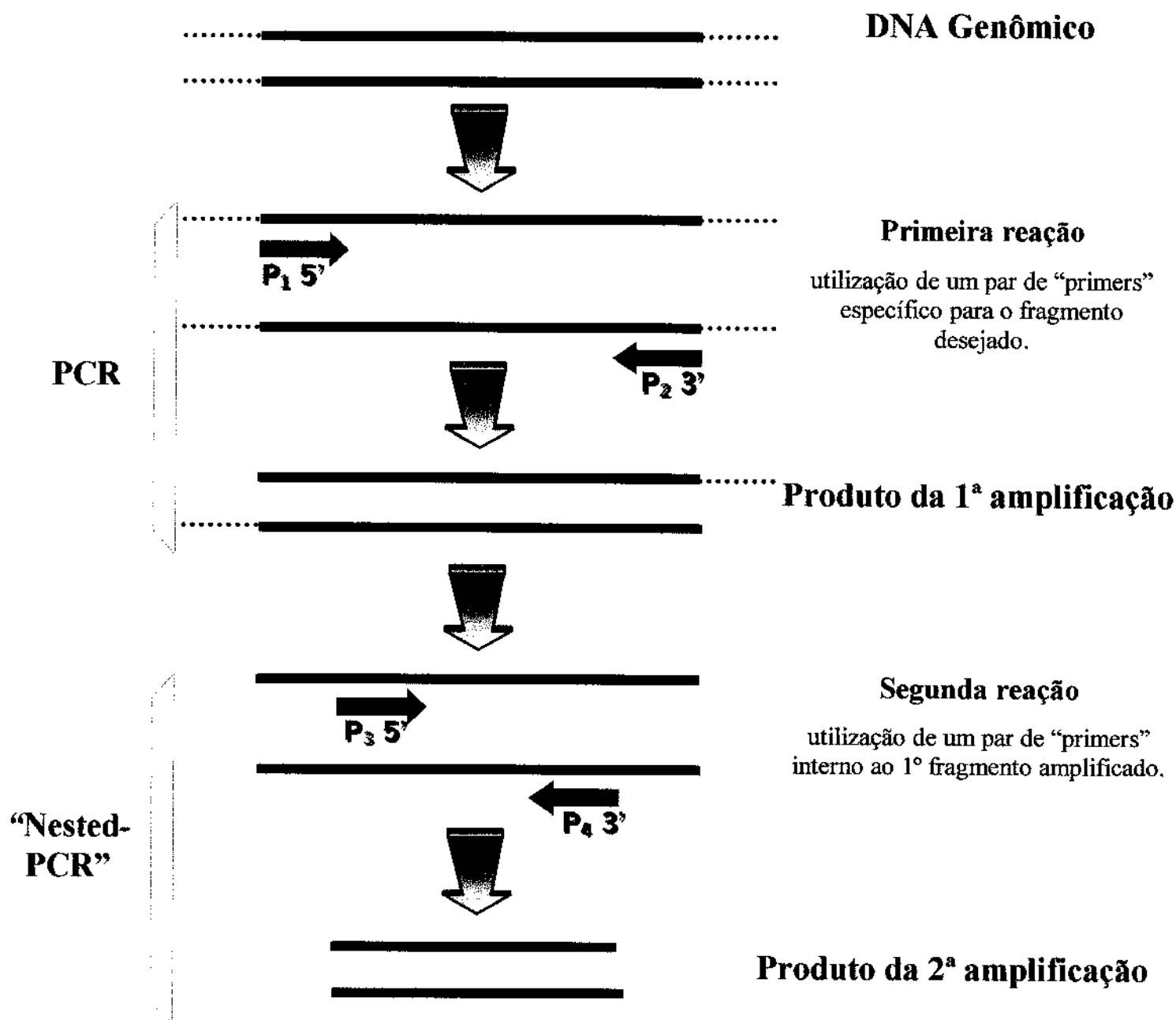


Figura 04: Esquema demonstrativo da “Nested-PCR”, maior sensibilidade e especificidade.

1.6.5.c. Captura Híbrida

Métodos comerciais para a detecção do genoma viral em sangue total ou leucócitos por técnicas de hibridação também estão disponíveis. No método de captura híbrida (Digene, USA; Murex, UK) uma sonda de RNA é utilizada para hibridar com o DNA viral e o híbrido resultante é então capturado por um anticorpo monoclonal (MAb) específico para o híbrido DNA:RNA. A detecção do sinal é através da quimioluminescência e pode fornecer resultados qualitativos e quantitativos (TONG, 1997).

1.7. Linhagens de Citomegalovírus

As regiões gênicas do HCMV são polimórficas. Cêpas epidemiologicamente não-relacionadas são únicas à nível de DNA (SHEPP *et al.*, 1996). Diferenças em genes funcionais (immediate early, glicoproteínas do envelope - gB e gH, polimerase, entre outros) podem existir entre as diversas linhagens de HCMV, influenciando sua capacidade em infectar linfócitos e células progenitoras hematopoiéticas, podendo ainda influenciar na virulência das linhagens virais (VOGELBERG *et al.*, 1996; HEBART *et al.*, 1997; WINGART *et al.*, 1998). Estas características também foram observadas em ratos (FRIES *et al.*, 1994; MEYER-KÖNIG *et al.*, 1998).

As cêpas podem ser agrupadas de acordo com as similaridades no DNA e sequência de aminoácidos de certas regiões polimórficas do gene (RASMUSSEN *et al.*, 1997; SHEPP, 1998); as variações entre elas têm sido usadas como marcadores genéticos em diversos estudos clínicos e consideram sua associação com a patogênese viral (HEBART *et al.*, 1997; TOROK-STORB *et al.*, 1997; RETIÈRE *et al.*, 1998; AQUINO & FIGUEIREDO, 2000).

Nenhum sistema de classificação sorológica para as linhagens de HCMV é reconhecido, no entanto, as variantes da estrutura do DNA foram primeiro demonstradas quando os padrões de

digestões com endonuclease de restrição do DNA viral, de origens diferentes, foram comparados (LEHNER, STAMMINGER & MACH, 1991; SHEPP *et al.*, 1996).

Análises enzimáticas por RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) têm mostrado que há, na população em geral, determinadas linhagens de CMV circulantes, cada uma com um perfil de restrição característico (DARLINGTON *et al.*, 1991).

No entanto, a técnica de RFLP do genoma viral é um procedimento ineficiente para análise de um número elevado de isolado viral, requer muito tempo para a replicação *in vitro* e além disso é dependente de grande quantidade de DNA. O problema da utilização de grande quantidade de DNA foi solucionado com a padronização da hibridação por Southern blot após a RFLP, mesmo assim o tempo consumido era muito. Com a introdução da PCR seguida da RFLP do produto amplificado, foi possível caracterizar a variabilidade genética do vírus, tornando-se uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos (CHOU, 1990; CHOU & DENNISON, 1992; SOUZA *et al.*, 1995; LASRY *et al.*, 1996).

1.7.1. Glicoproteína B

O maior componente do envelope do HCMV, a denominada glicoproteína B (gB), é essencial para a entrada viral na célula hospedeira e disseminação do vírus célula a célula; ela é também um importante alvo da resposta imune humana que induz à formação de anticorpos de neutralização (LASRY *et al.*, 1996; SHEPP *et al.*, 1996; BONGARTS *et al.*, 1996; ALBEROLA *et al.*, 1998).

Certas regiões do gene gB são altamente variáveis entre as diferentes cêpas de HCMV, estando uma delas situada próxima ao sítio de clivagem da protease (entre os aminoácidos 460 e 461) e está envolvida no processo de fusão com a célula hospedeira (VOGELBERG *et al.*, 1996).

Através de análises RFLP no gene que codifica a glicoproteína B, foi possível a distinção de 4 genotipos de gB (HEBART *et al.*, 1997; TOROK-STORB *et al.*, 1997). A tipagem do HCMV foi

também desenvolvida para ser aplicada em estudos epidemiológicos, determinando a frequência de reinfecção e ajudando no entendimento da transmissão viral (AUGUSTYNOWICZ & DZIERZANOWSKA, 1998).

Mais recentemente, a técnica de SSCP (“Single Strand Conformation Polymorphism”) tem sido utilizada para a caracterização viral, pois é capaz de discriminar, em fragmentos de DNA do mesmo tamanho, variação em sua sequência. A técnica é baseada na migração das fitas de DNA que, quando denaturadas, o padrão de migração em gel de acrilamida é alterado, em caso de variação genética (PALACIO & DURAN-VILA, 1999). Além de fornecer padrões eletroforéticos conformacionais característicos para os subtipos de HCMV descritos, a SSCP pode permitir a detecção de alterações na sequência alvo que não são reconhecidas pela endonuclease de restrição e que podem originar novas variantes virais (BINDER *et al.*, 1999).

Estudos revelam a prevalência de determinados genotipos entre os diferentes grupos de pacientes imunocomprometidos estudados. TOROK-STORB *et al.*(1997), descreve em seu estudo com transplantados de medula óssea, a correlação dos tipos gB3 e gB4 com morte por mielossupressão, e também a associação destes tipos com um risco reduzido de GVHD (doença do enxerto contra o hospedeiro) agudo de graus II a IV (TOROK-STORB *et al.*, 1997). Nesse grupo de pacientes, o subtipo gB1 foi encontrado mais comumente em pessoas que sobreviveram à infecção pelo HCMV, com melhor prognóstico (FRIES *et al.*, 1994).

O genotipo gB1 foi encontrado na maior parte da população transplantada hepática e foi associado com aumento dos casos de rejeição aguda (ROSEN *et al.*, 1998). Outros estudos revelaram que o genotipo gB2 está associado com infecção sintomática pelo CMV nestes pacientes (HEBART *et al.*, 1997).

Analisando um grupo de transplantados renais, VOGELBERG *et al.*(1996), não encontrou diferença significativa na prevalência dos tipos gB1, gB2 e gB3 e os tipos gB4 e mistura de linhagens

foram raramente encontrados. Também não observou diferença na patogenicidade dos genótipos entre os receptores de rim; da mesma forma, PEEK *et al.*(1998) encontraram esta mesma relação na população de pacientes HIV positivos com retinite por CMV, em amostras de fluido ocular e sangue.

RASMUSSEN *et al.*(1997) trabalhou com 2 populações diferentes, pacientes infectados com o HIV e receptores de transplantes alogênicos, e observou que os genótipos gB1 e gB2 são distribuídos diferentemente nestas populações, tanto em amostras de sangue, quanto de urina (VERBRAAK *et al.*, 1998). Além disso, descreveu que o genótipo gB4 ocorre mais frequentemente em amostras de sêmen do que em leucócitos de pacientes infectados pelo HIV. Em amostras de sangue de pacientes com AIDS, o genótipo mais frequentemente encontrado foi o gB2, e a associação com doença por HCMV, especialmente retinite, pôde ser observada (SHEPP *et al.*, 1996). Entretanto esta associação não foi possível por GILBERT *et al.*(1999).

Foi relatado por WADA *et al.* (1997), diferença na distribuição das linhagens do HCMV entre raças. Eles descrevem a prevalência da gB2 na população asiática de transplantados de medula óssea, enquanto em populações caucasianas o subtipo prevalente foi o gB1.

Um estudo brasileiro revelou a alta prevalência, em transplantados renais, de infecção por mais de um genótipo de HCMV durante o seguimento dos pacientes. Além disso, não comprovaram associação de genótipos gB com o desenvolvimento de infecção sintomática por esse vírus (AQUINO & FIGUEIREDO, 2000).

1.8. Determinação da Carga Viral

É provável a associação entre a carga viral como marcador ou preditor para o desenvolvimento de doença órgão-específica pelo HCMV (LIPSON *et al.*, 1998; FERREIRA-GONZALEZ *et al.*, 1999; SAI *et al.*, 2000).

Metodologias para detectar e quantificar o vírus ou componentes virais têm sido desenvolvidas, entre elas: viremia – que quantifica a infecção pelo vírus em leucócitos do sangue periférico (PBL) após cultivo em fibroblastos humanos; antigenemia – quantifica uma proteína do HCMV (pp65) que é produzida em excesso durante a replicação viral e é acumulada no núcleo dos PBLs de pacientes imunocomprometidos infectados pelo vírus; leucoDNAemia (L-DNA) e plasmaDNAemia (P-DNA) – quantifica o DNA viral nos PBLs ou plasma através da PCR quantitativa; e ainda os métodos de hibridação e PCR *in situ* – para detecção do ácido nucleico viral em células ou cortes de tecidos e detecção do menor número de cópias virais em uma única célula, respectivamente; e a determinação dos transcritos dos genes IE e L (mRNA) para detectar infecção viral ativa (GERNA *et al.*, 1998(b); GOOSSENS *et al.*, 2000). No entanto, nenhuma delas têm oferecido resultados definitivos em relação à significância clínica para o monitoramento da infecção pelo HCMV e eficácia do tratamento antiviral (GERNA *et al.*, 1998(a); BOECKH & BOIVIN, 1998).

Um dos métodos mais populares é a incorporação, na PCR, de um controle interno específico que será amplificado com a mesma eficiência e detectado por um método quantitativo pós-PCR independentemente da sequência alvo, desta forma, o “primer” para o controle interno deverá ter constituição semelhante à sequência alvo. A detecção é feita por captura através da hibridação dos “primers” biotinilados que utilizam um conjugado streptavidina-peroxidase, com sondas imobilizadas em placas (tipo ELISA). É escolhido um competidor comum com número de cópias determinado para ser comparado ao alvo (ALEXANDRE *et al.*, 1998).

GERNA *et al.* (1998), concluiu em seu estudo, que a quantificação através da L-DNA representa uma metodologia de escolha para o monitoramento da infecção primária em receptores de órgãos sólidos, com resultados comprobatórios e consistentes da associação dos níveis encontrados com manifestações clínicas. A L-DNA foi aplicada em um grupo de pacientes com AIDS e foi observada a relação entre os níveis do DNA viral e presença de retinite por HCMV e diferenças

nesses valores puderam indicar se houve reativação do vírus, sendo útil, portanto, na escolha entre terapia local ou sistêmica (TUFAIL *et al.*, 1999). Além do mais, o valor da carga viral está relacionado com o grupo de paciente (e/ou tipo de transplante), patogênese do HCMV e níveis de imunossupressão, e pode determinar o início da terapia antiviral (MENDEZ *et al.*, 1998).

Um protocolo que aplica a PCR-multiplex (regiões gênicas LA e IE) aliada à uma metodologia de diluição limitante foi padronizada por CABALLERO *et al.*, 1997, que demonstrou sua sensibilidade combinando fatores como: “PCR hot start”, temperatura de anelamento elevada e coloração do gel de acrilamida com prata. A “Nested-PCR” foi utilizada por WILDEMANN *et al.* (1998) seguida de diluições seriadas para determinar o número de genomas do vírus presente no fluido cerebrospinal (CSF) em pacientes com AIDS infectados pelo HCMV com o envolvimento do sistema nervoso central (CNS). BABER *et al.* (1999), adaptaram a PCR em conjunto com o método ELISA usando um padrão de DNA co-amplificado para quantificar o gene da glicoproteína B (gB) de HCMV. Esta metodologia consiste em um sistema de soluções de hibridação produzindo cor ao final da reação para detecção dos amplicons; possui padrões de calibração interna com número determinado de cópias.

Um método de PCR foi desenvolvido para detecção e quantificação do DNA de CMV em amostras de fezes humanas, a carga viral resultante nessas amostras sugere que o método pode ser utilizado no monitoramento da eficiência do tratamento antiviral (BOOM *et al.*, 2000).

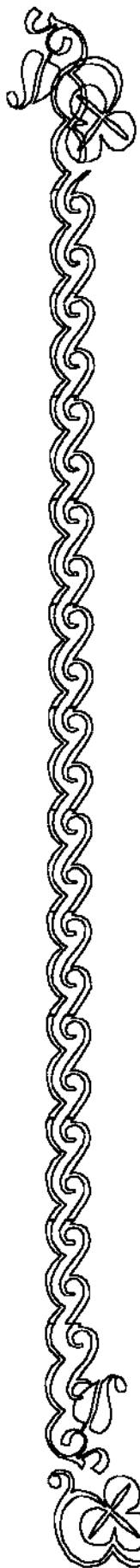
1.9. Profilaxia e Monitoramento da Infecção pelo CMV

O tratamento da doença ativa causada pelo HCMV está limitada aos agentes antivirais ganciclovir, foscarnet e mais recentemente ao cidofovir. Ganciclovir, um análogo nucleosídeo, foi o primeiro agente antiviral virostático com atividade comprovada contra o HCMV *in vitro* e *in vivo*. A terapia de supressão ou manutenção é feita na dose de 5 mg/Kg/dia, de 5 a 7 dias na semana; para

casos de retinite, a dose deve ser aumentada. O principal efeito colateral é a neutropenia e mielossupressão, responsáveis pela interrupção no tratamento; outros efeitos menos frequentes são: plaquetopenia, alterações hepáticas, neurológicas e renais (HIBBERD & SNYDMAN, 1995; COSTA, 1999; MAYA & AZULAY, 2000).

Foscarnet, um inibidor da DNA polimerase viral, é utilizado em pacientes com resistência ao Ganciclovir, e sua utilização em pacientes com AIDS demonstrou uma sobrevida maior nesse grupo. Apresenta como principal efeito colateral a nefrotoxicidade elevada e a resistência do HCMV à este medicamento é menos frequente (ALFORD & BRITT, 1990; COSTA, 1999; MAYA & AZULAY, 2000). Outra droga utilizada em pacientes HIV-positivos que desenvolveram retinite por HCMV é o Cidofovir, com potente ação anti-HCMV, inclusive para as linhagens resistentes. Também é nefrotóxico, pode provocar náuseas e vômitos além de neutropenia, irite e neuropatia periférica (MAYA & AZULAY, 2000).

A prevenção da infecção por HCMV é possível para a maioria dos pacientes, entretanto, algumas questões relevantes devem ser consideradas: o valor preditivo da carga viral para doença por HCMV (discutido anteriormente), resistência viral, além do custo e disponibilidade da terapia preventiva (LEGENDRE & THERVET, 2000).

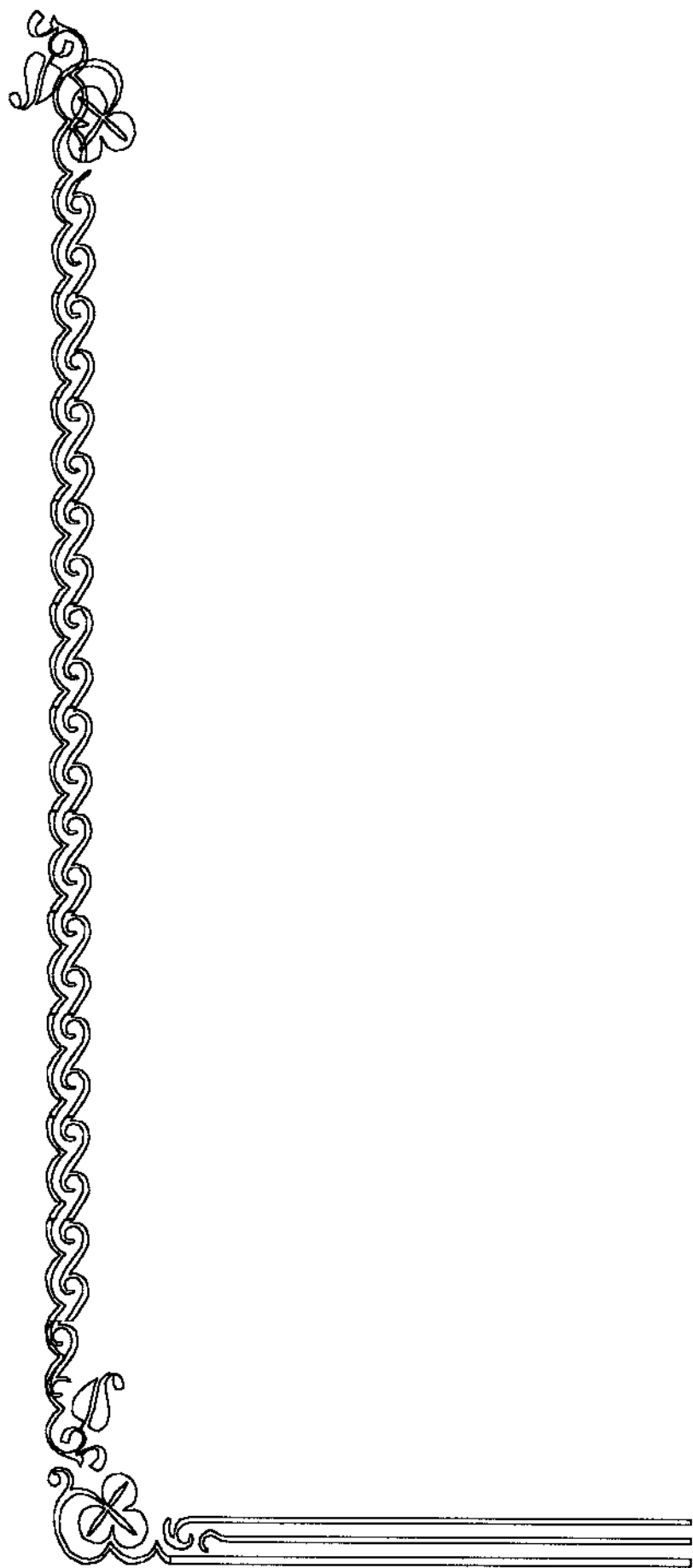


Objetivos

2. OBJETIVOS

Sabendo-se da importância da identificação das linhagens de Citomegalovírus Humano em pacientes imunocomprometidos, sua possível relação com a infectividade e apresentação clínica, e a relevância da determinação da carga viral, este trabalho, avaliando diferentes populações imunologicamente comprometidas atendidas no Hospital de Clínicas da UNICAMP, teve como objetivos principais:

- I. Determinar a prevalência dos subtipos gB de Citomegalovírus Humano nas populações imunocomprometidas infectadas por esse vírus;
- II. Avaliar, retrospectivamente, a relação de uma determinada linhagem com o quadro clínico apresentado, pelos diferentes grupos de pacientes estudados, durante a infecção ativa;
- III. Padronizar métodos de determinação da carga viral como ferramentas no monitoramento da terapia antiviral e valor preditivo de doença por HCMV.



Casuística

3. CASUÍSTICA

3.1. Genotipagem

Foram incluídas no estudo de determinação das linhagens de HCMV, 122 amostras clínicas (sangue e urina) de 104 pacientes imunocomprometidos de um banco de DNA com diagnóstico positivo para o vírus HCMV, seguidos no HC – UNICAMP no período entre novembro de 1995 a março de 1999. A tabela 01 mostra os pacientes estudados por grupo, idade, diagnóstico inicial, importância da infecção pelo CMV na data de coleta do exame, subtipo do vírus na amostra. De maneira geral, os pacientes seguidos tinham em média 23 anos (as idades variaram de 3 meses a 67 anos), 58 deles pertenciam ao sexo masculino e 46 ao sexo feminino.

A confirmação laboratorial de infecção pelo HCMV foi realizada no “Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular”, através da técnica “Nested-PCR”, para pacientes com quadro clínico sugestivo de infecção.

Como se tratou de estudo retrospectivo, os dados clínicos apresentados na tabela 01(Apêndice) foram verificados no prontuário dos pacientes.

3.2. Quantificação

Para a determinação da carga viral foram aplicadas 2 metodologias:

3.2.1. Sistema de Captura Híbrida DIGENE®

Pudemos analisar um total de 93 amostras de 30 pacientes em seguimento no HC-UNICAMP, no período entre setembro de 1999 a março de 2000, e avaliar a carga viral em relação às técnicas “Nested-PCR” e Antigenemia. A tabela 02 (Apêndice) descreve os pacientes estudados nesta metodologia.

