

*RONALDO LUÍS THOMASINI*

**DETECÇÃO E MONITORIZAÇÃO DO HERPESVÍRUS  
HUMANO 7 (HHV-7) EM TRANSPLANTADOS HEPÁTICOS:  
impacto clínico e associação com citomegalovírus e  
herpesvírus humano 6**

*CAMPINAS*

*2007*

***RONALDO LUÍS THOMASINI***

**DETECÇÃO E MONITORIZAÇÃO DO HERPESVÍRUS  
HUMANO 7 (HHV-7) EM TRANSPLANTADOS HEPÁTICOS:  
impacto clínico e associação com citomegalovírus e  
herpesvírus humano 6**

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

***ORIENTADOR: PROFA. DRA. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA***

***CAMPINAS***

***2007***

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

T361d Thomasini, Ronaldo Luís  
Detecção e monitorização do Herpesvírus humano 7 (HHV-7) em  
transplantados hepáticos: impacto clínico e associação com  
Citomegalovírus e Herpesvírus humano 6 / Ronaldo Luís Thomasini.  
Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Sandra Cecília Botelho Costa  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Herpesvírus humano 6. 2. Citomegalovirus. 3. Transplante  
de órgãos, tecidos, etc. 4. Infecções por Citomegalovirus. I. Costa ,  
Sandra Cecília Botelho. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Detection and monitoring of human herpesvirus 7(HHV-7)  
in liver recipients : clinical impact and association with cytomegalovirus  
and human herpesvirus 6**

**Keywords:** • Human herpesvirus 6  
• Cytomegalovirus  
• Organ transplantation  
• Cytomegalovirus Infections

**Titulação: Mestre em Farmacologia**

**Banca examinadora: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa  
Prof. Dr. Celso Francisco Hernandes Granato  
Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos**

**Data da defesa: 22 -05 -2007**

# Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Sandra Cecilia Botelho Costa

## MEMBROS:

- |  |                      |
|--|----------------------|
| 1. Profa. Dra. Sandra Cecilia Botelho Costa    | <i>Sandra Costa</i>  |
| 2. Prof. Dr. Celso Francisco Hernandes Granato | <i>C. F. Granato</i> |
| 3. Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos         | <i>Marcelo</i>       |

Curso de pós-graduação em Farmacologia, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/05/2007

## **DEDICATÓRIA**

*Á Deus acima de tudo...  
Pois sem ele, nada teria sido possível!*

*Á meus amados Pais Tereza e Osvaldo,  
por tudo o que significam na minha vida.  
Que em qualquer momento sempre estão  
ao meu lado, mesmo que só em pensamento!*

*Aos meus queridos irmãos César e Diego,  
pela benção e preciosidade! Que mais que  
irmãos de sangue, são também irmãos de alma...*

*Á minha querida vovó Antonia  
A qual tenho como mãe e sempre  
me alegra...*

*A meu avô José (in memorian), qual sua presença,  
pouco tive oportunidade usufruir...*

*Á minha vovó Maria e ao vovô Miguel (in memorian)  
Anjos que passaram pela Terra.  
Os quais sempre amarei e que me lembrarei por  
Todos os dias de minha vida...*

## *AGRADECIMENTOS*

---

Um especial agradecimento à Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa, pela paciência, dedicação e confiança.... Que esteve sempre à disposição com sua natural simpatia, que me transmitiu confiança e tranquilidade mesmo quando as coisas pareciam ruir...

À Dra. Ilka e Dr. Leonardi pela oportunidade...

Aos colegas do laboratório: Sandra pelo apoio e amizade...

A amizade e companheirismo da Bruna, Cristiane, Telma, Daniela, Débora, Juliana, Paula, Camila, Cristiane, Renata e outros tantos colegas... Carla que me estendeu a mão em um momento muito difícil...

À Ana Maria por ter, gentilmente, colaborado em coletar e armazenar amostras, pois sem ela as coisas ficariam bem mais difíceis. E também pelas risadas que demos juntos...

A Norma que provou se uma grande amiga ou mãe ou, quem sabe, as duas...

Na qual pude e posso confiar em todas as horas, sempre disposta a estender a mão! Pelo carinho e dedicação...

Ao Mendes que sempre foi um grande pai e amigo,

Aos colegas de faculdade e aos colegas de trabalho,

A Célia por ter “segurado as pontas” em muitas ocasiões, além é claro, da amizade...

Ao pessoal do laboratório Pasteur: José Roberto, Ester, Silvana, Luciano, André, Arnaldo e outros...

A Suely e Renato (in memoriam) pela importância que tiveram no início da minha vida profissional, pelas oportunidades dadas, pelo apoio, pela forma maternal e paternal que sempre me trataram...

A Coryna, Cinthia e Renatinho pelos estudos, brincadeiras, conversas e risadas dadas nas nossas adolescências...

A Silene, Tânia, Juliana, Cintia, Marcela, Priscila, Amanda e tantos outros...

*É preciso cuidado com que se sonha!  
Pois os sonhos podem se tornar realidade...*

***Autor desconhecido***

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xvii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xix</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>1.1- Histórico e classificação</b> .....	22
<b>1.2- Características biológicas</b> .....	24
<b>1.3- Epidemiologia e transmissão</b> .....	28
<b>1.4- Manifestações clínicas e fisiopatologia</b> .....	29
1.4.1- Considerações gerais.....	29
1.4.2- Indivíduos imunocompetentes.....	30
1.4.3- Indivíduos imunossuprimidos.....	31
<b>1.5- Tratamento</b> .....	32
<b>1.6- Diagnóstico da infecção pelo HHV-7</b> .....	33
1.6.1- Método de isolamento viral.....	33
1.6.2- Métodos imunológicos.....	35
1.6.3- Reação em cadeia da polimerase.....	41
1.6.4- Reação em cadeia da polimerase tipo “Nested” (Nested-PCR)....	43
<b>1.7- HHV-7 em transplantados hepáticos e sua relação com o HHV-6 E HCMV</b> .....	44
1.7.1- Efeitos diretos.....	44
1.7.2- Efeitos indiretos.....	45
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	47
<b>3- CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	49
<b>3.1- Casuística</b> .....	50

3.1.1- Grupo controle.....	50
3.1.2- Pacientes transplantados.....	50
3.1.3- Definição de infecção ativa para o HCMV, HHV-6 e HHV-7.....	52
3.1.4- Definição de infecção sintomática e assintomática por HCMV....	52
3.1.6- Critérios clínicos avaliados para o HHV-7 e HHV-6.....	54
<b>3.2- Métodos.....</b>	<b>54</b>
3.2.1- Isolamento do HHV-7 por cultura celular.....	55
3.2.2- Extração de DNA de leucócitos totais de sangue periférico.....	57
3.2.3- Extração de DNA de granulócitos de sangue periférico.....	58
3.2.4- Extração de DNA de soro, saliva e cultura celular.....	59
3.2.5- Nested-PCR para HHV-7.....	59
3.2.6- Nested-PCR para HHV-6 (A/B).....	60
3.2.7- Nested-PCR para HCMV.....	61
3.2.8- Visualização do produto da Nested-PCR.....	62
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
4.1- Grupo controle e padronização da Nested-PCR.....	64
4.2- Pacientes transplantados.....	68
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
5.1- Grupo controle.....	79
5.2- Pacientes transplantados.....	80
<b>6- CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>89</b>

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

<b>HHV-7</b>	Herpesvírus Humano 7
<b>RK</b>	Cepa “RK” do Herpesvírus Humano 7
<b>JI</b>	Cepa “JI” do Herpesvírus Humano 7
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>HHV-6</b>	Herpesvírus Humano 6
<b>HCMV</b>	Citomegalovírus Humano ou Herpesvírus Humano 5
<b>HHV-5</b>	Herpesvírus Humano tipo 5 ou Citomegalovírus Humano
<b>nm</b>	nanômetro
<b>CD4</b>	Determinante de Grupamento-4
<b>SupT1</b>	Linhagem Celular Contínua Linfoblastóide T
<b>gB</b>	Glicoproteína B
<b>HSV-1</b>	Herpesvírus Simples 1
<b>Jurkat</b>	Linhagem Celular Contínua - Jurkat
<b>PM1</b>	Linhagem Celular Contínua –PM1
<b>HeLa</b>	Linhagem Celular Contínua - HeLa
<b>CD4SURF</b>	Determinante de Grupamento-4 de Superfície Celular
<b>CD4INTRA</b>	Determinante de Grupamento-4 Intracelular
<b>CD34+</b>	Determinante de Grupamento-34
<b>CD8+</b>	Determinante de Grupamento-8
<b>HIV-1</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana 1
<b>HSB2</b>	Linhagem Celular Contínua –HSB2
<b>MolT-3</b>	Linhagem Celular Contínua –MolT-3
<b>MolT-4</b>	Linhagem Celular Contínua –MolT-4
<b>T-Jhan</b>	Linhagem Celular Contínua –T-Jhan
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>U/mL</b>	Unidade por miliLitro
<b>mg</b>	miligrama
<b>mL</b>	Militro

<b>RPMI-1640</b>	Meio de Cultura Celular – RPMI-1640
<b>PBS</b>	Solução Salina Fosfatada Tamponada
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono (Gás Carbônico)
<b>μM</b>	MicroMol
<b>VPP</b>	Valor Preditivo Positivo
<b>VPN</b>	Valor Preditivo Negativo
<b>P ou p</b>	Valor Alfa (estatístico)
<b>≤</b>	Menor ou Igual
<b>≥</b>	Maior ou Igual
<b>dATP</b>	Desoxirribonucleotídeo Adenina Trifosfato
<b>dCTP</b>	Desoxirribonucleotídeo Citosina Trifosfato
<b>dGTP</b>	Desoxirribonucleotídeo Guanina Trifosfato
<b>dTTP</b>	Desoxirribonucleotídeo Timidina Trifosfato
<b>pmol</b>	PicoMol
<b>q.s.p.</b>	Quantidade Suficiente Para
<b>EX1</b>	Iniciador EX1 (primer)
<b>EX2</b>	Iniciador EX2 (primer)
<b>IN-3</b>	Iniciador IN-3 (primer)
<b>IN-4</b>	Iniciador IN-4 (primer)
<b>MIE-4</b>	Iniciador MIE-4 (primer)
<b>MIE-5</b>	Iniciador MIE-5 (primer)
<b>IE-1</b>	Iniciador IE-1 (primer)
<b>IE-2</b>	Iniciador IE-2 (primer)
<b>TRIS</b>	Tris-Hidroximetilaminometano
<b>Hcl</b>	Ácido Clorídrico
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
<b>KDa</b>	Quilodaltos
<b>pp85</b>	Fosfoproteína-85
<b>RF</b>	Fator Reumatóide (Reumathoid Factor)

<b>SDS</b>	Duodecil Sulfato de Sódio
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético
<b>gp110</b>	Glicoproteína 110
<b>gp160</b>	Glicoproteína 160
<b>ng</b>	Nanograma
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>g</b>	Gramma
<b>mg</b>	Miligrama
<b>pb</b>	Pares de Base
<b>&gt;</b>	Maior Que
<b>n</b>	Número de Indivíduos (estatístico)
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>mM</b>	MiliMolar
<b>TKM1</b>	Tampão Tris – Potássio- Magnésio –Fórmula 1
<b>TKM2</b>	Tampão Tris – Potássio- Magnésio –Fórmula 2
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloreto de Amônio
<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de Amônio
<b>BSA</b>	Albumina Sérica Bovina
<b>AEC</b>	Amino-Etil -Carbazol
<b>G</b>	Base Nitrogenada Guanina
<b>A</b>	Base Nitrogenada Adenina
<b>T</b>	Base Nitrogenada Timidina
<b>C</b>	Base Nitrogenada Citosina
<b>ALT</b>	Alanina Amino Transferase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio (Água Oxigenada)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>MMF</b>	Mycolphenate-Mofetil
<b>FK-506</b>	Tracolimus-FK-506
<b>D+</b>	Doador de transplante Soro-positivo para HCMV
<b>R+</b>	Receptor de transplante Soro-positivo para HCMV
<b>R-</b>	Receptor de transplante Soro-negativo para HCMV

<b>μg</b>	Microgramas
<b>μL</b>	Microlitros
<b>RPM</b>	Rotações Por Minuto
<b>M</b>	Molar
<b>pp65</b>	Fosfoproteína-65
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>TEB</b>	Tris-EDTA-Borato

	<b>PÁG.</b>
<b>Tabela 1-</b> Lista de vírus do grupo herpes que infectam humanos.....	23
<b>Tabela 2-</b> Características gerais dos pacientes estudados, incluindo idade, sexo, e doença de base que motivou o transplante.....	51
<b>Tabela 3-</b> Iniciadores (primers) utilizados para a detecção do HHV-7, HHV-6 e HCMV.....	62
<b>Tabela 4-</b> Distribuição geral de pacientes que tiveram ao menos um episódio de infecção sintomática por HCMV de acordo com o tipo de doença por HCMV, presença de disfunção e rejeição do enxerto, outros achados clínico-laboratoriais e resultados positivos da Nested-PCR para HCMV, HHV-6 e HHV-7.....	68
<b>Tabela 5-</b> Distribuição geral de pacientes sem infecção ou com infecção assintomática por HCMV de acordo com a presença de disfunção e rejeição do enxerto, outros achados clínico-laboratoriais e resultados positivos da Nested-PCR para HCMV, HHV-6 e HHV-7.....	69
<b>Tabela 6-</b> Distribuição dos casos de infecção ativa por HHV-6, HHV-7 e de co-infecções entre si e com o HCMV com os casos de infecção sintomática, infecção assintomática e sem infecção por HCMV.....	73
<b>Tabela 7-</b> Distribuição dos casos de infecção ativa por HHV-6, HHV-7 e HCMV e de co-infecções entre si com os casos de infecção oportunista.....	73
<b>Tabela 8-</b> Distribuição dos casos de infecção ativa por HHV-6, HHV-7 e HCMV e de co-infecções entre si com os casos de disfunção e rejeição do enxerto.....	74

	<i>PÁG.</i>
<b>Figura 1-</b> Organização estrutural do genoma do HHV-7 e HHV-6 comparada ao HCMV.....	24
<b>Figura 2-</b> Fotomicrografia eletrônica do HHV-7 exibindo sua ultra-estrutura...	25
<b>Figura 3-</b> Efeitos citopáticos provocados pelo HHV-7 em cultura de células SupT1.....	34
<b>Figura 4-</b> Reação positiva por imunofluorescência para o HHV-7 usando células infectadas e não infectadas.....	37
<b>Figura 5-</b> Aspectos virológicos da infecção primária pelo HHV-7.....	39
<b>Figura 6-</b> Fotomicrografia ótica de linfócitos positivos para antígenos do HHV-7 (antigenemia) detectados por imunocitoquímica.....	41
<b>Figura 7-</b> Fotomicrografias óticas de cultivo celular após procedimento para isolamento do HHV-7 exibindo efeito citopático em isolamentos positivos e sem alterações morfológicas em isolamentos negativos..	65
<b>Figura 8-</b> Fotomicrografias óticas de lâminas preparadas a partir de cultivos celulares infectados por HHV-7 após reação de imunocitoquímica...	66
<b>Figura 9-</b> Gel de agarose visto à luz ultravioleta exibindo fragmentos de amplificação obtidos por Nested-PCR para HHV-7.....	67
<b>Figura 10-</b> Representação gráfica do sequenciamento dos fragmentos obtidos pela amplificação por Nested-PCR do genoma do HHV-7 isolado em cultura de uma das amostras de saliva positiva para HHV-7.....	67
<b>Figura 11-</b> Diagramas ilustrando o número de pacientes e de amostras que foram positivas para qualquer combinação dos vírus.....	71

	<i>PÁG.</i>
<b>Gráfico 1-</b> Cinética da detecção do HHV-6, HHV-7 e HCMV durante o período total de monitorização (% de amostras positivas em cada tempo).....	70
<b>Gráfico 2-</b> Frequências acumuladas de pacientes que apresentaram resultados positivos para cada vírus durante a monitorização.....	72
<b>Gráfico 3-</b> Frequências de detecção do HCMV nas amostras e o número de pacientes positivos antes e depois do tratamento com ganciclovir....	76
<b>Gráfico 4-</b> Frequências de detecção do HCMV nas amostras e o número de pacientes positivos antes e depois do tratamento com ganciclovir....	76
<b>Gráfico 5-</b> Frequências de detecção do HHV-6 nas amostras e o número de pacientes positivos antes e depois do tratamento com ganciclovir....	76
<b>Gráfico 6-</b> Frequências de detecção do HHV-6 nas amostras e o número de pacientes positivos antes e depois do tratamento com ganciclovir....	76
<b>Gráfico 7-</b> Frequências de detecção do HHV-7 nas amostras e o número de pacientes positivos antes e depois do tratamento com ganciclovir....	77
<b>Gráfico 8-</b> Frequências de detecção do HHV-7 nas amostras e o número de pacientes positivos antes e depois do tratamento com ganciclovir....	77

*RESUMO*



Neste estudo, 29 pacientes adultos, transplantados de fígado foram monitorados (até 180 dias pós-transplante) para infecções ativas por HCMV, HHV-6 e HHV-7 usando Nested-PCR (N-PCR). O protocolo de imunossupressão foi baseado na combinação de esteróides e ciclosporina e profilaxia com ganciclovir não foi usada. Aciclovir foi usado como profilaxia para o Herpes simples. Um grupo controle foi estudado, N-PCR em DNA extraído de PBL e soro de 53 indivíduos sadios foram realizados. Destes indivíduos, 8 amostras de saliva foram coletadas para isolamento do HHV-7 e produção de controle positivo. DNA do HHV-7 foi detectado em 87,5% de saliva, em 28,3% de PBL e 0% de soro. Isolamento do vírus mostrou ser 100% correlato com N-PCR. Soro foi considerado a amostra de escolha para detectar infecção ativa por HHV-7. DNA do HHV-6, HHV-7 e HCMV foram, frequentemente, detectados em pacientes após transplante hepático (65,5%, 51,7% e 48,2%, respectivamente). A maioria dos pacientes com infecção ativa por mais que um vírus é infectado de forma sequencial e não concorrente. Infecção ativa por HHV-7 ocorreu em muitos casos antes da infecção ativa por HCMV e/ou HHV-6 indicando que ele poderia ser um fator para reativação daqueles vírus. Nested-PCR para HCMV teve valor preditivo positivo de 50% e valor preditivo negativo de 100% para infecção sintomática. Neste estudo, o HCMV foi relacionado disfunção do enxerto, HHV-6 foi associado com pneumonite, encefalite, disfunção e rejeição do enxerto e predisposição para infecção oportunista. Em pacientes livres de HCMV e/ou HHV-6, nenhuma manifestação clínica nem achados laboratoriais significativos foram relacionados ao HHV-7. O tratamento antiviral com ganciclovir foi considerado satisfatório para o HCMV, mas para o HHV-6 e HHV-7, os dados não foram conclusivos. O aciclovir poderia ter demonstrado uma limitada atividade contra o HHV-7.

**Palavras-chave:** HHV-7, HHV-6, HCMV, transplante de fígado, infecção ativa.

*ABSTRACT*



In this study, 29 adult liver transplant patients were monitored (until day 180<sup>th</sup> posttransplantation) for HCMV, HHV-6 e HHV-7 active infections using Nested-PCR (N-PCR). Immunosuppression protocol was based on combinations of steroids and cyclosporine and no ganciclovir prophylaxis was used. Aciclovir was employed as Herpes simplex prophylaxis. A control group was studied; N-PCR in DNA extracted from PBL and serum of 53 healthy individuals was carried out. From these individuals, 8 samples of saliva were collected to design a positive control to N-PCR. HHV-7 DNA was detected in 87.5% of saliva, in 28.3% of PBL and 0% of serum. Virus isolation showed to be 100% correlated with N-PCR. Serum was considered to be the sample of choice to detect HHV-7 active infection. HHV-6, HHV-7 and HCMV DNA were frequently detected in patients after liver transplant (65.5%, 51.7% and 48.2%, respectively). The results show that few patients remain negative to active infection with betaherpesviruses after liver transplantation. Most of the patients with active infection with more than one virus were infected sequentially and not concurrently. HHV-7 active infection occurred in most of cases prior HCMV and HHV-6 active infections indicating that it could be a factor to reactivation of these viruses. HCMV Nested-PCR presented positive predictive value of 50% and negative predictive value of 100%. In this study, HCMV was related with graft dysfunction, HHV-6 was associated with pneumonitis, encephalitis, liver dysfunction, graft rejection and predisposition to opportunist infections. In HCMV and/or HHV-6 free patients, no clinical manifestation nor significant laboratory findings was related to HHV-7. Ganciclovir Antiviral treatment was considered satisfactory to HCMV symptomatic infections but to HHV-6 and HHV-7, no conclusive data was found. Aciclovir could be a limited activity against HHV-7.

**Key-words:** HHV-7, HHV-6, HCMV, liver transplantation, active infection.

## *1- INTRODUÇÃO*

## 1.1- Histórico e classificação

Os herpesvírus humanos pertencem a família *Herpesviridae*, são vírus ubíquos e uma vez ocorrida a primo-infecção, permanecem no organismo do indivíduo afetado (latência) durante toda a vida. Estes vírus provocam uma grande variedade de doenças, sendo que, as infecções são frequentemente benignas, podendo, contudo, em indivíduos imunocomprometidos, causar manifestações clínicas de gravidade variada (FERREIRA & SOUSA, 2002; WAGNER & HEWLETT, 1999).