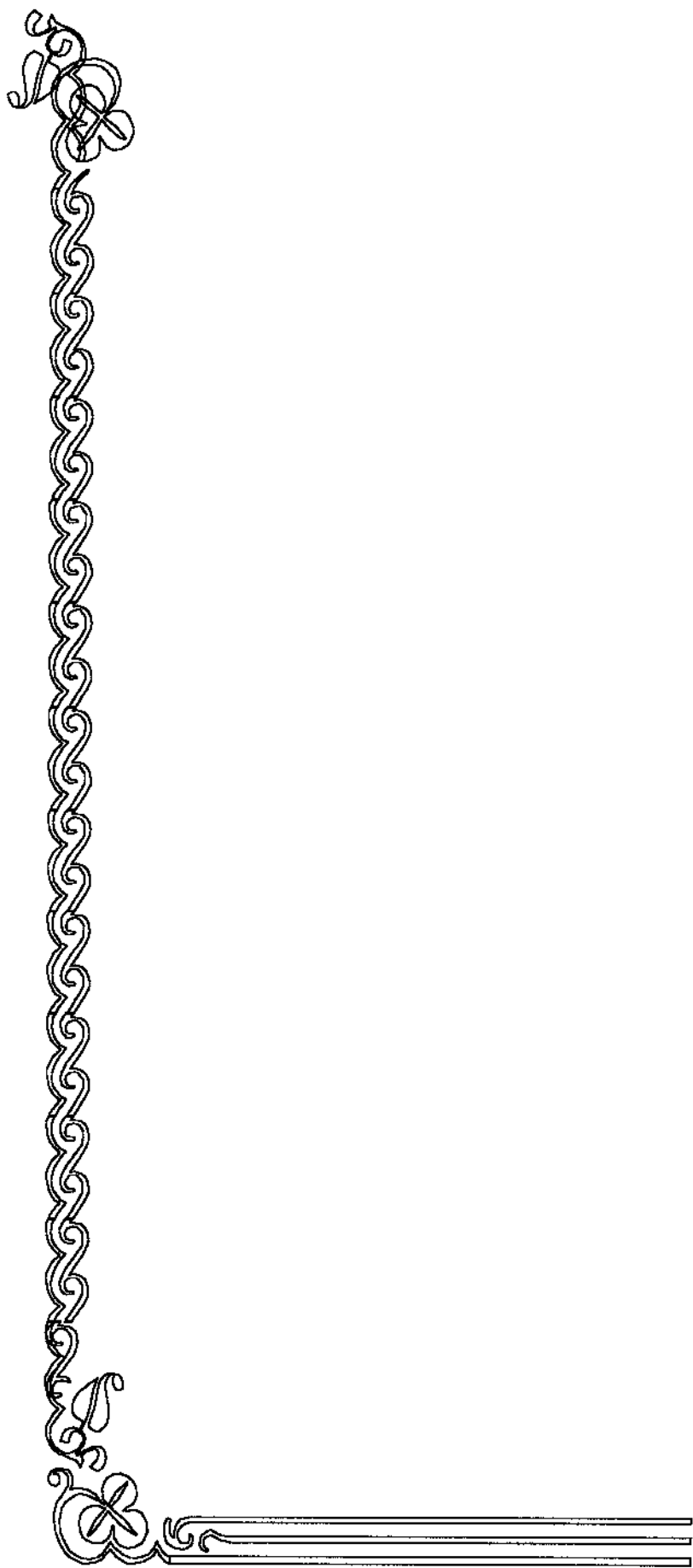
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

3.2.2. *Diluição limitante*

Esta técnica, com algumas adaptações, foi aplicada em amostras diferentes: 1- em um grupo de 24 pacientes portadores de HIV estudados para genotipagem do HCMV (amostras retrospectivas) e 2- em 9 amostras de pacientes que tiveram teste positivo pelo Sistema de Captura Híbrida DIGENE®.

A tabela 03 (Apêndice) discrimina a casuística avaliada para este procedimento.

A casuística não foi relevante para que os dados pudessem ser analisados.



Métodos

4. MÉTODOS

4.1. Extração do DNA

4.1.1. Preparação das amostras:

As amostras de sangue periférico, recebidas em tubo com anticoagulante (EDTA), foram centrifugadas a 2.500 rpm durante 10 minutos para a separação do plasma, o qual foi descartado.

4.1.2. Lise das hemáceas:

As hemáceas (sedimentadas) foram lisadas com uma mistura de soluções de cloreto de amônio (NH_4Cl), a 0,144 M - 5 vezes o volume de células e bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) a 0,01M - 0,5 vezes o volume de células. Após quinze minutos em repouso à temperatura ambiente, o hemolisado foi centrifugado durante 20 minutos a 2500 rpm, esta etapa foi repetida mais uma vez, e posteriormente o sobrenadante foi removido e o precipitado de leucócitos submetido à etapa seguinte.

4.1.3. Lise de Leucócitos:

Os leucócitos foram lisados com lavagens de solução TKM1 (Tris-HCl 10 mM (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 consecutivas, quando foi adicionado, aproximadamente, 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 essa etapa, foi acrescentado ao precipitado a solução TKM2 (0,8ml da solução contendo Tris-HCl 10 mM (pH=7,6); KCl 10 mM; NaCl 0,4 M; MgCl_2 10 mM; EDTA 2 mM; 0,025ml de duodecil sulfato de sódio (SDS) 20%. Em seguida o material foi incubado durante 40 minutos a uma temperatura de 56°C e então foi adicionado 0,3 ml de NaCl 5 M. Nessa etapa o precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para um tubo estéril.

4.1.4. Precipitação do DNA:

Ao sobrenadante foi adicionado 4,0 ml de etanol absoluto gelado (EtOH), ocorrendo a precipitação do DNA. O precipitado foi lavado em 1,0 ml de álcool 70% gelado e a seguir foi centrifugado. Descartado o sobrenadante, o DNA precipitado foi seco a temperatura ambiente e solubilizado em água destilada, deionizada e estéril (dH₂O); 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. Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção do CMV:

4.2.1. Condições da reação:

A reação em cadeia da polimerase seguiu o método descrito por Saiki *et al.* (1985 e 1988) com algumas modificações. A orientação dos “primers” faz com que a síntese do DNA ocorra na região interna entre eles. Desse modo, 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 no ciclo precedente. Assim, o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial, o que faculta no final de 30 ciclos um aumento da ordem de 10⁶ cópias, partindo-se de uma única célula (SAIKI *et al.*, 1985).

Para cada reação de amplificação utilizou-se 0,4 a 0,5 µl do DNA a ser estudado (que foi obtido das amostras de sangue periférico, submetidas ao método de extração anteriormente descrito) para um volume total de 20,0 µl de reação. Foram adicionados 50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 2,0 pmol de cada “primer” MIE4 e MIE 5 (*Tabela 04* - ver sequência de nucleotídeos), 200 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase.

Para a “Nested PCR”, as condições de reação foram as mesmas utilizadas na 1ª PCR, sendo que para a 2ª reação, uma alíquota do produto da 1ª foi reamplificada com o par de “primers” interno ao fragmento anterior (IE – “immediate early”). (tabela 04).

Tabela 04: Sequência dos “primers” utilizados para a detecção do Citomegalovírus Humano.

Nome	Sequência	Sentido	Tipo
MIE 4	5' CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAGCC 3'	“sense”	“primer” externo
MIE 5	5' CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG 3'	“antisense”	“primer” externo
IE 1	5' CCACCCGTGGTGCCAGCTCC 3'	“sense”	“primer” interno
IE 2	5' CCCGCTCCTCCTGAGCACCC 3'	“antisense”	“primer” interno

Sequência de “primers” descrita por BRYTTING *et al.*, 1991.

Trinta ciclos foram realizados automaticamente em termociclador Robocycler 40 (Stratagene). Os ciclos foram precedidos por um período de desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos e no final, 7 minutos a 72°C para a extensão final.

Para a 1ª reação, os ciclos de amplificação empregados para cada amostra compreenderam:

- Desnaturação: 94°C - 1 minuto;
- Anelamento: 55°C - 1 minuto;
- Extensão: 72°C - 1 minuto e 30 segundos.

E para a “Nested-PCR” houve uma pequena alteração no ciclo de amplificação:

- Desnaturação: 94°C - 40 segundos;
- Anelamento: 55°C - 40 segundos;
- Extensão: 72°C - 1 minuto e trinta segundos.

4.2.2. Detecção:

Cerca de 7,0µl do produto da “Nested PCR” acrescidos de 2,0µl do corante azul de bromofenol, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Em amostras positivas observou-se um fragmento de 159 pares de bases, ao passo que nas amostras negativas não houve fragmento amplificado. Como controle positivo da reação, foi usado uma aliquota do extrato viral da cêpa AD169 do HCMV; como controle negativo, uma amostra certamente negativa para o vírus e como branco de reação, a água.

4.3. Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para a β -globina humana.

A amplificação de um fragmento do gene da β -globina humana, seguindo a metodologia descrita por SAIKI *et al.* (1985), foi utilizada nas amostras estudadas e o produto serviu como controle interno de reação. O fragmento obtido, 365 pb, indicou que o DNA extraído era de boa qualidade e não houve inibição da reação - resultado indispensável para um diagnóstico seguro.

As condições de reação utilizadas para a amplificação do gene da β -globina foram as mesmas aplicadas para a detecção do HCMV. Os “primers” utilizados na 1ª reação foram P3 e P5 e na “Nested-PCR” P3 e 109 (*tabela 05*).

Tabela 05: Sequência dos “primers” utilizados para amplificação do gene da β -globina humana.

Nome	Sequência	Sentido	Tipo
P3*	5' AGACAGAGAAGACTCTTG 3'	“sense”	“primer” externo e interno
P5	5' TCATTCGTCTGTTTCCCATTC 5'	“antisense”	“primer” externo
109	5' CCCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT 5'	“antisense”	“primer” interno

Sequência de “primers” descrita por SAIKI *et al.* (1985). * O “primer” P3 foi utilizado na 1ª e 2ª reações.

Trinta ciclos foram realizados automaticamente em termociclador Robocycler 40 (Stratagene). Os ciclos foram precedidos por um período de desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos e no final, 7 minutos a 72°C para a extensão final.

O ciclo de amplificação foi padronizado para as 2 reações e o programa foi o seguinte:

- Desnaturação: 94°C - 1 minuto;
- Anelamento: 55°C - 1 minuto;
- Extensão: 72°C - 1 minuto.

O produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em sistema Polaroyd.

4.4. Normas aplicadas para se evitar contaminação:

Afim de se eliminar problemas de contaminação das reações, o que poderia ocasionar resultados falsos-positivos, foram tomados os seguintes cuidados:

- o ambiente utilizado para a extração do DNA foi diferente daquele destinado a amplificação da sequência alvo (PCR);
- as amostras a serem amplificadas foram manipuladas em bancada com fluxo laminar, o que torna o ambiente estéril;
- um outro ambiente foi utilizado para se fazer a eletroforese;
- antes da abertura dos “eppendorffs”, foi efetuada rápida centrifugação para que a reação contida no tubo ficasse concentrada na região inferior evitando sua dispersão por aerosol;
- foram utilizadas ponteiras e eppendorffs novos e estéreis, para aliquotar a amostra, utilizamos ponteiras com filtro;
- trocas constantes de luvas foram feitas durante todo o procedimento.

4.5. Identificação das linhagens de HCMV:

A identificação das diferentes cêpas do HCMV foi feita à partir do DNA de pacientes que obtiveram “Nested PCR” positiva para a região MIE do vírus.

4.5.1. Condições da reação:

Utilizamos a “Nested-PCR” para o gene da glicoproteína B para posterior análise de restrição. Para a primeira reação utilizamos 0,4 a 0,5 µl da amostra HCMV positiva para um volume total de 20,0 µl de reação. Foram adicionados 10% do volume total de reação de buffer (50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2,0 mM de cloreto de magnésio), 20 pmol dos “primers” gB1319 e gB1659 (*Tabela 06*), 200 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase.

Tabela 06: Sequência dos “primers” utilizados para a amplificação das glicoproteínas gB e gH do Citomegalovírus Humano. * O “primer” gB1319 foi utilizado para as duas reações.

Nome	Sequência	Sentido	Tipo
gB 1319*	5' TGGAAC GGAACGTT GGC 3'	“sense”	“primer” externo e interno
gB 1659	5' GCACCTTGACGCTGGTTTGG 3'	“antisense”	“primer” externo
gB 1604	5' GAAACGCGCGGCAATCGG 3'	“antisense”	“primer” interno
gH 172	5' TGGTGTTCACGCAGGAA 3'	“sense”	
gH 203	5' CCACCTGGATCACGCCGCTG 3'	“antisense”	

Os “primers” gB 1319 e gB 1604 foram descritos por CHOU, 1990; gB 1659 por VOGELBERG *et al.*, 1996; gH 172 e gH 203 por CHOU, 1992(2).

Para a 1ª reação, trinta e cinco ciclos foram realizados automaticamente em termociclador Robocycler 40 (Stratagene). Os ciclos foram precedidos por um período de desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos e no final, 7 minutos a 72°C para a extensão final.

O ciclo de amplificação para a 1ª reação compreendeu:

- Desnaturação: 94°C – 30 segundos;
- Anelamento: 65°C – 45 segundos;
- Extensão: 72°C - 1 minuto.

Na etapa seguinte mantivemos a concentração dos reagentes para um volume total de reação de 40,0 µl (volume necessário para a continuidade do procedimento – análise de restrição). Nesse caso adicionamos 1,0 µl da 1ª PCR ao invés do DNA do paciente e o par de “primer” usado foi gB 1319 e gB 1604.

O ciclo da “Nested-PCR” para a gB e gH foi o seguinte:

- | | |
|------------------------------------|------------|
| • Desnaturação: 94°C - 30 segundos | } 30 vezes |
| • Anelamento: 65°C - 30 segundo; | |
| • Extensão: 72°C - 1 minuto. | |
| • Desnaturação: 94°C - 30 segundos | } 15 vezes |
| • Anelamento: 55°C - 30 segundos | |
| • Extensão: 72°C - 1 minuto | |

Para a gH, foi utilizada uma única PCR seguindo as condições de reação da “Nested-PCR” para gB (inclusive o ciclo de amplificação). Foi adicionada à reação, 1,0 µl da amostra HCMV positiva e os “primers” da região gH (*tabela 06*) para um total de 40,0 µl da reação.

4.5.2. Detecção:

Cerca de 7,0 µl do produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em sistema Polaroyd.

4.5.3. Análise de Restrição (PCR-RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”):

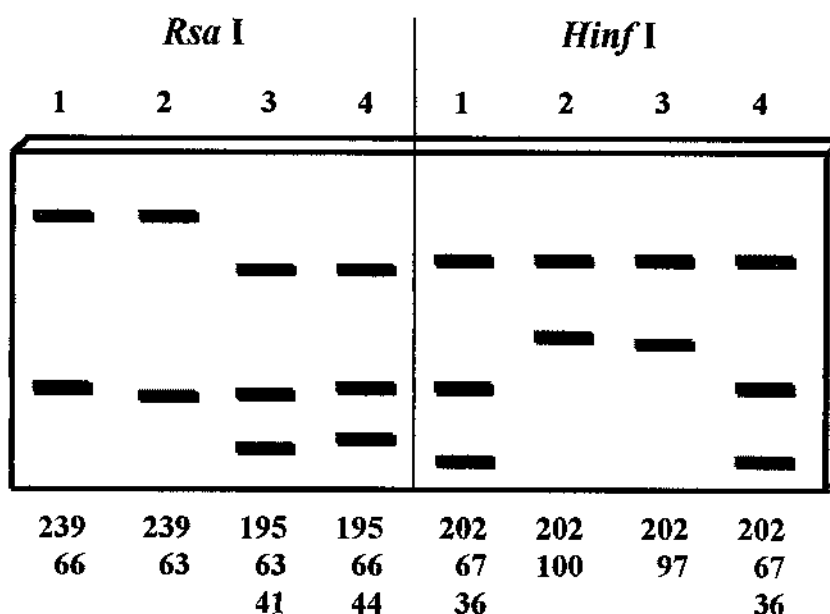
Após confirmação da amplificação, os produtos da gB e gH foram digeridos com enzimas de restrição para a determinação das linhagens de HCMV (CHOU *et al.*, 1990). Utilizamos as enzimas *Hinf* I e *Rsa* I, para a clivagem da região gB (*quadro 01*), e *Hha* I para a região gH.

Cerca de 10,0 µl do produto amplificado foi utilizado para a execução da reação de digestão, que continha também, 2,0 µl do tampão da enzima e 0,5 µl da enzima correspondente. Água deionizada e estéril foi adicionada para completar 20,0 µl e a mistura foi conduzida ao banho-maria a 37°C por no mínimo 2 horas, até overnight.

Os fragmentos produzidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1000 (Gibco-BRL) a 2,0% corado com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema Polaroyd.

As diferentes linhagens de HCMV apresentam padrões de digestão característicos (CHOU *et al.*, 1990), que são levados em consideração para a distinção entre os tipos de HCMV estudados.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



Quadro 01: Padrão de digestão para a glicoproteína B de Citomegalovírus Humano utilizando-se as enzimas *Rsa* I e *Hinf* I.

4.6. SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism):

O método de SSCP foi utilizado para comparação do padrão eletroforético obtido através da análise com enzimas de restrição e o padrão resultante do polimorfismo de conformação das 4 linhagens já descritas.

O produto da “Nested-PCR” para a gB foi diluído 1/4 em uma solução contendo 95% de formamida, EDTA 10mM (pH 8,0), 0,1% de azul de bromofenol e 0,1 % de xileno cianol. Essa mistura foi desnaturada por 5 minutos a 94 °C e 1,0 µl foi submetido à eletroforese no sistema automático “Phastsystem® Pharmacia” (Pharmacia, Uppsala, Suécia). A corrida eletroforética foi desenvolvida em gel homogêneo de poliacrilamida a 20% (43 mm x 50 mm x 0,45 mm), em tampão acetato e Tris 0,112 M, pH 6,5, utilizando-se o tampão L-Alanina 0,88M, Tris 0,25 M, pH 8,8 em 3% de agarose para isoeletrofocalização.

As condições de corrida foram: Pré-corrida – 150 V, 10,0 mA, 5,0 W, 15 °C, 10 V/h; Aplicação das amostras – 500 V, 10,0 mA, 5,0 W, 15 °C, 2 V/h e Corrida – 340 V, 10,0 mA, 5,0 W, 15 °C, até 650 V/h.

Os fragmentos de DNA foram visualizados após coloração do gel com nitrato de prata em programa automático, nas condições descritas a seguir:

1. Ácido tricloroacético a 20% por 5 minutos a 20 °C
2. Glutaraldeído a 5% por 5 minutos a 50 °C
3. Água destilada por 2 minutos a 50 °C
4. Água destilada por 2 minutos a 50 °C
5. Nitrato de prata a 0,4% por 8 minutos a 40 °C
6. Água destilada por 30 segundos a 30 °C
7. Água destilada por 30 segundos a 30 °C
8. Carbonato de sódio a 5%, formaldeído 0,0375% por 1,0 minuto a 30 °C
9. Carbonato de sódio a 5%, formaldeído 0,0375% por 5 minutos a 30 °C
10. Ácido acético a 5% por 2 minutos a 50 °C
11. Glicerol a 13% por 3 minutos a 50 °C

4.7. Quantificação do DNA de HCMV:

Dois procedimentos para a determinação da carga viral foram testados. Um determina a carga viral do HCMV presente nos pacientes imunocomprometidos estudados através de um kit de detecção quantitativa do DNA de HCMV pelo método de CAPTURA HÍBRIDA® da Digene e o outro método é baseado na PCR - diluição limitante. Dada a importância da determinação da carga viral em pacientes imunocomprometidos, este estudo avaliou principalmente a aplicabilidade dos métodos para posterior utilização em laboratório de rotina, no monitoramento dos pacientes.

4.7.1. Captura Híbrida *DIGENE*[®]

Para esse kit, o material para análise passa por 5 procedimentos básicos: desnaturação, hibridação, captura dos híbridos, reação dos híbridos com o conjugado e detecção dos híbridos por quimioluminescência. Reagindo com sonda específica, o material para análise forma híbridos de RNA:DNA que são capturados por anticorpos. A seguir, os híbridos imobilizados reagem com anticorpos específicos conjugados à fosfatase alcalina que irá agir sobre o substrato, produzindo luz de intensidade variável (diretamente correlacionada com a carga viral) medida no quimioluminômetro (manual do kit para captura híbrida *DIGENE*[®]).

Para isso, cerca de 4,0 ml de sangue total foram coletados de 30 pacientes imunossuprimidos em seguimento no HC/UNICAMP (± 3 amostras, com espaçamento de pelo menos uma semana entre elas, totalizando 93 amostras), adicionando-se a elas 10,0 ml de tampão de lise (kit). Após agitar-se essa mistura, incubou-se por 15 minutos a 20-25°C. A mistura foi centrifugada a 1000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* obtido foi ressuscitado em 1,5 ml do tampão de lise, agitando-se a mistura e incubando-a por 10 minutos a 20-25° C. Essa mistura também foi centrifugada a 1000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O material precipitado foi estocado até a data do procedimento, a -20°C (até 10 semanas).

A etapa seguinte consistiu na desnaturação das amostras. Adicionamos em cada tubo de hibridação contendo a amostra, 75,0 µl do diluente da amostra e 50,0 µl do reagente desnaturante (NaOH 1,75N). As amostras foram ressuscitadas e os reagentes bem misturados, para isso, a estante com os tubos foram homogeneizados a 1100 rpm durante 5 minutos em um agitador. A seguir, foram incubados em banho-maria a 70°C por 25 minutos. Transferimos cerca de 150,0 µl da amostra desnaturada para novos tubos de hibridação (para minimizar resultados falsos-positivo ou resultados equívocos) e incubamos novamente a 70°C por 25 minutos.

A próxima etapa é da hibridação. Em cada tubo de hibridação, contendo a amostra desnaturada, foi adicionado 50,0 µl da solução com a sonda do CMV. A mistura foi homogeneizada e a seguir a estante foi colocada no agitador por 5 minutos a uma rotação de 1100 rpm. Foi observada alteração na coloração da reação, de lilás a amarelo; pode haver variação na tonalidade do amarelo, dependendo da amostra. Os tubos foram, então, incubados a 70°C em banho-maria, por cerca de 2 horas.

Seguiu-se, então, a captura híbrida. Após a retirada do banho-maria, os tubos permaneceram em temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos para resfriar. As amostras foram removidas para os tubos de captura e posteriormente levadas ao agitador durante 1 hora a 1100 rpm; é nesta etapa que ocorre a hibridação do DNA:RNA com o anticorpo específico. Ao final de 1 hora de homogeneização, a solução foi descartada e o excesso eliminado por papel absorvente.

Em cada tubo de captura foi adicionado 250,0 µl do reagente 1 para detecção. Os tubos foram homogeneizados manualmente, com cuidado, em todas as direções e permaneceram em repouso, à temperatura ambiente, por cerca de 30 minutos.

A etapa posterior é denominada lavagem. Os reagentes contidos nos tubos foram descartados e o excesso eliminado com o auxílio de papel absorvente. A seguir foram lavados, por 5 vezes, com o tampão de lavagem e ao final, batidos firmemente sobre papel absorvente por 2 ou 3 vezes. Os tubos permaneceram sobre o papel absorvente por 5 minutos para a secagem.

O último passo é a geração do sinal. Foi adicionado ao tubo de captura 250,0 µl do reagente 2 e incubados no escuro por 30 minutos. Finalmente fez-se a leitura em luminômetro.

Foram utilizados 3 calibradores negativos e 3 positivos, além do branco, que foi um tubo contendo apenas o reagente de detecção 2.

4.7.2. Diluição Limitante

A metodologia de diluição limitante seguiu o protocolo proposto por CABALLERO *et al.*, 1999. É baseada na quantificação do DNA do HCMV através de um PCR simples, semi-quantitativo a partir de amostras previamente diluídas.

Após a obtenção do DNA através do procedimento de extração previamente descrito, a concentração da amostra foi estimada pela comparação com um marcador de massa molecular, High DNA Mass Ladder (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). As amostras e o marcador foram submetidos simultaneamente à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio. Foram aplicados no gel, 2,0 µl do marcador (que correspondem às bandas de 10, 20, 30, 40, 60 e 100 ng de DNA) e o mesmo volume de cada amostra. A banda da amostra foi comparada com o marcador e de acordo com a intensidade correspondente, obtivemos o valor aproximado da concentração de DNA na amostra. Foi considerado que cada célula possui 6 pg de DNA (CABALLERO *et al.*, 1999).

Para a diluição limitante, 5,0 µl de cada amostra de DNA foi diluída em igual volume de água, e subsequentemente diluições seriadas, múltiplas de 2 foram executadas em água. A partir das amostras diluídas é que foi feita a PCR.

A reação da PCR para um volume final de 30,0 µl continha: 10% do volume total da reação de buffer (50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4)), 2,0 mM de cloreto de magnésio, 12,5 pmol de cada “primer” que amplifica um fragmento do gene LA do HCMV (“late antigen”, 136 pb), 200 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA).

Tabela 07: Sequência dos “primers” utilizados para a amplificação do gene “Late Antigen” do Citomegalovírus Humano.

Nome	Sequência	Sentido
LA 1	5' CGCAACCTGGTGCCCATGG 3'	“sense”
LA 2	5' CGTTTGGGTTGCGCAGCGGG 3'	“antisense”

“Primers” descritos por CABALLERO *et al.*, 1997.

Trinta ciclos foram realizados automaticamente em termociclador Robocycler 40 (Stratagene). O programa foi precedido pela desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos e seguidos pela extensão final a 72°C durante 3 minutos.

A reação foi submetida ao seguinte ciclo :

- Desnaturação: 95°C – 40 segundos;
- Anelamento: 64°C – 45 segundos;
- Extensão: 72°C – 55 minutos.

Foram aplicados 4,0 µl das amostras em gel de poliacrilamida 8,0% usando uma cuba eletroforética vertical (Hoefer). Em seguida, o gel foi submetido ao seguinte tratamento para visualização do produto amplificado:

- Solução de Fixação: durante 5 minutos.

30,0 ml de Álcool Etilico

1,5 ml de Ácido Acético

Completar para 300,0 ml de dH₂O

- Solução Corante: durante 5 minutos.

0,4 g de Nitrato de Prata

Completar para 200,0 ml de dH₂O

- Lavagem por 2 vezes, durante 10 segundos cada, com dH₂O.

- Solução Reveladora: durante 5 minutos.

4,5 g de Hidróxido de Sódio

2,0 ml de formaldeído

Completar para 200,0 ml de dH₂O.

- Após o item anterior, voltar o gel para a Solução Fixadora e deixar overnight em geladeira.
- Secar o gel no dia seguinte.

O passo seguinte foi calcular o número de leucócitos equivalentes à quantidade de DNA utilizada na PCR, partindo do princípio que 1 célula contém 6 pg de DNA (CABALLERO *et al.*, 1999). Para estimar o número de genomas virais por 10⁶ leucócitos, utilizamos a seguinte equação:

$$\text{Nº de genomas virais/10}^6 \text{ leucócitos} = \frac{\text{Título da última amplificação consecutiva} \times 10^6}{\text{nº de células da amostra}}$$

4.8. Seqüenciamento do fragmento de DNA amplificado:

O método de seqüenciamento direto descrito por “Sanger” foi utilizado para a confirmação das linhagens resultantes da amplificação e posterior análise de restrição. Para a realização do seqüenciamento foi utilizado o “Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit” (Amersham Life Science, Cleveland, Ohio 44128, USA).

4.8.1. Purificação:

Esta etapa é exigida pois garante a remoção de oligonucleotídeos e dNTPs que podem interferir na reação de seqüenciamento. Cerca de 5,0 µl do produto amplificado foi purificado com 1 U de Fosfatase alcalina e 1,0 µl de Exonuclease (1U/µl), a 37°C, durante 15 minutos e posteriormente o material foi mantido a 80°C durante mais 15 minutos em termociclador automático.

4.8.2. Reação de Terminação:

Para cada reação de terminação, 2,0µl de dGTP Master Mix (7,5µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP) foram utilizados com o produto amplificado purificado, acrescidos de 1,2 pmols do “primer” e 0,5µl de [$\alpha^{33}\text{P}$]ddATP (Du Pont).

4.8.3. Reação de Seqüenciamento:

A etapa seguinte consistiu na reação de seqüenciamento propriamente dita com: 2,0µl de tampão de reação (260 mM Tris-HCl, pH 9,5; 65mM MgCl_2), 2,0 µl do produto da amplificação purificado, 1,0 µl de “primer” marcado, 2,0 µl de Thermo Sequenase DNA polimerase e 13,0 µl de dH_2O . Um volume de 4,5 µl da reação de seqüenciamento + 2,5 µl do produto da reação de terminação + 1 gota de óleo mineral, serão submetidos ao seguinte programa em termociclador Robocycler 40 (Stratagene): 95°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto, perfazendo um total de 35 ciclos. Após esta reação de seqüenciamento, foi adicionada a cada amostra, 4,0 µl da solução Stop (95% formamida, EDTA 20 mM, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol).

4.8.4. Eletroforese em gel desnaturante:

A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida a 6% na proporção de 19:1 acrilamida/bis acrilamida, em tampão de corrida TTE (Tris 72mM, pH8,0, Taurina 24 mM, EDTA 0,4 mM), uréia 7 M, persulfato de amônio a 10% (APS) e 0,04% de TEMED. O gel foi preparado em placas de dimensões 38 cm X 50 cm com espaçadores de 0,4 mm de espessura e de gradiente de espessura com 0,25 mm até 0,4 mm.

Para a separação dos fragmentos marcados radioativamente, o gel foi submetido a uma corrida eletroforética com potência constante de 90W, com prévio aquecimento do sistema de eletroforese por cerca de 1 hora.

Foram aplicados 4,0 µl de cada amostra previamente desnaturadas durante 5 minutos a 94°C. A corrida durou cerca de 3 horas e a seguir o gel foi transferido para um papel de filtro 3mm e levado à secadora de gel a vácuo (Bio-Rad) durante 2 horas a 80°C. O gel foi mantido em contato com um filme de raio-X, temperatura ambiente, overnight. Em seguida foi revelado e a leitura foi comparada com as seqüência descritas no Banco de Dados (Genbank: www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Amostras das seqüências obtidas para os subtipos gB1-gB4 foram alinhadas manualmente (Quadro 02).

4.9. Teste Estatístico

Testes estatísticos (Qui-quadrado e o teste exato de Fisher) foram aplicados nas amostras genotipadas afim de se determinar a prevalência de determinado subtipo de HCMV na população imunossuprimida/imunocompetente em geral, bem como nos grupos individualizados. Ainda, para demonstrar se houve significância na relação linhagem/quadro clínico entre os grupos.



Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Padronização da “Nested-PCR” para amplificação da gB

Foram várias as tentativas para amplificação do fragmento a ser utilizado posteriormente na análise de restrição. As condições sugeridas por CHOU (1990) e CHOU & DENNISON (1992) não puderam ser reproduzidas no laboratório, necessitando padronização desde as concentrações dos reagentes usados na reação, até para ciclo de amplificação.

Assim, optamos pela “Nested-PCR”, que além de purificar a amplificação em casos de bandas inespecíficas (a banda inespecífica diminui consideravelmente sua intensidade ou desaparece) devido ao aumento da especificidade, a concentração do fragmento alvo em amostras com baixa viremia é elevada com a utilização deste método, pois a sensibilidade também é aumentada e o fragmento pode ser visualizado em gel de agarose corado com brometo de etídio.

Padronizamos um novo conjunto de “primers” para a obtenção do produto de 300 pb amplificados através da “Nested-PCR” para uma região variável da glicoproteína B (**Figura 05**). Foram utilizadas 3 seqüências de oligonucleotídeos 2 das quais (gB 1319 e gB 1604) descritas por CHOU (1990) e 1 (gB 1659) utilizada por VOGELBERG *et al.* (1996) e posteriormente por MEYER-KÖNIG *et al.* (1998).

Esse novo conjunto de “primers” possibilitou a identificação dos subtipos de HCMV através da análise de restrição com as enzimas *Rsa* I e *Hinf* I, metodologia descrita por CHOU (1990), com a vantagem dos fragmentos serem visualizados em gel de agarose.

Mesmo com a alta sensibilidade e especificidade da “Nested-PCR”, muitas amostras HCMV-positivas do banco de DNA do “Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular” não puderam ser amplificadas, muitas das quais eram alíquotas de urina. Sabe-

se, no entanto, que algumas substâncias presentes nestas amostras podem inibir a PCR, inclusive componentes de medicamentos utilizados pelos pacientes na época da coleta.

Outro fato é a degradação do DNA quando estocados por períodos prolongados, e são submetidos a ciclos de congelamento e descongelamento. É sugerido que o *pellet* de leucócitos seja armazenado em lugar do DNA já extraído, e alíquota do material seja extraída quando da sua utilização.

Ainda assim conseguimos amplificar, em condições para posterior tipagem, 122 amostras clínicas, sendo 91 de sangue e 31 de urina, armazenadas desde novembro de 1995.

A tabela 01 (Apêndice) descreve a casuística estudada; grupo de pacientes, idade, quadro clínico, linhagem e relevância da infecção na época da coleta.

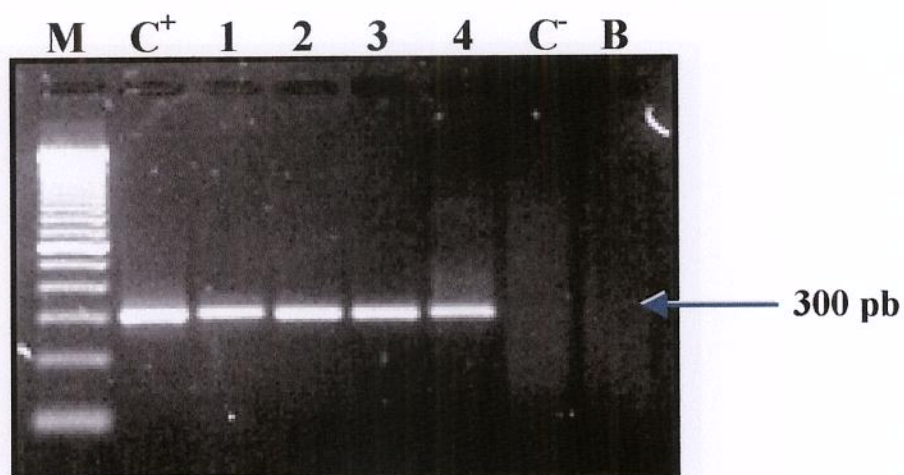


Figura 05 – Amplificação de 300 pb do DNA do HCMV com os “primers” gB1319 e gB1604 (produto da “Nested-PCR”). Eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio.

Legenda referente à figura 05:

M – marcador de peso molecular (Ladder 100 pb; Gibco-BRL, USA)

C⁺ - controle positivo para a reação (cêpa AD169);

1 e 2 - PCR positivo para amostras de urina;

3 e 4 - PCR positivo para amostras de sangue periférico;

C⁻ - paciente sabidamente negativo para a presença do vírus;

B – branco de reação (H₂O).

5.2. Genotipagem do HCMV através da gB

5.2.1. Análise de Restrição (PCR-RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”)

A partir do produto da “Nested-PCR”, a análise de restrição foi de fácil padronização. Outra vantagem da metodologia utilizada na amplificação, é que os fragmentos de menor peso molecular, produtos da digestão, podem ser visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Utilizamos uma agarose de maior densidade, ideal para fragmentos pequenos (Agarose 1000, Gibco-BRL, USA) que possibilitou a caracterização dos subtipos. Pudemos identificar na população imunocomprometida analisada, os 4 subtipos principais de HCMV descritos na literatura (*Figura 05*) além de caracterizar casos de mistura de cêpas em 4 amostras.

Além disso, pudemos analisar a frequência dos subtipos de HCMV nas diferentes populações estudadas e observar a prevalência do genotipo gB2 em praticamente todos os grupos de pacientes imunocomprometidos, com exceção dos transplantados hepáticos (gB3) (*Gráfico 01*).

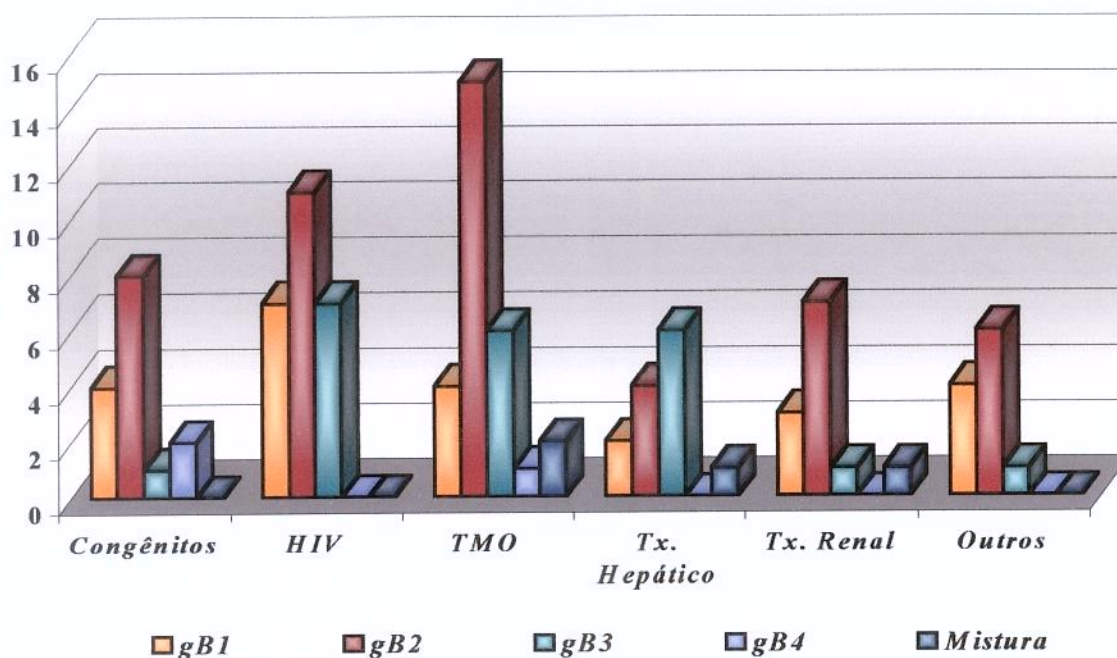


Gráfico 01: Frequência dos subtipos de HCMV por grupo de pacientes.

Apesar da pequena amostragem por grupo de pacientes, o subtipo gB2 foi demonstrado ser prevalente na população imunocomprometida da região de Campinas/SP. Ainda em relação ao gráfico 1, notamos que os subtipos gB1 e gB3 estão bem representados em nossa população, e que o genotipo gB4 e mistura de subtipos apareceram raramente em nossa casuística.

A seguir, analisando os prontuários, conseguimos estabelecer características descritivas da gravidade na apresentação clínica do paciente e designar uma simbologia para determinar essa relação (*Tabela 08*), e então determinar a frequência dos graus de manifestação clínica nas diversas populações imunocomprometidas.

Tabela 08: Principais manifestações clínicas observadas nos prontuários dos pacientes.

<i>Gravidade</i>	<i>Quadro Clínico (Prontuários)</i>
+	Esofagite, Coriorretinite, Hepatite, Enterite, Pneumonia, Pancreatite, Neurotoxo, Encefalite, Rejeição ou Perda do Enxerto - Comprovação através de biópsia, citologia, cultura, PCR, Atg.
±	Febre, Anemia, Diarréia, Quadro suspeito de Infecção por CMV mas sem comprovação, Melhora pós tratamento com Ganciclovir, Co-infecção com outros patógenos.
—	CMV assintomático no período de coleta da amostra. Outros patógenos como causa principal na apresentação clínica: HIV, HAV, HBV, HCV, HSV, sífilis, pneumonia bacteriana.

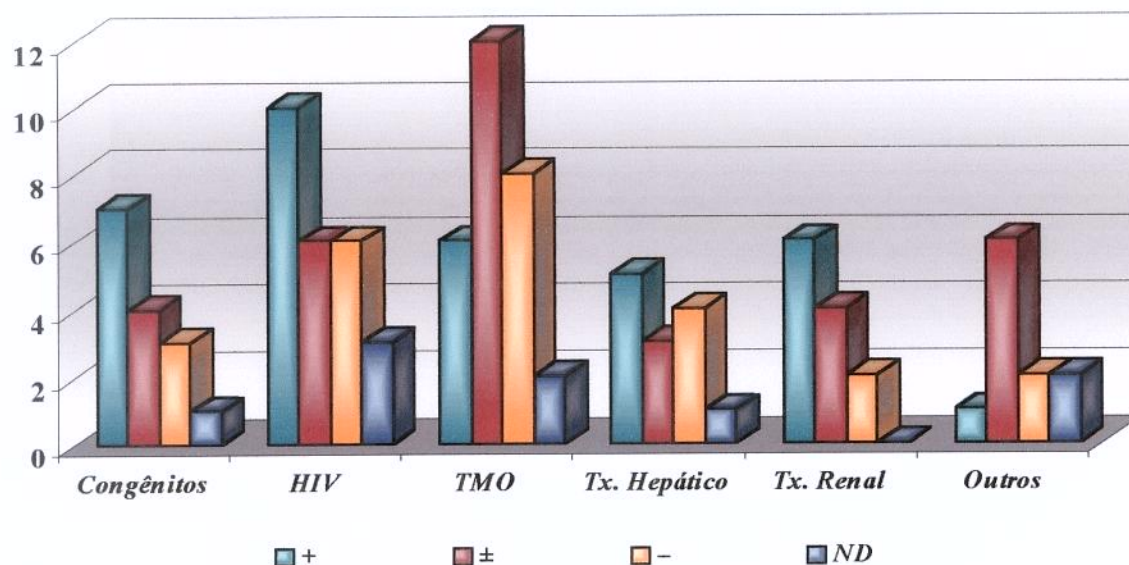


Gráfico 02: Gravidade das manifestações clínicas por grupo de pacientes.

De maneira geral, a infecção por HCMV contribuiu para a gravidade na manifestação clínica, como agente principal ou secundário (**Gráfico 02**), em todos os grupos de pacientes estudados, tendo uma relevância, um pouco maior, em pacientes infectados congenitamente pelo vírus e no grupo de pacientes HIV positivos. Parece que, em nossa casuística, os pacientes que foram infectados com HCMV dos genotipos gB3, gB4 e mistura de cêpas, evoluíram para um quadro clínico menos favorável, mas que devido à pequena amostragem não pôde ser avaliado estatisticamente.

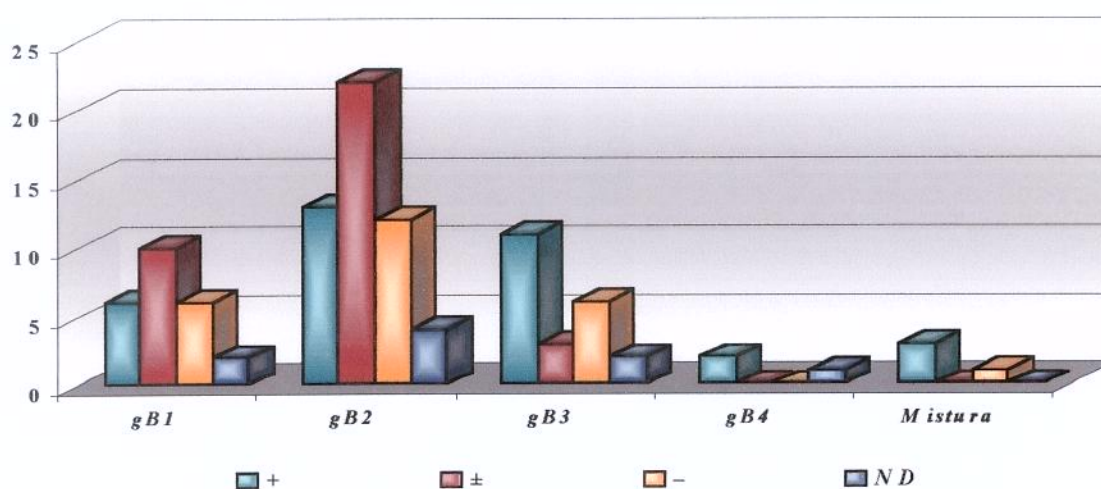


Gráfico 03: Gravidade das manifestações clínicas por subtipo de HCMV.

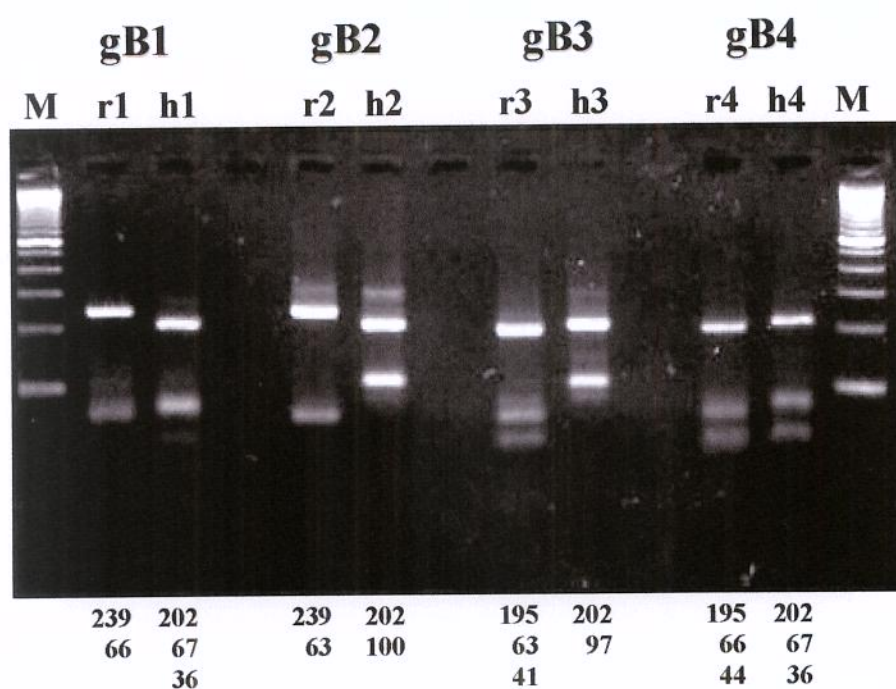


Figura 06 - Padrões de digestão (gB) encontrados para as amostras analisadas. Eletroforese em gel de agarose 1000 (Gibco-BRL) 2,0% corado com brometo de etídio.

Legenda referente à figura 06:

M – marcador de peso molecular (Ladder 100 pb; Gibco-BRL, USA)

r – padrão de digestão para a enzima *RsaI*;

h – padrão de digestão para a enzima *HinfI*.

Obs: Na foto estão representados os grupos 1, 2, 3 e 4 respectivamente.

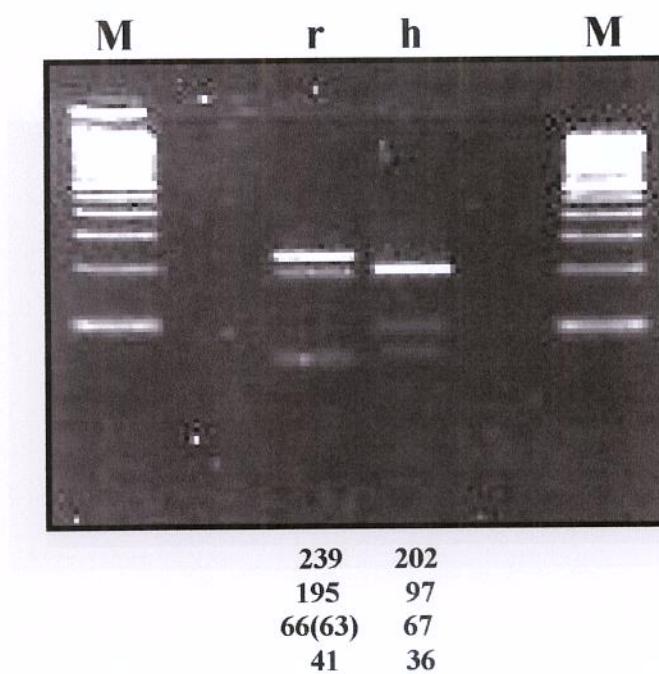


Figura 07 - Padrão de digestão (gB) encontrado para a amostra com mistura de linhagens.

Eletroforese em gel de agarose 1000 (Gibco-BRL) 2,0% corado com brometo de etídio.

Legenda referente à figura 07:

M – marcador de peso molecular (Ladder 100 pb; Gibco-BRL, USA)

r – padrão de digestão para a enzima *RsaI*;

h – padrão de digestão para a enzima *HinfI*.

5.2.2. SSCP (“Single Strand Conformation Polymorphism”)

A SSCP têm sido utilizada como uma importante ferramenta na caracterização molecular de viroses. Em seu estudo com gB de HCMV, BINDER *et al.* (1999) utilizaram a SSCP radioativa afim de detectar alterações conformacionais no padrão eletroforético do fragmento alvo.

A padronização da SSCP não-radioativa foi um primeiro passo para poder caracterizar melhor os subtipos de HCMV, já que alterações em sítios que não aqueles reconhecidos por enzimas de restrição podem significar novas variantes virais que não podem ser detectadas pela técnica de PCR-RFLP.

Não pudemos avaliar a importância desta metodologia para o estudo de genotipagem, mas certamente trata-se de uma poderosa ferramenta que poderá ser utilizada para a caracterização molecular dos subtipos virais.

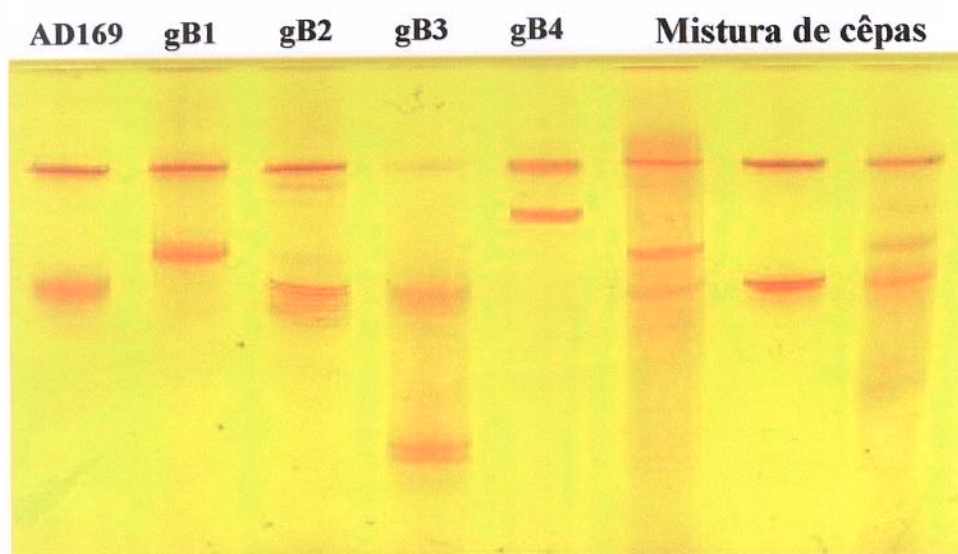


Figura 08 - Padrões eletroforéticos de polimorfismo de conformação (SSCP) para as amostras dos genótipos gB1 – gB4 analisadas em gel de poliacrilamida 20,0% corado com nitrato de prata.