A família *Herpesviridae* está dividida em 3 sub-famílias: *Alphaherpesvirinae* ( $\alpha$ -herpesvirinae), a sub-família *Betaherpesvirinae* ( $\beta$ -herpesvirinae) e a sub-família *Gammaherpesvirinae* ( $\gamma$ -herpesvirinae). Estas distinguem-se pelas suas características virais e estruturais, bem como pelo seu poder patogênico. Todos os tipos de vírus inseridos nesta família são vírus de DNA com cadeia dupla e os diferentes tipos de herpesvírus partilham características estruturais semelhantes. A Tabela 1 exhibe uma lista de vírus pertencentes ao grupo herpes que infectam humanos.

Os vírus do grupo herpes estabelecem infecções primárias com sintomas, geralmente, ligeiros, que podem resultar em resposta imunitária eficiente que impede uma nova infecção. Contudo, o vírus não é totalmente eliminado, sendo o seu genoma mantido em determinadas células sem que haja uma infecção produtiva, mas sim, uma infecção latente. As infecções latentes podem tornar-se ativas (reativação) devido a fatores internos ao hospedeiro e estas manifestações permitem a disseminação dos herpesvírus uma vez que se verifica libertação de vírions extracelulares (FERREIRA & SOUSA, 2002, WAGNER & HEWLETT, 1999 e MADIGAN *et al.*, 2000).

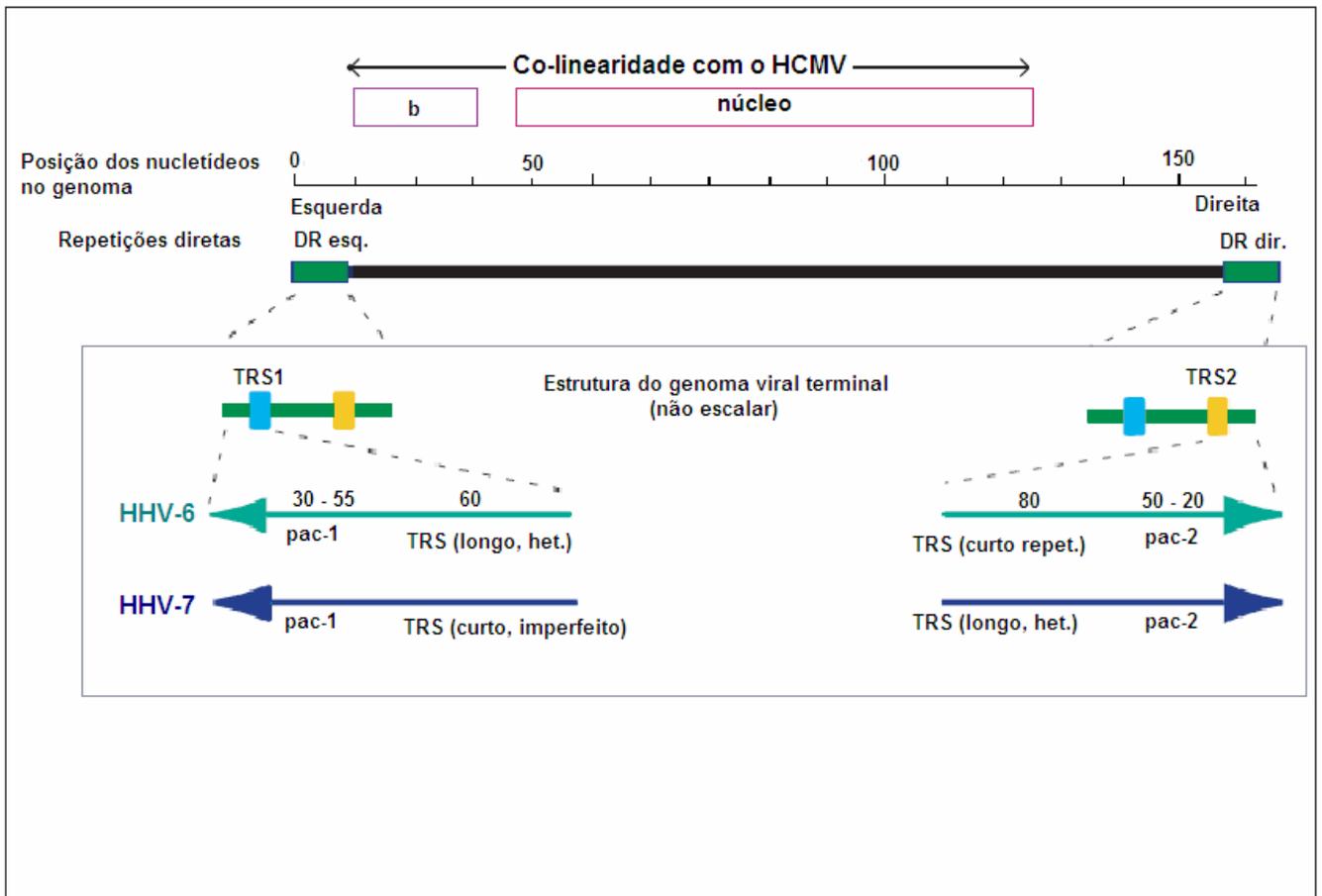
**Tabela 1-** Vírus do grupo herpes que infectam humanos.

Vírus	Sinônimo	Sub-família	Abreviação
Herpesvírus Humano-1	Herpes simplex-1	$\alpha$	HSV-1/HHV-1
Herpesvírus Humano-2	Herpes simplex-2	$\alpha$	HSV-2/HHV-2
Herpesvírus Humano-3	Varicella-zoster	$\alpha$	VZV/HHV-3
Herpesvírus Humano-4	Epstein-Barr	$\gamma$	EBV/HSV-4
Herpesvírus Humano-5	Citomegalovírus	$\beta$	CMV/HHV-5
Herpesvírus Humano-6	Não há	$\beta$	HHV-6
Herpesvírus Humano-7	Não há	$\beta$	HHV-7
Herpesvírus Humano-8	Não há	$\gamma$	KSHV/HHV-8

O Herpesvírus Humano 7 (HHV-7) foi isolado pela primeira vez em 1990, a partir de linfócitos T purificados de células mononucleares de sangue periférico de um doador sadio após ativação destas células, sendo esta cepa denominada RK (FRENKEL *et al.*, 1990). Outra cepa (cepa JI), obtida de um isolamento independente a partir de células mononucleares de sangue periférico de um paciente portador de Síndrome de Fadiga Crônica, foi relatada mais tarde (BERNEMAN *et al.*, 1992).

O Herpesvírus Humano 7 é um DNA vírus pertencente ao gênero *Roseolovirus*, família *Herpesviridae*, subfamília *betaherpesvirinae*. O HHV-7 é mais relacionado ao Herpesvírus Humano 6 (HHV-6) que qualquer outro herpesvírus e, o próximo vírus mais similar na escala dos herpesvírus é o Citomegalovírus Humano (HCMV ou HHV-5).

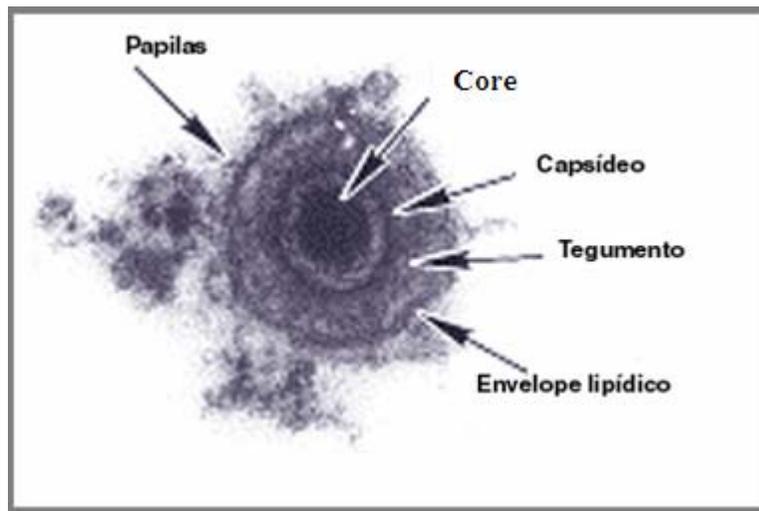
O genoma do HHV-7 consiste de DNA de fita dupla, linear e de 145 quilobases de tamanho e, é co-linear com o genoma do HHV-6 (Figura 1). O Genoma do HHV-7 é aproximadamente 10% mais curto que o genoma do HHV-6 e consiste de uma longa e única região (DEWHURST *et al.*, 1997). O vírus HHV-7 compartilha alguns epitopos antigênicos comuns com o HHV-6 (WARD, 2002).



**Figura 1-** Organização estrutural do genoma do HHV-7 e HHV-6 comparada ao HCMV (DEWHURST *et al.*, 1997).

## 1.2- Características biológicas

O HHV-7 possui as mesmas características estruturais dos outros herpesvírus. A ultra-estrutura do HHV-7 maduro consiste em uma partícula de cerca de 170 nm de diâmetro com nucleocapsídeo de 90-95 nm e, tegumento de 30 nm, aproximadamente. Os isolados podem apresentar variações morfogênicas e quantitativas consideráveis, dependendo do lote de células utilizado para isolamento, mas as características dos isolados da maioria das cepas são similares, morfológicamente (ABLASHI *et al.*, 1998). A estrutura do HHV-7 maduro extracelular visualizada através de microscopia eletrônica é mostrada na Figura 2.



**Figura 2-** Fotomicrografia eletrônica do HHV-7 exibindo sua ultra-estrutura (ABLASHI *et al.*, 1998).

O HHV-7 é um vírus linfotrópico com tropismo para células CD4<sup>+</sup>, especialmente para linfócitos T-CD4<sup>+</sup> e linhagem celular SupT1 (célula T-linfoblastóide de linhagem contínua). O receptor CD4 é necessário, mas não suficiente para a internalização do vírus na célula. Tem sido proposto que, proteoglicanas sulfatadas de superfície celular são capazes de se ligar a uma proteína do HHV-7, homóloga à Glicoproteína B (gB) do HSV-1 (Herpesvirus Humano 1 ou Herpesvirus simples 1). Esta ligação precede a interação com os receptores CD4 de superfície celular, de forma que sem esta prévia ligação, não há efetivação da infecção celular pelo HHV-7. Isto explica porque muitas outras linhagens celulares CD4<sup>+</sup> como as Jurkat, PM1 e HeLa não são susceptíveis a infecção pelo HHV-7 (DEWHURST *et al.*, 1997).

Alguns autores propuseram que o HHV-7 não infecta monócitos ou macrófagos (DEWHURST *et al.*, 1997). No entanto, estudos mais recentes encontraram DNA do HHV-7 em monócitos/macrófagos obtidos de sangue periférico em 6,3% de indivíduos sadios soropositivos para HHV-7 (MIYAKI *et al.*, 2006), mas com baixa carga viral (1,7 cópias/ 1x10<sup>6</sup> células). ZHANG *et al.* (2001) também demonstraram através de inoculação de macrófagos cultivados com cepas do HHV-7 que estas células são

susceptíveis à infecção produzindo vírus infectantes, sugerindo que macrófagos podem ser um sítio de latência *in vivo*.

O HHV-7 é capaz de provocar infecções sub-clínicas persistentes (com baixo nível de replicação viral), incorporar seu DNA no genoma das células do hospedeiro (células linfóides, células glandulares salivares) e permanecer latente por toda a vida do indivíduo. O epítipo CD4 está presente em células das glândulas salivares, o que explica a alta frequência de isolamento desse vírus da saliva de seres humanos adultos saudáveis (KONEMAN *et al.*, 2001; WYATT & FRENKEL, 1992).

IHIRA *et al.* (2003) demonstraram que há variações na taxa de secreção de partículas virais na saliva relacionadas a idade do indivíduo e ao título de anticorpos anti-HHV-7. A maior frequência no isolamento do vírus ocorre em indivíduos mais jovens e com baixo título de anticorpos. No mesmo estudo, foi demonstrado que nem todas as amostras de saliva coletadas dos mesmos indivíduos ao longo de 6 meses de monitorização foram positivas para isolamento do HHV-7. Isto sugere variação da carga viral secretada na saliva por um mesmo indivíduo ao longo do tempo.

Em células mononucleares de sangue periférico, a replicação viral do HHV-7 é lenta, apresenta ciclo lítico e induz a formação de sincício. A replicação do HHV-7 induz a perda do receptor CD4 na superfície celular (“downregulation”). Estudos *in vitro* em células SupT1 demonstraram uma marcada perda de receptor CD4 de superfície (CD4SURF) comparado ao receptor CD4 intracelular (CD4INTRA), embora haja redução de ambos. Também foi demonstrado que existe uma co-localização de CD4INTRA com antígenos do HHV-7 em alguns compartimentos celulares na célula infectada (SECCHIERO *et al.*, 1997).

Um receptor de quimiocina-CXC (“7-Transmembrane G-Protein-Coupled CXC-Chemokine Receptor-4 - CXCR4”), que é expresso em todas as células hematopoiéticas, desde células imaturas progenitoras CD34<sup>+</sup> até linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e, conhecido como um co-receptor para o HIV-1 (vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida tipo 1), também sofre diminuição da sua expressão em células infectadas pelo HHV-7 (SECCHIERO *et al.*, 1998).

Alguns estudos demonstraram que o HHV-7 *in vitro* pode competir com o HIV-1 e, interferir negativamente na replicação deste último em cultura, mas *in vivo*, o efeito sobre a replicação do HIV-1 permanece desconhecido e merece investigação (DEWHURST *et al.*, 1997; KONEMAN *et al.*, 2001).

Estudos em culturas de células mononucleares periféricas estimuladas demonstraram que a replicação do HHV-7 pode induzir a reativação do HHV-6 *in vitro* (DEWHURST *et al.*, 1997). Alguns trabalhos têm sugerido que isso ocorre também *in vivo* em pacientes imunossuprimidos (EMERY, 2001; MENDEZ *et al.*, 2001).

O cultivo do HHV-7 *in vitro* geralmente é feito em células mononucleares de sangue de cordão umbilical ativadas com fitohemaglutinina (agente que induz transformação blástica em células T). A transferência dos vírus (isolados a partir das células de cordão umbilical) para linhagem celular contínua (SupT1) para estudos e produção de antígenos virais têm sido utilizada devido ao fato de ser mais fácil de se trabalhar com células de linhagens contínuas do que manter sempre disponíveis células de cordão umbilical viáveis e livres de contaminação (ABLASHI *et al.*, 1998).

Os antígenos do HHV-7 aparecem, em cultivo celular, entre 4 e 7 dias após as células de sangue de cordão terem sido infectadas, já as células SupT1 demoram de 7 a 14 dias para demonstrarem antígenos, sugerindo maior susceptibilidade das células de sangue de cordão à infecção por este vírus do que as células SupT1.

Outras linhagens celulares T linfoblastóides que se mostraram eficientes para isolamento do HHV-6 (linhagens HSB2, MoLT-3, MoLT-4, J-Jhan, Jurkat) não são susceptíveis à infecção pelo HHV-7, pelo menos, não o suficiente para serem úteis para cultivo. Os graus de efetividade e de demonstração de antígenos são similares (45-60% de células infectadas) nos dois tipos de células – Células de sangue de cordão e SupT1 (ABLASHI *et al.*, 1998).

Não há relatos de cepas de HHV-7 que infectem e causem doenças em animais, tal como acontece com o Citomegalovírus, até o momento da confecção deste trabalho.

### 1.3- Epidemiologia e transmissão

A prevalência da infecção primária pelo HHV-7 na população em geral é alta, cerca de 5 infectados para cada 7 crianças (71%) segundo relatos de TANAKA *et al.* (1994). No Brasil (região norte), 93 % de adultos e crianças maiores que 10 anos de idade apresentam anticorpos de classe IgG contra o HHV-7, segundo estudos de FREITAS *et al.* (2004).

A primo-infecção pelo HHV-7 incide em idades entre 5 e 6 anos de vida, um pouco mais tarde que para o HHV-6 que ocorre aos 2 anos, aproximadamente (IOSHIKAWA *et al.*, 1989; WYATT *et al.*, 1991; TORIGOE *et al.*, 1995; TANAKA *et al.*, 1996; WARD *et al.*, 2001). A infecção pelo HHV-7 pode ocorrer mais cedo em regiões tropicais como o Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

A transmissão horizontal do HHV-7 se dá, provavelmente, através da saliva como foi sugerido por TAKAHASHI *et al.* (1997). O índice de isolamento do HHV-7 a partir da saliva é muito alto, cerca de 75% (Canada Communicable Disease Report, 2000). O HHV-6 B tem, provavelmente, a mesma forma de transmissão (MUKAI *et al.*, 1994), mas o HHV-6 A é encontrado apenas ocasionalmente na saliva (HALL *et al.*, 1998) e sua forma exata de transmissão permanece desconhecida. Se o HHV-6 B é também transmitido pela saliva, não fica explicado o motivo pelo qual a infecção pelo HHV-7 ocorre mais tardiamente (WARD, 2005).

A transmissão vertical do HHV-7 pode ser resultado da passagem pela placenta ou de forma hereditária após integração do seu genoma nos cromossomos gaméticos do hospedeiro assim como acontece com o HHV-6. Quanto ao HHV-6, trabalhos recentes demonstraram que 0,2% em cromossomos de pacientes japoneses e 1,6% de células de cordão umbilical possuem DNA do HHV-6 incorporado ao seu genoma (DAIBATA *et al.*, 1999 ; TANAKA –TAYA *et al.*, 2004) e, isto pode acontecer também com o HHV-7.

Transmissão após o parto através do leite materno é outra possibilidade para o HHV-7 de acordo com BLACK e PELLETT (1999). Transmissão nosocomial/iatrogênica pode ocorrer através de transfusão de sangue, células progenitoras hematopóicas e órgãos transplantados, causando infecção primária ou infecção recorrente (WARD, 2005).

É definido como infecção primária ou primo-infecção, o primeiro contato com uma das cepas do HHV-7. A reinfecção ocorre quando o indivíduo entra em contato com uma cepa diferente da que foi, anteriormente, infectado. A infecção latente é definida pela persistência do genoma do HHV-7 nas células do hospedeiro. Reativação é definida pela replicação do genoma viral a partir do estado de latência. Infecção ativa é definida pela replicação do vírus na célula do hospedeiro e liberação de vírus para o espaço extracelular. A infecção ativa pode estar ligada a fase aguda da infecção primária ou à reativação de uma infecção latente (LJUNGMAN *et al.*, 2002).

## **1.4- Manifestações clínicas e fisiopatologia**

### 1.4.1- Considerações gerais

Como os outros herpesvírus, o HHV-7 pode estabelecer uma infecção latente por toda a vida do indivíduo e se reativar durante um estado de imunossupressão (LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2002). Em indivíduos que receberam transplantes de órgãos pode ocorrer reativação similarmente ao que ocorre com outros herpesvírus (YOSHIKAWA, 2003).

Após a infecção primária, os vírus do grupo herpes estabelecem latência e o DNA viral persiste sem expressão protéica que poderia ser alvo para uma resposta imune. Intermitentemente, o genoma viral latente pode tornar-se ativo e produzir virions infectantes- uma infecção ativa com viremia transitória (IHMF - Management Strategies Workshop and 4<sup>th</sup> Annual Meeting, 1997). No caso do HHV-7, em pacientes imunossuprimidos, farmacologicamente, os fatores que controlam a sua reativação não são ainda muito claros, mas parece estar associada ao grau de imunossupressão. Sugere-se que, os fatores que controlam a reativação ou o aumento da replicação do HHV-7 em indivíduos imunossuprimidos podem ser similares aos previamente identificados para o HCMV (MENDEZ *et al.*, 2000).

Um fator que pode causar confusão na análise do HHV-7 em sangue periférico e em outros tecidos, usando PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é a detecção potencial de infecção latente (GRIFFITHS *et al.*, 2000). Contudo, a detecção do DNA do HHV-7 em

soro ou plasma é indicativa de replicação viral ativa (IHIRA *et al.*, 2001; FELDSTEIN *et al.*, 2003; CANADA COMMUNOCABLE DISEASE REPORT, 2000).

#### **1.4.2- Indivíduos imunocompetentes**

Exantema súbito ou *Roseola infantum* é uma síndrome exantemática caracterizada, classicamente, por febre alta e erupção cutânea, principalmente em crianças menores. A infecção é, tipicamente, acompanhada de leucopenia (neutrófilos e linfócitos, concomitantemente) e, por vezes, de plaquetopenia e hepatite. Algumas vezes, a infecção pelo HHV-7 pode se ocorrer sem a presença de erupção cutânea (WARD, 2005). Normalmente, a doença é efetivamente controlada pelo sistema imune do indivíduo infectado sem deixar seqüelas.