Legenda referente à figura 08:

gB1 - Padrão eletroforético para linhagem gB1 de CMV determinada por RFLP;

gB2 - Padrão eletroforético para linhagem gB2 de CMV determinada por RFLP;

gB3 - Padrão eletroforético para linhagem gB3 de CMV determinada por RFLP;

gB4 - Padrão eletroforético para linhagem gB4 de CMV determinada por RFLP.

5.3. Padronização da PCR e PCR-RFLP para gH

Como descrito para gB, as condições de reação sugeridas por CHOU (1990) e CHOU & DENNISON (1992) para amplificação do fragmento alvo da glicoproteína H do CMV também não puderam ser reproduzidas em laboratório, necessitando padronização desde as concentrações dos reagentes usados na reação, até para ciclo de amplificação.

No entanto, ao contrário da gB, as condições padronizadas aqui produziram um fragmento genômico suficientemente bom para que, após o tratamento de restrição, os produtos resultantes pudessem ser visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio.

De acordo com alguns pesquisadores (FRIES *et al.*, 1994; SHEPP *et al.*, 1996; BONGARTS *et al.*, 1996) a região estudada da gH é menos variável que a gB e sua eficiência como parâmetro de distinção entre as linhagens é menor. Além disso, demonstraram que a distribuição dos genotipos gH era praticamente igual em pacientes HCMV-assintomáticos e sintomáticos, indicando que o gene em questão não estaria relacionado com manifestações clínicas específicas.

Foram estudados 28 pacientes para a região variável da glicoproteína H, e na corrida em gel de agarose 1000 2,0 % (Gibco-BRL) não foi possível fazer a distinção entre as linhagens, sendo portanto descartado o estudo desta região, o que não compromete o trabalho.

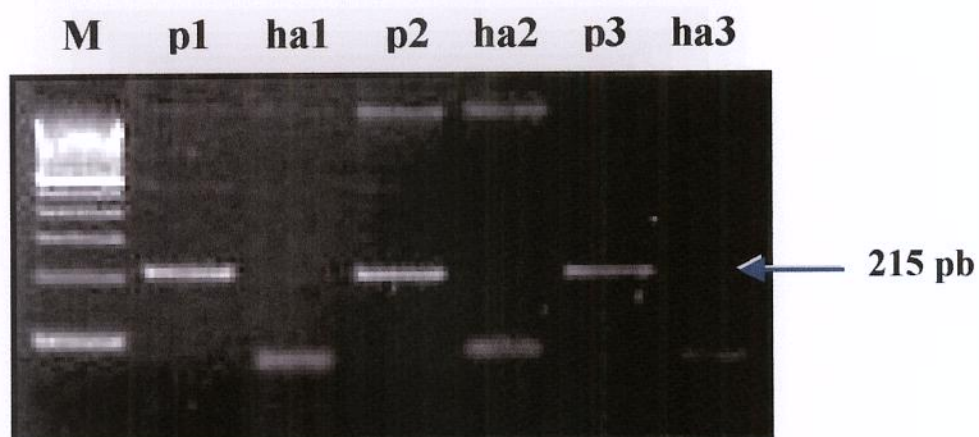


Figura 09 – Amplificação de 215 pb do DNA do HCMV com os “primers” gH172 e gH203 e padrões de digestão (gH) encontrados para as amostras analisadas. Eletroforese em gel de agarose 1000 (Gibco-BRL) 2,0% corado com brometo de etídio.

Legenda referente à figura 09:

M – marcador de peso molecular (Ladder 100 pb; Gibco-BRL, USA)

p – PCR da amostra analisada;

ha – padrão de digestão para a enzima *HhaI*.

Obs: Na foto estão representados os grupos 1, 2 e 3 (gB) respectivamente.

5.4. Seqüenciamento

No início do trabalho, algumas amostras amplificadas pela “Nested-PCR” para a região variável da glicoproteína B foram seqüenciadas, afim de se comprovar que o produto visualizado em gel pertencia à região alvo do CMV humano.

Os resultados obtidos através do seqüenciamento direto descrito por SANGER, NIKLEN & COULSON (1977), foram comparados com as seqüências disponíveis para o vírus no GENBANK, acessos M64937 a M64974 (LEHNER, STAMMINGER & MACH, 1991).

Posteriormente, uma amostra de cada subtipo, determinado neste estudo, foi seqüenciada e comparadas entre si para a verificação dos sítios de maior variação entre elas.

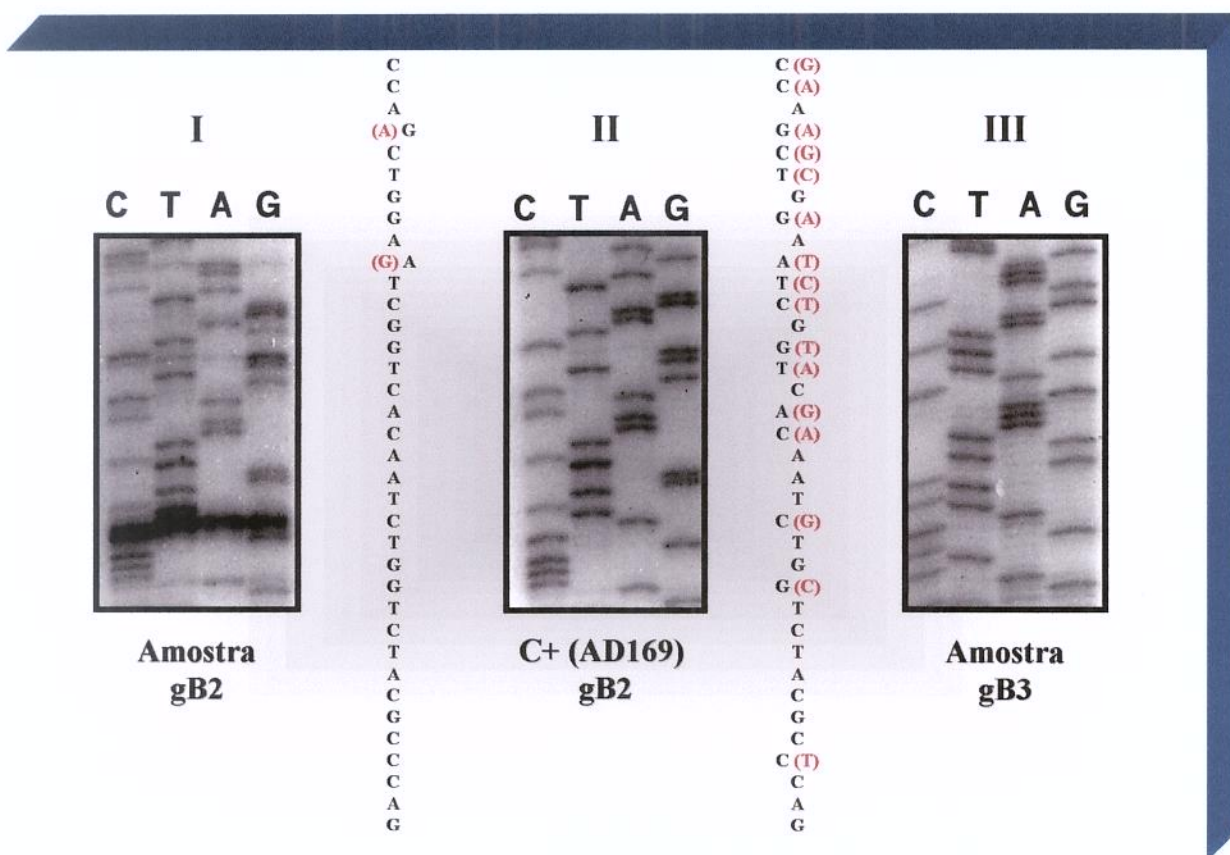


Figura 10 – Seqüenciamento direto de um fragmento (cerca de 40 pb) de grande variabilidade no gene da glicoproteína B entre as linhagens. Confirmação da seqüência amplificada.

Legenda referente à figura 10:

- I – Seqüenciamento da amostra de um paciente, padrão gB2 por RFLP;
- II - Seqüenciamento do C+ (Cêpa AD169) sabidamente padrão gB2 por RFLP;
- III - Seqüenciamento da amostra de um paciente, padrão gB3 por RFLP;

Obs: Notar a semelhança, quase que total, entre os nucleotídeos de I e II.

Comparando-se II e III, é percebido um número maior de alterações, daí a classificação em outro grupo.

Sentido 5'-3' ("primers" gB1319 –gB1604)

AD169 (Genbank)	tggaattggaacggtttggccaatcgatccagctgaatatcactcatagaccagaagaagacgagtgacaataatacaactcattgtccagcatggaatcgggt
AD169 (laboratório)	aa(c)tggaaacggtttggccaatcgatccagctgaatatcactcatagaccagaagaagacgagtgacaataatacaactcattgtccagcatggaatcgggt
gB1 (laboratório)	acaat(g)caagctcattt(a)ca(a)catggaatcgggt
gB2 (laboratório)	aggaccacaagaagaag-ac...tgacaa(c)aatacaactcattt(a)tcaca(a)catggaatcgggt
gB3 (laboratório)	ggaaccagacagagagtagcagagtggaacaataatgacaacctcattgtccagcatggaatcgggt
gB4 (laboratório)	atgga(c)tcgggt
AD169 (Genbank)	gcacaatctggtctacgcccagctgcagttcacctatgacacgttgccggttacatcaaccggggcgctggcgcaaatcgcaagaagcctggtgtgtggatcaa
AD169 (laboratório)	gcacaatctggt-tacgcccagctgcagttcacctatgacacgttgccggtttacatcaaccggggcgctggcgcaaatcgcaagaagcctggt-tgtggatcaa
GB1 (laboratório)	gcacaatctggtctacgcccagctgcagttcacctat-acaccgttgccggttgac.. tcaaccggggcgctggcgca(c)acactcgcaagaagcctggtgtgtggatcaa
gB2 (laboratório)	gcacaatctggt-tacgcccagctgcagttcacctatgacacgttgccggttacatcaaccggggcgctggcgcaaatcgcaagaagcctggtgtgtggatcaa
gB3 (laboratório)	gcagcaat(g)tgggtacgcccagctgcagtt-acctatgacacgttgccggttacatcaaccggggcg.tggcgcaaatcgcaagaagcctggtgtgtggatcaa
gB4 (laboratório)	(a)cacaatctggtctacgcccagctgcagttcacct(a)gcacagttgcggg(c)tcacatcaaccggggcg.....aaatcgcaagaagcctggtgtgtggatcaa
AD169 (Genbank)	cggcgcacccctagaggtcttcaaggaaactcagcaagatcaaccgctcagcattctctcgccatttacaacaaacggattggcgcggtttc
AD169 (laboratório)	cggcgcacccctagaggtctt....agga....
gB1 (laboratório)	cggcgcacccctagaggtcttcaatggaacatc-gtc(g)atgaatcaacctcgactcatgctcaattctctctgg.....
gB2 (laboratório)	cg-cgcaccctagag.....
gB3 (laboratório)	c-gcgcacccctagaggt-ttcaa-gaaactcagca-ga(a)aacccg.....ccatt-tc.....
gB4 (laboratório)	cggcgcacccctagaggtcttcaaggaaact(t)a-a-caagatcaaccgctcagc(t)attctctggccat(c)tacaacaaaccgattggcgcggtttc

Quadro 02: Alinhamento de representantes das linhagens analisadas neste trabalho, comparadas com a cepa AD169, cuja sequência foi extraída do GenBank. As sequências em destaque referem-se aos “primers internos” utilizados na amplificação de 300 pb. Utilizamos a seguinte nomenclatura:

x : Negrito: inserção de nucleotídeo;

() : Entre parênteses: alteração nucleotídica;

..... : Reticências: continuação da sequência, impossibilidade de leitura;

- : Hifen: deleção de nucleotídeo.

5.5. Quantificação: Captura Híbrida DIGENE®.

Para a avaliação quantitativa do DNA do HCMV através do Sistema de Captura Híbrida DIGENE®, 93 amostras de 30 pacientes imunossuprimidos em seguimento no HC/UNICAMP foram testadas.

O kit, específico para HCMV, produz resultados quantitativos diretos da viremia sem a necessidade da contagem de células através da microscopia e o tempo de processamento das amostras é mais flexível pois não depende da viabilidade dos vírus.

A Captura Híbrida é considerada hoje um teste diagnóstico promissor e eficaz, pela sua facilidade de uso, rapidez de resultados, alta sensibilidade e especificidade além da comprovada correlação clínica.

A população analisada foi, na sua maioria, transplantados de medula óssea e que têm contagem de leucócitos reduzida no período da intervenção, o que pode ser um fator limitante da utilização do método. Outro fator que pode influenciar a interpretação dos resultados é o tempo de estoque do *pellet* (que deve ser armazenado a -20°C até um período de 10 semanas).

A tabela 02 (Apêndice) discrimina a casuística estudada para esta metodologia.

A interpretação dos resultados dependem, em primeiro lugar, da validação do teste, através dos calibradores positivos e negativos, que para o método quantitativo foram feitos em triplicata. O valor do calibrador negativo deve ser menor ou igual a 12.000 RLU (unidade de luz relativa). Os calibradores positivos 1, 2 e 3 possuem o número determinado de cópias em pg/ml: 2,1; 41,5; 830, respectivamente.

Outros parâmetros para a validação do teste são os seguintes:

Teste de Quantificação
$10,0 \geq \text{CP1 } \bar{X} / \text{CN } \bar{X} \geq 1,5$
$200,0 \geq \text{CP2 } \bar{X} / \text{CN } \bar{X} \geq 10,0$
$1200,0 \geq \text{CP3 } \bar{X} / \text{CN } \bar{X} \geq 100,0$

Onde:

CP1 - Calibrador Positivo 1

CP2 - Calibrador Positivo 2

CP3 - Calibrador Positivo 3

CN - Calibrador Negativo

O valor HCMV positivo de corte é 2 vezes $\text{CN } \bar{X}$.

Os valores impressos durante a leitura em quimioluminômetro foram:

Cutoff: $3479 \times 2 = 6958$

$$\text{CP1 } \bar{X} / \text{CN } \bar{X} = 9340 \div 3479 = 2,68$$

$$\text{CP2 } \bar{X} / \text{CN } \bar{X} = 74323 \div 3479 = 21,36$$

$$\text{CP3 } \bar{X} / \text{CN } \bar{X} = 1075017 \div 3479 = 309,00$$

Interpretação dos resultados:

$$X = \text{RLU} / \text{cutoff}$$

$X \geq 1$: indica amostra positiva

$0,75 \leq X < 1$: resultado inconclusivo

$X \leq 0,75$: indica amostra negativa

Para determinar a concentração atual de HCMV na amostra, o número de genomas equivalentes detectado deve ser calculado da concentração de DNA complementar lida no luminômetro em pg/ml utilizando-se a seguinte equação que relaciona a concentração do DNA detectado ao número equivalente de genoma do HCMV, sabendo-se que em $41,5 \text{ pg/ml} = 1 \times 10^5$ genomas/amostra, temos: 2410 genoma-ml/pg-amostra.

Genomas do HCMV por amostra = concentração de DNA do HCMV (impressa em pg/ml)

$$\boxed{\text{Genomas do HCMV por amostra}} = \boxed{\text{Concentração de DNA do HCMV (impressa em pg/ml)}} \times \boxed{2410 \text{ genoma-ml / pg-amostra.}}$$

Utilizamos a equação para todas as amostras testadas. A aplicação da metodologia foi demonstrada com a amostra de EPS, que foi positiva para a presença do HCMV.

- A concentração de DNA do HCMV foi de 1,954 pg/ml
- A URL foi de 8941, valor maior que o cutoff (6958); a relação entre os 2 valores = 1,28; que afirma a positividade do CMV para a amostra
- Aplicação da equação:

$$\boxed{\text{Genomas do CMV na amostra de EPS}} = 1,954 \times 2410 = 4709,14 \text{ genomas/amostra}$$

- A amostra inicial continha 3,5 ml de sangue total, então a concentração do CMV na amostra foi:

$$\text{Concentração do CMV} = 4709,14 \text{ genomas/amostra} \div 3,5 \text{ ml/amostra}$$

$$\text{Concentração do CMV na amostra de EPS} = 1345,46 \text{ genomas de CMV/ml}$$

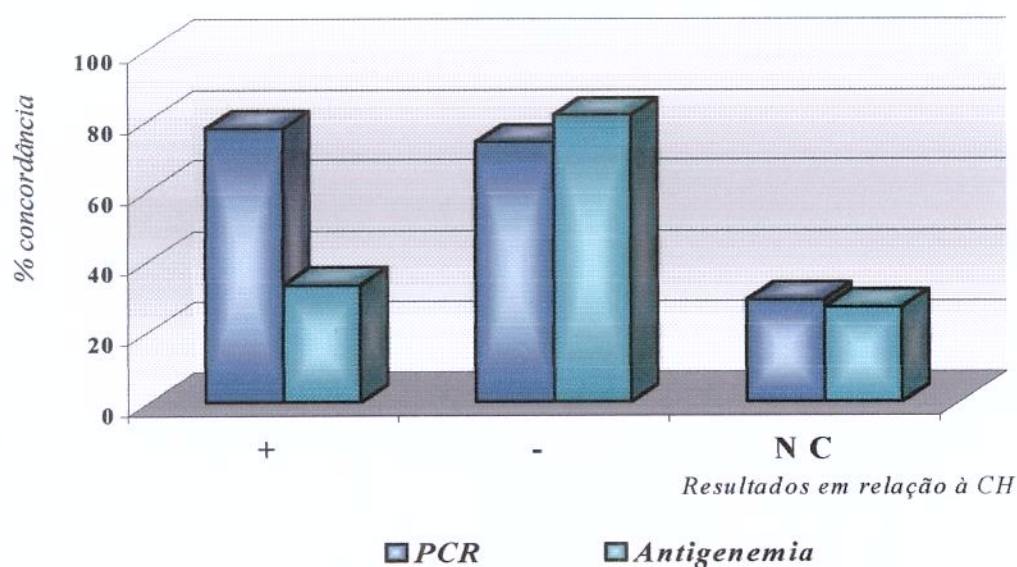
Em nossa casuística, apenas 9 amostras foram positivas para o HCMV. Levamos em consideração o fato de que muitas amostras apresentaram número de leucócitos abaixo do recomendado (5,0 K/ μ l) para a realização de um teste confiável. Além disso, algumas amostras permaneceram estocadas por um período superior a 10 semanas, o que pode ter influenciado em nossos resultados.

Tabela 09: Resumo dos resultados obtidos com as metodologias PCR, Antigenemia e Captura

Híbrida para o grupo de pacientes estudados:

Resultados	<i>Metodologias</i>		
	PCR	Antigenemia	Captura Híbrida
+	27	14	9
-	63	71	80
?	3	8	4
<i>Total de Pacientes Avaliados = 93</i>			

O gráfico 04 demonstra em porcentagem, a relação de concordância entre os resultados de PCR e Antigenemia com a metodologia de Captura Híbrida.

**Gráfico 04:** Relação de resultados entre PCR e Antigenemia vs Captura Híbrida.

Nossos resultados demonstram cerca de 77% e 74% de concordância entre resultados da PCR em relação à metodologia de Captura Híbrida positiva e negativa, respectivamente. Por outro lado, a técnica de Antigenemia forneceu apenas 23% de resultados compatíveis à Captura Híbrida positiva, enquanto para resultados negativos, a concordância se aproxima aos 80%. Vale ressaltar, que algumas amostras (3) não puderam ser avaliadas pela Antigenemia. Além disso, observamos que os resultados não concordantes (NC) das metodologias PCR e Antigenemia, em relação à Captura Híbrida, foram semelhantes (cerca de 20%).

5.6. Quantificação: Diluição Limitante

A diluição limitante é uma técnica semi-quantitativa para avaliação da carga viral em amostras de pacientes HCMV-positivos. É uma técnica relativamente simples, de implantação viável e com baixo custo em qualquer laboratório de Biologia Molecular.

No entanto, poucas amostras foram testadas para esta metodologia não sendo possível fazer qualquer tipo de análise. A padronização desta técnica foi pertinente pois pudemos verificar sua utilização em amostras retrospectivas, o que não acontece quando aplicamos uma metodologia de quantificação viral através de kits comerciais.

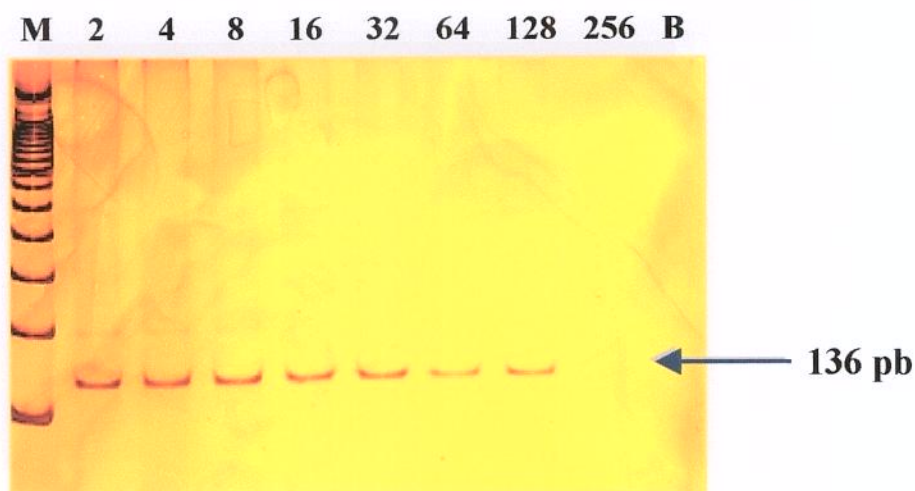


Figura 11 – Amplificação de 136 pb do DNA do HCMV com os “primers” LA1 e LA2, derivados da diluição limitante múltipla de 2 de uma amostra HCMV-positiva e cujo o último título foi 128. Visualização em gel de acrilamida 8,0% corado com nitrato de prata.

Legenda referente à figura 11:

M – marcador de peso molecular (Ladder 100 pb; Gibco-BRL, USA)

1 a 256 - Títulos em que as amostras de DNA foram diluídas para o processamento da PCR.

B – branco de reação (H₂O).

5.7. Resultados Estatísticos para a Genotipagem

Afim de se verificar a existência de associação entre os grupos de pacientes estudados com relação à gravidade do quadro clínico e linhagem do HCMV presente no paciente, utilizamos o teste estatístico Qui-quadrado. Como os valores esperados foram menores que 5, utilizamos o teste exato de Fisher, sendo considerado significativa a associação quando o valor $p \leq 0,05$.

Foram analisados amostras de um total de 104 pacientes, distribuídos da seguinte forma:

Tabela 10: Frequência de cada grupo de pacientes em relação à população estudada.

GRUPOS	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
HIV	25	24,5	25	24,5
Transplante Hepático	13	12,7	38	37,3
Transplante Renal	12	11,8	50	49,0
Transplante de Medula Óssea	28	27,5	78	76,5
Congênitos	15	14,7	93	91,2
Outros	9	8,8	102	100,0

Obs: 2 pacientes não puderam ser avaliados devido à origem indeterminada da amostra.

Estudamos 122 amostras biológicas de pacientes imunocomprometidos acompanhados no HC-UNICAMP, de modo que 91 eram de DNA extraído de sangue periférico, e 31 de urina. A seguinte tabela discrimina a frequência dos subtipos em relação ao tipo de amostra.

Tabela 11: Frequência das linhagens de CMV para as amostras de sangue dos pacientes avaliados.

Linhagens	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
gB1	20	22,0	20	22,0
gB1gB3	1	1,1	21	23,1
gB2	44	48,4	65	71,4
gB2gB3	3	3,3	68	74,7
gB3	21	23,1	89	97,8
gB4	2	2,1	93	100,0

Tabela 12: Frequência das linhagens de CMV para as amostras de urina dos pacientes avaliados.