É importante salientar que, a maioria dos casos de exantema súbito são causados pelo HHV-6 variante B e um segundo episódio de exantema súbito pode ocorrer provocado pelo HHV-7. A infecção pelo HHV-7 pode ocorrer antes do HHV-6, embora, isto seja menos comum (WARD, 2005).

Convulsões, encefalite e encefalopatia têm sido associadas a doenças febris causadas pelo HHV-7 e HHV-6 bem antes do exantema súbito ser, clinicamente, caracterizado no paciente. Relação entre infecção primária pelo HHV-6 subtipo B e as manifestações acima descritas foram confirmadas por alguns autores (ASANO *et al.*, 1994; HALL *et al.*, 1994; WARD & GRAY, 1994), mas para o HHV-7 foi bem menos documentada (TORIGOE *et al.*, 1996; CASERTA *et al.*, 1998). Uma infecção primária pelo HHV-7 associada com encefalopatia foi documentada por VAN DEN BERG *et al.* (1999) na qual a criança recuperou-se. A contribuição em morbidade neurológica tem sido relatada por alguns autores associando o HHV-7 com doença neurológica incluindo estado epiléptico (WARD *et al.*, 2005).

Existem relatos sugerindo ligação do HHV-6 com Esclerose Múltipla e Síndrome de Fadiga Crônica, mas ainda é muito controversa (TYLER, 2003). Devido à estreita relação entre o HHV-6 e HHV-7, pode se pensar que estas características também

se apliquem ao HHV-7. A relação do HHV-7 com pitíriase rósea tem sido estudada, mas permanece ainda sem provas (CHUH *et al.*, 2004).

Não há relato na literatura associando o HHV-7 e doença congênita até o momento. A infecção primária em crianças mais velhas e adultos não é usual e, costuma ser mais grave do que em mais tenra idade (WARD *et al.*, 2002).

#### 1.4.3- Indivíduos imunossuprimidos

O HHV-7 mantém latência, com baixo nível de replicação viral, após a infecção primária, podendo se reativar após um período de disfunção imune. Após imunossupressão farmacológica em transplantes de órgãos podem-se reativar e a replicação viral prosseguir de forma clinicamente benigna. Apesar de até o momento não haver provas sobre efeitos patogênicos do HHV-7, não está descartada a possibilidade de manifestações clínicas diretas ou indiretas.

A forma mais comum de manifestação do HHV-7 é a reativação endógena. Ou seja, a persistência natural da infecção primária com baixo nível de replicação e a subsequente reativação no indivíduo receptor do órgão na fase de imunossupressão desses pacientes transplantados. Contudo, a transmissão por via hematogênica (transusão sanguínea) ou do próprio transplante é também possível, a partir de doadores soropositivos para o HHV-7. Ambos os fenômenos, ou seja, reativação endógena e reinfeção adquirida podem também ocorrer, concomitantemente, no mesmo indivíduo.

O HHV-7 incide em cerca de 14 a 46% dos pacientes transplantados. A variação se deve às condições do paciente, tipo de imunossupressão e o método de detecção de infecção ativa utilizado; testes sorológicos, cultura ou a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (RAZONABLE & PAYA, 2002).

Vários tipos de manifestações clínicas têm sido relatados: síndrome exantemática clássica (exantema súbito), outras erupções cutâneas, pneumonite intersticial, encefalite e hepatite, mas é ainda muito controverso (RAZONABLE & PAYA, 2002).

## 1.5- Tratamento

Dentre os betaherpesvirus, o HCMV é o único em que há um relativo consenso em relação ao tratamento com antivirais. O ganciclovir tem sido a droga mais utilizada para o tratamento de infecção pelo HCMV em pacientes transplantados. Embora a atividade antiviral do ganciclovir contra o HCMV seja comprovada, muitos estudos sugerem diferenças na efetividade desta droga dependendo da via de administração (RAZONABLE *et al.*, 2003).

A terapia pré-clínica com ganciclovir de forma oral, uma modalidade terapêutica em que o paciente recebe o medicamento antes do aparecimento de sintomas, tem sido utilizada em alguns serviços baseados na positividade da PCR ou da antigenemia para HCMV. Embora este protocolo reduza a incidência de doença por HCMV em transplante de órgãos sólidos, ele não previne de forma completa o aparecimento dos sintomas, principalmente, em pacientes com cargas virais mais altas (RAZONABLE *et al.*, 2003).

Devido às semelhanças entre o HCMV, HHV-7 e HHV-6, alguns autores investigaram a atividade dos medicamentos usados para o tratamento do HCMV contra o HHV-7 e HHV-6. HUMAR *et al.* (2002) sugeriram que *in vivo* a profilaxia com ganciclovir diminui o risco de infecção pelo HHV-6. Alguns estudos *in vitro* sugerem que o ganciclovir, cidofovir e foscarnet são efetivos e que o aciclovir tem efeito limitado contra o HHV-7, mas são escassos os dados que suportam a efetividade do tratamento com estas drogas *in vivo* (RAZONABLE *et al.*, 2002).

Os dados apresentados na literatura relativos à eficácia dos medicamentos anti-HCMV para o tratamento de infecções pelo HHV-7 e HHV-6 são ainda conflitantes. A falta de um agente antiviral específico para o HHV-7 e a falta de métodos de monitorização da resposta ao tratamento também são, em parte, responsáveis por estes dados conflitantes. A ocorrência da co-infecção do HHV-7, HHV-6 e HCMV dificultam um estudo randomizado de atividade antiviral no período pós-transplante (RAZONABLE *et al.*, 2003).

Para as infecções primárias pelo HHV-7 e HHV-6, não há recomendações específicas para o uso de drogas antivirais em pacientes imunocompetentes, exceto em algumas situações particulares em que o HHV-6 ou HHV-7 possam estar envolvidos em quadros com comprometimento neurológico (WARD, 2005).

## **1.6- Diagnóstico da infecção pelo HHV-7**

### 1.6.1- Método de isolamento viral

O isolamento do HHV-7 pode ser feito a partir de células mononucleares de sangue de cordão umbilical ativadas com fitohemaglutinina (agente que induz transformação blástica em células T) e com adição de interleucina-2 e polibrene, esta última, uma substância que facilita, mas não é essencial à infecção celular pelo HHV-7. A produção endógena de interleucina-2 pelas células da cultura interfere na produção de antígenos virais. Quando concentrações entre 0,1 e 1,0 U/ml de interleucina-2 são adicionados ao meio de cultura, o número de células que apresentam antígenos do HHV-7 aumenta significativamente (BLACK *et al.*, 1997). No entanto, quando concentrações maiores que 1,0 U/ml são adicionadas, o desenvolvimento do HHV-7 é inibido na maioria das culturas.

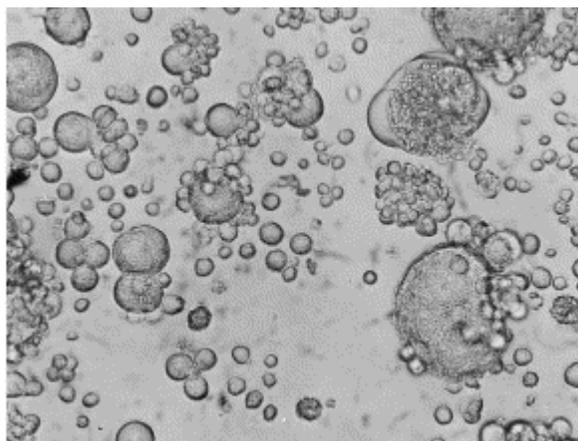
A adição de 0,01mg/ml de hidrocortisona também melhora o desenvolvimento do HHV-7 nas culturas (BLACK *et al.*, 1997). A transferência das culturas para linhagem celular T linfoblástico – Células SupT1 tem sido descrita em detalhes por ABLASHI *et al.* (1998).

Para que se possa fazer o isolamento do HHV-7 é necessário dispor de células mononucleares de cordão umbilical. Estas células precisam ser coletadas na sala de parto tão logo quanto possível. A coleta é feita com seringa após o cordão ter sido cortado e o sangue é introduzido em tubos estéreis contendo heparina com cuidados de extrema assepsia. Os tubos devem ser encaminhados ao laboratório para serem processados o mais rápido possível para garantir a viabilidade celular.

As células mononucleares podem ser isoladas utilizando gradientes de densidade (Ficoll-Hypaque), lavadas em PBS e cultivadas a 37°C em meio de cultura RPMI-1640 contendo soro fetal bovino. Lançado o cultivo celular, os frascos podem ser inoculados com a amostra do paciente e incubados em estufa de CO<sub>2</sub> ou em sistema fechado. Amostras, potencialmente contaminadas, com fungos ou bactérias devem ser antes, filtradas em filtros altamente retentores de 0,45 µm e estéreis para eliminar estes agentes.

Após cerca de 7 dias o efeito citopático (Figura 3) pode aparecer e consiste de pleomorfismo, formação de sincício e de células gigantes até 3 vezes o tamanho normal (ABLASHI *et al.*, 1998). O efeito citopático do HHV-7 é similar ao do HHV-6 e, portanto, é necessária a caracterização do isolado por métodos imunológicos usando anticorpos monoclonais específicos para o HHV-7 ou análise por PCR (WARD, 2005).

O isolamento do HHV-7 por cultivo celular é demorado (7 a 28 dias) para uso diagnóstico, além de apresentar dificuldades técnicas para a sua realização. Por estas razões, o isolamento não é um método de diagnóstico precoce sendo usado mais para a produção de antígenos virais e estudos biológicos do vírus.



**Figura 3-** Efeitos citopáticos provocados pelo HHV-7 em cultura de células SupT1 (ABLASHI *et al.*, 1998).

### 1.6.2- Métodos imunológicos

Quando ocorre a infecção primária pelo HHV-7 em indivíduos imunocompetentes os anticorpos de classe IgM são os primeiros a serem sintetizados, seguidos posteriormente, pelos de classe IgG. Estes últimos permanecem pelo resto da vida do indivíduo. A reatividade de anticorpos de classe IgG indica contato prévio - recente ou antigo ao HHV-7. Os anticorpos de classe IgM indicariam infecção aguda ou muito recente, mas cerca de 5% da população tem sorologia IgM positiva para HHV-7 em qualquer tempo, tornando-se um problema a confirmação sorológica da infecção aguda (Canada Communicable Disease Report, 2000).

A realização de testes sorológicos quantitativos do tipo IgG em amostras pareadas ao longo de algum tempo para verificação do aumento nos títulos de anticorpos e testes de avididade podem ajudar a contornar esse problema (WARD *et al.*, 2002).

A pesquisa e quantificação de anticorpos de classe IgM e IgG para o HHV-7 têm sido utilizadas por vários pesquisadores para determinar a soroprevalência do HHV-7 e caracterização da infecção aguda pelo HHV-7. No entanto, a utilidade da sorologia para monitorização de pacientes imunossuprimidos ainda não está bem definida. A reação cruzada entre o HHV-7 e o HHV-6 é fator preocupante, porque a maioria dos soros humanos tem anticorpos para os dois vírus (ABLASHI *et al.*, 1998). Estudos utilizando soro hiperimune de ratos mostraram reação cruzada entre os dois vírus sugerindo compartilhamento de epítopos comuns (TOMASI *et al.*, 1994).

A infecção por um dos vírus, HHV-6 ou HHV-7, pode induzir a proliferação de clones de células B que produzem anticorpos contra o outro, complicando ainda mais a avaliação sorológica para estes agentes (WARD, 2005).

Estudos de avaliação de sensibilidade e especificidade para o HHV-7 comprovaram uma limitada reatividade cruzada entre o HHV-7 e o HHV-6. Porém, considerada-se aceitável resultados com títulos de reação por imunofluorescência de 1:32 ou mais (WARD, 2002). Testes de ELISA ou Imunofluorescência após técnicas de absorção cruzada com o HHV-6 e realização de Western Blot mostraram que as proteínas mais

imunorreativas dos dois vírus são distintas, ficando a reação cruzada restrita a proteínas de baixa reatividade imune, não chegando a interferir quanto se parte de uma diluição de 1:32 na imunofluorescência, reforçando os critérios acima sugeridos. Verificou-se também que uma reatividade contra uma proteína de peso molecular de 85 kDa do HHV-7 (pp85) é específica para este vírus (BLACK *et al.*, 1996).

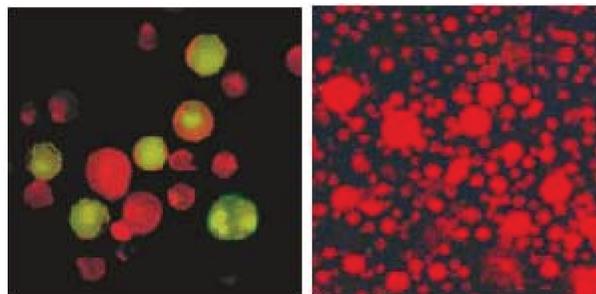
#### 1.6.2.1- Imunofluorescência indireta

A imunofluorescência indireta tem sido empregada como o método clássico para diagnóstico sorológico do HHV-7. Nela células de sangue de cordão umbilical ou células SupT1 infectadas com cepas de HHV-7 são depositadas sobre lâminas de microscopia, secas e fixadas. As lâminas são recobertas com diluições adequadas de amostras dos pacientes (soro ou plasma) e incubadas em câmara úmida a 37°C por tempo determinado.

Após a incubação, elas são lavadas com tampão para retirar os anticorpos em excesso e outras proteínas que não se ligaram aos antígenos virais e após isso são recobertas com anticorpos anti-IgG ou anti-IgM específicos marcados com fluoresceína, incubadas e lavadas novamente. Finalmente, as lâminas são levadas ao microscópio de fluorescência onde se observam células com coloração fluorescente esverdeada quando a preparação for positiva. Um contra-corante (geralmente o Azul de Evans) é utilizado para facilitar a observação fazendo com que amostras negativas exibam coloração alaranjada leve (Figura 4).

Para a pesquisa de anticorpos de classe IgM é necessário o tratamento prévio com RF-Ab-sorbent (Hoechst-Behring, Kanata, Ontario, Canada) para evitar a interferência da IgG e Fator Reumatóide na reação. A imunofluorescência pode, também, apresentar reatividade falso positiva em algumas amostras, principalmente, em indivíduos HIV-positivos ou com doenças auto-imunes (ABLASHI *et al.*, 1998). Células não infectadas podem ser misturas antes da preparação das lâminas para se minimizar este problema (Figura 4), pois uma amostra realmente positiva terá que apresentar células

coradas e, outras, não coradas na mesma lâmina de reação (Advanced Biotechnologies Inc-Maryland -EUA).



**Figura 4-** À esquerda - Reação positiva por imunofluorescência para o HHV-7 usando células infectadas e não infectadas (coloração esverdeada e laranja, respectivamente). À direita – Reação negativa exibindo pálida coloração alaranjada (Advanced Biotechnologies Inc-Maryland -EUA).

#### 1.6.2.2- Enzimaimunoensaio

O imunoensaio tipo ELISA (“Enzyme Linked Imunosorbent Assay”) tem sido descrito como método para avaliação sorológica de vários agentes infecciosos. É um teste quantitativo, relativamente fácil de padronizar e factível de ser produzido em larga escala para uso diagnóstico (ABLASHI *et al.*, 1998). Além disso, pode-se pesquisar anticorpos tanto de classe IgG como de classe IgM.

No método imunoenzimático, antígenos do agente em questão são imobilizados em uma superfície plástica (fase sólida) e recobertos com diluições adequadas de amostras dos pacientes (soro ou plasma) e incubados a 37°C por tempo determinado. Após incubação, as placas são lavadas com tampão para retirar os anticorpos e outras proteínas que não se ligaram e, então, são recobertas com anticorpos anti-IgG ou anti-IgM específico marcados com uma enzima, geralmente fosfatase alcalina ou peroxidase, incubadas e lavadas novamente. Um substrato enzimático é adicionado e revelará a reação pela produção de uma substância colorida.

Na presença de anticorpos específicos na amostra eles se ligarão aos antígenos virais presentes na superfície da fase sólida e, se ligarão também, aos anticorpos marcados com enzima acrescentados depois. Após a adição do substrato da enzima, uma reação positiva é revelada pela formação de cor que pode ser avaliada visualmente ou, então, quantificada fotometricamente.

Métodos de ELISA para o HHV-7 usando lisados de células SupT1 infectadas por este vírus e concentrados de partículas virais foram descritas por ABLASHI *et al.* (1998). Método similar utilizando células mononucleares de cordão umbilical infectadas com uma cepa diferente de HHV-7 foi descrito por BLACK *et al.* (1996). No entanto, estão descritos apenas testes “in house” e não há kits para detecção do HHV-7 por ELISA, disponíveis comercialmente, até o momento da elaboração deste trabalho.

#### 1.6.2.3- Western Blot

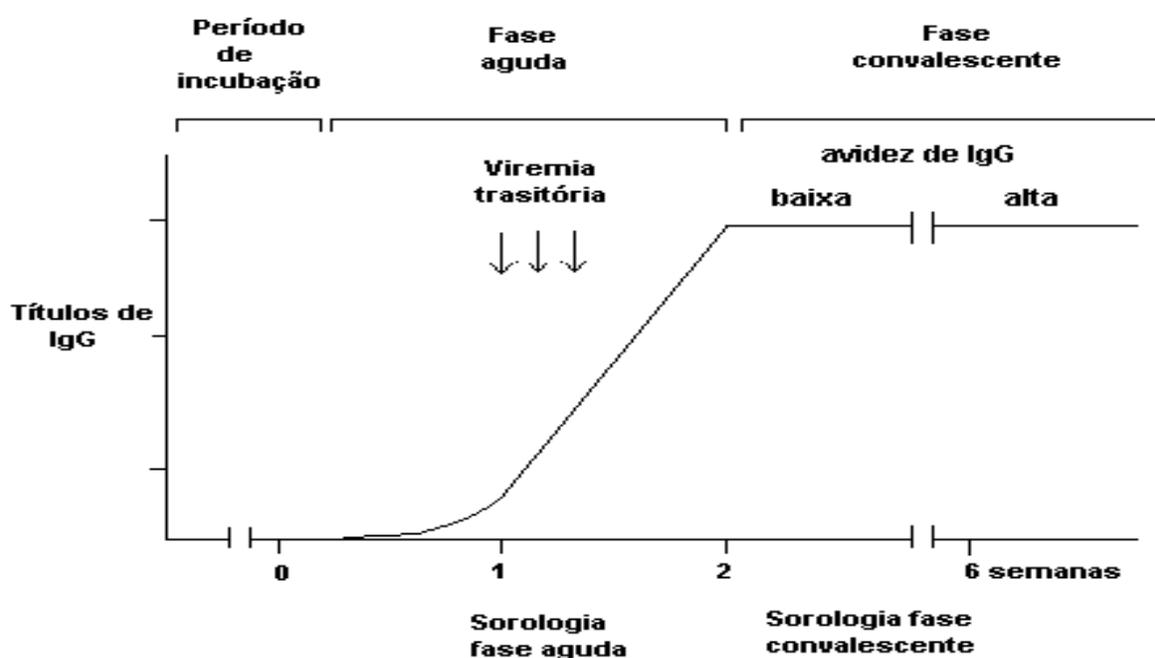
O Western Blot tem sido descrito como ferramenta muito útil para resolver problemas de reatividade sorológica cruzada e, há muito tempo é utilizado para confirmação do diagnóstico laboratorial do HIV. Neste método, proteínas do sobrenadante de cultivo celular do HHV-7 (centrifugado e filtrado) são lisadas e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (duodecil-sulfato de sódio) e transferidas para membranas de nitrocelulose. Este método de eletroforese separa as proteínas de acordo com seus pesos moleculares.

As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas separadas são colocadas em contato com uma diluição de amostra (soro ou plasma) e, após incubação a imunoreatividade é revelada em bandas por anticorpos anti-IgG marcados com fosfatase alcalina através de substratos cromogênicos.

A reatividade com visualização de uma banda protéica de 85 kDa (pp85) no teste de Western Blot é considerada, imunologicamente, específica para o HHV-7 (BLACK *et al.*, 1996).

#### 1.6.2.4- Teste de avides para anticorpos IgG

Os anticorpos de classe IgG quando começam a ser sintetizados possuem baixa avides pelo antígeno, produzindo ligações antígeno-anticorpo fracas e sensíveis à ação da uréia, que é capaz de desfazer essas ligações. Já, anticorpos que estão sendo sintetizados por mais tempo produzem ligações antígeno-anticorpo mais fortes e pouco ou nada sensíveis à ação da uréia. A Figura 5 exhibe a evolução da resposta imune contra o HHV-7 ao longo de uma infecção primária.



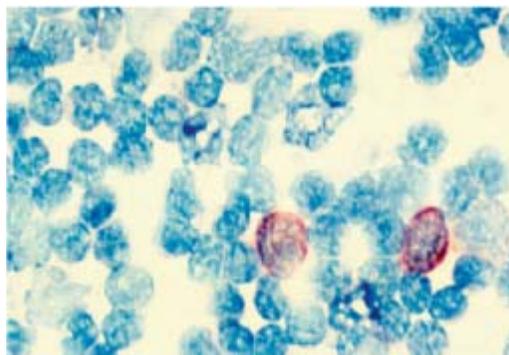
**Figura 5-** Aspectos imunológicos da infecção primária pelo HHV-7 (WARD, 2005).