Linhagens	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
gB1	9	29,0	9	29,0
gB2	14	45,2	23	74,2
gB2gB3	1	3,2	24	77,4
gB3	5	16,1	29	93,5
gB4	2	6,5	31	100,0

As amostras também foram avaliadas quanto à importância da infecção pelo Citomegalovírus no período de coleta. Foram analisadas 92 amostras, 12 prontuários não puderam ser consultados e a tabela a seguir demonstra os resultados encontrados:

Tabela 13: Importância da infecção pelo HCMV em pacientes imunocomprometidos.

Gravidade	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
(-)	25	27,2	25	27,2
(±)	32	34,8	57	62,0
(+)	35	38,0	92	100,0

A avaliação dos grupos separadamente é relevante para comparação com outros grupos de estudos, já que alguns deles associam a presença de uma determinada linhagem com melhor prognóstico em uma população específica de pacientes, ou piora do estado geral e até morte em outra população.

Sendo assim, temos para a população HIV positiva 25 casos, dos quais 6 não tiveram o prontuário pesquisado, distribuídos em 23 amostras originadas de sangue periférico e 8 de urina:

Tabela 14: Frequência das variáveis para o grupo de pacientes portadores do vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) com infecção ativa pelo CMV.

Gravidade				
Gravidade	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
(-)	6	31,6	6	31,6
(±)	3	15,8	9	47,4
(+)	10	52,6	19	100,0

Amostra de Sangue				
Linhagens	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
gB1	6	26,1	6	26,1
gB2	11	47,8	17	73,9
gB3	6	26,1	23	100,0

Amostra de Urina				
Linhagens	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
gB1	3	37,5	3	37,5
gB2	2	25,0	5	62,5
gB3	3	37,5	8	100,0

Um dos grupos em que a presença do HCMV tem relevância maior é o de recém-nascidos, adquirido através de infecção congênita. Desta forma, foram analisadas 15 amostras (7 provenientes de sangue e 13 de urina). Nesse grupo apenas 1 prontuário não pôde ser verificado.

Tabela 15: Frequência das variáveis para o grupo de pacientes com infecção congênita pelo CMV.

Gravidade				
Gravidade	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
(-)	3	21,4	3	21,4
(±)	4	28,6	7	50,0
(+)	7	50,0	14	100,0

Amostra de Sangue				
Linhagens	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
gB1	2	28,6	2	28,6
gB2	3	42,9	5	71,4
gB3	1	14,3	6	85,7
gB4	1	14,3	7	100,0

Amostra de Urina				
Linhagens	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
gB1	3	23,1	3	23,1
gB2	8	61,5	11	84,6
gB4	2	15,4	13	100,0

Outra população imunocomprometida estudada compreendeu: 13 pacientes submetidos ao transplante hepático e as amostras, 13 obtidas à partir de sangue e 3 de urina foram assim classificadas (1 prontuário não pôde ser investigado):

Tabela 16: Frequência das variáveis para o grupo de pacientes transplantados hepáticos com infecção pelo HCMV.

Gravidade				
Gravidade	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
(-)	4	33,3	4	33,3
(±)	3	25,0	7	58,3
(+)	5	41,7	12	100,0

Amostra de Sangue				
Linhagens	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
gB1	2	15,4	2	15,4
gB2	4	30,8	6	46,2
gB2gB3	1	7,7	7	53,8
gB3	6	46,2	13	100,0

Amostra de Urina				
Linhagens	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
gB2gB3	1	33,3	1	33,3
gB3	2	66,7	3	100,0

Dentre os pacientes submetidos ao transplante renal, obtivemos 12 amostras, sendo 11 originárias de sangue e 3 de urina:

Tabela 17: Frequência das variáveis para o grupo de pacientes transplantados renais com infecção pelo HCMV.

Gravidade				
Gravidade	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
(-)	2	16,7	2	16,7
(±)	4	33,3	6	50,0
(+)	6	50,0	12	100,0

Amostra de Sangue				
Linhagens	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
gB1	3	27,3	3	27,3
gB1gB3	1	9,1	4	36,4
gB2	6	54,5	10	90,9
gB3	1	9,1	11	100,0

Amostra de Urina				
Linhagens	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
gB2	3	100,0	3	100,0

Um dos grupos mais estudados em relação à genotipagem é de pacientes submetidos ao transplante de medula óssea, também é a população que conseguimos uma casuística um pouco mais significativa. Foram avaliadas 28 amostras, 2 pastas não estavam disponíveis para a caracterização da gravidade.

Tabela 18: Frequência das variáveis para o grupo de pacientes transplantados de medula óssea com infecção ativa pelo HCMV.

Gravidade				
Gravidade	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
(-)	8	30,8	8	30,8
(±)	12	46,2	20	76,9
(+)	6	23,1	26	100,0

Amostra de Sangue				
Linhagens	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
gB1	4	14,3	4	14,3
gB2	15	53,6	19	67,9
gB2gB3	2	7,1	21	75,0
gB3	6	21,4	27	96,4
gB4	1	3,6	28	100,0

Amostra de Urina				
Linhagens	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
gB1	1	100,0	1	100,0

Os demais pacientes que completaram a nossa casuística não pertenciam a um grupo específico anteriormente descrito, decidimos então incluí-los em uma categoria denominada outros, que englobou casos de etiologia desconhecida, casos de linfoma e neoplasia e ainda casos de Lupus. Foram 9 pacientes avaliados, sendo 8 amostras obtidas à partir de sangue e 2 de urina.

Tabela 19: Frequência das variáveis para pacientes incluídos em “outros” com infecção ativa pelo HCMV.

Gravidade				
Gravidade	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
(-)	2	22,2	2	22,2
(±)	6	66,7	8	88,9
(+)	1	11,1	9	100,0

Amostra de Sangue				
Linhagens	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
gB1	3	37,5	3	37,5
gB2	4	50,0	7	87,5
gB3	1	12,5	8	100,0

Amostra de Urina				
Linhagens	Frequência	%	Frequência Acumulada	% Acumulada
gB1	2	100,0	2	100,0

As tabelas a seguir demonstram os dados utilizados na análise estatística afim de verificar a possível associação entre grupos específicos de pacientes e linhagens de CMV, bem como se há ou não relação de um determinado genotipo do vírus com o grau de manifestação clínica apresentada no período de coleta da amostra.

Tabela 20: Análise estatística através do teste exato de Fisher (dupla entrada) entre as variáveis Grupos de Pacientes vs Linhagens de CMV.

Grupos de Pacientes				
Frequência % % linha % coluna	Linhagens mais frequentes			Total
	gB1	gB2	gB3	
HIV	6	11	6	23
	7,41	13,58	7,41	28,40
	26,09	47,83	26,09	
	33,33	25,00	31,58	
Transplante Hepático	2	4	6	12
	2,47	4,94	7,41	14,81
	16,67	33,33	50,00	
	11,11	9,09	31,58	
Transplante Renal	3	6	1	10
	3,70	7,41	1,23	12,35
	30,00	60,00	10,00	
	16,67	13,64	5,26	
Transplante de Medula Óssea	4	15	6	25
	4,94	18,52	7,41	30,86
	16,00	60,00	24,00	
	22,22	34,09	31,58	
Congênitos	3	8	0	11
	3,70	9,88	0,00	13,58
	27,27	72,73	0,00	
	16,67	18,18	0,00	
Total	18	44	19	81
	22,22	54,32	23,46	100,00

Teste Exato de Fisher (dupla entrada) $p = 0,251$

As amostras incluídas no grupo “Outros” foram retiradas da comparação devido à escassez de informações e para o grupo “Congênitos”, foram utilizadas as amostras de urina para a avaliação devido à maior amostragem.

Tabela 21: Análise estatística através do teste exato de Fisher (dupla entrada) entre as variáveis Grupos de Pacientes vs Linhagens de CMV.

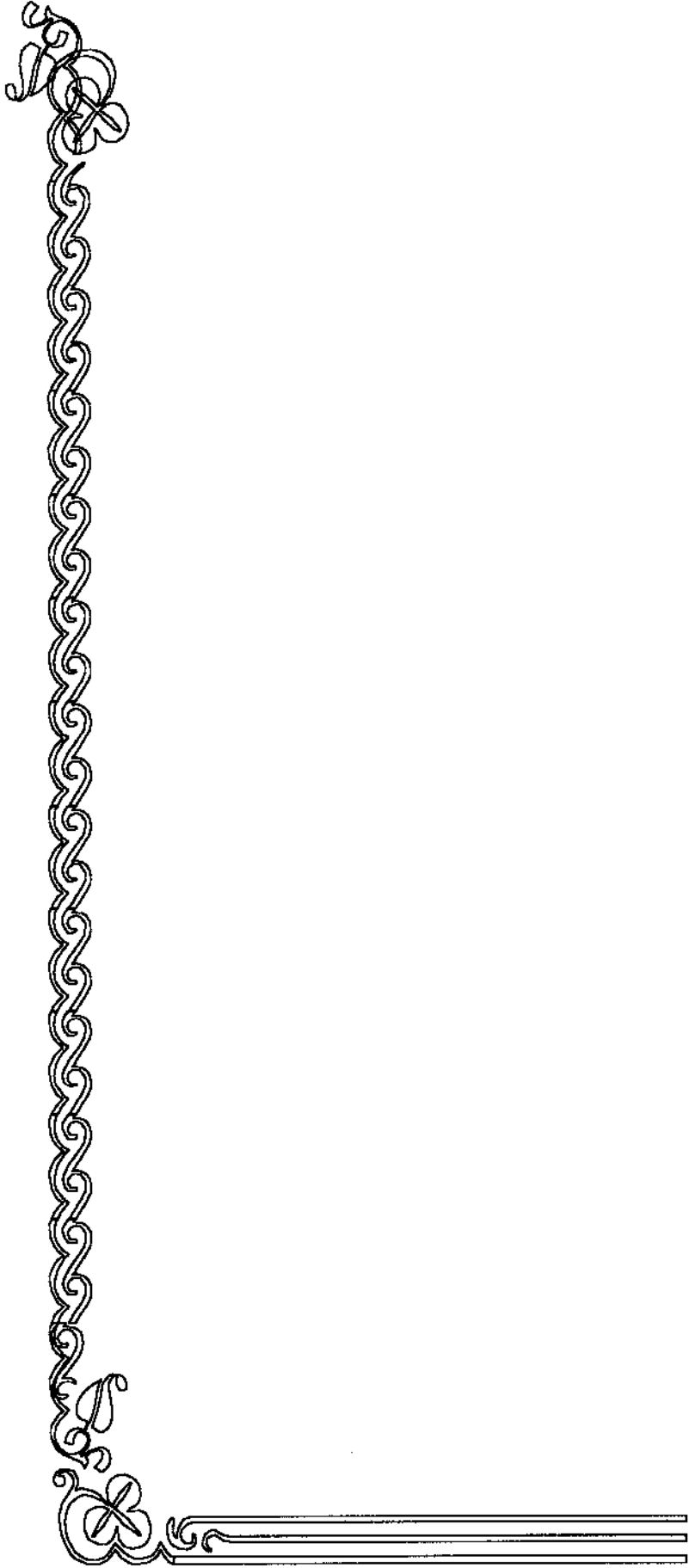
Grupos de Pacientes				
Frequência				
%				
Linhagens mais frequentes				
% linha				
% coluna	gB1	gB2	gB3	Total
HIV	6	11	6	23
	8,57	15,71	8,57	32,86
	26,09	47,83	26,09	
	40,00	30,56	31,58	
Transplante Hepático	2	4	6	12
	2,86	5,71	8,57	17,14
	16,67	33,33	50,00	
	13,33	11,11	31,58	
Transplante Renal	3	6	1	10
	4,29	8,57	1,43	14,29
	30,00	60,00	10,00	
	20,00	16,67	5,26	
Transplante de Medula Óssea	4	15	6	25
	5,71	21,43	8,57	35,71
	16,00	60,00	24,00	
	26,67	41,67	31,58	
Total	15	36	19	70
	21,43	51,43	27,14	100,00
Teste Exato de Fisher (dupla entrada) $p = 0,483$				

Os grupos “Outros” e “Congênitos” foram retirados da comparação devido à escassez de informações e amostragem pequena para amostras de sangue periférico.

Tabela 22: Análise estatística através do teste exato de Fisher (dupla entrada) entre as variáveis Grupos de Pacientes vs Gravidade.

Grupos de Pacientes				
Frequência	Gravidade			
%				
% linha				
% coluna	(-)	(±)	(+)	Total
HIV	6	3	10	19
	7,23	3,61	12,05	29,89
	31,58	15,79	52,63	
	26,09	11,54	29,41	
Transplante Hepático	4	3	5	12
	4,82	3,61	6,02	14,46
	33,33	25,00	41,67	
	17,39	11,54	14,71	
Transplante Renal	2	4	6	12
	2,41	4,82	7,23	14,46
	16,67	33,33	50,00	
	8,70	15,38	17,65	
Transplante de Medula Óssea	8	12	6	26
	9,64	14,46	7,23	31,33
	30,77	46,15	23,08	
	34,78	46,15	17,65	
Congênitos	3	4	7	14
	3,61	4,82	8,43	16,87
	21,43	28,57	50,00	
	13,04	15,38	20,59	
Total	23	26	34	83
	27,71	31,33	40,96	100,00
Teste Exato de Fisher (dupla entrada) $p = 0,446$				

O grupo “Outros” foi retirado da comparação devido à escassez de informações e amostragem pequena.



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Discussão

6. DISCUSSÃO

O Citomegalovírus humano é um herpesvírus cosmopolita e que geralmente é capaz de produzir infecções persistentes e assintomáticas durante toda a vida. No entanto, em populações que são imunologicamente comprometidas ou que têm um sistema imune imaturo (transplantados, portadores do HIV, pacientes submetidos à quimioterapia, portadores de doença auto-imune e recém-nascidos) o HCMV é o mais freqüente patógeno oportunista, podendo gerar inúmeras manifestações clínicas, que variam desde uma doença com pouca repercussão clínica até uma que envolve risco de vida (DARLINGTON *et al.*, 1991; LEHNER, STAMMINGER & MACH, 1991; NAVARRO *et al.*, 1997).

Sabe-se que as manifestações clínicas causadas por infecção pelo HCMV podem ser decorrentes da variabilidade genética entre as diferentes linhagens do vírus (LEHNER, STAMMINGER & MACH, 1991). Acredita-se que algumas linhagens têm preferência em infectar determinados órgãos ou tipos celulares, que são mais virulentas ou mais imunossupressoras que outras, ou ainda que têm uma probabilidade maior de contribuir para a rejeição do órgão, em casos de transplante (BINDER *et al.*, 1999). Essas variações ocorrem, geralmente, em regiões gênicas altamente conservadas e em consequência, funcionalmente relevantes (VOGELBERG *et al.*, 1996; WIGART *et al.*, 1998), além disso, elas têm sido utilizadas como marcadores genéticos em estudos clínicos para se fazer a distinção entre as cêpas e avaliar sua associação com a patogênese viral (RETIÈRE *et al.*, 1998).

As glicoproteínas do envelope dos herpesvírus podem ser alvos para anticorpos de neutralização do vírus, controlam a entrada viral e têm papel importante na disseminação do vírus entre as células do hospedeiro (RASMUSSEN *et al.*, 1991). Regiões variáveis, especialmente nas glicoproteínas B (gB) e H (gH) do envelope do CMV, têm sido extensivamente estudadas, através de

técnicas que envolvem biologia molecular, para caracterizar as diferentes linhagens do vírus e sua possível relação com a gravidade de expressão de doença em diversos grupos de pacientes (CHOU, 1990; CHOU & DENNISON, 1991; FRIES *et al.*, 1994; SHEPP *et al.*, 1998; ROSEN *et al.*, 1998; MEYER-KÖNIG *et al.*, 1998 e 1998(2); GILBERT *et al.*, 1999; BINDER *et al.*, 1999).

A metodologia geralmente aplicada para a distinção entre os subtipos de CMV é a PCR-RFLP (CHOU, 1990; CHOU & DENNISON, 1991; FRIES *et al.*, 1994), que através de um tratamento com endonucleases de restrição, o produto da PCR é clivado em fragmentos de diferentes tamanhos e o perfil da digestão é determinante das linhagens. Para a gB, utilizam-se as enzimas de restrição *RsaI* e *HinfI*, que determinarão pelo menos quatro subtipos virais. SHEPP *et al.* (1998), em seus estudos para a mesma região, caracterizou um quinto genotipo. Recentemente, TRINCADO *et al.* (2000), encontrou em um grupo de crianças com infecção congênita por HCMV, dois novos genotipos virais (gB6 e gB7).

A glicoproteína H, em comparação com a gB, possui maior grau de conservação entre as linhagens e, quando submetidas à metodologia RFLP com a enzima *HhaI*, produz apenas dois perfis de restrição (CHOU, 1992(2)). Estudos anteriores não conseguiram relacionar a variação na região gênica alvo com o quadro clínico apresentado por diversos grupos de pacientes com comprometimento imunológico; foi demonstrado semelhança na distribuição do genotipo gH entre pacientes sintomáticos e assintomáticos (FRIES *et al.*, 1994; AQUINO, YAMAMOTO & FIGUEIREDO, 1997; AQUINO, 1998). Portanto, não foi considerada um bom marcador para a distinção entre os subtipos, mas por ser uma importante região de reconhecimento para anticorpos de neutralização do vírus, é utilizada em estudos de vacinas (CHOU, 1992(2)).

Por essas razões e por não apresentar diferenças perceptíveis no perfil eletroforético em gel de agarose pela análise de restrição, decidimos pela não inclusão da tipagem do HCMV através desta região neste trabalho.

Estudamos seis diferentes grupos de pacientes imunossuprimidos ou imunocomprometidos infectados pelo HCMV, entre eles: congênitos, HIV-positivos, transplantados (medula óssea, hepático e renal) e um grupo que inclui outras patologias (lupus, neoplasia, etc...).

Encontramos, na população HIV-infectada incluída neste, a prevalência da linhagem gB2 do HCMV e não conseguimos relacioná-la com a presença de retinite causada por esse vírus. Nesse grupo de pacientes, a infecção pelo HCMV provocou distúrbios gastro-intestinais como principal manifestação clínica, também não associada a um determinado subtipo. Também pudemos observar semelhante prevalência entre os subtipos gB1 e gB3 entre os pacientes com AIDS.

A associação entre um genotipo específico e quadro de retinite na população HIV também não foi confirmada por HANDFIELD *et al.* (1999); GILBERT *et al.* (1999) e PEEK *et al.* (1998), embora este último não tenha encontrado significância na prevalência da gB2 em relação a outros genotipos. Estes grupos de pesquisa afirmam que a genotipagem não oferece benefícios adicionais sobre a carga viral para identificação de pacientes HIV-infectados com alto risco de desenvolvimento de doença por HCMV. BONGARTS *et al.* (1996) encontraram praticamente a mesma prevalência entre os subtipos gB1 e gB2 em pacientes com AIDS e em áreas diferentes do corpo, relacionando-os com disseminação viral; também não relacionaram uma determinada cêpa e retinite e ainda, os resultados por eles obtidos, indicam que infecções com gB1 estão associadas com apresentação clínica mais favorável.

SHEPP *et al.*, 1996, descreveram a associação da prevalência do genotipo gB2 do HCMV com retinite em pacientes com doença pelo HIV; achados sustentados por HEBART *et al.* (1997). Para estes pesquisadores, diferenças na virulência, tropismo celular ou distúrbios da resposta imune de certas linhagens virais podem ser importantes determinantes da infecção.

Na população transplantada de medula óssea (TMO), o genotipo gB2 também foi o mais freqüente, com maior representatividade em comparação aos demais grupos estudados. No entanto, a

presença do vírus nessa população não provocou, de maneira geral, pertinente gravidade na apresentação clínica dos pacientes. A presença de mistura de linhagens não foi freqüente em nosso estudo (4 : 104), porém dois pacientes de TMO, que apresentaram duas diferentes cêpas do HCMV simultaneamente, evoluíram com agravamento do quadro clínico, podendo ser um dado relevante, mas que não pôde ser estatisticamente comprovado.

TOROK-STORB *et al.* (1997) e RASMUSSEN *et al.* (1997), descreveram a predominância do gB1 e os dados por eles apresentados sugerem que as linhagens gB3 e gB4 podem estar relacionadas com morte por mielossupressão e menor risco de GVHD aguda de graus II a IV. Outros autores (CHOU & DENNISON, 1991; FRIES *et al.*, 1994) também encontraram na população estudada por eles, um maior número de linhagens do genotipo 1 e relacionaram-na com um melhor prognóstico da infecção. WADA *et al.* (1997), em seus relatos, associaram a prevalência do gB2 com população transplantada de medula óssea de origem oriental e do gB1 em caucasianos, o que não foi confirmado por nós, já que nenhum dos pacientes avaliados em nosso estudo era de origem oriental.

Em nossa casuística para o grupo de pacientes transplantados hepáticos, encontramos o subtipo gB3 em seis dos treze pacientes avaliados, sendo que 50% evoluíram para doença por HCMV. A gravidade das manifestações clínicas não puderam ser associadas a um determinado genotipo devido à pequena amostragem. ROSEN *et al.* (1998) perceberam um número significativamente maior da linhagem gB1 entre os transplantados hepáticos com episódios de rejeição aguda, contudo, não houve diferença na gravidade da rejeição ou desenvolvimento de rejeição crônica entre pacientes com genotipos diferentes, conclusões obtidas também por BINDER *et al.* (1999).

Houve predominância do gB2 em transplantados renais avaliados no presente estudo, e a gravidade da infecção não pôde ser associada com uma cêpa específica. Em um estudo prévio, VOGELBERG *et al.* (1996) não encontraram diferenças significativas na distribuição das linhagens

gB1, gB2 e gB3; também não observaram correlação entre os genótipos e apresentação clínica. AQUINO (1998) caracterizou uma população de transplantados renais na região de Ribeirão Preto/SP, e em contraste com os resultados obtidos por nós, encontrou igual prevalência dos genótipos gB1 e gB3. Também discordando dos nossos dados, encontrou alta incidência de amostras com mistura de linhagens.

Como demonstrado por VERBRAAK *et al.*, 1998 em estudo com pacientes HIV-positivos, a análise por PCR-RFLP para HCMV em isolados de sangue, urina e sêmen, revelou que infecção com múltiplas cêpas desse vírus é relativamente comum, sendo demonstrada mais de uma linhagem em diferentes locais no corpo.

Em nossa casuística, 16 pacientes tiveram amostras de sangue e urina coletadas simultaneamente e em análise genotípica, todas demonstraram concordância nas linhagens entre os isolados correspondentes.

Em resumo, todos os 4 genótipos de HCMV descritos em literatura, foram caracterizados na região de Campinas/SP em pacientes com comprometimento imunológico. Observamos uma maior incidência do subtipo gB2, embora os genótipos gB1 e gB3 tenham sido bem representados, no entanto, não foi observada a prevalência, estatisticamente significativa ($p = 0,483$), entre as linhagens e grupos de pacientes. Mistura de linhagens e o genótipo gB4 foram encontrados raramente.

Como observado em nossos resultados de genotipagem, o HCMV, independente do genótipo apresentado, é um agente de grande importância clínica em qualquer grupo de pacientes imunologicamente comprometidos.

Ainda em relação à genotipagem, padronizamos a técnica de SSCP não-radioativo que poderá ser utilizada futuramente para melhor caracterização das linhagens de HCMV. Conseguimos reconhecer, por essa técnica, padrões conformacionais característicos para as 4 linhagens principais descritas em literatura. A SSCP é uma metodologia rápida e fácil quando utiliza-se o sistema

automático para eletroforese e coloração, e que poderá ser útil no “screening” dos genótipos virais. BINDER *et al.* (1999), em estudo com SSCP radioativo, afirmaram que esta técnica é capaz de detectar alterações que não podem ser identificadas pela PCR-RFLP, e que provavelmente não modificam um sítio de reconhecimento enzimático.

O método de Captura Híbrida Digene® é rápido, relativamente fácil e de flexibilidade na manipulação da amostra, tendo como desvantagem principal o custo do Kit. A amostra pode ser processada em 6 dias a partir da coleta, e o *pellet* pode ficar armazenado (a – 20°C) até 10 semanas ou quando o número necessário de amostras para a utilização de 1 kit (48 amostras) for adquirido, para então dar continuidade ao experimento. Nossos resultados com a utilização do kit para Captura Híbrida não condizem com os esperados ou descritos na literatura, já que cerca de 22% das amostras que obtiveram Captura Híbrida positiva, revelaram resultado de Antigenemia positivo. Para casos de Captura Híbrida negativa, a concordância de resultados com a Antigenemia foi maior, aproximando-se de 80%. A estocagem de algumas amostras por período superior ao indicado e a contagem de leucócitos inferior ao valor recomendado (5,0 K/ μ l), principalmente no grupo de pacientes pós-TMO, podem ter interferido nos resultados.

Muitos autores concordam que a utilização de uma metodologia de avaliação da carga viral, em pacientes imunocomprometidos, representa um parâmetro valioso para o monitoramento da infecção pelo HCMV e tratamento antiviral (SHIBATA *et al.* 1992; GERNA *et al.* 1995; BAILEY *et al.* 1995; RASMUSSEN *et al.* 1995; ARRIBAS *et al.* 1995; BADLEY *et al.* 1996;).

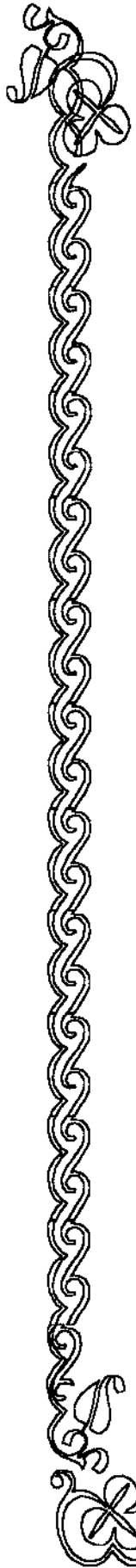
A utilização da PCR diluição-limitante, permite a determinação da carga viral em amostras retrospectivas, no entanto, não pudemos avaliar sua aplicação. Tomando-se o devido cuidado com a contaminação de um tubo para outro na hora da diluição, pode-se dizer que esta técnica é facilmente aplicável, sensível e específica, devido à metodologia de coloração rápida para gel de acrilamida, por nitrato de prata.



Conclusões

7. CONCLUSÕES

1. Padronizou-se e aplicou-se a “Nested-PCR” para amplificação de uma região variável da glicoproteína B de HCMV;
2. Observou-se a prevalência do genotipo gB2 de HCMV através da análise de restrição padronizada em gel de Agarose 1000 (Gibco-BRL) na população imunocomprometida em geral, atendida no HC-UNICAMP, Campinas/SP;
3. Não foi constatada a associação entre um genotipo de HCMV e gravidade na apresentação clínica;
4. A relação entre um subtipo de HCMV e um grupo específico de pacientes, também não foi comprovada;
5. Padronizou-se a técnica de SSCP não-radioativo, que poderá ser uma ferramenta complementar para caracterizar subtipos virais a partir de um fragmento amplificado pela PCR;
6. O kit de Captura Híbrida para HCMV não demonstrou resultados concordantes com a literatura, sugerindo uma limitação do método quando aplicado em amostras de pacientes pós-TMO;
7. Acreditamos que a determinação da linhagem do HCMV aliada à carga viral, sejam metodologias complementares e de fundamental importância no entendimento e monitoramento da infecção pelo HCMV em pacientes imunocomprometidos.



Summary

8. SUMMARY

Human Cytomegalovirus (HCMV) is one of the most important infectious agents that attack immunocompromised patients causing significant morbidity and mortality in this group. The detection of the HCMV genome by the PCR (Polymerase Chain Reaction) is specific and sensitive; and it can be used as a powerful tool for the early diagnoses of the infection caused by this virus. Variations in functionally relevant areas of the HCMV genome have been used as genetic markers in numerous clinical studies to differentiate the strains and to associate them with the viral pathogenesis and the clinical manifestation in the patient. The glycoproteins of the envelope of the human cytomegalovirus are probably essential to the entrance and the viral dissemination in the host cells; they are also important targets of the human immune response that induce the formation of the antibodies of the virus neutrality. The PCR, combined with the analysis of restriction of the polymorphic areas of the amplified products (PCR-RFLP), is effective for the identification of the HCMV genotypes, becoming possible the distinction of at least 4 (four) electrophoretic patterns.

On the other hand, the determination of the viral load in patients immunologically affected has been associated as marker or predictor for the development of the organ specific disease by the HCMV, being of fundamental importance to the management of the therapy. Besides, the value of the viral load is related to the group of patients and/or the type of transplant, the pathogenesis of the HCMV, and the levels of the immune-suppression; and it can indicate the beginning of the antiviral therapy.

Knowing the importance of the identification of the strains of the HCMV in immunocompromised patients, its possible relation with the infection and clinical presentation, and the relevance of the determination of the viral load in several groups, this study, evaluating different immunocompromised people followed at HC-UNICAMP, had as main targets: to determine the

prevalence of the HCMV genotypes and evaluate a possible association of the subtype with the clinical table presented by different groups studied; standardize determination methods of the viral load with the finality of evaluating the applicability in the management of the antiviral therapy, and as predictable value of the disease by the HCMV.

A hundred and twenty-two (122) clinical samples (blood and urine) of 104 patients were evaluated retrospectively to the genotyping. The groups of HCMV infected patients were basically the following: newborn children with congenital infection, bone marrow transplanted patients, hepatic and renal transplanted patients, and HIV infected individuals. The results were statistically analyzed.

Two methodologies were evaluated for the quantification: one based on the principle of the hybrid capture, where 93 samples were analyzed; and another one on the PCR limiting dilution, where some exemplars were evaluated, since the quality of the DNA is fundamental to the continuation of the methodology.

We could characterize, in our group of patients, the four genotypes described in literature as results. We observed the largest prevalence of the gB2 genotype, although the gB1 and gB3 genotypes were well represented. Statistical data did not prove the association of a determined strain of the virus with the severity of the clinical manifestation, as well as a specific group of patients.

The methodologies of quantification evaluated have high sensitivity and specificity, compatible with the Antigenemia. The main advantage of the methodologies regarding the former one is in relation to the processing of the sample that does not need to be just after the collection because it does not depend on the viability of the virus.

Finally, we believe that the determination of the HCMV strain and viral load are complementary methodologies and of fundamental importance for the understanding and management of the HCMV infection in immunocompromised patients.



Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHA, S.A.; COLEMAN, J.C.; SELWYN, S.; MAHMOUD, 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. *Journal of Virological Methods*, **22**: 41-50, 1988.
- ALBEROLA, J.; DOMÍNGUEZ, V.; CARDEÑOSO, L.; LÓPEZ-ALDEGUER, J.; BLANES, M.; ESTELLÉS, F.; RICART, C.; PASTOR, A.; IGUAL, R.; NAVARRO, D. – Antibody Response to Human Cytomegalovirus (HCMV) Glycoprotein B (gB) in AIDS Patients with HCMV End-Organ Disease. *Journal of Medical Virology*, **55**: 272-280, 1998.
- ALEXANDRE, I.; ZAMMATTEO, N.; ERNEST, I.; LADRIERE, J.M.; LE, L.; HAMELS, S.; CHANDELIER, N.; VIPOND, B.; REMACLE, J. – Quantitative Determination of CMV DNA Using a Combination of Competitive PCR Amplification and Sandwich Hybridization. *BioTechniques*, **25**: 676-683, 1998.
- ALFORD, C.A.; BRITT, W.J. - Cytomegalovirus. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. - *Virology*, 2^a ed., New York, Raven Press Ltda, 1990, p. 1981- 2010.
- AQUINO, V.H. – Estudo sobre a Citomegalovirose em Transplantados de Rim e Análise de Genotipos Virais. (1998). *Tese de Mestrado*.
- AQUINO, V.H.; YAMAMOTO, A.Y.; FIGUEIREDO, L.T.M. – Cytomegalovirus (CMV) Glycoprotein B Genotypes Causing Congenital and Perinatal Infections. *Virus – Resumos da VI Viroológica* **97**, **2**: 161, 1997.
- ARRIBAS, J.R.; CLIFFORD, D.B.; FICHTENBAUM, C.J.; COMMINS, D.L.; POWDERLY, W.G.; STORCH, G.A. – Level of Cytomegalovirus (CMV) DNA in Cerebrospinal Fluid of Subjects with AIDS and CMV Infection of the Central Nervous System. *Journal of Infectious Diseases*, **172**: 527-531, 1995.
- AUGUSTYNOWICZ, E.; DZIERZANOWSKA, D. – Molecular Analysis of the Human Cytomegalovirus Strains Isolated from Infected Infants. *Acta Microbiologica Polonica*, **47(4)**: 373-383, 1998.
- BADLEY, A.D.; PATEL, R.; PORTELA, D.F.; HARMSSEN, W.S.; SMITH, T.F.; ILSTRUP, D.M.; STEERS, J.L.; WIESNWR, R.H.; PAYA, C.V. – Prognostic Significance and Risk Factors of

- Untreated Cytomegalovirus Viremia in Liver Transplant Recipients. *Journal of Infectious Diseases*, **173**: 446-449, 1996.
- BAILEY, T.C.; BULLER, R.S.; ETTINGER, N.A.; TRULOCK, E.P.; GAUDREAULT-KEENER, M.; LANGLOIS, T.M.; FORNOFF, J.E.R.; COOPER, J.D.; STORCH, G.A. – Quantitative Analysis of Cytomegalovirus Viremia in Lung Transplant Recipients. *Journal of Infectious Diseases*, **171**: 1006-1010, 1995.
- BALDANTI, F.; SARASINI, A.; FURIONE, M.; GATTI, M.; COMOLLI, G.; REVELLO, M.G.; GERNA, G. – Coinfection of the Immunocompromised but not the Immunocompetent Host by Multiple Human Cytomegalovirus Strains. *Archives of Virology*, **143**: 1701-1709, 1998.
- BARBER, L.; EGAN, J.J.; TURNER, A.J.; GUIVER, M.; WOODCOCK, A.A.; YONAN, N.; DEIRANIYA, A.K.; FOX, A.J. – The Development of a Quantitative PCR ELISA to Determine HCMV DNAemia Levels in Heart, Heart/Lung and Lung Transplant Recipients. *Journal of Virological Methods*, **82**: 85-97, 1999.
- BECKWITH, D.G.; HALSTEAD, D.C.; ALPAUGH, K.; SCHWEDER, A.; BLOUNT-FRONEFIELD, D.A.; TOTH, K. - Comparison of a Latex Agglutination Test with Five other Methods for Determining the Presence of Antibody against Cytomegalovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, **21**: 328-331, 1985.
- BINDER, T.; SIEGERT, W.; KRUSE, A.; OETTL, H.; WILBORN, F.; PENG, R.; TIMM, H.; NEUHAUS, P.; SCHMIDT, C.A. – Identification of Human Cytomegalovirus Variants by Analysis of Single Strand Conformation Polymorphism and DNA Sequencing of the Envelope Glycoprotein B Gene Region-Distribution Frequency in Liver Transplant Recipients. *Journal of Virological Methods*, **78(1-2)**: 153-162, 1999.
- BOECKH, M.; BOIVIN, G. – Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications. *Clinical Microbiology Reviews*, **11(3)**: 533-554, 1998.
- BONGARTS, A.; von LAER, D.; VOGELBERG, C.; EBERT, K.; van LUNZEN, J.; GARWEG, J.; VAITH, P.; HUFERT, F.; HALLER, O.; MEYER-KÖNIG, U. – Glycoprotein B Genotype of Human Cytomegalovirus: Distribution in HIV-Infected Patients. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **28**: 447-449, 1996.

- BOOM, R.; SOL, C.; WEEL, J.; LETTINGA, K.; GERRITS, Y.; van BRED, A.; van DILLEN, P.W. – Detection and Quantitation of Human Cytomegalovirus DNA in Faeces. *Journal of Virological Methods*, **84(1)**: 1-14, 2000.
- BRAINARD, J. A.; GREENSON, J.K.; VESY, C.J.; TESI, R.J.; PAPP, A.C.; SNYDER, P.J.; WESTERN, L.; PRIOR, T.W. - Detection of Cytomegalovirus in Liver Transplant Biopsies. *Transplantation*, **57**: 1753-1757, 1994.
- BRESNAHAN, W.A.; SHENK, T. - A Subset of Viral Transcripts Packaged Within Human Cytomegalovirus Particles. *Science*, **288**: 2373-2376, 2000.
- BROWN, H.L.; ABERNATHY, M.P. – Cytomegalovirus Infection. *Seminars in Perinatology*, **22(4)**: 260-266, 1998.
- BRUGGEMAN, C.A. – Cytomegalovirus and Latency: an overview. *Virchows Archiv B: Cell Pathology*, 325-333, 1993.
- BRUGGEMAN, C.A.; MARJORIE, H.J.; NELISSEN-VRANCKEN, G. – Cytomegalovirus and Atherogenesis. *Antiviral Research*, **43**: 135-144, 1999.
- BRYTTING, M.; SUNDQVIST, V.A.; STALHANDSKE, P.; LINDE, A.; WAHREN, B. - Cytomegalovirus DNA Detection of an Immediate early Protein Gene with Nested Primer Oligonucleotides. *Journal of Virological Methods*, **32**: 127-138, 1991.
- BUFFONE, G.J.; DEMMLER, G.J.; SCHIMBOR, C.M.; GREER, J. - Improved Amplification of Cytomegalovirus DNA from Urine after Purification of DNA with Glass Beads. *Clinical Chemistry*, **37**: 1945-1949, 1991.
- CABALLERO, O.L.; COSTA, M.C.S.L.; TREVISAN, A.; de OLIVEIRA, R.M.; VIOTTI, E.A.; TÁVORA, E.R.F.; VILAÇA, S.S.; SABBAGA, E.; de PAULA, F.J.; TÁVORA, P.F.; BRASILEIRO-FILHO, G.; VILLA, L.L.; SIMPSON, A.J.G. – Monitoring Human Cytomegalovirus Viral Load in Peripheral Blood Leukocytes of Renal Transplant Recipients by Simple Limiting Dilution-PCR Assay. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **32(12)**: 1515-1523, 1999.

- CABALLERO, O.L.; MENEZES, C.L.P.; COSTA, M.C.S.L.; FERNANDES, S.C.; ANACLETO, T.M.; de OLIVEIRA, R.M.; VIOTTI, E.A.; TÁVORA, E.R.F.; VILAÇA, S.S.; SABBAGA, E.; de PAULA, F.J.; TÁVORA, P.F.; VILLA, L.L.; SIMPSON, A.J.G. – Highly Sensitive Single-Step PCR Protocol for Diagnosis and Monitoring of Human Cytomegalovirus infection in Renal Transplant Recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**(12): 3191-3197, 1997.
- CASSOL, S.A.; POON, M.; PAL, R.; NAYLOR, M.J.; CULVER-JAMES, J.; BOWEN, T.J.; RUSSEL, J.A.; KRAWETZ, S.A.; PON, R.T.; HOAR, D.I. - Primer-Mediated Enzymatic Amplification of Cytomegalovirus (CMV) DNA. *Journal of Clinical Investigation*, **83**: 1109-1115, 1989.
- CHOU S.- Differentiation of Cytomegalovirus Strains by Restriction Analysis of DNA Sequences Amplified from Clinical Specimens. *Journal of Infectious Diseases*, **162**: 738-42, 1990.
- CHOU, S. – Cytomegalovirus Infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **5**: 427-432, 1992.
- CHOU, S. – Molecular Epidemiology of Envelope Glycoprotein H of Human Cytomegalovirus. *Journal of Infectious Diseases*, **166**: 604-607, 1992(2).
- CHOU, S.; DENNISON, K.M. – Analysis of Interstrain Variation in Cytomegalovirus Glycoprotein B Sequences Encoding Neutralization-Related Epitopes. *Journal of Infectious Diseases*, **163**: 1229-1234, 1991.
- CHOU, S.; MERIGAN, T.C. - Rapid Detection and Quantitation of Human Cytomegalovirus in Urine through DNA Hybridization. *New England Journal of Medicine*, **308**: 921-925, 1983.
- CLEWLEY, J.P. - The Polymerase Chain Reaction, a Review of the Practical Limitations for Human Immunodeficiency Virus Diagnosis. *Journal of Virological Methods*, **25**: 179-88, 1989.
- COSTA, S.C.B. – Infecção por Citomegalovírus (CMV): Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento. *Revista Brasileira de Clínica Terapêutica*, **25**(1): 18-28, 1999.
- COSTA, S.C.B.; MIRANDA, S.R.P.; ALVES, G.; ROSSI, C.L.; FIGUEIREDO, L.T.M.; COSTA, F.F. – Detection of Cytomegalovirus Infections by PCR in Renal Transplant Patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **32**: 953-959, 1999.

- DARLINGTON, J.; SUPER, M.; PATEL, K.; GRUNDY, J.E.; GRIFFITHS, P.D.; EMERY, V.C. – Use of the Polymerase Chain Reaction to Analyse Sequence Variation within a Major Neutralizing Epitope of Glycoprotein B (gp58) in Clinical Isolates of Human Cytomegalovirus. *Journal of General Virology*, **72**: 1985-1989, 1991.
- DEGIROLAMI, P.C.; DAKOS, J.; EICHELBERGER, K.; MILLS, L.S.; DE LUCA, A.M. - Rapid Detection of Cytomegalovirus in Clinical Specimens by Immunofluorescent Staining of Shell Vial Cultures. *British Scientific Reproduction*, **89**: 528-532, 1987.
- DEMMLER, G.J. - Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of IgM Class Antibodies to Cytomegalovirus. *Journal of Infectious Diseases*, **153**: 1152-1155, 1986.
- 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 . *Journal of Infectious Diseases*, **158**: 1177-1184, 1988.
- DREW, W.L. - Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. *Reviews of Infectious Diseases*, **10 (suppl3)**: 468-476, 1988(a).
- DREW, W.L. - Herpesviridae: Cytomegalovirus. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases (Principles and Practice)*, vol II, 247-260, 1988(b).
- EHRNST, A. - The Clinical Relevance of Different Laboratory Tests in CMV Diagnosis. - *Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplement 100*: 64-71, 1996.
- EVANS, M.J.; EDWARDS-SPRINGS, Y.; MYERS, J.; WENDT, A.; POVINELLI, D.; AMSTERDAM, D.; RITTENHOUSE-DIAKUN, K.; AMSTRONG, D.; MURRAY, B.M.; GREENBERG, S.J.; RIEPENHOFF-TALTY, M. - Polymerase Chain Reaction Assays for the Detection of Cytomegalovirus in Organ and Bone Marrow Transplant Recipients. *Immunological Investigation*, **26 (1&2)**: 209-229, 1997.
- FERREIRA-GONZALEZ, A.; FISHER, R.A.; WEYMOUTH, L.A.; LANGLEY, M.R.; WOLFE, L.; WILKINSON, D.S.; GARRETT, C.T. – Clinical Utility of a Quantitative Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Patients. *Transplantation*, **68(7)**: 991-996, 1999.

- 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. *Journal of Infectious Diseases*, **172**: 1087-1090, 1995.
- FRIES, B.C.; CHOU, S.; BOECKH, M.; TOROK-STORB, B. – Frequency Distribution of Cytomegalovirus Envelope Glycoprotein Genotypes in Bone Marrow Transplant Recipients. *Journal of Infectious Diseases*, **169**: 769-774, 1994.
- GERNA, G.; FURIONE, M.; BALDANTI, F.; PERCIVALLE, E.; COMOLI, P.; LOCATELLI, F. – Quantitation of Human Cytomegalovirus DNA in Bone Marrow Transplant Recipients. *British Journal of Haematology*, **91**: 674-683, 1995.
- GERNA, G.; PERCIVALLE, E.; BALDANTI, F.; SARASINI, A.; ZAVATTONI, M.; FURIONE, M.; TORSSELLINI, M.; REVELLO, M.G. – Diagnostic Significance and Clinical Impact of Quantitative Assays for Diagnosis of Human Cytomegalovirus Infection/Disease in Immunocompromised Patients. *Microbiologica*, **21**: 293-308, 1998.
- GERNA, G.; ZAVATTONI, M.; BALDANTI, F.; SARASINI, A.; CHEZZI, L.; GROSSI, P.; REVELLO, M.G. – Human Cytomegalovirus (HCMV) LeukoDNAemia Correlates more Closely with Clinical Symptoms than Antigenemia and Viremia in Heart and Heart-Lung Transplant Recipients with Primary HCMV Infection. *Transplantation*, **65(10)**: 1378-1385, 1998(a).
- GILBERT, C.; HANDFIELD, J.; TOMA, E.; LALONDE, R.; BERGERON, M.G.; BOIVIN, G. – Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotypes in Blood of AIDS Patients: Lack Association with either the Viral DNA Load in Leukocytes or Presence of Retinitis. *Journal of Medical Virology*, **59(1)**: 98-103, 1999.
- GLEAVES, C.A.; HURSH, D.A.; RICE, D.H.; MEYERS, J.D. - Detection of Cytomegalovirus from Clinical Specimens in Centrifugation Culture by *in situ* DNA Hybridization and Monoclonal Antibody Staining. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**: 21-23, 1989.
- GOOSSENS, V.J.; BLOK, M.J.; CHRISTIAANS, 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(1)**: 155-158, 2000.
- GRIFFITHS, P.D. – Herpesvirus and AIDS. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplement* **100**: 3-7, 1996.
- GRIFFITHS, P.D.; WHITLEY, R.J. – Viral Infections in the Immunocompromised Host. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **6**: 471-421, 1993.
- HEBART, H.; GREIF, M.; KRAUSE, H.; KANZ, L.; JAHN, G.; MÜLLER, C.A.; EINSELE, H. – Interstrain Variation of Immediate Early DNA Sequences and Glycoprotein B Genotypes in Cytomegalovirus Clinical Isolates. *Medical Microbiology and Immunology*, **186**: 135-138, 1997.
- HIBBERD, P.L.; SNYDMAN, D.R. – Cytomegalovirus Infection in Organ Transplant Recipients. *Infectious Disease Clinics of North America*, **9(4)**: 863-877, 1995.
- HSIA, K.; SPECTOR, D.H.; LAWRIE, J.; SPECTOR, S.A. - Enzymatic Amplification of Human Cytomegalovirus Sequences by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**: 1802-1809, 1989.
- KAHAN, B.D.; LAUNDERS, T.A. - Rapid Detection of Cytomegalovirus Infection Using a DNA Probe. *Transplantation Proceedings*, **17**: 989-992, 1985.
- KHAN, G.; KANGRO, G.K.; COATES, P.J.; HEATH, R.B. - Inhibitory Effects of Urine on the Polymerase Chain Reaction for Cytomegalovirus DNA. *Journal of Clinical Pathology*, **44**: 360-365, 1991.
- KONTOYIANNIS, D.P.; RUBIN, R.H. – Infection in the Organ Transplant Recipient – An Overview. *Infectious Disease Clinics of North America*, **9(4)**: 811-822, 1995.
- KRAUSE, P.R.; STRAUS, S.E. – Herpesvirus Vaccines. *Infectious Disease Clinics of North America*, **13(1)**: 61-81, 1999.
- KWOK, S.; HIGUSHI, R. - Avoiding False Positives with PCR. *Nature*, **339**: 237-238, 1989.
- LASRY, S.; DÉNY, P.; ASSELO, C.; RAUZY, M.; BOUCHER, J.; GUYOT, C.; LEROUX, M.C.; LIVARTOWSKI, A.; REINERT, P.; NICOLAS, J.C. – Interstrain Variations in the

- Cytomegalovirus (CMV) Glycoprotein B Gene Sequence among CMV-Infected Children Attending Six Day Care Centers. *Journal of Infectious Diseases*, **174**: 606-609, 1996.
- LEE, P.C.; HALSWORTH, P. - Rapid Viral Diagnosis in Perspective. *British Medical Journal*, **300**: 1413-1418, 1990.
- LEGENDRE, C.; THERVET, E. – Cytomegalovirus Prophylaxis in Solid Organ Transplant Recipients: The Issues. *Transplantation Proceedings*, **32(2)**: 377-378, 2000.
- LEHNER, R.; STAMMINGER, T.; MACH, M. – Comparative Sequence Analysis of Human Cytomegalovirus Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **29**: 2494-2502, 1991.
- LELAND, D; HANSING, R.L.; FRENCH, M.L.V. - Clinical Experience with Cytomegalovirus Isolation Using Conventional Cell Cultures and Early Antigen Detection in Centrifugation-enhanced Shell Vial Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**: 1159-1162, 1989.
- LIPSON, S.M.; MATCH, M.E.; TORO, A.I.; KAPLAN, M.H.; SHEPP, D.H. – Application of a Standardized Cytomegalovirus Antigenemia Assay in the Management of Patients with AIDS. *Diagnostic Microbiology in Infectious Diseases*, **32**: 75-79, 1998.
- LJUNGMAN, P. – Cytomegalovirus Infections in Transplant Patients. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplement* **100**: 59-63, 1996.
- MATHIESEN, T.; BRATTSTROM, C.; ANDERSON, J.; LINDE, A.; LJUNGMAN, P.; WAHREN, B. - Immunoglobulin G Subclasses and Lymphocyte Stimulatory Responses to Cytomegalovirus in Transplant Patients with Primary Cytomegalovirus Infections. *Journal of Medical Virology*, **36**: 65-69, 1992.
- MAYA, T.C; AZULAY, D.R. – Infecção pelo Citomegalovírus. In: LUPI, O.; SILVA, A.S.; PEREIRA Jr., A.C. – *Herpes – Clínica, Diagnóstico e Tratamento*, 1º edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda, 2000. Cap. 8, p. 135-156.
- McKEATING, J.A.; STAGNO, S.; STIRK, P.R.; GRIFFITHS, P.D. - Detection of Cytomegalovirus in Urine Samples by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Journal of Medical Virology*, **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 Disease after Liver Transplantation. *Transplantation*, **65**(11): 1477-1481, 1998.
- MEYER-KÖNIG, U.; HABERLAND, M.; von LAER, D.; HALLER, O.; HUFERT, F.T.; – Intragenic Variability of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B in Clinical Strains. *Journal of Infectious Diseases*, **177**: 1162-1169, 1998(2).
- MEYER-KÖNIG, U.; VOGELBERG, C.; BONGARTS, A.; KAMPA, D.; DELBRÜCK, R.; WOLFF-VORBECK, G.; KIRSTE, G.; HABERLAND, M.; HUFERT, F.T.; von LAER, D. – Glycoprotein B Genotype Correlates with Cell Tropism *In Vivo* of Human Cytomegalovirus Infection. *Journal of Medical Virology*, **55**: 75-81, 1998.
- MILLER, H.; McCULLOCH, B.; LANDINI, M.P.; ROSSIER, E. - Comparision of Immuno Blotting with other Serological Methods and Virus Isolation for the Early Detection of Primary Cytomegalovirus Infection in Allograft Recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**: 2672-2677, 1989.
- MOCARSKI, E.S.Jr.; ABENES, G.B.; MANNING, W.C.; SAMBUCETTI, L.C.; CHERRINGTON, J.M.- Molecular Genetic Analysis of Cytomegalovirus Gene Regulation in Growth, Persistence and Latency. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **154**: 47-73, 1990.
- MURPHY, F.A. – Virus Taxonomy. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. – *Fundamental Virology*, 3^a ed., Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1996, p. 15- 57.
- MURRAY, B.M. – Management of Cytomegalovirus Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *Immunological Investigation,s* **26**: 243-255, 1997.
- MUSTAFA, M.M. - Cytomegalovirus Infection and Disease in the Immunocompromised Host. *The Pediatric Infectious Diseases Journal*, **13**: 249-259, 1994.
- NAVARRO, D.; LENNETTE, E.; TUGIZOV, S.; PEREIRA, L. – Humoral Immune Response to Functional Regions of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B. *Journal of Medical Virology*, **52**: 451-459, 1997.