No teste de avides, uma titulação de anticorpos IgG é realizada e repetida na amostra após o tratamento com um tampão contendo uréia. O decréscimo no título de anticorpos de classe IgG (por imunofluorescência) contra o HHV-7 após o tratamento com uréia de 8 vezes ou mais é considerado de baixa avides e, portanto, infecção recente. Decréscimo de 4 vezes ou menos é considerado de alta avides ou infecção antiga (WARD *et al.*, 2002).

#### 1.6.2.5- Antigenemia

A antigenemia é um método de demonstração de antígenos de determinado patógeno no fluido sangüíneo, sobretudo, em células sangüíneas. O HHV-7 quando utiliza os linfócitos para se replicar induz, obviamente, a produção de proteínas virais e estas, podem ser detectadas através da reação com anticorpos monoclonais. Pode-se utilizar anticorpos contra várias proteínas do vírus, mas é essencial que se use anticorpos contra proteínas específicas do HHV-7 (anticorpos monoclonais).

Um método para determinação da antigenemia (imunocitoquímica) foi descrito por LAUNTENSCHAGER *et al.* (2002) e consiste na separação de células mononucleares de sangue periférico colhido com anticoagulante EDTA através de gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque) e citocentrifugação em lâminas de microscopia. As lâminas são fixadas e recobertas com anticorpos monoclonais de camundongo contra os antígenos precoce e tardio do HHV-7 gp110/160, respectivamente. A reação de imunoperoxidase é realizada usando anticorpos de coelho contra os anticorpos monoclonais de camundongo acima descritos e, um terceiro anticorpo de cabra contra este último formando um “sandwiche”. Estes dois últimos anticorpos estão conjugados a peroxidase (horseradish). A reação é revelada pela adição de amino-etil-cabazol e peróxido de hidrogênio usando hematoxilina de Mayer como contra-corante. As lâminas são observadas em microscópio óptico para verificação e contagem das células que exibirem reação positiva. As células positivas apresentam coloração amarela escura ou marrom em seu citoplasma (Figura 6). A reação positiva é encontrada, usualmente, em linfócitos (LAUNTENSCHAGER *et al.*, 2002, HÄRMÄ *et al.*, 2006).



**Figura 6-** Fotomicrografia ótica de linfócitos positivos para antígenos do HHV-7 (antigenemia) detectados por imunocitoquímica (HÄRMÄ *et al.*, 2006).

#### 1.6.3- Reação em cadeia da polimerase

Com a introdução da amplificação de DNA por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) por SAIKI *et al.* (1985), a detecção de agentes infecciosos tornou-se mais fácil e rápida, sobretudo, no diagnóstico de doenças causadas por vírus, que antes dependia do isolamento em cultura ou métodos sorológicos nem sempre conclusivos.

A amplificação gênica por PCR permite a produção de grandes quantidades de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas. Basicamente, este procedimento permite a amplificação de um fragmento de DNA escolhido, cuja concentração final excede em milhares de vezes a do DNA original presente na amostra (COSTA *et al.*, 1992).

A PCR consiste em repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de dois iniciadores (primers) com orientações opostas, isto é, dois segmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos, com seqüências complementares às duas extremidades do fragmento alvo e, levadas a efeito por reação enzimática mediada por uma polimerase, com atividade em altas temperaturas (Taq DNA Polimerase). Cada ciclo de reação é constituído por três fases:

separação das hélices de DNA a ser amplificado; ligação complementar entre os iniciadores e o DNA e síntese do DNA pela “Taq Polimerase”.

A orientação dos iniciadores faz com que a síntese de DNA ocorra na região interna entre eles. Assim, o produto da extensão de um iniciador é utilizado como substrato para o outro, o que resulta em cada ciclo, na duplicação da quantidade de DNA sintetizada pelo ciclo anterior. O número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial, o que possibilita no final de 30 ciclos um aumento na ordem de  $10^6$  cópias, partindo-se de uma única molécula (SAIKI, 1985; SHIBATA, 1988).

Os fragmentos de DNA (cópias) podem ser analisados por eletroforese em gel de agarose revelados pela adição de brometo de etídio que se intercala entre as bases nitrogenadas que torna as bandas de DNA fluorescentes à luz ultravioleta no gel. A adição de um padrão de peso molecular (Ladder) permite estimarmos o tamanho do fragmento amplificado.

A PCR é um método rápido (4-6 horas), específico e extremamente sensível, porém, devido a sua alta sensibilidade, os principais problemas são os falso-positivos resultantes da contaminação durante a execução do teste. Resultados falso-negativos também podem ocorrer devido à presença de inibidores na amostra (THE *et al.*, 1992). Por estes motivos, cuidados especiais devem ser tomados durante a manipulação das amostras e da reação.

Todo material como ponteiros, tubos devem ser autoclavados antes do uso e descartados após terem sido usados uma vez. Todo material não descartável deve ser esterilizado e cada etapa realizada em ambientes separados e, em fluxo laminar quando possível.

O tipo de amostra e o método de extração de DNA destas amostras devem ser cuidadosamente escolhidos, pois extratos de DNA não bem preparados podem conter proteínas que inibem a PCR.

Os iniciadores escolhidos devem ser analisados quanto à sua especificidade porque estes devem amplificar somente o fragmento do genoma do organismo em questão e nada mais. Cuidados também devem ser tomados para que a região do genoma que será

pesquisada seja, preferencialmente, uma região altamente conservada, que sofra muito pouca ou nenhuma mutação para que não haja reações falso-negativas.

Quando se trabalha com vírus que causam infecção latente, é preciso escolher muito bem o tipo de amostra para análise de acordo com o objetivo da análise. Se a intenção é analisar o DNA do vírus incorporado ao genoma do hospedeiro, ou seja, determinar se há infecção latente, é preciso realizar a PCR usando DNA extraído de tipos celulares que são alvo do vírus. No caso do HHV-7, o tipo de célula é preferencialmente, linfocítica ou proveniente das glândulas salivares (saliva). Mas, se a intenção é avaliar infecção ativa, estes materiais não são adequados por conterem DNA viral incorporado ao DNA celular resultando numa interpretação falso positiva (GRIFFITHS *et al.*, 2000).

O ajuste da concentração de DNA para 30 ng (extraído de leucócitos de sangue periférico) pode ajudar a contornar o problema da detecção de infecção latente (GRIFFITHS *et al.*, 1999). No caso do HHV-7, admite-se que DNA extraído de soro ou plasma como material adequado para detecção de infecção ativa, já que só haveria vírus circulantes detectáveis fora da célula nesta condição (FELDSTEIN *et al.*, 2003; IHIRA *et al.*, 2001). Contudo, vários autores têm sugerido que a PCR quantitativa é a mais adequada para determinação da infecção ativa (YOSHIKAWA *et al.*, 2003; MENDEZ *et al.*, 2001; WARD, 2005).

Algo que aparentemente poderia acontecer é a contaminação do soro ou plasma por DNA leucocitário durante o processo de separação por manipulação inadequada das amostras de sangue. Desta forma, seria prudente que quando se utilizar soro ou plasma proceder à separação destes de forma rápida e com o maior cuidado possível.

#### 1.6.4- Reação em cadeia da polimerase tipo “Nested” (Nested-PCR)

Recentemente, uma variação da PCR chamada “Nested-PCR” (Dupla PCR), propiciou aumento da especificidade e sensibilidade da PCR. Nela o produto da primeira PCR, amplificado com um par de iniciadores, é submetido à nova reação de amplificação

utilizando-se outro par de iniciadores internos ao primeiro, sendo o produto então detectado por eletroforese em gel de agarose (BRYTTING *et al.*, 1991).

Vários métodos de Nested-PCR têm sido descritos na literatura, como o método de Nested-Multiplex-PCR descrito por POZO *et al.* (1999) que detecta outros herpesvírus, concomitantemente, ao HHV-7.

### **1.7- HHV-7 em transplantados hepáticos e sua relação com o HHV-6 e HCMV**

Durante as duas últimas décadas, com técnicas avançadas de cirurgia, melhores protocolos de imunossupressão e melhor acompanhamento do transplantado no pós-operatório têm aumentado o grau de sucesso dos transplantes hepáticos. No entanto, infecções oportunistas tem sido a maior causa de morbidade e mortalidade nestes pacientes.

Há algum tempo já se associa o HCMV e o Herpes Simples com várias complicações de natureza infecciosa após o transplante de fígado. Recentes estudos sugerem que as infecções pelo HHV-7 e pelo HHV-6 podem ser uma importante causa de morbidade nesses pacientes (FELDSTEIN *et al.*, 2003).

A infecção sintomática por HCMV (doença por HCMV) é, sem dúvida, uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes transplantados. O HCMV é considerado o mais importante entre os betaherpesvírus, mas a associação entre as infecções ativas pelos vírus HHV-7, HHV-6 e HCMV tem sido observada em receptores de medula óssea, transplante renal e hepático.

#### **1.7.1- Efeitos diretos**

Os efeitos diretos foram mais, freqüentemente, descritos para o HCMV e HHV-6 que para o HHV-7. Os efeitos diretos causados pelo HCMV vão desde a “Síndrome Viral” que consiste de febre, plaquetopenia, leucopenia e alguns sintomas, até doenças

órgão-invasivas como: hepatite, encefalite, pneumonite intersticial, doença gastrointestinal, retinite, nefrite e, outras.

Para o HHV-6 as manifestações clínicas mais comuns são: encefalite, pneumonite intersticial, hepatite e mielossupressão. As manifestações clínicas de origem neurológicas parecem ser as mais dignas de nota (LJUNGMAN, 2002; FELDSTEIN *et al.*, 2003).

Para o HHV-7, as manifestações são as mesmas que as, anteriormente descritas, para o HHV-6, porém, são ainda menos documentadas e muito menos claras.

#### 1.7.2- Efeitos indiretos

Os efeitos indiretos são aqueles onde a infecção pelo vírus não provocam, diretamente, manifestações clínicas, mas induzem, exacerbam ou contribuem para outras infecções ou processos patológicos no paciente.

Em relação ao HHV-6, foi demonstrado que, ele pode infectar o fígado transplantado causando disfunção do enxerto e alguma associação com rejeição do enxerto tem sido relatada (LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2002).

Especula-se que a infecção primária pelo HHV-7 pode induzir a reativação do HHV-6 após o transplante (IHIRA *et al.*, 2001; MENDEZ *et al.*, 2001; EMERY, 2001). O aumento do risco de desenvolvimento de infecções oportunistas tem sido inferido. Contrastando com os efeitos bem descritos causados pelo HCMV em transplantes, o impacto da infecção pelo HHV-7, é menos conhecido. Estudos em transplantados renais têm associado o HHV-7 e HHV-6 a uma modulação imune proporcionando fatores de risco que predis põem a doença pelo HCMV.

Para o HCMV existem drogas antivirais que quando corretamente administradas reduzem a morbidade provocada por este vírus. Para o HHV-6 e HHV-7, ainda não existem drogas específicas e os estudos sobre a atividade das drogas anti-HCMV nos pacientes são controversos.

Devido à importância da doença por HCMV no período pós-transplante e, às características compartilhadas entre os betaherpesvirus, estudos que ajudem a compreender a inter-relação entre o HCMV, HHV-6 e HHV-7 e a avaliação de possíveis efeitos patogênicos se fazem necessários.

## ***2- OBJETIVOS***

- Padronizar a técnica de Nested-PCR em amostras de sangue periférico e soro para a detecção de infecção ativa pelo Herpesvírus Humano 7 (HHV-7).
- Determinar a prevalência, cinética e a co-infecção pelos vírus HCMV, HHV-6 e HHV-7 em pacientes transplantados hepáticos do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas-Unicamp.
- Avaliar o impacto clínico da infecção ativa pelo HHV-7, HHV-6 e HCMV.

### *3- CASUÍSTICA E MÉTODOS*

### **3.1- Casuística**

#### 3.1.1- Grupo controle

O grupo controle foi composto por 53 voluntários, 30 do sexo feminino e 23 do sexo masculino, com idade mediana de 22 anos (intervalo: 18-42), clinicamente saudáveis, que foram devidamente esclarecidos e que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Dos 53 voluntários, coletou-se 1 amostra de sangue, 4 ml foi colocado em tubo seco e 4 ml em tubo com EDTA para realização da Nested-PCR em DNA extraído a partir do soro e dos leucócitos, respectivamente. De 8 voluntários foi coletada também amostras de saliva para Nested-PCR e isolamento do vírus para obtenção de controle positivo, cujos produtos da Nested-PCR foram submetidos ao sequenciamento de bases para comprovação da identidade da banda com o genoma viral do HHV-7.

#### 3.1.2- Pacientes transplantados

Vinte e nove pacientes adultos, com idade mediana de 47 anos (intervalo: 18-66), submetidos a transplante hepático na Unidade de Transplante Hepático do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – São Paulo – Brasil, entre os anos de 2000 a 2004, foram incluídos neste estudo. A imunossupressão básica consistiu de ciclosporina (0,4 mg/kg/dia), metilprednisona (1,0 g no primeiro mês, 20 mg a partir do 30º dia, diminuindo 5 mg/mês até o 90º dia), azatioprina (100mg/dia). Micofenolato de Mofetil-MMF (100 mg/dia) e Tracolimus-FK-506 (0,1 mg/kg/dia) foram administrados para alguns pacientes baseado no estudo de cada caso.

Aciclovir (200 mg 12/12 horas; por dois meses) foi usado como profilaxia antiviral para o herpes simples. Os pacientes não fizeram profilaxia para o HCMV, a não ser que o doador fosse soro-positivo e o receptor soro-negativo. Pacientes com doença por HCMV, com sintomas clínicos, receberam ganciclovir, por via Intravenosa, na dose de 5 mg/kg 2 vezes ao dia por 6 semanas, seguido por dose de manutenção. As características dos pacientes relatando a idade, sexo, e doença de base estão resumidas na Tabela 2.

O protocolo foi seguido de acordo com os requerimentos para pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil e, foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado pelo paciente ou por seu responsável após todas as dúvidas terem sido esclarecidas e, somente então, foram incluídos neste estudo.

Sangue periférico foi obtido dos pacientes no dia do transplante, semanalmente no primeiro mês e uma vez por mês até o final do estudo (180 dias). Leucócitos de sangue periférico foram separados para Nested-PCR para HHV-6 e HCMV conforme metodologia já padronizada no laboratório. Amostras de soro foram separadas para a realização da Nested-PCR para o HHV-7. A evolução clínica dos pacientes e a informação sobre “status sorológico” dos doadores e receptores foram baseadas nos dados coletados a partir dos prontuários médicos dos pacientes e de dados obtidos junto à equipe médica da Unidade de Fígado e Transplante Hepático.

**Tabela 2-** Características gerais dos pacientes estudados, incluindo idade, sexo, e doença de base que motivou o transplante.

<b>Característica</b>	<b>N= 29</b>
Idade Mediana (anos)	47 (18 – 66)
Sexo (Masculino/Feminino)	20/9
<b>Sorologia para HCMV</b>	
D+/R+	100%
<b>Doença de Base</b>	
Hepatite C	15
Alcoolismo	3
Hepatite B	2
Hepatite C e Álcool	2
Cirrose Hepática	2
Hepatite B e Álcool	1
Cirrose Biliar Primária	1
Hepatite Autoimune	1
Colangite Esclerosante	1
Hemocromatose e Álcool	1

D+/R+ : Doador e Receptor soro-positivos para HCMV.

### 3.1.3- Definição de infecção ativa para o HCMV, HHV-6 e HHV-7

- Infecção ativa pelo vírus HCMV foi considerada quando ocorreu reação positiva por Nested-PCR consecutiva em duas ou mais amostras de DNA extraídas de granulócitos de sangue periférico, critérios propostos por LJUNGMAN (2002) e EINSELE *et al.* (1995). Este critério visa desconsiderar viremias transitórias, clinicamente, insignificantes.
- Infecção ativa para o HHV-6 foi definida baseada na positividade da Nested-PCR em DNA extraído de leucócitos totais.
- Infecção ativa para o HHV-7 foi definida quando pelo menos uma amostra de soro resultou positiva pela Nested-PCR (FELDSTEIN *et al.*, 2003; IHIRA *et al.*, 2001).
- Co-infecção foi definida quando dois ou mais vírus foram detectados na mesma amostra.
- Infecção primária e reinfecção foram avaliadas apenas para o HCMV devido ao fato de sorologia para HHV-6 e HHV-7 não terem sido realizadas.

### 3.1.4- Definição de infecção sintomática e assintomática por HCMV

Para caracterização de provável doença por HCMV, além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas anteriormente, fez-se necessário a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo HCMV (LJUNGMAN, GRIFFITHS e PAYA, 2002). Essas manifestações são apresentadas abaixo.

- Febre maior ou igual a 38°C, por três dias, no mínimo acompanhada por leucopenia ( $\leq 3.000/\text{mm}^3$ ) e plaquetopenia ( $\leq 100.000/\text{mm}^3$ ) afastadas outras causas;
- Pneumonite: com sintomatologia respiratória e achados radiológicos, junto com HCMV, detectado em lavado brônquico-alveolar ou biópsia de pulmão;

- Doença gastrointestinal: com sintomatologia compatível com colite, gastrite ou esofagite, associada com histologia ou imunohistoquímica positiva para HCMV de biópsias de lesões macroscópicas do trato gastrointestinal;
- Hepatite ou colangite: o vírus deve ser demonstrado em biópsias hepáticas, em combinação com o aumento de duas vezes o valor normal de alanina-amino-transferase (ALT) e achados histopatológicos consistentes com hepatite e colangite;
- Doença neurológica: sintomatologia compatível com quadro de encefalite, mielite ou doença difusa no sistema nervoso central, juntamente com detecção do HCMV por PCR em líquido cefalorraquidiano, por cultura ou detecção do antígeno;
- Retinite: com lesões oftálmicas típicas com ou sem provas virológicas;
- Nefrite: “nefrite por HCMV” pode ser definida pela detecção da infecção pelo HCMV sempre com a identificação histológica em biópsia de rim obtida do paciente com disfunção renal;
- Miocardite: sempre com identificação histológica convencional em biópsia de coração obtida de pacientes com miocardite.
- “Síndrome viral por HCMV” foi definida baseada em febre inexplicada ( $>37,5^{\circ}\text{C}$ ) por no mínimo 3 dias, em combinação com pelo menos uma das seguintes manifestações: artralgia, leucopenia ( $\leq 3.000/\text{mm}^3$ ), plaquetopenia ( $\leq 100.000/\text{mm}^3$ ), elevação de enzimas hepáticas ( $\text{ALT} > 50 \text{ U/l}$ ) (Aquino et al., 2001).

Infecção assintomática por HCMV foi definida quando infecção ativa ocorreu na ausência de sinais, sintomas ou alterações laboratoriais descritas anteriormente.

### 3.1.5- Definição de disfunção e rejeição do enxerto

A avaliação da função hepática foi baseada na elevação sérica da alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamil transpeptidase e das bilirrubinas.

Episódios de rejeição do enxerto foram documentados baseados em análises histopatológicas de material obtido por biópsia hepática. O esquema de Banffs (HEPATOLOGY, 1997) foi utilizado para classificação e determinação do grau de rejeição.

### 3.1.6- Critérios clínicos avaliados para o HHV-7 e HHV-6

As manifestações clínicas mais comuns para o HHV-6 são a encefalite, pneumonite intersticial, disfunção do enxerto, plaquetopenia, leucopenia e febre (FELDSTEIN *et al.*, 2003).

Para o HHV-7 não há ainda consenso em relação às manifestações clínicas, mas, sintomas como febre, encefalite, pneumonite intersticial, hepatites, disfunção e rejeição do enxerto e alterações laboratoriais como leucopenia ( $\leq 3.000/\text{mm}^3$ ) e plaquetopenia ( $\leq 100.000/\text{mm}^3$ ) foram considerados.

Foram também avaliadas as infecções oportunistas e, estas foram definidas como àquelas que não ocorreram logo após a cirurgia ( $>7$  dias).

Os episódios clínicos acima relatados foram comparados e analisados com a presença de infecção ativa para cada um dos vírus. Efeitos indiretos como aumento no risco de infecção ativa pelo HCMV ou evolução para infecção sintomática (Doença por HCMV) foram também avaliados.

## 3.2- Métodos

Em um primeiro momento foi realizado o isolamento do vírus HHV-7 em cultura celular através da inoculação de saliva de voluntários sadios para a produção de controle positivo para a Nested-PCR. As culturas que exibiram efeito citopático sugestivo para HHV-7 foram submetidas à caracterização imunológica através de uma técnica imunocitoquímica para antígenos do HHV-7. Nested-PCR para HHV-7 foi realizada em DNA extraído do sobrenadante, das células de cultura e diretamente das amostras de saliva.

Os produtos das Nested-PCRs foram sequenciados e comparados ao Genbank Database e, somente então, as culturas foram consideradas positivas e o DNA delas extraído foi usado como controle.

Em uma segunda etapa, amostras de DNA extraídas de leucócitos periféricos e soro foram analisadas por Nested-PCR em um grupo controle considerado sadio para estabelecer a frequência do genoma do HHV-7 nas amostras desses indivíduos.