- NELSON, J.A.; GNANN, J.W.Jr.; GHAZAL, P.- Regulation and Tissue-Specific Expression of Human Cytomegalovirus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **154**: 75-100,1990.
- OLIVE, D.M.; AL-MUFTI, S.; SIMSEK, M.; FAYEZ, H.; AL NAKIB, W. - Diret Detection of Human Cytomegalovirus in Urine Specimens from Renal Transplant Patients Following Polymerase Chain Reaction Amplification. *Journal of Medical Virology*, **29**: 232-237, 1989.
- PALACIO, A.; DURAN-VILA, N. – Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis as a Tool for Viroid Characterisation. *Journal of Virological Methods*, **77**: 27-36, 1999.
- PANNUTI, C.S. - Infecção por Citomegalovírus. *Revista de Ensaios Pediátricos* (São Paulo), **6**:144-153, 1984.
- PANNUTI, C.S.; VILASBOAS, L.S.; NETO, V.A.; ANGELO, M.J.O.; SABBAGA, E. - Detecção de Anticorpos IgM nas Infecções Primárias e Secundárias pelo Citomegalovírus em Pacientes Submetidos a Transplante Renal. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* (São Paulo), **29**: 317-322, 1987.
- PATEL, R.; PAYA, C.V. – Infections in Solid-Organ Transplant Recipients. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**: 86-124, 1997.
- PEEK, R.; VERBRAAK, F.; BRUINENBERG, M.; van der LELIJ, A.; van der HORN, G.; KIJLSTRA, A. – Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotyping in Ocular Fluids and Blood of AIDS Patients with Cytomegalovirus Retinitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, **39**(7): 1183-1187, 1998).
- PLACHTER, B.; SINZGER, C.; JAHN, G. – Cell Types Involved in Replication and Distribution of Human Cytomegalovirus. *Advances in Virus Research*, **46**: 195-261, 1996.
- PORTER-JORDAN, K.; ROSEMBERG, E.I.; KEISER, J.F.; GROSS,J.D.; ROSS, A.M.; NASSIM, S.; GARRET, C.T. - Nested polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Cytomegalovirus Overcomes False Positive Caused by Contamination with Fragmented DNA. *Journal of Medical Virology*, **30**: 85-91, 1990.
- RASMUSSEN, L. – Immune Response to Human Cytomegalovirus Infectious. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **154**: 221-254, 1990.

- RASMUSSEN, L.; HONG, C.; ZIPETO, D.; MORRIS, S.; SHERMAN, D.; CHOU, S.; MINER, R.; DREW, W.L.; WOLITZ, R.; DOWLING, A.; WARFORD, A.; MERIGAN, T.C. – Cytomegalovirus gB Genotype Distribution Differs in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients and Immunocompromised Allograft Recipients. *Journal of Infectious Diseases*, **175**: 179-184, 1997.
- RASMUSSEN, L.; MATKIN, C.; SPAETE, R.; PACHL, C.; MERIGAN, T.C. – Antibody Response to Human Cytomegalovirus Glycoprotein gB e gH after Natural Infection in Humans. *Journal of Infectious Diseases*, **164**: 835-842, 1991.
- RASMUSSEN, L.; MORRIS, S.; ZIPETO, D.; FESSEL, J.; WOLITZ, R.; DOWLING, A.; MERIGAN, T.C. – Quantitation of Human Cytomegalovirus DNA from Peripheral Blood Cells of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients Could Predict Cytomegalovirus Retinitis. *Journal of Infectious Diseases*, **171**: 177-182, 1995.
- RETIÈRE, C.; IMBERT, B.M; DAVID, G.; COURCOUX, P.; HALLET, M.M. – A Polymorphism in the Major Immediate-Early Gene Delineates Groups Among Cytomegalovirus Clinical Isolates. *Virus Research*, **57**: 43-51, 1998.
- REYNOLDS, D.W.; STAGNO, S.; ALFORD, C.A. - Laboratory Diagnosis of cytomegalovirus Infections. In: LENNETTE, E.H.; SCHMIDT N.J. (eds) - *Diagnosis Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, 5ª ed., New York, American Public Health Association Inc, p. 399-439, 1979.
- ROSEN, H.R.; CHOU, S.; CORLESS, C.L.; GRETCH, D.R.; FLORA, K.D.; BOUDOUSQUIE, A.; ORLOFF, S.L.; RABKIN, J.M.; BENNER, K.G. – Cytomegalovirus Viremia: Risk Factor for Allograft Cirrhosis After Liver Transplantation for Hepatitis C. *Transplantation*, **64**: 721-726, 1997.
- ROSEN, H.R.; CORLESS, C.L.; RABKIN, J.M.; CHOU, S. – Association of Cytomegalovirus Genotype with Graft Rejection after Liver Transplantation. *Transplantation*, **66**: 1627-1631, 1998.
- RUBIN, R.H. – Introduction to the Symposium. *Review of Infectious Diseases*, **12(Suppl.)**: 691-692, 1990.
- RÜGER, R.; BORNKAMM, G.W.; FLECKENSTEIN, B. – Human Cytomegalovirus DNA Sequences with Homologies to the Cellular Genome. *Journal of General Virology*, **65**: 1351-1364, 1984.

- SAI, I.G.; WILSON, J.A.; GROETTUM, C.M.; ESPY, M.J.; SMITH, T.F.; PAYA, C.V. – Cytomegalovirus (CMV) DNA Load Predicts Relapsing CMV Infection after Solid Organ Transplantation. *Journal of Infectious Diseases*, **181**: 717-720, 2000.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. - Enzymatic Amplification of Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analyses for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*, **230**: 1350-1354, 1985.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. – *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 2 ed. New York, Cold Spring Harbor, Laboratory, 1989.
- SANGER, F.; NIKLEN, S.; COULSON, A.R. – DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *Proceedings Natl. Academy Science, USA*, **74**: 5463-5467, 1977.
- SCOTT, L.L.; HOLLIER, L.M.; DIAS, K. – Perinatal Herpesvirus Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, **11**: 27-53, 1997.
- SHEN, C.; CHANG, B.; CHANG, S.; YANG, S.; TSENG, S.; CHEN, C.; WU, C. – Molecular Epidemiology of Cytomegalovirus Infection in Kindergarten Children. *Journal of Medical Virology*, **48**: 33-37, 1996.
- SHEPP, D.H.; MATCH, M.E.; ASHRAF, A.B.; LIPSON, S.M.; MILLAN, C.; PERGOLIZZI, R.G. – Cytomegalovirus Glycoprotein B Groups Associated with Retinitis in AIDS. *Journal of Infectious Diseases*, **174**: 184-187, 1996.
- SHEPP, D.H.; MATCH, M.E.; LIPSON, S.M.; PERGOLIZZI, R.G. – A Fifth Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotype. *Research in Virology*, **149**: 109-114, 1998.
- 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 Immunodeficiency Virus. *Journal of Infectious Diseases*, **158**: 1185-1192, 1988.
- SHIBATA, M.; TERASHIMA, M.; KIMURA, H.; KUSUSHIMA, K.; YOSHIDA, J.; HIRIBE, K.; MORISHIMA, T. – Quantitation of Cytomegalovirus DNA in Lung Tissue of Bone Marrow Transplant Recipients. *Human Pathology*, **23**: 911-915, 1992.
- SILVA, A.G. – Propriedades Gerais dos Herpesvírus. In: LUPI, O.; SILVA, A.S.; PEREIRA Jr., A.C. –

- Herpes – Clínica, Diagnóstico e Tratamento*, 1ª edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda, 2000. Cap. 8, p. 135-156.
- SOUZA, I.E.; NICHOLSON, D.; MATTHEY, S.; ALDEN, B.; HAUGEN, T.H.; TRIGG, M.E.; BALE, J.E. – Rapid Epidemiologic Characterization of Cytomegalovirus Strains from Pediatric Bone Marrow Transplant Patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, **16**: 399-404, 1995)
- SPECTOR, D.H.; KLUCHER, K.M.; RABERT, D.K.; WRIGHT, D.A. – Human Cytomegalovirus Early Gene Expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **154**: 21-45, 1990.
- SPIEGEL, C.A. – Comparison of CMV DNA Hybrid Capture Assay (HCA;Digene), Antigenemia (AG; Biotest), Shell Vial (SV) and Conventional Culture (CC) for Detection of CMV in Blood, Bronchoalveolar Lavage (BAL) and Tissue Biopsy (Bx). *ASM*, may/1998.
- STINSKI, M.F. - Cytomegalovirus and Its Replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. - *Virology*, 2ª ed., New York, Raven Press Ltda, p. 1959-1980, 1990.
- SUASSUNA, J.H.R.; MACHADO, R.D. - Diagnóstico das Infecções por Citomegalovírus (CMV) em Pacientes com Deficiência Imunológica. *Revista da Associação de Medicina do Brasil*, **38(1)**: 33-47, 1992.
- THE, T.H.; VAN DER PLOEG, M.; VAN DER BERG, A.P.; VLIEGER, A.M.; VAN DER GIESSEN, M.; VAN SON, W.J. - Direct Detection of Cytomegalovirus in Peripheral Blood Leukocytes. A Review of Antigenemia Assay and Polymerase Chain Reaction. *Transplantation*, **54**: 193-198, 1992.
- TONG, C.Y.W. – Diagnosis of Cytomegalovirus Infection and Disease. *Journal of Medical Microbiology*, **46**: 717-719, 1997.
- TOROK-STORB, B; BOECKH, M.; HOY, C.; LEISENRING, W.; MYERSON, D.; GOOLEY, T. – Association of Specific Cytomegalovirus Genotypes with Death from Myelosuppression after Marrow Transplantation. *Blood*, **90(5)**: 2097-2102, 1997.
- TRINCADO, D.E.; SCOTT, G.M.; WHITE, P.A.; HUNT, C.; RASMUSSEN, L.; RAWLINSON, W.D. – Human Cytomegalovirus Strains Associated with Congenital and Perinatal Infections. *Journal of Medical Virology*, **61(4)**: 481-487, 2000.

- TUFAIL, A.; MOE, A.A.; MILLER, M.J.; WAGAR, E.A.; BRUCKNER, D.A.; HOLLAND, G.N. – Quantitative Cytomegalovirus DNA Level in the Blood and Its Relationship to Cytomegalovirus Retinitis in Patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome. *Ophthalmology*, **106**: 133-141, 1999.
- van der BERG, A.P.; van der BIJ, W.; van SON, W.J. – Cytomegalovirus Antigenemia as a Useful Marker of Symptomatic Cytomegalovirus Infection after Renal Transplantation: a Report 130 Consecutive Patients. *Transplantation*, **48**: 991, 1989.
- VERBRAAK, F.D.; BRUINENBERG, M.; van der HORN, G.J.; MEENKEN, C.; van der LELIJ, A.; HOYNG, C.B.; KIJLSTRA, A.; PEEK, R. – Cytomegalovirus (CMV) Strain Differences between the Eye and Blood in AIDS Patients with CMV Retinitis. *AIDS*, **12**: 713-718, 1998.
- VOGELBERG, C.; MEYER-KÖNIG, U.; HUFERT, F.T.; KIRSTE, G.; von LAER, D. – Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotypes in Renal Transplant Recipients. *Journal of Medical Virology*, **50**: 31-34, 1996.
- WADA, K.; MIZUNO, S.; KATO, K.; KAMIYA, T.; OZAWA, K. – Cytomegalovirus Glycoprotein B Sequence Variation among Japanese Bone Marrow Transplant Recipients. *Intervirology*, **40**: 215-219, 1997.
- WALTER, E.A.; BOWDEN, R.A. – Infection in the Bone Marrow Transplant Recipient. *Infectious Disease Clinics of North America*, **9(4)**: 823-847, 1995.
- WELLER, T.H.; HANSHAW, J.B. - Virologic and Clinical Observations on Cytomegalic Inclusion Disease. *New England Journal of Medicine*, **226**: 1233-1244, 1962.
- WILDEMANN, B.; HASS, J.; LYNEN, N.; STINGELE, K.; STORCH-HAGENLOCHER, B. – Diagnosis of Cytomegalovirus Encephalitis in Patients with AIDS by Quantitation of Cytomegalovirus Genomes in Cells of Cerebrospinal Fluid. *Neurology*, **50**: 693-697, 1998.
- WINGART, B.Z.; BRYTTING, M.; LINDE, A.; WAHREN, B.; GRILLNER, L. – Sequence Variation within Three Important Cytomegalovirus Gene Regions in Isolates from Four Different Patient Populations. *Journal of Clinical Microbiology*, **36(12)**: 3662-3669, 1998.

XU, W; SUNDQVIST, V.A.; BRYTTING, M.; LINDE, A. - Diagnosis of Cytomegalovirus Infections Using Polymerase Chain Reaction, Virus Isolation and Serology. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **25**: 311-316, 1993.

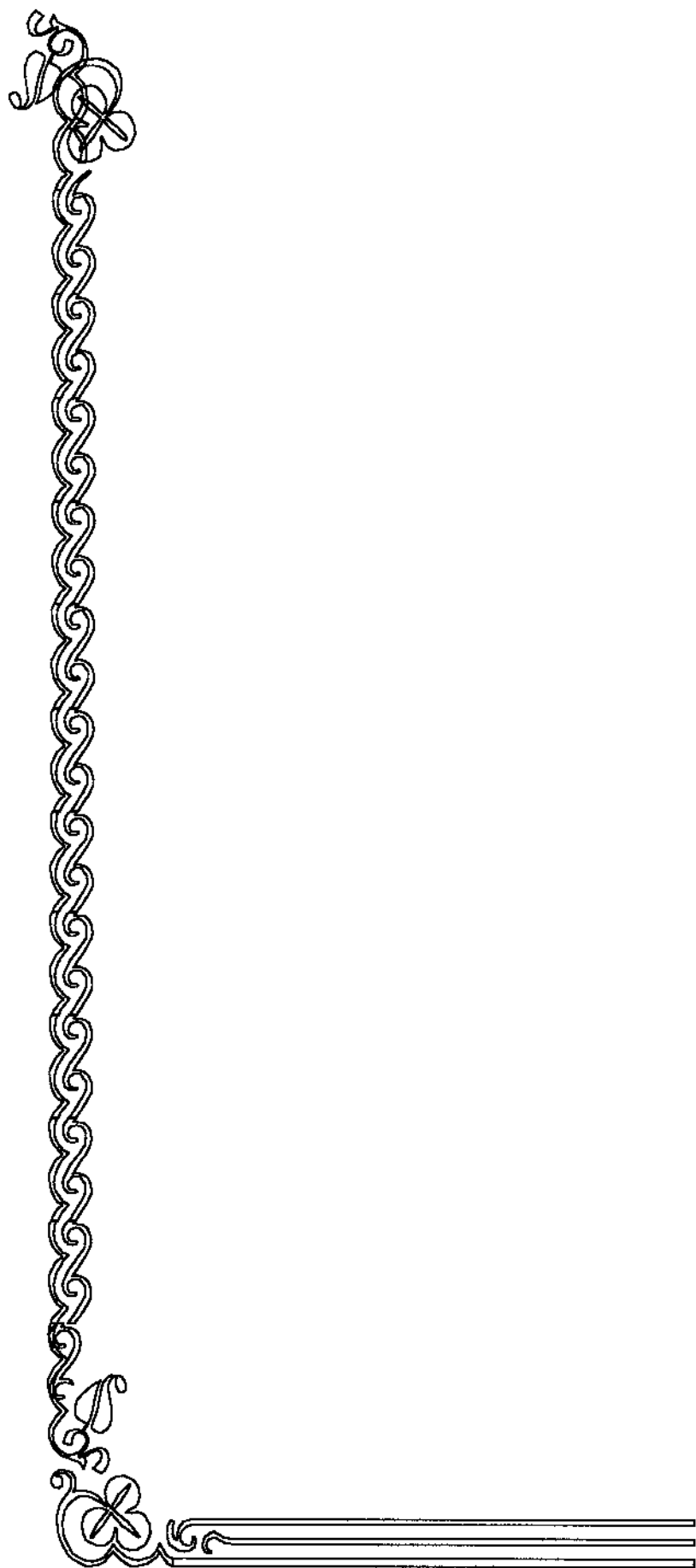
ZAIA, J.A.; FORMAN, S.J. – Cytomegalovirus Infection in Bone Marrow Transplant Recipient. *Infectious Disease Clinics of North America*, **9(4)**: 879-900, 1995.

SITES REFERIDOS:

www.science.mcmaster.ca/biology/virology/

www.biografix.de/hcmv/html/metaframe.htm

www.ncbi.nlm.nih.gov/



Apêndice

10. APÊNDICE

Tabela 01: Pacientes estudados para a tipagem através da glicoproteína B.

<i>Iniciais</i>	<i>Idade</i>	<i>Grupos de Pacientes</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>Gravidade</i>	<i>Amostra Sangue</i>	<i>Amostra Urina</i>
ALSQ	3 meses	CMV congênito	RGE, pneumonia, apnéia, cianose, esofagite/CMV. Malformação/ hematoma placentário, síndrome da quase morte súbita	±	G2	G2 (02/07/97)
ECF		CMV congênito				G2 NC
GRA	5 meses	CMV congênito	Hepatoesplenomegalia, candidíase oral e perianal, sífilis congênita. Em 26/09/97 Coriorretinite por CMV.	+		G1 (22/09/97)
JCI	4 meses	CMV congênito	Nasceu com icterícia, febre, hepatite por CMV (biópsia), pneumonia.	+	G3 (12/02/96)	
JSB	6 meses	CMV congênito	Hidrocefalia, sopro cardíaco. Em 04/97 febre, vômito - tratada com GAN	+		G2 (28/04/97)
KSM	1 ano e 1 mês	CMV congênito	Hepatite neonatal, icterícia. Hepatite viral por CMV ou VHA, aos 8 meses teve Hepatite A	-	G2 (29/01/97)	G2 (27/01/97)
MSR	1 ano e 3 meses	CMV congênito	Hidrocefalia, icterícia, pneumonia, convulsões, febre, cianose, baixo ganho (P e E), malformação (46XX, inv. (9).	+		G4 (29/01/97)
PPS	2 anos e 6 meses	CMV congênito	Asma e pneumonia de repetição, RGE, febre, hepatoesplenomegalia, linfonodomegalia, CMV	+	G1 (05/11/98)	
MCC	3 meses	CMV congênito/ Tx. Hepático	Icterícia, hepatomegalia, otite, convulsão, febre, anemia. CMV não tratado, possível relação atresia biliar/CMV.	±		G2 (25/11/98)
MPS	6 meses	CMV congênito/ Tx. Hepático	Hepatite neonatal por CMV. Coletase e icterícia neonatal. Em 08/97-UTI por hepatoesplenomegalia e coletase. Tx. 07/98	+	G2 (07/08/97)	G2 (07/08/97)
BMTc	4 meses	CMV congênito/HIV	Mãe HIV+, febre à esclarecer, pneumonia, hepatite e enterite por CMV. Óbito em 30/05/98, sepse severa, infecção e pneumonia por CMV.	+	G4 (08/05/98)	G4
ESR	1 ano	CMV congênito/HIV	Mãe HIV (drogas), icterícia, anemia, CMV assintomático. Soroconversão HIV em 08/96 WB -.	-		G2 (16/04/96)
JRJ	1 ano e 7 meses	CMV congênito/HIV	Pais HIV + (parceiros), RGE, febre, hepatoesplenomegalia por CMV. GAN, assintomático na data da amostra.	±	G1	G1 (05/08/97)
KAM	9 meses	CMV congênito/HIV	Mãe HIV+(parceiros/drogas), tratada desde 6º mês de gestação, anemia, sorotransfusão. Tratamento para sífilis	-		G2 (10/10/96)

MLP	5 meses	CMV congênito/HIV	Mãe HIV+ (parceiro), não medicada no pré-natal, febre, anemia, sororeversor, em tratamento desde o nascimento.	±		G1 (16/04/96)
AFS	10 anos e 3 meses	HIV	Pais HIV +, 02/90 - diarreia, febre, retardo mental e anemia. Óbito 01/10/97 - I. R.C, pneumonia bacteriana, PC	-	G2 (28/01/97)	G2 (28/01/97)
AA	33 anos e 8 meses	HIV	Internado com pneumonia/tuberculose (02/97), neurotoxo (CMV) febre. Óbito 01/03/97 broncopneumonia, HIV.	±	G2 (25/02/97)	
AHM	46 anos	HIV	HIV, Neurotoxoplasmose. Não refere CMV.	-	G2 (28/11/96)	
CAC	4 anos e 6 meses	HIV	Pais HIV+. Episódios de febre, diarreia, lesões vesiculares (HZV). Óbito em 28/07/97, quadro séptico e choque	±	G2 (04/07/97)	G2 (23/07/97)
DSP	4 meses	HIV	Vômitos, diarreia, febre. Nega HIV. Suspeita CMV. Óbito 30/07/98 PCR, pneumonia bilateral (CMV?)	±	G3 (29/07/98)	G3 (28/07/98)
DS	28 anos e 11 meses	HIV	Confusão mental, diarreia, febre. 07/98 neurotoxo, esofagite erosiva, gastrite e duodenite (biópsia). Óbito 09/08/98 PCR	+	G1 (09/08/98)	
JOFS		HIV			G2 (28/05/97)	
JFM	9 anos e 4 meses	HIV	Mãe HIV, febre, pneumonia, dor abdominal, tosse, retinite por CMV (10/97), miocardite por CMV.	+	G3 (07/08/97)	
JGA	36 anos e 2 meses	HIV	Em 01/97 abscesso ano-retal, queda do estado geral, febre. Pneumotórax. Óbito 07/02/97 IR e CMV disseminado.	+	G2 (29/01/97)	
JG	29 anos e 8 meses	HIV	10/94 neurotoxo HIV. CMV ocular vários (perda de visão). Óbito 08/98 CMV disseminado, pneumonia, FMO e PCR.	+	G3 (07/08/97)	
JLA	31 anos e 10 meses	HIV	HIV (drogas), tuberculose, pneumonia, pancreatite por CMV, GAN. Infecção sistêmica por CMV 04/98.	+	G3 (30/03/98)	
MRB	67 anos e 2 meses	HIV	HIV +. 01/99 bx- 1 erosão esofágica - hepatite crônica ativa. Endoscopia- lesões em 06/99 bx hepática CMV +.	+	G2 (24/06/99)*	
MPV	39 anos e 5 meses	HIV	Parceiro HIV+, em 95 vários episódios de diarreia e febre 05/96 FO incompatível com CMV. Óbito 23/06/96 HIV	-	G2 (16/04/96)	
NAS	44 anos e 7 meses	HIV	Internada com hipertensão, sorologia HIV +, alteração de comportamento. Óbito 23/02/97 neurotoxo, CMV, HIV	+	G1 (19/02/97)	
PPM	1 ano e 5 meses	HIV	Pais HIV+, febre, anemia, otite, pneumonia, encefalopatia, gastrite, laringite, CMV assintomático na data da amostra.	-	G1 (05/02/97)	