Em uma terceira etapa foram realizadas Nested-PCRs para HHV-7 em amostras de DNA extraídas de soro dos indivíduos transplantados. Nested-PCRs para HHV-6 e HCMV foram realizadas em DNA extraído de leucócitos totais (HHV-6) e de granulócitos de sangue periférico (HCMV) destes pacientes.

Todas as amostras de DNA genômico (leucócitos e cultivo celular) foram submetidos a PCR para beta-globina segundo a metodologia descrita por SAIKI *et al.* (1988) para detectar eventuais substâncias inibidoras à reação. As amostras cuja PCR foram negativas para beta-globina foram excluídas deste estudo.

Finalmente, os resultados foram comparados a dados coletados dos prontuários médicos dos pacientes. A análise estatística foi realizada através de estatística descritiva e pela comparação das variáveis categóricas usando o Teste do Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher e, das variáveis contínuas, os métodos Mann-Whitney e Wilcoxon Rank Test. P-valor <0,05 foi considerado, estatisticamente, significativo.

### 3.2.1- Isolamento do HHV-7 por cultura celular

Amostras de sangue de cordão umbilical foram gentilmente cedidos pela Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de ARARAS-SP. Essas amostras foram coletadas (após o consentimento da paciente e da equipe médica) em condições assépticas e introduzidas em tubos heparinizados Vacuttainer® através da tampa de borracha e homegenizados gentilmente.

O sangue foi transferido para tubos estéreis contendo Ficoll-Hypaque (densidade 1,077) na proporção sangue-Ficoll Hypaque 1:2 e centrifugados a 2.000 RPM por 30 minutos. A camada de células mononucleares (situada no sobrenadante) foi removida com pipeta Pasteur estéril e transferida para outro tubo contendo PBS (solução salina fosfatada tamponada) gelada e centrifugada por 10 minutos a 2000 RPM. Ao precipitado foi adicionado mais PBS gelada e centrifugado mais uma vez. O sobrenadante foi removido restando cerca de 0,5 mL de PBS.

Foi realizada a contagem de células e avaliada sua viabilidade em câmara de Neubauer com solução de Azul de Tripán a 1%. A concentração de células foi ajustada para que a concentração final na cultura fosse de  $1 \times 10^6$  células/mL de meio de cultura. O concentrado assim preparado foi inoculado em frascos de meio RPMI-1640, 5 ml por frasco, suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado e 2,5  $\mu\text{g/mL}$  de fitohemaglutinina P. Os frascos foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 72 horas em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . As células cultivadas foram testadas por Nested-PCR para HHV-7 (descrita adiante) antes de serem inoculadas para evitar que células que já contivessem o vírus fossem utilizadas para o isolamento.

Os frascos foram inoculados com 50  $\mu\text{L}$  de saliva de doadores saudáveis após terem sido filtradas em filtros altamente retentores de 0,45  $\mu\text{m}$  estéreis - Millipore®. A cada bateria de cultura, um frasco não foi inoculado e usado como controle negativo. As culturas foram avaliadas duas vezes por semana até 21 dias por microscopia óptica em aumento de 100X para verificação do efeito citopático.

As culturas que mostraram efeitos citopáticos descritos como pleomorfismo, aumento do tamanho celular de cerca de 3 vezes (efeito “Balloon-like”) e formação de sincício, foram consideradas suspeitas de positividade para o HHV-7. Culturas que não exibiram estas características foram consideradas negativas.

As culturas consideradas suspeitas para HHV-7 baseadas nos critérios acima expostos foram submetidas à Nested-PCR para HHV-7 e para uma técnica imunocitoquímica para caracterização e confirmação das culturas.

Para a caracterização imunológica, as células cultivadas foram lavadas com PBS por centrifugação a 2.000 RPM por 3 vezes e com o sedimento, confeccionados esfregaços que foram, posteriormente, secos ao ar.

As lâminas foram, então, fixadas com mistura metanol-acetona (1:1) gelada e lavadas por 3 vezes com PBS, recobertas com anticorpos monoclonais de camundongo–Mab-KR-4 (Advanced Biotechnologies Inc., Maryland -EUA) diluído 1:10 em PBS contendo 1% de BSA (albumina sérica bovina) e incubadas em câmara úmida a 37°C por 1 hora.

Após este período de incubação as lâminas foram lavadas por 3 vezes com PBS, recobertas com anticorpo de coelho Anti-IgG de camundongo-Z0456 (Dako, Copenhagen, Dinamarca) diluído 1:50 em PBS contendo 1% de BSA e incubadas em câmara úmida por 1 hora. Após este período, as lâminas foram novamente lavadas por 3 vezes em PBS e recobertas com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase-81-6120 (Zymed, São Francisco, Califórnia, EUA) diluído 1:200 em PBS contendo 1% de BSA e incubadas novamente em câmara úmida por 1 hora.

As lâminas foram novamente lavadas com PBS por 3 vezes e recobertas com solução de AEC recém preparada (20 mg de amino-etil-carbazol, 5 ml de dimetilformamida, 100 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,9 e 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e incubadas no escuro, em câmara úmida, à temperatura ambiente por 30 minutos.

Finalmente, as lâminas foram lavadas com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,9 por 3 vezes, com água destilada por mais 3 vezes e montadas com glicerina tamponada e lamínula. As que exibiram células com coloração marrom vistas ao microscópio ótico comum foram consideradas positivas para antígenos do HHV-7.

### 3.2.2- Extração de DNA de leucócitos totais de sangue periférico

As amostras de sangue colhidas em anticoagulante EDTA (2 ml) foram centrifugadas a 2.500 RPM por 10 minutos e o plasma separado e desprezado.

Ao sedimento foi adicionada uma solução lisante (constituída de cloreto de amônio -NH<sub>4</sub>Cl a 0,444 M - 9 partes e de bicarbonato de amônio -NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a 0,01 M – 1parte) 5 vezes o volume de células. O hemolisado foi centrifugado a 3.000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi centrifugado mais duas vezes, uma com nova solução lisante e outra com PBS. O precipitado obtido por este método contém cerca de 2x10<sup>6</sup> células.

O precipitado de leucócitos foi lisado em solução de TKM1 (tris-HCl 10mM (pH 7,6); KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 10mM e EDTA 20mM), centrifugado por 10 minutos a 2.500 rpm, por duas vezes consecutivas, quando foram adicionadas 3 gotas de Nonidet P-40 na primeira lavagem.

O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 8 ml de solução de TKM2 (Tris-HCl 10mM (pH 7,6); NaCl 0,4M; MgCl<sub>2</sub> 10mM; KCl 10 mM; EDTA 2 mM e 0,025 de SDS a 20%). Em seguida o material foi incubado por 40 minutos a uma temperatura de 56°C. Após a incubação, foi adicionado 0,3 mL de NaCl 5M, centrifugado, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi transferido para outro tubo.

Depois da transferência da fase aquosa para outro tubo, foi realizado a precipitação do ácido nucleico pela adição de acetato de sódio 3 M pH 5,3 (10% do volume) e etanol absoluto gelado (3 vezes o volume). O DNA foi solubilizado em 50 µl de tampão TEB (Tris-EDTA-Borato) estéril e deixado em banho-maria à 37°C por 8 horas. O DNA assim obtido foi mantido congelado à -20°C até o momento da análise.

### 3.2.3- Extração de DNA de granulócitos de sangue periférico

As amostras de sangue colhidas em anticoagulante EDTA foram transferidas para tubos plásticos cônicos (tipo Falcon) e adicionado dextran a 6% em PBS (4 partes de sangue e uma de solução de dextran). Os tubos foram homogeneizados gentilmente por inversão e colocados em estante com inclinação de 45 graus por 30 minutos em estufa a 37°C.

O sobrenadante, rico em granulócitos, foi transferido para outro e as hemácias remanescentes foram lisadas com solução de cloreto de amônio gelado- pH 7,4 e, os granulócitos lavados com PBS por 3 vezes à 1.200 RPM por 10 minutos, cada lavagem. O precipitado obtido por este método contém cerca de  $2 \times 10^6$  células.

O precipitado de leucócitos foi lisado em solução de TKM1 e os próximos passos seguiram o mesmo protocolo descrito na extração de DNA de leucócitos totais de sangue periférico (ver tópico anterior).

#### 3.2.4- Extração de DNA de soro, saliva e cultura celular

O material biológico (200  $\mu$ l) foi incubado em tubos tipo “Eppendorf” por 2 horas a 56°C com 100  $\mu$ l de tampão contendo proteinase K (tampão Tris-HCl pH 8,3 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, SDS 10%, Proteinase K 10 mg/mL).

Foi adicionado 200  $\mu$ l de mistura fenol-clorofórmio (na proporção de 1:1), homogeneizado por 15 segundos em agitador mecânico e, posteriormente, centrifugado a 15.000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada à 10°C .

O sobrenadante foi removido para outro tubo. Este último processo foi repetido por mais duas vezes. Ao sobrenadante, foi adicionado 25 $\mu$ l de Acetato de Sódio 3M gelado e 900  $\mu$ l de etanol absoluto. O tubo foi agitado bem e incubado em banho de gelo por 10 minutos.

O tubo foi centrifugado a 15.000 rpm por 10 minutos, descartado o sobrenadante e o precipitado foi seco com os tubos invertidos protegidos da exposição à luz e de contaminantes por 8 horas. O precipitado foi ressuspenso em 25  $\mu$ l de tampão TEB. O DNA assim obtido foi mantido congelado à -20°C até o momento da análise.

#### 3.2.5- Nested-PCR para HHV-7

As condições da reação seguiram a metodologia clássica da Reação em Cadeia da Polimerase. A Nested-PCR para o HHV-7 seguiu o método descrito por POZO *et al.* (1999) para HHV-7, com algumas modificações (originalmente, um Multiplex-PCR).

O DNA extraído como descrito anteriormente foi processado na quantidade de 5 µL com 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmol de cada iniciador (Tabela 2), e 1,25 U de Taq DNA Polimerase num total de 50 µL, usando água deionizada estéril q.s.p.

A PCR foi realizada em Termociclador - MJ Research -MA, com uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 53°C e 30 segundos a 72°C e, extensão final de 72°C por 5 minutos.

Uma segunda PCR foi realizada usando 1 µL do primeiro PCR e 49 µL de uma mistura consistindo de 60 mM Tris-HCl (pH 8.5), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmol de cada iniciador (Tabela 2) e, 1,25 U de Taq DNA Polimerase . As condições da reação seguiram as mesmas da PCR anterior, exceto que a temperatura de anelamento foi de 47°C.

### 3.2.6- Nested-PCR para HHV-6 (A/B)

As condições da reação seguiram a metodologia clássica da Reação em Cadeia da Polimerase. A Nested-PCR seguiu o método descrito por SECCHIERO *et al.* (1999) para HHV-6, com algumas modificações. Este método foi padronizado de modo que não detectasse infecção latente pelo ajuste da quantidade de amostra processada.

O DNA extraído de leucócitos totais como descrito anteriormente foi processado na quantidade de 2 µL com 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 pmol de cada iniciador (Tabela 2), e 1 U de Taq DNA Polimerase num total de 25 µL, usando água deionizada estéril q.s.p.

A PCR foi realizada em Termociclador - MJ Research -MA, com uma desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C e 1 minuto a 72°C e, extensão final de 72°C por 10 minutos.

Uma segunda PCR foi realizada usando 1  $\mu\text{L}$  do primeiro PCR com 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 400  $\mu\text{M}$  de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 pmol de cada iniciador (Tabela 2), e 1 U de Taq DNA Polimerase num total de 25  $\mu\text{L}$ , usando água deionizada estéril q.s.p. A condições de reação da segunda PCR foram: desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C e 1 minuto a 72°C e, extensão final de 72°C por 10 minutos.

### 3.2.7- Nested-PCR para HCMV

As condições da reação seguiram a metodologia clássica da Reação em Cadeia da Polimerase. A Nested-PCR seguiu o método descrito por DEMMLER *et al.*(1988) para HCMV, com algumas modificações. Este método foi padronizado de modo que não detectasse infecção latente pelo ajuste da quantidade de amostra processada e uso de DNA extraído de granulócitos em vez de leucócitos totais.

O DNA extraído de granulócitos como descrito anteriormente foi processado na quantidade de 0,8  $\mu\text{L}$  com 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500  $\mu\text{M}$  de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 pmol de cada iniciador (Tabela 2), e 0,5 U de Taq DNA Polimerase num total de 20  $\mu\text{L}$ , usando água deionizada estéril q.s.p. A PCR foi realizada em Termociclador - MJ Research -MA, com uma desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C e, extensão final de 72°C por 10 minutos.

Uma segunda PCR foi realizada usando 0,6  $\mu\text{L}$  do produto da primeira amplificação com 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500  $\mu\text{M}$  de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2 pmol de cada iniciador (Tabela 2), e 1 U de Taq DNA Polimerase num total de 25  $\mu\text{L}$ , usando água deionizada estéril q.s.p. A condições da Segunda PCR foram: desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C e, extensão final de 72°C por 10 minutos.

**Tabela 3-** Sequência de bases dos Iniciadores (primers) utilizados para a detecção do HHV-7, HHV-6 e HCMV e seus respectivos códigos de acesso ao *Genbank Database*.

Indicadores	Seqüência de Bases
HHV-7 1+	5' GAG GTG ATT TAT GGT GAT ACT GA 3'
HHV-7 1-	5' AAC TTT CCA ATG TAA CGT TTC TT 3'
HHV-7 2+	5' GTT ACT TTC AAA AAT GTT TGT CCC 3'
HHV-7 2-	5' GGA AAT AGG ATC TTT TCA AAT TC 3'
Cod. Acesso: U43400	
<i>Complete virion genome</i>	
HHV-6 (A/B) 1+ EX-1	5' GCG TTT TCA GTC TGT AGT TCG GCA G 3'
HHV-6 (A/B) 1- EX-2	5' TGG CCG CAT TCG TAC AGA TAC GGA GG 3'
HHV-6 (A/B) 1+ IN-3	5' GCT AGA ACG TAT TTG CTG CAG AAC G 3'
HHV-6 (A/B) 1+ IN-4	5' ATC CGA AAC AAC TGT CTG ACT GGC A 3'
Cod. Acesso: X83413	
<i>Complete virion genome</i>	
HCMV 1+ MIE-4	5' CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C 3'
HCMV 1- MIE-5	5' CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTG G 3'
HCMV 2+ IE-1	5' CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC 3'
HCMV 2- IE-2	5' CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC 3'
Cod. Acesso: HS5MIE4	
<i>Major immediate early gene (MIE)</i>	

### 3.2.8- Visualização do produto da Nested-PCR

A visualização das bandas foi realizada após a aplicação de 10 µl do produto da segunda PCR de cada vírus em gel de Agarose a 2% em tampão TEB (TRIS-EDTA-BORATO), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e, submetida à eletroforese em imersão em tampão TEB por 15 minutos à 100 Volts. Após a corrida eletroforética, os géis foram visualizados à luz ultravioleta para a comprovação das bandas usando um padrão de peso molecular (DNA-Ladder, Gibco-BRL). Os tamanhos das bandas separadas do HHV-7, HHV-6 (A/B) e HCMV são de 122, 258 e 159 pares de bases, respectivamente.

## ***4- RESULTADOS***

#### **4.1- Grupo controle e padronização da Nested-PCR**

Dos 8 frascos de cultivo celular que foram inoculados com saliva obtida de doadores sadios para a obtenção de controle positivo, 7 (87,5%) apresentaram efeito citopático de pleomorfismo, aumento de tamanho celular e formação de sincício sugestivos de HHV-7. A Figura 7 exibe os efeitos citopáticos nas culturas celulares inoculadas com amostras de saliva. Cerca de 10 a 15% das células cultivadas exibiram os efeitos citopáticos anteriormente descritos.

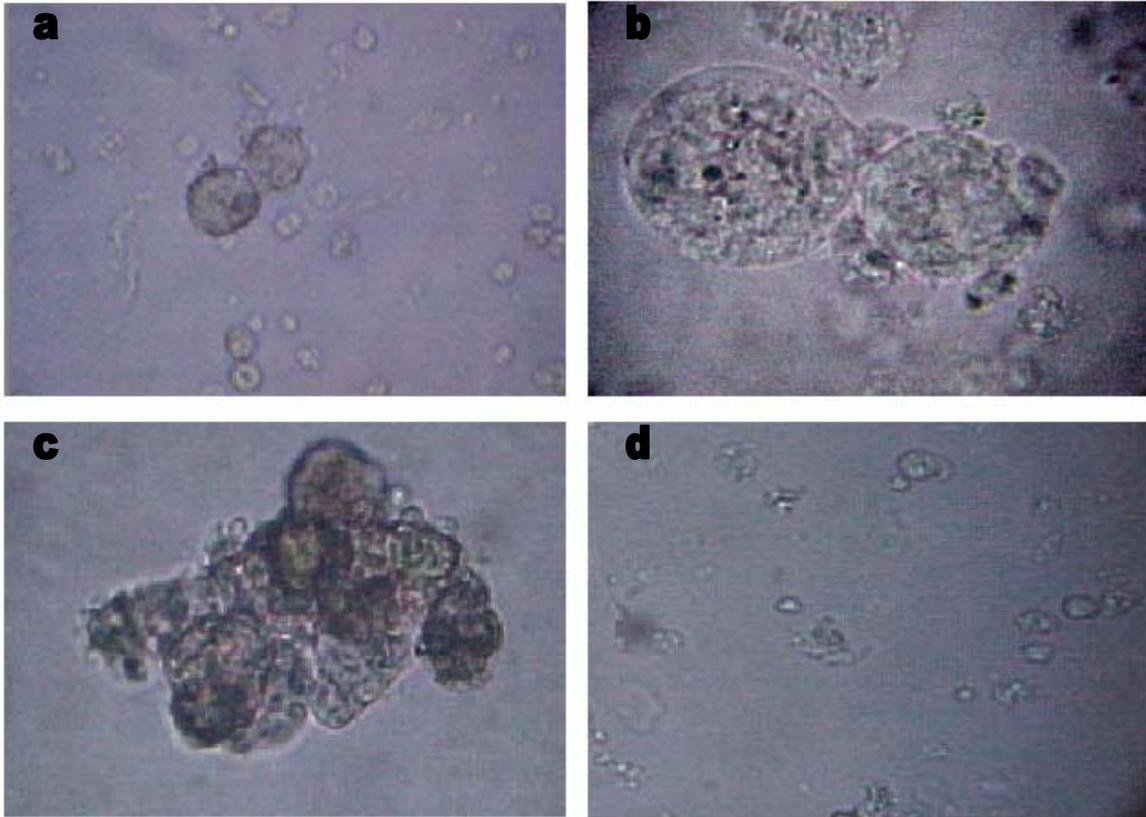
Todas as culturas, tanto as positivas como as negativas, foram submetidas à imunocitoquímica e somente as culturas que exibiram efeito citopático foram positivas para antígenos do HHV-7.

A Figura 8 exibe fotomicrografias óticas de reações positivas e negativas por imunocitoquímica para antígenos do HHV-7 de células de cultura infectadas e, não infectadas por este vírus, respectivamente.

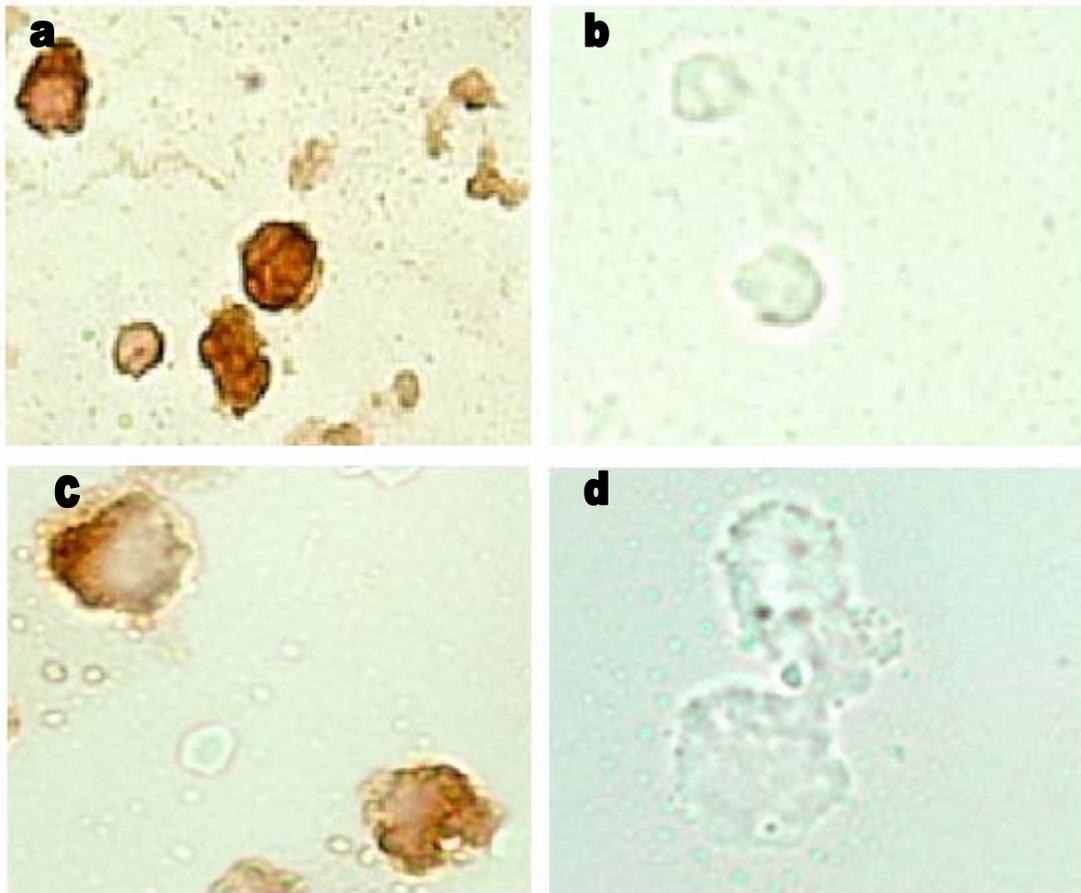
Todas as amostras de DNA extraídas de cultivo celular e diretamente das amostras de saliva foram submetidas à Nested-PCR para HHV-7 resultando em bandas de 122 pares de bases (Figura 9). Todas as 7 amostras de saliva que apresentaram efeito citopático à cultura resultaram positivas pela Nested-PCR para DNA extraído a partir da cultura celular e, também, para DNA extraído diretamente da saliva.

Os produtos das Nested-PCRs foram submetidos ao sequenciamento de bases e analisados com o software Chromas® e comparados ao Genbank Database e, resultaram em compatibilidade, estatisticamente, significativa para HHV-7 (Figura 10). O DNA extraído das culturas positivas foi usado como controle positivo para a Nested-PCR.

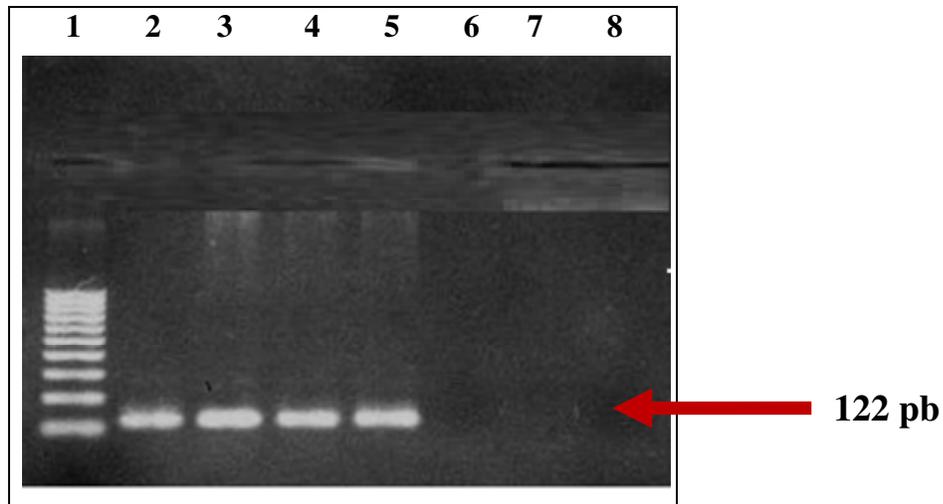
A Nested-PCR em DNA extraído de leucócitos periféricos foi positiva em 15/53 (28,3%) voluntários. Destes indivíduos, 7 (46,6%) eram homens e 8 (53,3%) eram mulheres, diferença não significativa. A idade também não influenciou nos resultados. Nenhuma amostra foi positiva em DNA extraído do soro.



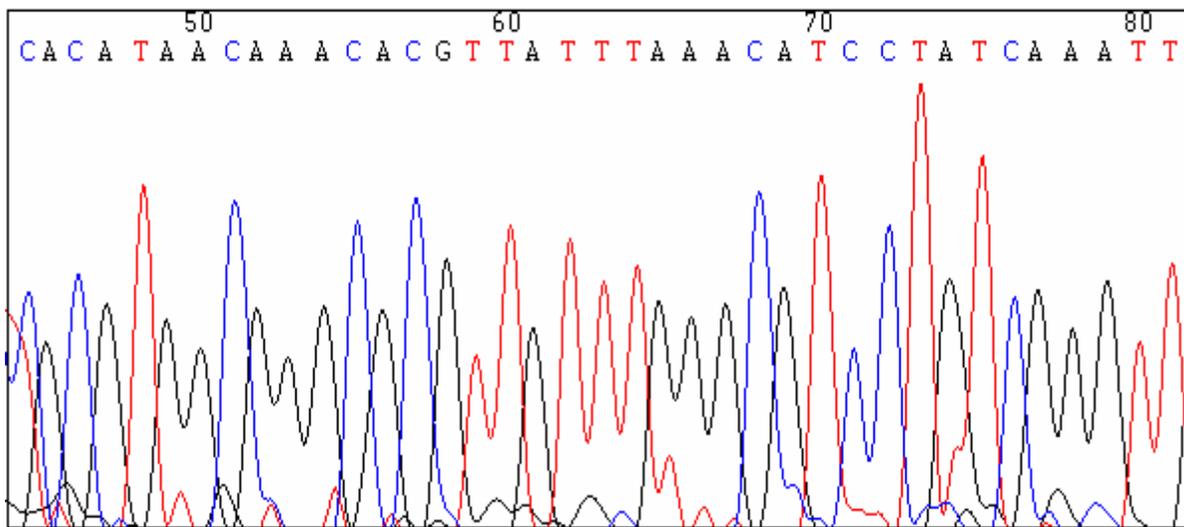
**Figura 7-** Fotomicrografias ópticas de cultivo celular após procedimento para isolamento do HHV-7 exibindo efeito citopático em isolamentos positivos e sem alterações morfológicas em isolamentos negativos. Em (a) e (b) – aumento do tamanho celular, em (c) – formação de sincício e, em (d) – células cultivadas sem alterações morfológicas (400x).



**Figura 8-** Fotomicrografias óticas de lâminas preparadas a partir de cultivos celulares infectados por HHV-7 após reação de imunocitoquímica. Em (a) e (b) - células exibindo reação positiva e negativa com coloração marrom e transparente, respectivamente (aumento de 100X). Em (c) e (d) – mesmas preparações sob aumento de 1.000X.



**Figura 9-** Gel de agarose visto à luz ultravioleta exibindo fragmentos de amplificação obtidos por Nested-PCR para HHV-7. A figura 9 mostra nas colunas: 1 – Padrão de peso molecular (Ladder), 2,3,4 e 5 amostras positivas para HHV-7 (122 pb) e, em 6,7,8 amostras negativas para HHV-7.



DEFINITION Human herpesvirus-7 (HHV7) J1, complete virion genome.  
 ACCESSION U43400

**Figura 10-** Representação gráfica do sequenciamento dos fragmentos obtidos pela amplificação por Nested-PCR do genoma do HHV-7 isolado em cultura de uma das amostras de saliva positiva para HHV-7.

## 4.2- Pacientes transplantados

Um total de 191 amostras, média de  $7 \pm 2$  amostras por indivíduo, foram obtidas dos 29 pacientes durante o período de monitorização. Dois óbitos e três retransplantes ocorreram antes de 180 dias pós-transplante. Um óbito ocorreu devido à falência do enxerto (paciente 1) e outro por choque séptico (paciente 23). Dois retransplantes ocorreram devido à trombose da artéria hepática (pacientes 5 e 14) e outro por falência do enxerto (paciente 23).

Todos os pacientes e doadores foram positivos para anti-HCMV IgG, mas não para IgM antes do transplante (D+/R+), indicando que todos os pacientes tiveram reativação/reinfecção por HCMV no período pós-transplante. As Tabelas 3 e 4 exibem detalhes das detecções dos três vírus e das manifestações clínicas, alterações laboratoriais e outros achados relevantes.

**Tabela 4-** Distribuição geral de pacientes que tiveram ao menos um episódio de infecção sintomática por HCMV de acordo com o tipo de doença por HCMV, presença de disfunção e rejeição do enxerto, outros achados clínico-laboratoriais e resultados positivos da Nested-PCR para HCMV, HHV-6 e HHV-7.

Paciente Nº	Nested-PCR			Tipo de doença por HCMV	Disfunção do enxerto	Rejeição do enxerto	Outros achados clínico-Laboratoriais #
	HCMV	HHV-6	HHV-7				
4	92,98	—	0,153	GI (90)*	—	—	—
5 ‡(15)	16,25,63,93,164,168	143	—	H (70)*	+	—	Ascite Infeciosa (45)
8	17,38,62,122	—	—	H (21)*	+	—	—
11	26, <u>49</u>	<u>49</u> ,147	0	H (26)*	+	85	—
14 ‡(4)	33,56	<u>126</u>	0,161	SV (33)*	+	—	—
16	<u>59</u> ,125,143,181	—	<u>59</u>	SV (59,143)*	+	104	—
17	55,59,69	—	24	SV (59)*	+	—	—
23 ‡ (112),†(140)	68,70,112	<u>0,50</u>	<u>50</u>	SV (70)*	—	—	Infecção de Ponta de Catéter (35), Pneumonite (56)
25	99, <u>114</u>	<u>16,114</u>	—	SV (99)*	—	—	Sepse (38), ITU (98)

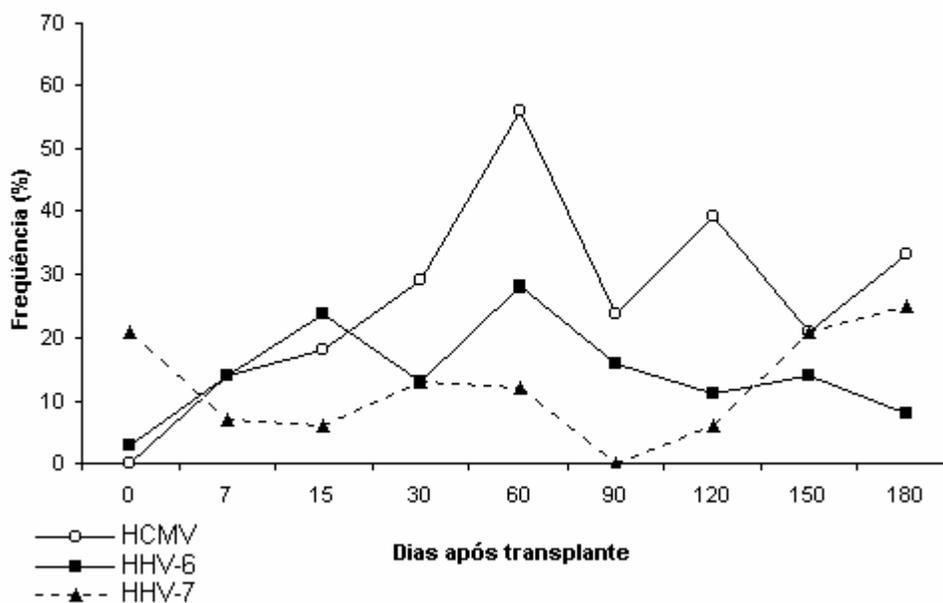
# Achados clínico-laboratoriais não relacionados com infecção por HCMV, DG: Doença gastrintestinal, H: Hepatite, SV: “Síndrome viral”, \* tratados com ganciclovir, ‡ retransplante, † óbito. ITU: Infecção do Trato Urinário. Números indicam dia do evento (dias pós transplante) e os em vermelho sublinhados indicam co-infecção.

**Tabela 5-** Distribuição geral de pacientes sem infecção ou com infecção assintomática por HCMV de acordo com a presença de disfunção e rejeição do enxerto, outros achados clínico-laboratoriais e resultados positivos da Nested-PCR para HCMV, HHV-6 e HHV-7.

Paciente Nº	Nested-PCR			Disfunção do enxerto	Rejeição do enxerto	Outros achados clínico-Laboratoriais #
	HCMV	HHV-6	HHV-7			
1 †(178)	24,127	—	—	+	127	Sarcoma de Kaposi (111)
2	11,18,42,60	—	28,193	—	—	—
3	<u>108</u> ,122	<u>108</u>	0	—	—	—
6	106,131,181	—	—	—	—	—
7	—	—	170	—	—	Peritonite abdominal infecciosa (30)
9	7,16,74,137	—	—	+	—	—
10	<u>46</u> , <u>74</u>	<u>6</u> , <u>12</u> , <u>74</u>	<u>0</u> , <u>6</u> ,137,159	—	—	Pneumonite (7)
12	7,24,57	—	34	—	—	—
13	—	71,106	—	—	—	—
15	<u>62</u> ,75	<u>28</u> , <u>62</u>	14	—	—	—
18	<u>54</u> ,63,110	—	<u>54</u> ,192	—	—	—
19	—	—	—	—	—	—
20	—	6	—	—	—	Pneumonite (15)
21	29,71,92,112	—	—	—	—	—
22	181	—	0	—	—	—
24	—	26,56,89	—	+	87	ITU (74), Encefalite (90), PLT↓, LEUC↓
26	—	65,86	—	+	90	PLT↓, LEUC↓
27	—	—	—	—	—	—
28	—	12,27	—	—	—	Encefalite (24)
29	—	19,180	—	—	—	—

# Achados clínico-laboratoriais não relacionados com infecção por HCMV, PLT↓ plaquetopenia, LEUC↓ leucopenia, † óbito, ITU: Infecção do Trato Urinário. Números indicam o dia do evento (dias pós-transplante) e os sublinhados em vermelho indicam co-infecção.

Infecção ativa pelo HHV-7 ocorreu em 14/29 (48,2%) pacientes; tempo mediano para a primeira detecção foi de 19 dias (intervalo: 0-170). Infecção ativa pelo HHV-6 ocorreu em 13/29 (44,8%) pacientes; tempo mediano para a primeira detecção foi de 28 dias (intervalo: 0-143). Infecção ativa por HCMV foi detectada em 18/29 (62%) pacientes; tempo mediano para a primeira detecção foi de 50 dias (intervalo: 7-181). A cinética da detecção para cada um dos três vírus é mostrada no gráfico 1.



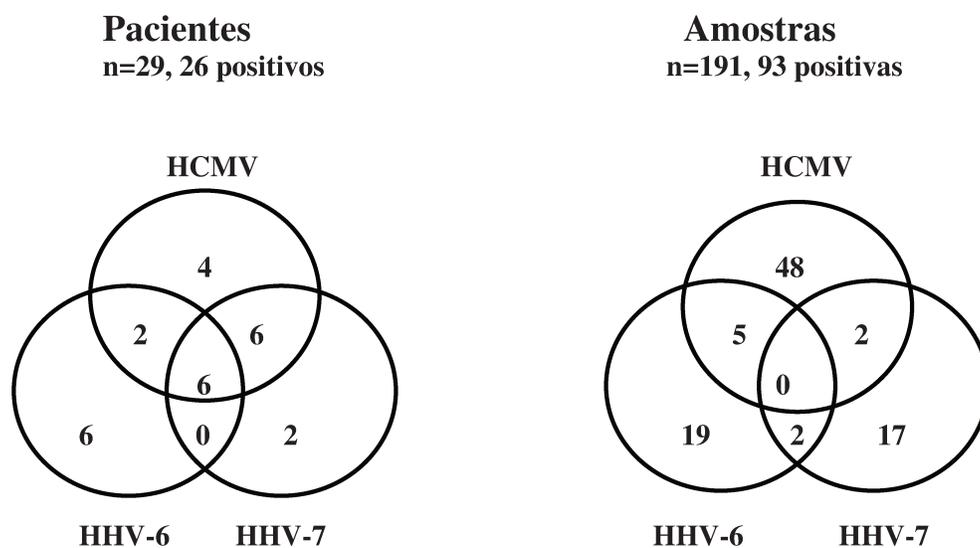
**Gráfico 1-** Cinética da detecção do HHV-6, HHV-7 e HCMV durante o período total de monitorização (% de amostras positivas em cada tempo).

Nove pacientes apresentaram provável doença por HCMV incluindo: “Síndrome viral por HCMV” (n=5), “Hepatite por HCMV” (n=3) e “Doença Gastrointestinal” (n=1). Os sintomas ocorreram em média 7 dias após a primeira detecção de DNA do HCMV. Infecção ativa por HCMV detectada por Nested-PCR foi, estatisticamente, correlacionado a doença por HCMV (p=0,004) e teve valor preditivo positivo (VPP) de 50% e valor preditivo negativo (VPN) de 100%.

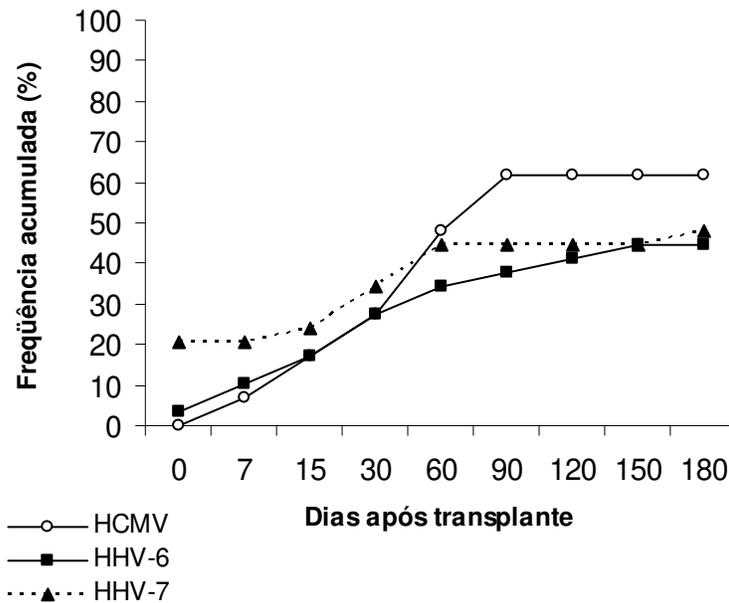
Seis pacientes tiveram infecção ativa pelo HHV-7 já no dia do transplante, contrastando com um caso de HHV-6 e nenhum de HCMV. Os três vírus (HCMV, HHV-6 e HHV-7) foram encontrados em 6/29 (20,7%) pacientes, mas em nenhuma amostra ao mesmo tempo. Co-infecção por HCMV/HHV-6, HCMV/HHV-7 e HHV6/HHV-7 ocorreu em 5 (17,2%), 2 (6,9%) e 2 (6,9%) dos pacientes, respectivamente.

Diagramas ilustrando a positividade da Nested-PCR para cada combinação dos vírus estão mostrados na Figura 11.

Ao longo do período de monitorização, o número de pacientes livres dos três vírus diminui. Próximo aos 60 dias pós-transplante, cerca de 35-45% dos pacientes tiveram pelo menos uma detecção para cada um dos três vírus (Gráfico 2).



**Figura 11-** Diagramas ilustrando o número de pacientes e de amostras que foram positivas para qualquer combinação dos vírus.



**Gráfico 2-** Frequências acumuladas de pacientes que apresentaram resultados positivos para cada vírus durante a monitorização.

A análise estatística mostrou correlação entre a infecção ativa por HHV-7 e infecção ativa por HCMV. Do total de pacientes que tiveram infecção ativa por HCMV (n=18), 11 (61,1%) foram precedidos por infecção ativa por HHV-7 (mediana=33 dias; intervalo=0-181). A frequência de infecção ativa por HHV-6 não influenciou no aparecimento de infecção ativa por HCMV e não foi influenciada pelo HHV-7 (p=0,42). No entanto, o HHV-7 precedeu o HHV-6 em 5 de 6 (83,3%) que tiveram infecção ativa por ambos os vírus.

O HHV-6 foi detectado em pelo menos uma amostra em qualquer tempo em 55,5% dos pacientes com infecção ativa sintomática por HCMV e em 33,3% dos pacientes com infecção assintomática (p=0,47). HHV-7 foi, também, detectado em pelo menos uma amostra em qualquer tempo em 66,6% de infecção ativa sintomática por HCMV e em 66,6% dos pacientes assintomáticos (p=0,17). Co-infecções pelo HHV-6 ou HHV-7, também, não influenciaram no aparecimento de sintomas. A Tabela 6 exhibe as variáveis

estudadas em relação ao risco de desenvolvimento de infecção ativa total e sintomática por HCMV (doença por HCMV). O HHV-6 foi associado ao desenvolvimento de infecção oportunista (Tabela 7).

**Tabela 6-** Distribuição dos casos de infecção ativa por HHV-6, HHV-7 e de co-infecções entre si e com o HCMV com os casos de infecção sintomática, infecção assintomática e sem infecção por HCMV.

n=29	Sem infecção Ativa		Com Infecção Ativa		
	Total	Total	P-valor*	Sintomática	P-valor*
<b>Infecção ativa</b>					
HHV-6	6/11	8/18	0,44	5/9	0,45
HHV-7	2/11	12/18	<b>0,01</b>	6/9	0,17
HHV-6/HHV-7 †	0/11	2/18	0,37	1/9	0,53
HCMV/HHV-6 †	--	5/18	--	2/9	0,25
HCMV/HHV-7 †	--	2/18	--	1/9	0,53

\* Teste exato de Fisher, † co-infecção.