PHRP	2 anos e 4 meses	HIV	Pais HIV+, doença de Crohn, febre, diarreia, pneumonia, colite, duodenite, gastrite.	±		G1 (08/01/98)
RDSA		HIV			G3 (28/11/95)	
RnMOC		HIV			G1 NC	G1
RC	7 meses	HIV	Pai HIV+, Vômitos e constipação intestinal. Picos febris, icterícia, cianose (CMV?). Óbito em 17/10/96 FMO, HIV.	±		G3 (17/10/96)
RLS	11 anos e 7 meses	HIV	LMA transfusão - HIV + 04/93. Esofagite e CMV ocular (05/95). Óbito - 27/11/95 PCR, IH e R, Micobacteriose.	-	G1 (20/11/95)	
RSSa	26 anos e 3 meses	HIV	Diarréia e vômito, emagrecimento. Encefalopatia. 09/02/97 neurotoxo por CMV. Óbito 14/02/97 CMV disseminado IR	+	G2 (05/02/97)	
SCM	35 anos e 5 meses	HIV	03/96 diarreia. 05/96 coriorreinite CMV, repetições. Óbito 13/07/97 encefalite viral e HIV.	+	G2 (23/05/96)	
VAF	20 anos e 11 meses	HIV	Febre, pneumonia <i>rodzococcus</i> , tuberculose, hepatomegalia. Óbito em 06/97 HIV, tuberculose e toxoplasmose. IR.	-	G1 (16/07/96)	G1 (16/07/96)
VFAJ	3 anos e 1 mês	HIV	Pai HIV+ (drogas), pneumonia, hepatite 04/94. Lesões HSV 09/96. Óbito 03/97 bx esofagite CMV, PR, pneumonia bacteriana	+	G3 (11/06/96)	G3 (26/02/97)
JVOL	21 anos e 4 meses	HIV Tx. Medula Óssea	Tx 14/11/96. Em 09/97, icterícia e aumento de transaminases. 06/97 GVHD oral. Ausência infecção herpética HAV+	±	G2 (07/08/97)	
CCMM	28 anos e 2 meses	I	Febre indeterminada, sorologia CMV e rubéola +.	±	G1 (23/05/96)	
LAL	26 anos e 10 meses	LES	Linfonodomegalia. CMV ocular (96). Lesões e pneumonia. Óbito 21/10/97 PCR, pneumonia - bacteriana e viral.	±	G2 (16/04/97)	
MLMP	26 anos	LES	Hepatite a esclerocer, sorologia CMV+, vasculite, febre, cefaléia, diarreia. CMV assintomática na data da amostra.	±	G2 (14/04/98)	
RAS	33 anos e 1 mês	LES	Lúpus diagnosticado em 02/93. Poliartrite, emagrecimento. Estável.	±		G1 (02/07/97)
RL	23 anos e 3 meses	LES	Manchas, pneumonia, anemia, artralgia. 02/97 derrame pleural.	±	G2 (05/03/97)	
TAAS	23 anos e 9 meses	LES	Lúpus, poliartrite, edema, pancitopenia, nefrite. 02/96 CMV assintomático	-	G3 (29/02/96)	
MPL	30 anos e 8 meses	LES/Transplante Renal	IRC/LES, tx. em 06/03/96. 04/96 febre e perda da função renal. 05/96 infecção CMV. Rejeição e perda enxerto	+	G1 (08/05/96)	G1 (22/04/96)

ABS		NC					G2 (06/08/96)
EFG		NC				G2 (16/04/96)	
BOM	50 anos e 5 meses	Neoplasia			±	G1 (22/09/97)	
ASCA	21 anos	PTI (Purpura Trombocitopenica)			-	G2 (22/04/96)	
AFM	16 anos	Transplante de Medula Óssea			-	G2 (10/03/98)	
AFO	27 anos e 2 meses	Transplante de Medula Óssea			+	G3 (28/05/97);	
DG	9 anos e 6 meses	Transplante de Medula Óssea			-	G3 (28/10/96)	
ENIM	25 anos e 3 meses	Transplante de Medula Óssea			+	G2 (15/02/96)	
EBAF	42 anos	Transplante de Medula Óssea			±	G2 (05/08/97)	
EFN	16 anos e 9 meses	Transplante de Medula Óssea			±	G1 (05/01/99)	
FMF		Transplante de Medula Óssea				G1	G1 (06/03/98)
FC	25 anos e 9 meses	Transplante de Medula Óssea			-	G1 (08/01/98)	
IRSG	17 anos e 11 meses	Transplante de Medula Óssea			±	G2 (05/03/98)	
JLM	38 anos	Transplante de Medula Óssea			±	G2 (05/03/98)	
JP	44 anos e 3 meses	Transplante de Medula Óssea			±	G2 (24/03/98)	

JRP	26 anos e 8 meses	Transplante de Medula Óssea	AAS. Tx em 28/08/97. Em 09/97 neutropenia, febre - abscesso dentário. Não refere CMV.	±	G3 (16/10/97)	
KGB	19 anos e 2 meses	Transplante de Medula Óssea	SMD, tx 28/01/99. Mucosite, icterícia 02/99. Esofagite e pangastrite erosiva. Bx não refere CMV. Infecções cateter.	±	G2 (16/03/99)	
LMS	42 anos e 2 meses	Transplante de Medula Óssea	AAS, tx 28/03/96. Diarréia, confusão mental, vesículas labiais (HSV). 05/96- GVHD, hematúria e infecção /CMV.	+	G3 (16/07/96)	
LFG	21 anos e 5 meses	Transplante de Medula Óssea	AA. Tx 31/10/96. Infecções bacterianas e HSV. 01/97 hepatomegalia/ bx CMV disseminado 02/97.	+	G2G3 (27/01/97)	
LBM	44 anos	Transplante de Medula Óssea	LMC, tx 03/09/98. 10/98 bx - GVHD aguda GII. 11/98 infecção CMV, bx CMV esofágico. 04/99 retinite CMV	+	G2G3 (15/10/98);	
LN	42 anos e 11 meses	Transplante de Medula Óssea	LMC, tx. Em 30/10/97. Febre a esclarecer, esofagite erosiva, mucosite oral sem etiologia. Óbito 08/04/98 PCR	±	G2 (28/01/98)	
MFV	26 anos e 9 meses	Transplante de Medula Óssea	SMD, tx em 29/01/98. Infecção gastrointestinal e esclerite . <i>H. Pylori</i> - erosões em bulbo duodenal. GVHD10/98.	±	G2 (17/02/98)	
MRS	29 anos e 3 meses	Transplante de Medula Óssea	LMC, 09/97-tx, HSV oral, transaminases altas, neutropenia e febre. CMV - Bx. Hepática CMV (-). Infecção bacteriana	-	G1 (30/10/97)	
MRSC	10 anos e 2 meses	Transplante de Medula Óssea	AAS, severa, tx 23/08/96 - herpes labial HSV e bactérias +. Rejeição enxerto. AAS recidiva 04/98, retransplante.	-	G3 (28/10/96)	
OF		Transplante de Medula Óssea			G4 (06/11/96)	
PS	10 anos e 8 meses	Transplante de Medula Óssea	LMA. Tx. em 10/07/97. LMA recidiva 09 e 12/97. 12/97 Enterite/colite CMV. Óbito 11/01/98 choque séptico, LMA	+	G2 (22/09/97)	
RSSo	19 anos e 4 meses	Transplante de Medula Óssea	LH refratário. Doença de Hodgkin. Tx em 10/06/97. Lesões linguais, diarréia, vômito e febre (HSV). Culturas +	±	G2 (05/08/97)	
RP	21 anos	Transplante de Medula Óssea	LMC, diarréia, vômitos, perda de peso. Gastrite e bronquite. GVHD 10/97 citologia.	-	G2 (29/09/97)	
RPS	30 anos e 1 mês	Transplante de Medula Óssea	LMC (tx 05/09/97) Perda peso - gan prof. e infecção bacteriana. Pancitopenia, lesões de pele.	±	G2 (06/11/96)	
SGC	41 anos e 10 meses	Transplante de Medula Óssea	LMC. Tx em 04/06/98. <i>Staphylococcus</i> + . bactrin e gan profilático. Bx. 08/98 GVHD.	-	G3 (18/08/98)	
VLS	9 anos e 7 meses	Transplante de Medula Óssea	LMC tx 25/09/97, febre e mucosite HSV e <i>Acinetobacter</i> . Esofagite e várias culturas -. GVHD crônica e infecções.	±	G2 (24/03/98)	

VGS	34 anos e 9 meses	Transplante de Medula Óssea	LMC, tx. 13/11/97. Mucosite, diarreia e vômito (HSV). Bx não revela CMV. Óbito em 02/03/98 GVHD e septicemia.	-	G2 (15/01/98)	
AP	51 anos e 4 meses	Transplante Hepático	Malaria, nefropatia calcúlosa, hepatite C (carirose hepática), ascite. 05/98 tx. dor epigástrica, vômito, icterícia. GAN	±	G2 (20/08/98)	
ADJR	45 anos e 1 mês	Transplante Hepático	Cirrose hepática não alcoólica. Tx 19/02/98, CMV+. Em 09/03/98 bx revela rejeição e sugere investigação p/ CMV.	+	G1 (10/03/98)	
APJ	11 anos e 10 meses	Transplante Hepático	Dor abdominal, icterícia, encefalopatia e hepatomegalia. Sorologia Hep. A, B e C (-). Bx. Hepática CMV (+). Óbito em 05/10/96 - IH, FMO e Hepatic Fulminante.	+	G3 (25/09/96)	
ARC	47 anos e 3 meses	Transplante Hepático	Cirrose alcoólica. Tx 04/98. 05/98 dor epigástrica, abcesso (drenado), icterícia e prurido. 06/98 pneumonia por CMV	+	G3 (27/05/98)	G3 (28/05/98)
ER	38 anos e 8 meses	Transplante Hepático	Cirrose hepática HCV, icterícia. Tx 08/98. Náuseas e vômito. 11/98 desistiu do tratamento. Bx não refere CMV.	-	G3 (29/01/98)	G3 (28/05/98)
JDG	56 anos e 5 meses	Transplante Hepático	Cirrose hepática alcoólica e VHC Tx 23/02/96. Derrame pleural, esplenomegalia. Sem sintomas na data da amostra.	-	G3 (14/03/96)	
JRFS		Transplante Hepático			G3 (05/08/97)	
LAR	27 anos e 8 meses	Transplante Hepático	Em 24/07/96 hepatite auto imune (HVA). Tx em 07/10/97. bx compatível com CMV 11/97, aumento transaminases.	+	G3 (18/11/97)	
MFLS	32 anos e 7 meses	Transplante Hepático	Hepatite B, cirrose, dor abdominal e icterícia. Óbito em 04/10/98 recidiva do vírus B, IH e FMO.	-	G1 (26/02/97)	
NAF	37 anos e 10 meses	Transplante Hepático	Cirrose Hepática VHC, icterícia, prurido, 02/98 tx. febre contínua, biópsia CMV+, GAN, risco de perda do enxerto, pneumonia.	+	G2 (15/03/98)	
OC	46 anos e 11 meses	Transplante Hepático	Tx 03/09/98. Dor abdominal, HSV labial e enterobacter 11/98.	±	G2 (13/11/98)	
RFM	48 anos e 3 meses	Transplante Hepático	Cirrose HCV (bx) em 07/93. Tx 16/08/96. Lesões (HSV). Bx 10/96 necrose, gastrite <i>H. pylori</i> . Óbito 28/04/97 IH.	±	G2 (21/10/96)	
STC	17 anos e 2 meses	Transplante Hepático	Hepatopatia crônica HCV. Tx. 04/09/97. Bx. - necrose e rejeição. Óbito em 03/08/99 IH, R e Rs - reativação HCV	-	G2G3 (30/10/97)	G2G3 (30/10/97)
AF	10 anos e 8 meses	Transplante Renal	IRC. Diálise, nefrite e pneumonia. Infecção por <i>E coli</i> e <i>Staphylococcus</i> . Tx. 05/08/97	-	G2 (29/01/97)	
AST	12 anos e 8 meses	Transplante Renal	IRC - malformação renal. Febre, dor abdominal, peritonite fúngica, hepatomegalia. Óbito 11/98 FMO, PCR e seps.	±	G2 (05/03/98)	G2 (03/11/98)

CBM	32 anos	Transplante Renal	Hemodíálise desde 03/94, 10/95 tx, biópsia renal CMV + GAN, IRC, tosse, febre, pneumonia, rejeição em 07/96.	+	G2 (30/11/95)	G2 (30/11/95)
EFBS	36 anos e 10 meses	Transplante Renal	IRC, tx 04/09/97. Rejeição crônica - bx . 08/98-diarréia, dor gástrica/CMV não tratado, rejeição renal 11/98.	±	G1 (12/08/98)	
GLL	42 anos e 9 meses	Transplante Renal	IRC, rim policístico, tx 27/07/97. 09/97 endoscopia - esofágite erosiva. 10/97 diarréia, GAN - melhora.	+	G3 (06/10/97)	
JFFS	28 anos	Transplante Renal	IRC, tx 28/11/95. Gânglios-inflamação. Gastrite e anemia 12/95. 01/96 - bx. CMV e rejeição. 02/96 perda enxerto.	+	G2 (11/01/96)	
LFC	9 anos e 8 meses	Transplante Renal	IRC, tx 24/09/97. Doador CMV -, 07/98 pneumonia e diarréia. Óbito 31/12/99 febre hemorrágica, doença C e R.	±	G1 (29/01/98)	
MSA	9 anos e 10 meses	Transplante Renal	IRC. Tx. 30/06/96. Em 07/96 pancitopenia, uremia, bx. Renal indicando rejeição. Óbito 06/08/96 coma e choque pós infecção. Esofágite, pangastrite e pneumonia.	+	G2 (13/08/96)	
MARC	43 anos	Transplante Renal	Glomerulopatia, 02/96 tx, sinais de rejeição, diminuição da função do rim, biópsia renal CMV+.	+	G2 (16/04/96)	
NS	44 anos e 3 meses	Transplante Renal	Rim policístico. Tx. 02/98. Bx. 04/98 - necrose. Monilíase e gastrite. <i>Staphylococcus</i> . Óbito 04/12/98 hemotórax e PCR.	±	G1 (14/04/98)	
PRRM	15 anos e 3 meses	Transplante Renal	IRC- síndrome nefrítica, tx em 27/10/98. Piora do fluxo sanguíneo e função glomerular. Bx. compatível com infecção-rejeição.	+	G1G3 (05/11/98)	
VRM	43 anos	Transplante Renal/HIV	Nefropatia crônica, tx 03/91. HIV+(12/95) transfusão. psoríase, pneumonia, CMV assintomático na data da amostra.	-		G2 (28/01/97)

RGE	Refluxo Gastro - esofágico	Bx.	Biópsia	SMD	Síndrome Mielodisplásica
GAN	Ganciclovir	IH/IR	Insuficiência Hepática/ Renal	LMC	Leucemia Mielóide Crônica
VHA/B/C	Vírus da Hepatite tipo A/B/C	LES	Lupus Eritematoso Sistêmico	AAS	Anemia Aplásica
UTI	Unidade de Terapia Intensiva	GVHD	Doença do Enxerto contra o Hospedeiro	LLA	Leucemia Linfóide Aguda
P e E	Peso e Estatura	I	Inconclusivo	AA	Anemia Aguda
Tx.	Transplante	PTI	Púrpura Trombocitopênica	LH	Linfoma Hodgkin
PC/R	Parada Cardíaca/ Respiratória	LMA	Leucemia Mielóide Aguda	VHS	Vírus Herpes simples
FMO	Falência de Múltiplos Órgãos	LNH	Linfoma não-Hodgkin	FO	Fundo de olho

Tabela 02: Pacientes estudados para a quantificação da carga viral do CMV através da Captura Híbrida DIGENE®

<i>Paciente</i>	R.S.B. – TMO 06/99 - LMC. GVHD crônica (Biópsia bucal)		L.S.O. – TMO por LMC. Tx em 13/05/99, PCR + assintomático		L.B.M. TMO(09/98) - LMC 08/99 retinite / uveíte CMV	
Datas	14/09/99		09/09/99	14/09/99	21/09/99	
WBC (K/ μ l)	2,7		4,3	4,4	3,2	
ANTIGENEMIA (n° células)	-		-	-	-	
PCR	+		+	-	-	
Captura Híbrida DIGENE	31/03/00 off curve		31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	20/01/00 off curve	
<i>Paciente</i>	A.V.S.S. – TMO 19/08 - AAS. perda do enxerto, necrose gástrica (CMV). Óbito		M.B.S. – TMO por LMC		J.M.P. – Tx . renal (IRC) GAN, doador IgG+ e receptor -	
Datas	23/09/99	28/09/99	09/09/99	16/09/99	23/09 (30/09)	21/09/99 (22)
WBC (K/ μ l)	2,8	3,1	4,2	N tem na data	4,9	8,1
ANTIGENEMIA (n° células)	-	-	-	-	-	-
PCR	-	-	-	+	-	-
Captura Híbrida DIGENE	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve
<i>Paciente</i>	E.F.N. – TMO por AAS. 2° TMO em 09/98; 22/07/99 – CMV ocular		O.P. – TMO por LMC (03/02), assintomático		C.H.F.B. – TMO por LMC (17/02/00)	
Datas	14/09/99	16/09/99	09/03/00	14/03/00	14/03/00	
WBC (K/ μ l)	6,0	N tem na data	4,4	3,9	2,4	
ANTIGENEMIA (n° células)	-	?	?	+1	-	
PCR	-	+	+	-	-	
Captura Híbrida DIGENE	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	

Paciente	B.C.S.D.V. - TMO por AAS em 08/99, biópsia estômago em 28/09/99 - CMV+				J.A.F. - TMO por LMC		A.M.R. - TMO por LMC. Tx. em 26/08/99.			
Datas	23/09 (26/99)	28/09/99	05/10/99	14/10/99	26/10	05/10/99	04/11/99	23/11 (17/11)	30/11/99	
WBC (K/μl)	5,2	4,1	7,4	3,4	2,8	3,3	3,3	2,1	1,6	
ANTIGENEMIA (n° células)	?	+3	?	-	-	-	-	-	-	
PCR	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Captura Híbrida DIGENE	20/01/00 x - 82,4 (+) 681203,71 cmv/ml	20/01/00 x - 154,3 (+) 1319302,8 cmv/ml	20/01/00 x - 16,71 (+) 122910,0 cmv/ml	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	
Paciente	R.A.S.A. - Tx. renal (IRC)		S.F.M. - Tx. renal (IRC) Duodenite por <i>H. pylori</i>		L.S.P. - TMO por LMA. Biópsia mucosa oral em 21/12/99 -GVHD					
Datas	14/10/99		14/10/99		05/10/99	04/11/99	07/12/99	10/02/00		
WBC (K/μl)	6,0		9,6		4,1	3,5	2,1	2,5		
ANTIGENEMIA (n° células)	-		?		-	?	-	-		
PCR	?		-		+	-	-	-		
Captura Híbrida DIGENE	20/01/00 off curve		20/01/00 off curve		20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve		
Paciente	G.E.C. - TMO por LMC (14/10/99)				G.A.M. - TMO por LMC 1° tx. 93; LMC recidiva 10/99. Óbito.					
Datas	23/11/99	30/11/99	07/12/99	15/02/00	22/02/00	14/03/00	23/11/99	30/11/99		
WBC (K/μl)	3,6	3,5	1,8	2,6	4,2	2,2	5,2	6,8		
ANTIGENEMIA (n° células)	-	-	-	+4	-	-	-	-		
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-		
Captura Híbrida DIGENE	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve		

Paciente	A.C.S.F. – TMO por AAS Tx. em 07/10/99		D.R.C.L.T. - TMO		V.S. - TMO	
Datas	07/12/99		15/02/00	14/03/00	09/09/99	21/09/99
WBC (K/ μ l)	3,5		2,2	3,1	17,2	14,2
ANTIGENEMIA (n° células)	+27		-	-	-	-
PCR	-		-	+	+	-
Captura Híbrida DIGENE	31/03/00 off curve		20/01/00 x - 0,80 (i) 702,34 cmv/ml	31/03/00 off curve	20/01/00 off curve x - 0,58 (-)	20/01/00 x - 1,353 (+) 9137,34 cmv/ml
Paciente	J.A.J.R. - TMO		J.L.R. – TMO por LMC (12/08/99). Petéquias e equimoses em mucosa oral (HSV). Em 29/11 – IgG +			
Datas	09/09/99	14/09/99	21/09/99	28/09/99	30/11/99	07/12/99
WBC (K/ μ l)	4,1	4,0	5,4	6,4	0,7	0,7
ANTIGENEMIA (n° células)	-	-	-	-	-	-
PCR	-	+	-	+	-	-
Captura Híbrida DIGENE	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	31/03/00 off curve
Paciente	E.P.S. - TMO		L.C.S. - TMO			
Datas	23/11/99	30/11/99	15/02/00	22/02/00	15/02/00	14/03/00
WBC (K/ μ l)	2,2	4,6	3,1	2,8	3,6	2,7
ANTIGENEMIA (n° células)	-	-	+9	+9	-	-
PCR	-	-	+	+	-	+
Captura Híbrida DIGENE	20/01/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 x - 1,28 (+) 1345,46 cmv/ml	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve

Paciente	E.S.M. – TMO por LMC (09/09/99), IgG+ (1,2 – 1,9) desde 05/99. Mucosite resolvida sem outros sintomas					V.R.S. – TMO por LMA (13/01/00). IgG+ 8,9/18,0 em 30/03/00				
Datas	05/10/99	23/11/99	30/11/99	07/12/99	17/02/00	15/02/00	22/02/00	09/03/00	14/03/00	
WBC (K/ μ l)	9,5	1,8	2,0	2,2	3,7	4,0	7,8	1,9	3,6	
ANTIGENEMIA (n° células)	-	-	-	+56 (rep)	+17 (rep)	-	-	?	+3	
PCR	?	-	-	-	-	+	-	+	+	
Captura Híbrida DIGENE	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 x – 0,86 (i) 824,90 emv/ml	31/03/00 x – 0,94 (i) 761,56 emv/ml	31/03/00 x – 1,96 (+) 3440,79 emv/ml	31/03/00 x – 0,90 (i) 681,34 emv/ml	
Paciente	A.B. – TMO picos febris esporádicos					J.B.M.C. – TMO				
Datas	07/12/99	15/02/99	22/02/00	09/03/00	14/03/00	14/02/00	22/02/00	09/03/00	14/03/00	
WBC (K/ μ l)	2,4	1,6	1,8	1,8	1,1	1,0	1,0	1,1	1,0	
ANTIGENEMIA (n° células)	-	-	-	?	-	+5 (rep)	-	-	-	
PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Captura Híbrida DIGENE	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	
Paciente	R.P.R.R. – TMO assintomática					D.A.M. – TMO por LMC Tx. em 18/10/99; hepatoesplenomegalia				
Datas	10/02/00	15/02/00	22/02/00	14/03/00	23/11/99	30/11/99	07/12/99	10/02/00	15/02/00	
WBC (K/ μ l)	2,0	1,8	2,1	3,3	1,7	2,6	2,4	2,5	3,4	
ANTIGENEMIA (n° células)	-	-	-	+2	-	-	-	+4	-	
PCR	+	-	-	-	-	-	+	-	?	
Captura Híbrida DIGENE	31/03/00 off curve	31/03/00 x – 0,72 (-) 516,91 emv/ml	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	20/01/00 off curve	20/01/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	31/03/00 off curve	

Tabela 03: Pacientes estudados para a quantificação da carga viral do CMV através da PCR-diluição limitante:**Grupo 1:** Pacientes com HIV estudados para a genotipagem

PACIENTES	DATA DA AMOSTRA
AFS	28/01/97
AA	25/02/97
AHM	28/11/96
CAC	04/07/97
DSP	29/07/98
DS	09/08/98
JOFS	28/05/97
JFM	07/08/97
JGA	29/01/97
JG	07/08/97
ILA	30/03/98
MRB	24/06/99
MPV	16/04/96
NAS	19/02/97
PPM	05/02/97
PHRP	?
RDSA	28/11/95
RnMOC	?
RC	?
RLS	20/11/95
RSSa	05/02/97
SCM	23/05/96
VAF	16/07/96
VFAJ	11/06/96

Grupo 2: Pacientes positivos pelo teste DIGENE®

PACIENTES	DATA DA AMOSTRA
JMP	09/09/99
JMP	14/09/99
EFN	23/09/99
BCSDV	23/09/99
BCSDV	28/09/99
BCSDV	05/10/99
VS	21/09/99
EPS	15/02/00
VRS	09/03/00