**Tabela 7-** Distribuição dos casos de infecção ativa por HHV-6, HHV-7 e HCMV e de co-infecções entre si com os casos de infecção oportunista.

n=29	Infecção Oportunista		P-valor*
	Presente	Ausente	
<b>Infecção ativa</b>			
HCMV	4/9	14/20	0,18
HCMV sintomático	3/9	6/20	0,59
HHV-6	7/9	7/20	<b>0,04</b>
HHV-7	3/9	11/20	0,24
HHV-6/HHV-7 †	2/9	0/20	0,08
HCMV/HHV-6 †	0/9	3/20	0,31
HCMV/HHV-7 †	0/9	2/20	0,46

\* Teste exato de Fisher, † co-infecção.

O total de infecção ativa por HCMV, HHV-6 e HHV-7 ou suas co-infecções não foram, estatisticamente, associadas à disfunção ou rejeição do enxerto ( $p>0,05$ ). Apenas infecção ativa sintomática por HCMV foi associada à disfunção ( $p=0,002$ ). De 10 pacientes que tiveram disfunção do enxerto, 6 (60%) tiveram infecção ativa sintomática por HCMV. Destes 10 pacientes, 2 (20%) tiveram somente infecção ativa por HHV-6. Embora não tenha sido estatisticamente significativo, dos 5 pacientes que apresentaram episódios de rejeição do enxerto, 2 estavam associados com infecção ativa por HHV-6 isoladamente e foram acompanhados por plaquetopenia e leucopenia durante a rejeição. Um deles teve um episódio de encefalite ao mesmo tempo da rejeição.

Um paciente foi precedido por co-infecção ativa sintomática por HCMV e HHV-6, 36 dias antes da rejeição e, outro por co-infecção ativa sintomática por HCMV e HHV-7, 45 dias antes da rejeição. Todos os pacientes foram acompanhados por disfunção persistente do enxerto até o episódio de rejeição.

Todos os episódios de rejeição foram classificados como leve. Infelizmente, não foi possível realizar a detecção de antígenos virais nas biópsias hepáticas. Nos pacientes que tiveram disfunção e/ou rejeição do enxerto, nenhuma recidiva da doença de base (HCV ou HBV) ocorreu durante a monitorização. A Tabela 8 exibe as variáveis que foram estudadas em relação à disfunção e rejeição do enxerto.

**Tabela 8-** Distribuição dos casos de infecção ativa por HHV-6, HHV-7 e HCMV e de co-infecções entre si com os casos de disfunção e rejeição do enxerto.

n=29	Disfunção do Enxerto			Rejeição do Enxerto		
	Presente	Ausente	P-valor*	Presente	Ausente	P-valor*
<b>Infecção ativa</b>						
HCMV total	7/10	12/19	0,52	2/5	17/24	0,52
HCMV sintomático	6/10	3/19	<b>0,02</b>	2/5	7/24	0,50
HHV-6	5/10	9/19	0,45	3/5	11/24	0,46
HHV-7	4/10	10/9	0,40	2/5	12/24	0,53
HCMV/HHV-6 †	1/10	4/19	0,42	1/5	4/24	0,61
HCMV/HHV-7 †	1/10	1/19	0,57	1/5	1/24	0,32
HHV-6/HHV-7 †	0/10	2/19	0,51	0/5	2/24	0/67

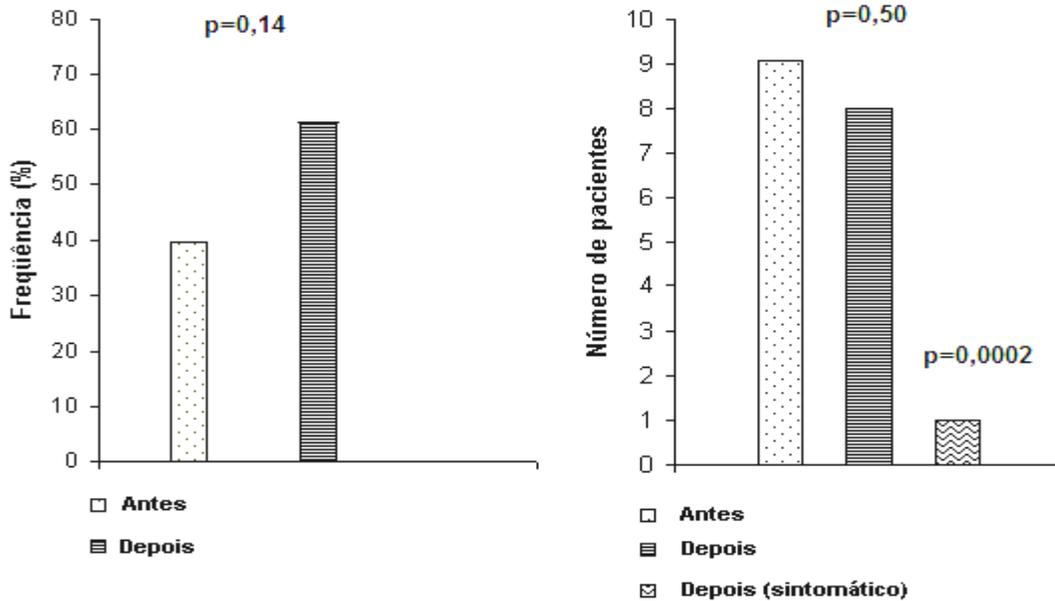
\* Teste exato de Fisher, † co-infecção.

Dois episódios de pneumonite foram relacionadas com co-infecção ativa por HHV-6 e HHV-7. Um caso de pneumonite e dois de encefalites foram também relacionados infecção ativa por HHV-6 isoladamente e, nenhum outro agente infeccioso foi encontrado. Contudo, outros testes para a detecção do HHV-6 e do HHV-7 em amostras de tecido, líquido ou lavado brônquico não foram realizados. Em paciente sem infecção ativa por HCMV e/ou HHV-6 nenhum sintoma ou alteração laboratorial significativa pôde ser relacionada com HHV-7.

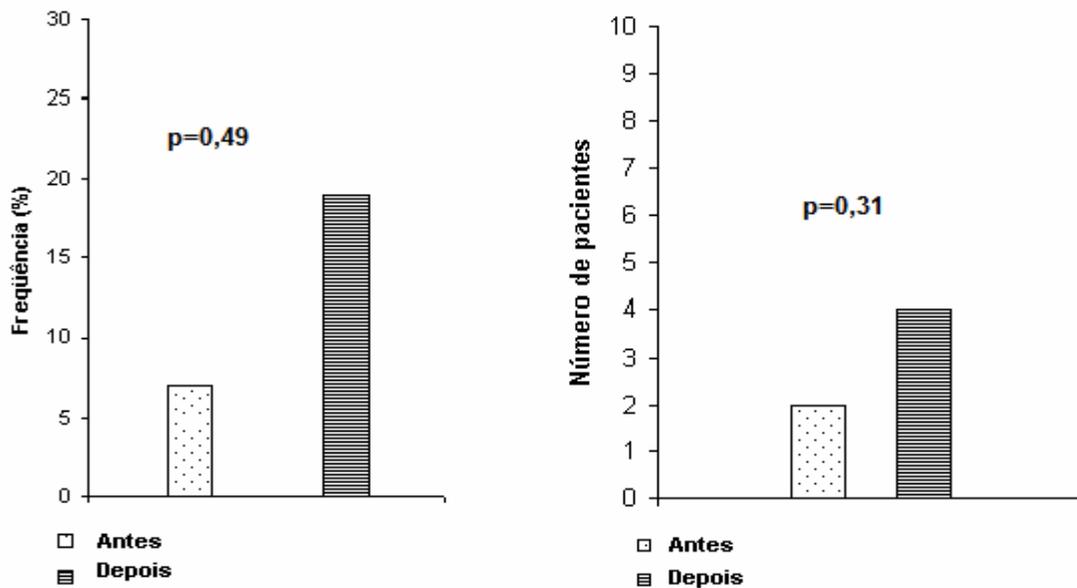
Todos os pacientes que tiveram infecção ativa sintomática por HCMV (n=9) receberam tratamento com ganciclovir. As frequências de amostras positivas e número de pacientes positivos para HCMV antes e depois do tratamento com ganciclovir foram analisados, estatisticamente, através do método de Wilcoxon Rank Test e Teste exato de Fisher, respectivamente. Embora a frequência média de amostras positivas o número de pacientes positivos depois do tratamento com ganciclovir não reduziu comparada à frequência antes do tratamento (Gráfico 3), o número de pacientes que tornaram a ter resultados positivos acompanhados de sintomas foram significativamente menores (Gráfico 4).

As médias das frequências de amostras positivas e os números de pacientes com resultados positivos para HHV-6 (Gráficos 5 e 6) e para HHV-7 (Gráficos 7 e 8) antes e depois do tratamento com ganciclovir não foram, estatisticamente, diferentes.

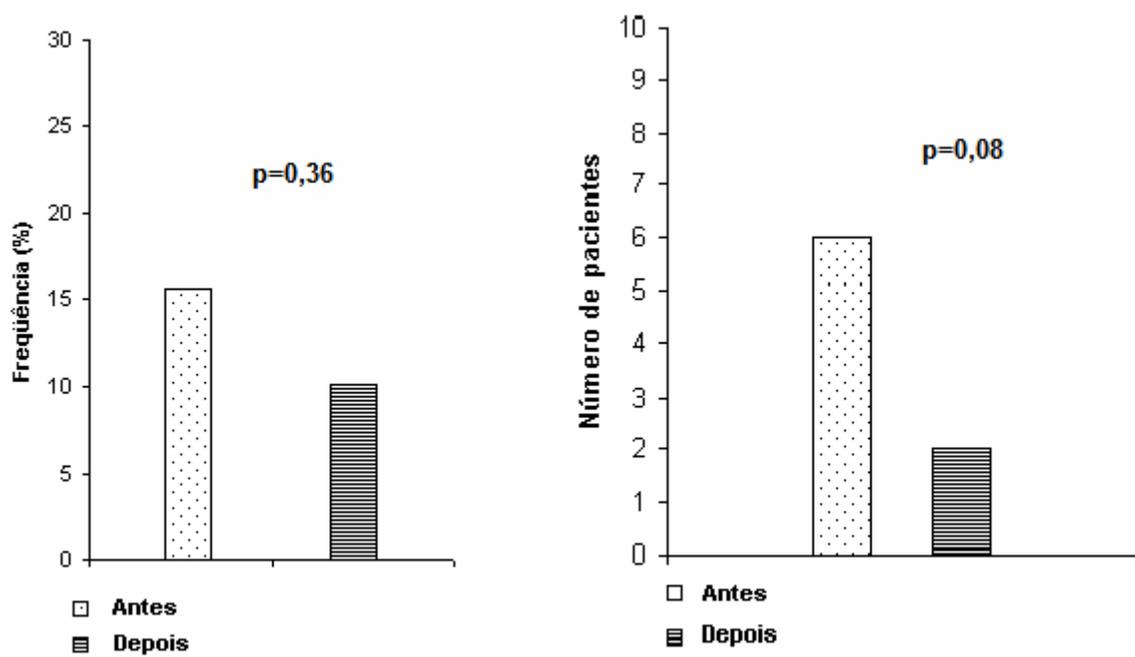
O HHV-7 teve uma tendência a diminuir sua frequência nos primeiros 15 dias (de 21% para 7%), aumentou levemente depois (13%) e, tornou a diminuir chegando à 0% entre 60 e 90 dias. Embora, os fatores que influenciaram nesta diminuição não tenham sido claramente identificados, ela coincidiu com o uso de aciclovir, uma profilaxia para Herpes simples. Com a interrupção do tratamento a frequência do HHV-7 volta a subir (até 25% no 180º dia). A cinética da infecção ativa por HHV-7 pôde ser vista no Gráfico 4.



**Gráficos 3 e 4-** Frequências de detecção do HCMV nas amostras (à esquerda) e o número de pacientes positivos (à direita), antes e depois do tratamento com ganciclovir (n=9).



**Gráficos 5 e 6 -** Frequências de detecção do HHV-6 nas amostras (à esquerda) e o número de pacientes positivos (à direita), antes e depois do tratamento com ganciclovir (n=9).



**Gráficos 7 e 8-** Frequências de detecção do HHV-7 nas amostras (à esquerda) e o número de pacientes positivos (à direita), antes e depois do tratamento com ganciclovir (n=9).

## *5- DISCUSSÃO*

## 5.1- Grupo controle

O isolamento do HHV-7 em amostras de saliva de indivíduos sadios através do método da cultura celular é freqüente (87,5%) e mostrou correlação de 100% com a detecção direta por Nested-PCR nas amostras de saliva analisadas. Os resultados das imonocitoquímicas e dos sequenciamentos dos produtos da Nested-PCR realizados a partir dos cultivos celulares confirmaram a identificação do vírus isolado e, portanto, especificidade dos iniciadores utilizados.

Embora tenha sido suficiente para caracterizar a cultura como positiva, o índice de células que exibiram efeitos citopáticos (10-15%) foi menor que o relatado na literatura (45-60%) (ABLASHI *et al.*, 1998). Isso, provavelmente, se deve ao fato de não ter sido incluído interleucina-2, polibrene e hidrocortisona na fórmula do meio de cultura utilizada para isolamento do vírus. Estas substâncias aumentam a produção de antígenos e, possivelmente, influenciam no percentual de células infectadas na cultura (BLACK *et al.*, 1997). Isso precisa ser considerado se há intenção de se utilizar células infectadas pelo HHV-7 em cultura para testes de imunofluorescência indireta (sorologia) sem a adição das supracitadas substâncias, pois há baixo rendimento.

A freqüência do HHV-7 detectado em leucócitos periféricos de voluntários adultos sadios neste estudo (28,3%) foi mais baixa comparada a dados publicados por outros autores. Em estudos conduzidos por KOZIREVA *et al.* (2001), DNA do HHV-7 foi detectado por PCR em 43,3% de doadores de sangue e CHAPENKO *et al.* (2000) encontraram 63,2% de PCRs positivos em leucócitos periféricos de pacientes aguardando por transplante renal. Contudo, a infecção latente pelo HHV-7 é caracterizada por um baixo número de cópias de DNA viral em leucócitos periféricos (WARD, 2005) o qual poderia ser menor do que a sensibilidade da nossa técnica de PCR que detecta carga viral entre 10 e 100 cópias (POZO *et al.*, 1999). Ainda, na população estudada, indivíduos que tiveram infecção primária, o HHV-7 poderia não ter persistido em seus linfócitos periféricos, hipótese que não pôde ser confirmada até a confecção do presente trabalho.

Estudos de soroprevalência associada com isolamento viral, detecção de DNA do HHV-7 em amostras de saliva (WYATT & FRENKEL, 1992) ou Nested-PCR em linfócitos purificados através de gradientes de densidade (Ficoll-Hypaque) poderiam ser

desenvolvidos para esclarecer esta hipótese, bem como, outros iniciadores precisam ser estudados. Nenhuma diferença na frequência da detecção do HHV-7 foi encontrada entre os indivíduos sadios considerando idade e sexo, provavelmente, devido ao fato de todos os voluntários serem adultos.

Nenhuma amostra de soro foi positiva para HHV-7 por Nested-PCR (amostras livres de células) nos voluntários sadios sugerindo que este método é um marcador útil para detectar infecção ativa para o HHV-7. DNA viral livre não é usualmente encontrado em plasma ou soro de indivíduos com infecção latente (WARD, 2005).

## **5.2- Pacientes transplantados**

A alta frequência de positividade para anti-HCMV IgG observada nos doadores e receptores de fígado concorda com estudo prévio que indicou uma prevalência de 90 a 100% de anticorpos anti-HCMV na população brasileira (SUASSUNA *et al.*, 1995, COSTA *et al.*, 1999).

O HCMV, HHV-6 e HHV-7 foram detectados com frequência em pacientes após transplante hepático (62%, 44,8% e 48,2%, respectivamente). Em pacientes adultos transplantados hepáticos, GRIFFITHS *et al.* (1999) encontraram DNA do HCMV em 47%, DNA do HHV-6 em 32% e DNA do HHV-7 em 48% dos pacientes. IHIRA *et al.* (2001) encontraram DNA do HHV-6 em 38% e DNA do HHV-7 em 40% dos pacientes nas primeiras 8 semanas após transplante hepático. HUMAR *et al.* (2000) encontraram DNA do HCMV em 63,6% e DNA do HHV-6 em 54,5% dos transplantados hepáticos.

A diferença encontrada entre os trabalhos depende da sensibilidade do PCR, tipo de transplante, protocolo de imunossupressão, tamanho da amostragem usada e diferenças entre sujeitos. Contudo, o índice encontrado neste estudo foi relativamente similar a outros já publicados.

Os resultados descritos neste trabalho mostram que poucos pacientes permanecem livres de betaherpesvirus após transplante hepático e indica que muitos pacientes infectados ativamente com mais que um vírus são infectados de forma seqüencial e, não concorrente (GRIFFITHS *et al.*, 1999).

Infecções ativas pelos vírus HHV-7, HHV-6 ou HCMV podem desenvolver-se independentemente umas das outras, mas houve correlação significativa entre infecções ativas por HCMV e HHV-7, sendo o HCMV precedido pelo HHV-7 em 61,1% dos casos.

O HHV-7 precedeu o HHV-6 na maioria dos pacientes que tiveram infecção ativa pelos dois vírus. A ordem de reativação/infecção nos transplantados hepáticos foi HHV-7, seguido pelo HHV-6 e, por último o HCMV.

Este estudo demonstrou que o HHV-7 pode ter reativado infecções latentes por HCMV e HHV-6, já que precede a maioria de ambas as infecções ativas. O HHV-6 foi, também, associado a infecções oportunistas.

Um efeito regulatório inibidor da expressão do epítipo CD4 em linfócitos provocado pelo HHV-7 tem sido descrito (SECCHIERO *et al.*, 1997; SECCHIERO *et al.*, 1998) e um possível efeito imunomodulatório *in vivo* pode existir (efeitos indiretos). Alguns efeitos imunomodulatórios, também, têm sido atribuídos ao HHV-6.

Neste estudo, 6/29 (20,7%) pacientes tiveram positividade para HHV-7 por Nested-PCR já no dia do transplante, mas sem qualquer sintoma. Este método não detectou infecção latente no grupo controle sadio e as amostras de sangue foram colhidas antes das transfusões sangüíneas, imediatamente, antes da cirurgia. Esta positividade já no dia do transplante poderia ser explicada pela reativação causada pela doença de base ou por viremia transitória. Embora algumas “síndromes” relacionadas ao HHV-7 em pacientes “imunocompetentes” tem sido descritas (WARD *et al.*, 2005), estudos no período pré-transplante precisam ser realizados para avaliar estas hipóteses.

Nove de dezoito pacientes (50%) que tiveram DNA do HCMV detectado por Nested-PCR desenvolveram infecção ativa sintomática por HCMV (provável doença por HCMV). Os nove pacientes remanescentes sem sintomas poderiam ser explicados pela alta sensibilidade da Nested-PCR que pode detectar cargas virais baixas (TOKIMATSU *et al.*, 1995), e clinicamente, não significativas (MENDEZ *et al.*, 2001). Contudo, a análise estatística mostrou correlação entre a Nested-PCR para HCMV e

infecção sintomática. Cerca de 50% dos casos de infecção ativa por HCMV detectado por Nested-PCR não evolui para infecção sintomática, mas o valor preditivo negativo é próximo a 100% indicando que ele é um método sensível porém menos específico para doença.

Utilizando PCR em DNA extraído de leucócitos totais periféricos, LJUNGMAN (2002) e EINSELE *et al.* (1995) propuseram que seja considerado infecção ativa por HCMV apenas quando duas ou mais amostras consecutivas fossem positivas. Este critério visa desconsiderar infecções latentes e viremias transitórias devido à alta sensibilidade da PCR. Detecção em mais de uma amostra ao longo do tempo indica viremia persistente e maior risco de desenvolvimento de infecção sintomática.

Neste estudo, foram utilizados, para Nested-PCR para o HCMV, amostras de DNA extraído de granulócitos obtidos a partir de sangue periférico (através sedimentação seletiva com dextran) e não leucócitos totais. Essas amostras são constituídas, principalmente, por neutrófilos e a utilização destas células para testes de antigenemia para HCMV (pp65) já é conhecida no meio científico. Embora a presença de proteínas virais do HCMV (principalmente pp65) sejam indicadores da carga viral elevada, ela não expressa replicação viral completa do HCMV nos neutrófilos (um tipo de replicação abortiva) (GERNA *et al.*, 2000).

A presença de vírus se deve à internalização de partículas virais por fagocitose e por processos de fusão das partículas virais com a membrana celular (ainda não muito bem conhecidos), que dependem do contato das células onde ocorreu a replicação viral, principalmente células endoteliais com os neutrófilos (KAS-DEELEN *et al.*, 2001; GERNA *et al.*, 2000). Isto significa que haverá partículas virais do HCMV em neutrófilos quando houver infecção ativa e indica carga viral mais elevada, explicando a boa correlação da antigenemia com infecção ativa sintomática por HCMV.

DNA extraído de granulócitos para a Nested-PCR para HCMV pode ser mais adequada para diagnóstico do que DNA extraído de leucócitos totais. Nested-PCR positiva em granulócitos, provavelmente, indicou infecção ativa por HCMV contrária a detecção em leucócitos periféricos totais onde, pode-se detectar baixas cargas virais em replicação

transitória em outras células que são sítio de latência do HCMV (ex. monócitos). As preparações de granulócitos obtidas por separação com dextran podem sofrer contaminação com monócitos e, uma potencial detecção de infecção latente em algumas amostras não pode ser descartada. Métodos de separação de monócitos/macrófagos por aderência em placas plásticas foram descritos na literatura (MIYAKE *et al.*, 2006; PERES & CURI, 2005) e poderiam ser empregados para aumentar a pureza das preparações de granulócitos e, portanto, a especificidade da análise por Nested-PCR nestas amostras.

A incidência de infecção ativa sintomática por HCMV (31% do total de pacientes) foi mais alta que a incidência publicada por HUMAR *et al.* (2000) que encontraram infecção ativa sintomática por HCMV em 21,6% dos pacientes. HARMÄ *et al.* (2006) encontrou 30% de infecção ativa sintomática por HCMV durante os 3 primeiros meses após transplante, estando de acordo com este estudo.

A mais alta incidência de infecção ativa sintomática pelo HCMV pode ser devido à alta soroprevalência na população brasileira, não utilização de profilaxia universal ou precoce com ganciclovir e o uso de ciclosporina. HUMAR *et al.* (2000) encontrou um fator de risco independente para desenvolvimento de doença por HCMV quando o perfil sorológico dos doadores e receptores era D+/R+ e todos os pacientes e doadores envolvidos neste estudo eram D+/R+. Isto é conflitante com a maioria dos estudos que sugerem um fator de risco mais alto quando o perfil sorológico é D+/R-. HOPPE *et al.* (2004) sugeriram um maior probabilidade de infecção ativa por HCMV entre pacientes tratados com ciclosporina comparado aos tratados com tacrolimus, mas não sugeriu mecanismos que explicassem este achado.

A maioria dos pacientes que apresentaram disfunção e todos os que apresentaram rejeição do enxerto tiveram infecção ou co-infecção ativa por betaherpesvírus. Embora não houve prova estatística, este estudo sugeriu que infecção ativa sintomática por HCMV pode estar associada com disfunção e rejeição do enxerto. Co-infecção do HCMV com HHV-6 ou HHV-7 e, infecção ativa por HHV-6 isolada está mais associada à rejeição do enxerto que infecção ativa por HCMV, isoladamente.

Alguns casos de pneumonite e encefalite foram também associados com infecção ativa por HHV-6 ou com co-infecção HHV-6/HHV-7, mas não puderam ser confirmados. HÄRMÄ *et al.* (2006) sugeriram uma influência do HHV-6 em disfunção e rejeição com antígenos do HHV-6 detectados em biópsias hepáticas em alguns pacientes. GRIFFITHS *et al.* (1999) encontraram também associação entre disfunção e rejeição do enxerto com HHV-6 e, HHV-7 com disfunção.

Algumas das manifestações, possivelmente, causadas pelo HHV-6 ou por co-infecção HHV-6/HHV-7, poderiam ter relação com infecções primárias por estes vírus, já que a sorologia no período pré-transplante não pôde ser realizada. Embora isto seja pouco provável devido à alta prevalência de ambos os vírus na população em geral, não há, até o momento da confecção deste trabalho, estudos de soroprevalência do HHV-6 e do HHV-7 na região sudeste do Brasil.

HHV-6 poderia ter participação direta no processo de rejeição ou potencial exacerbação da resposta inflamatória característica da rejeição (EMERY, 2001). Pode, também, ter predisposto a infecções oportunistas.

A maioria dos pacientes teve detecção assintomática do HHV-6 provavelmente devido à viremia transitória. Uma potencial detecção de infecção latente nestes indivíduos não pôde ser também descartada. No entanto, apenas um paciente teve DNA do HHV-6 detectado no já no dia do transplante sugerindo que este método não detectou infecção latente.

A alta frequência de infecção assintomática por HHV-6 e HHV-7 por PCR qualitativa torna difícil obter uma conclusão sobre o papel destes vírus com patologias após transplante. Em pacientes sem infecção ativa por HCMV ou HHV-6 nenhum sintoma ou alteração laboratorial significativa pôde ser relacionado ao HHV-7.

Estudos recentes têm sugerido maior correlação entre carga viral e desenvolvimento de sintomas (LJUNGMAN, 2002; MENDEZ *et al.*, 2000). Esta correlação foi mais evidente no caso do HCMV onde, 10 de 11 pacientes que apresentaram carga viral  $\geq 7.000$  cópias evoluíram para infecção sintomática (MENDEZ *et al.*, 2000).

Intermitentemente, em infecções latentes pelos vírus do grupo herpes, o genoma viral pode tornar-se ativo e produzir virions infectantes, uma infecção ativa com viremia transitória e, geralmente, com baixa carga viral. Esta infecção ativa pode ser efetivamente controlada pelo sistema imune do hospedeiro e permanecer de forma sub-clínica (IHMF - Management Strategies Workshop and 4<sup>rd</sup> Annual Meeting, 1997). Por isso, devido a alta sensibilidade da Nested-PCR esta replicação viral pode ser detectada, mesmo em pacientes assintomáticos. Baseado nessas características, à modelo do HCMV, é importante que as técnicas utilizadas para diagnóstico dos betaherpesvirus discriminem, não somente entre infecção latente e ativa, mas também se a viremia presente na infecção ativa é, clinicamente, significativa. Isto pode explicar a baixa correlação entre infecções ativas pelo HHV-6 e HHV-7, detectadas por Nested-PCR qualitativo e aparecimentos de manifestações clínicas observada neste estudo. Talvez, se fosse levado em conta a carga viral do HHV-6 e HHV-7 poderia haver maior correlação com efeitos diretos ou indiretos.

A carga viral pode ser determinada por várias técnicas incluindo “Quantitative Competitive-PCR” e “Real Time- PCR” ou ainda, de forma semi-quantitativa, onde se possa ajustar a quantidade de amostra analisada ou da sensibilidade da PCR para que a mesma, possa detectar apenas cargas virais significativas.

Embora isso possa parecer simples, estudos para determinação do “valor de corte”, clinicamente significativo, precisam ser realizados e este valor pode sofrer variações de laboratório para laboratório. Mesmo após o estabelecimento do valor de corte, é preciso incluir a cada bateria de PCR no mínimo três amostras controles: baixas, intermediárias e altas cargas virais como controle de qualidade interno aos testes para evitar resultados falsos ou tendenciosos.

Estudos considerando HCMV, HHV-6 e HHV-7 com disfunção e rejeição do enxerto poderiam ser desenvolvidos incluindo determinação da carga viral e detecção de antígenos virais em biópsias hepáticas, bem como, avaliação da imunidade celular e reposta imune humoral. IHIRA *et al.* (2003) encontraram uma correlação inversamente proporcional entre os títulos de anticorpos contra o HHV-7 e o número de cópias virais na saliva e, possivelmente, em sangue.

A eficácia da terapia com ganciclovir para o HCMV foi considerada satisfatória, pois houve baixo índice de recorrência sintomática. As frequências de infecções ativas por HHV-6 e HHV-7 antes e depois do tratamento com ganciclovir não foram significativamente diferentes e, não mostraram dados conclusivos para avaliar a eficácia do ganciclovir nestas infecções.

O aciclovir pode ter apresentado uma limitada atividade contra o HHV-7 e, isto já foi sugerido por RAZONABLE *et al.* (2002). Recentemente, DRAGO *et al.* (2006) reportaram um alto índice de sucesso no tratamento de pitíriase rósea com altas doses de aciclovir (800 mg 5X/dia por 1 semana). A etiologia da pitíriase rósea ainda não é clara, mas vários estudos têm implicado à infecção pelo HHV-7 ou HHV-6.

A atividade antiviral do aciclovir para o HHV-7, mesmo que seja baixa, pode reforçar a hipótese de origem viral do pitíriase rósea. Neste caso, hipoteticamente, o aciclovir poderia contribuir para uma diminuição nos efeitos indiretos do HHV-7 se a profilaxia para o Herpes simples nos pacientes transplantados fosse prolongada.

## ***6- CONCLUSÃO***

- Padronizou-se a Nested-PCR para HHV-7 e os iniciadores moleculares utilizados mostraram amplificação somente do genoma do HHV-7.
- A frequência do HHV-7 detectado em leucócitos do sangue periférico de voluntários adultos sadios neste estudo indicou, provavelmente, infecção latente. A Nested-PCR para HHV-7 em DNA extraído de soro detectou somente infecção ativa.
- HCMV, HHV-6 e HHV-7 foram, freqüentemente, detectados nos pacientes após transplante hepático e muitos pacientes infectados ativamente com mais que um vírus foram infectados de forma seqüencial e, não concorrente.
- O HHV-7 precede os vírus HHV-6 e HCMV na maioria dos casos e, possivelmente, induziu a reativação dos mesmos.
- A maioria dos casos de disfunção hepática e rejeição ao transplante estão associadas à presença de infecções ou co-infecções por betaherpesvírus.
- Encefalite e pneumonite foram associadas ao HHV-6 isolado e a co-infecção com o HHV-7. Uma maior atenção deveria ser dada a estes vírus nestes tipos de manifestações clínicas, principalmente, na ausência de outros agentes infecciosos.
- Os efeitos indiretos para ambos HHV-6 e HHV-7 são, provavelmente, os mais significativos. O impacto clínico dos betaherpesvírus pode ser ordenado na seguinte forma: HCMV > HHV-6 > HHV-7.

***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



ABLASHI DV, HANDY M, BERNBAUM J, CHATLYNNE LG, LAPPS W, KRAMARSKY B, BERNEMEM ZN, KOMAROFF AL, WHITMAN JE. Propagation and characterization of human herpesvirus-7 (HHV-7) isolates in a continuous T-lymphoblastoid cell line (SupT1). J Virol Methods. 73(2):123-40, 1998.

ASANO Y, YOSHIKAWA T, SUGA S, KOBAYASHI L, NAKASHIMI T, YAZAKI T, et al. Clinical features of infants with primary human herpesvirus 6 infection (exanthem subitum, roseola infantum) Pediatrics, 93:104-108,1994.

BANFFS SCHEMA FOR GRADING LIVER ALLOGRAFT REJECTION. An International Consensus Document. Hepatology.25(3):658-63, 1997.

BERNEMAN ZN, ABLASHI DV LI, G, EGER-FLETCHER M, REITZ M S, HUNG C L, BRUS I, KOMAROFF A L, GALLO RC. Human Herpesvirus-7 Is a T-Lymphotropic Virus and Is Related to, But Significantly Different from, Human Herpesvirus-6 and Human Cytomegalovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10552-10556, 1992.

BLACK J, BURNS DA, GOLDSMITH CS, FEORINO PM, KITE-POWELL K, SCHINAZI R, KRUG PW, PELLET PE. Biologic properties of human herpesvirus 7 strain SB. Virus Research, 52(1):25-41, 1997.

BLACK JB, PELLETT PE. Human herpesvirus 7. Rev Med Virol. 9:245-262, 1999.

BRYTTING M, SUNDQUIST V, STALHANDSKE P, LINDE A, WAHREN B, Cytomegalovirus detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. J Virol Methods 32: 127-138, 1991

CANADA COMUNICABLE DISEASE REPORT. Expert Working Group on HHV-6 and 7 Laboratory Diagnosis and Testing, 26(S4), 2000

CASERTA MT, HALL CB, SCHNABEL K, LONG CE, D'HERON N. Primary human herpesvirus 7 infection: a comparison of human herpesvirus 7 human herpesvirus 6 infection in children. J Pediatr. 133:386-389, 1998.

CHAPENKO S, FOLKMANE I, TOMSOME V, AMERIKA D, ROSENTALS R, MUROVSKA M- Co-infection of two  $\beta$ -herpesviruses (CMV and HHV-7) as an increased risk factor for "CMV disease" in patients undergoing renal transplantation. Clin. Transp. 14:486, 2000.

CHUH A, CHAN H, ZAWAR V. Ptyriasis rosea-evidence for and against an infectious aetiology. *Epidemiol Infect.* 132:381-390, 2004.

COSTA FF, COSTA SCB. Reação em cadeia da polimerase (PCR): princípios e aplicações clínicas. *Rev Bras Reumatol* 32:142-146, 1992.

COSTA SCB, MIRANDA SRP, ALVES G, et al. Detection of cytomegalovirus infection by PCR in renal transplant patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1999;32:953-959.

DAIBATA M, TAGUCHI T, NEMOTO Y, TAGUCHI H, MIYOSHI I. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood.* 94:1545-1549,1999.

DEMMLER GJ, BUFFONE CJ, SCHIMBOR CM, et al. Detection of cytomegalovirus in urine newbornes by using polymerase chain reaction DNA amplication. *J Infect Dis.* 158:1177-1184, 1988.

DEWHURST S, SKRINCOSKY D, VAN LOON N. Human herpesvirus 7. Expert reviews in molecular medicine. 1:1-12, 1997.

DRAGO F, VECCHIO F, REBORA A. Use of High-Dose Acyclovir in Pityriasis Rosea. *J Amer Acf Dermatol.* 54(1), 2006.

EINSELE H, EHNINGER G, HERBAT H, et al. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood* 86(7):2815-2820, 1995.

EMERY V C Human Herpesvirus 6 and 7 in solid organ transplant recipients. *Clin Infec Dis.* 32:1357-1360, 2001.

FELDSTEIN AE, RR RAZONABLE, TG BOYCE, et al. Prevalence and clinical significance of human herpesvirus 6 and 7 active infection in pediatric liver transplant patients. *Pedriatr Transplantation.* 7: 125-129, 2003.

FERREIRA W, SOUSA J, 2002. *Microbiologia – volume III.* Lidel – edições técnicas, lda; Lisboa, Portugal.

FRANTI M, AUBIN JT, DE SAINT-MAUR G, KOSUGE H, YAMANISHI K, GAUTHERET-DEJEAN A, GARBARG-CHENON A, HURAUX JM, AGUT H. Immune Reactivity of Human Sera to the Glycoprotein B of Human Herpesvirus 7. *J Clin Microbiol.* 51(40):44-51,2002.

FREITAS R, FREITAS MR, OLIVEIRA CS, et al. Human herpesvirus-7 as a cause of exanthematous illnesses in Belém, Pará, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 46(3):139-143, 2004.

FRENKEL N, SCHIRMER EC, WYATT IS, et al. Isolation of a new herpesvirus from human CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)*, 87:748-752, 1990.

GERNA G, PERCIVALLE E, BALDANTI F, SOZZANI S, LANZARINI P, GENINI E, LILLERI D, REVELLO MG. Human cytomegalovirus replicates abortively in polymorphonuclear leukocytes after transfer from infected endothelial cells via transient microfusion events. *J Virol.* 74(12):5629-5638, 2000.

GRIFFITHS PD, CLARK DA, EMERY VC- Betaherpevirus in transplant recipients. *J Antimicrob. Chem.* 45 (3): 29-34, 2000.

HALL CB, CASERTA MT, SCHNABEL KC, LONG C, EPSTEIN LG, INSEL RA, et al. Persistence of human herpesvirus6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clinic Infect Dis.* 26:132-137,1998.

HALL CB, LONG CE, SCHNABEL KC, CASERTA MT, MCINTYRE KM, COSTANZO MA, et al. Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *N Engl J Med.* 331:432-438, 1994.

HÄRMÄ M, HÖCKRSTEDT K, LYYTIKÄINEN et al. HHV-6 and HHV-7 antigenemia related to CMV infection after liver transplantation. *J Med Virol.* 78:800-805, 2006.

HOPPE L, BRESSANE R, LAGO LS, et al. risk factors associated with cytomegalovirus-positive antigenemia in orthotopic liver transplant patients *Transpl. Proc.* 36(4):961-963, 2004.

HUMAR A, KUMAR D, CALIENDO AM, MOUSSA G, ASHI-SULAIMAN A, LEVY G, MAZZULLI T. Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation*, 73:599-604, 2002.

IHIRA M, YOSHIKAWA T, SUZUKI K, et al. Correlation between human herpesvirus 6 and 7 infections after living related liver transplantation. *Microbio. Immunol.* 45(3):225-232, 2001.

IHMF- Management strategies workshop and 4<sup>th</sup> annual meeting. CYTOMEGALOVIRUS AND HUMAN HERPESVIRUS TYPE 6 INFECTIONS IN THE IMMUNOCOMPROMISED (NON-HIV) HOST, 1997.

KAS-DEELEN AM, THE TH, BLOM N, VAN DER STRATE, DE MAAR EF, SMITt J, VAN SON WJ, HARMASEN MC. Uptake of pp65 in in vitro generated pp65-positive polymorphonuclear cells mediated by phagocytosis and cell fusion? *Intervirology*. 44(1):8-13, 2001.

KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM, CHRECKENBERGER PL, WINN JR WC. Diagnóstico microbiológico. Editora médica e científica LTDA. Rio de Janeiro, 2001. Cap 21, p.1225-1226.

KOZIREVA S, NEMCEVA G, DANILANE I, PAVLOVA O, BLOMBERG J, MUROVSKA M. Prevalence of blood-borne viral infections (cytomegalovirus, human herpesvirus-6, human herpesvirus-7, human herpesvirus-8, human T-cell lymphotropic virus I/II, human retrovirus-5) among blood donors in Latvia. *Ann. Hematol.* 80 (11):669-673, 2001.

LAUTENSCHLAGER I, LAPPALAINEN M, LINNAVUORI K, et al. CMV infection is usually associated with concurrent HHV-6 and HHV-7 antigenemia in liver transplant patients. *J Clin Virol.* 25: S57-S61, 2002.

LJUNGMAN P, GRIFFITHS P, C PAYA. Definition of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 34:1094-1097, 2002.

MADIGAN M, MARTINKO J, PARKER J, 2000. Brock – Biology of Microorganisms (9<sup>th</sup> edition). Prentice Hall; New Jersey, USA.

MENDEZ JC, DH DOCKRELL, MJ ESPY, et al. Human  $\beta$ -Herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis.* 183:179-184, 2001.

MIYAKE F, YOSHIKAWA T, SUN H, KAKIMI A, OHASHI M, et al. Latent infection of human herpesvirus 7 in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Med Virol.* 78:112-116, 2006.

MUKAI T, YAMAMOTO T, KONDO K, OKUNO T, KOSUGE H et al. Molecular epidemiological studies of human herpesvirus 6 in families. *J Med Virol.* 42:224-227, 1994.

OLIVEIRA SA, TURNER DJ, KNOWLESW, NASCIMENTO JP, BROWN DW, WARD KN. Primary human herpesvirus-6 and 7 infections, often coinciding, misdiagnosed as measles in children from a tropical region of Brazil. *Epidemiol Infect.* 131:873-879, 2003.

PD GRIFFITHS, AIT-KHALED M, CP BEARCROFT, et al. Human herpesvirus 6 and 7 as potential pathogens after liver transplant: prospective comparison with the effect of cytomegalovirus. *J Med Virol.* 59:496-501, 1999.

PERES CM, CURI R, Como cultivar células. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005. Cap 20, p.114-121.

POZO F, TENORIO A. Detection and typing of lymphotropic herpesvirus by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods.* 79:9-19, 1999.

RAZONABLE RR, FANNING C, BROWN RA, ESPY MJ, RIVERO A, WILSON J et al. Selective reactivation of HHV-6 variant A occurs in critically ill immunocompetent hosts. *J Infect Dis.* 185:110-3, 2002.

RAZONABLE RR, PAYA C. The impact of HHV-6 and 7 infection on the outcome of liver transplantation. *Liver Transplantation,* 8:651-658, 2002.

RAZONABLE RR, RIVERO A, BROWN RA, HART GD, ESPY MJ, VAN CRUIJSEN H, WILSON J et al. Detection of simultaneous  $\beta$ -herpesvirus infections in clinical syndromes due to defined cytomegalovirus infection. *Clin Transpl.* 17:114-120, 2003.

SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLISH HA, ARNHEIN N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230:1350-1354, 1985.

SECCHIERO P, GIBELLINI D, FLAMAND L, et al. Human Herpesvirus 7 induces the down-regulation of CD4 antigen in lymphoid T cells without affecting p56lck levels. *J Immunol.* 159(7):3412-3423, 1997.

SECCHIERO P, ZELLA D, BARABITSKAJA O, REITZ MS, CAPITANI S, GALLO RC, ZAULI G. Progressive and Persistent Downregulation of Surface CXCR4 in CD4<sup>+</sup> T Cells Infected With Human Herpesvirus 7. *Blood,* 92(12): 4521-4528, 1998.

SECCHIERO P, CARRIGAN DR, ASANO Y, BENEDETTI L, CROWLEY RW, KOMAROFF A L et al. Detection of Human Herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by Polymerase Chain Reaction. *J Infect Dis.* 171: 273-80, 1995.

SHIBATA D, MARTIN WJ, APPLEMAN MD, CAUSEY DM, LEEDOM JM, ARNHEIM N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human deficiency virus. *J Infect Dis.* 158: 1185-1192, 1988.

SUASSUNA JH, LEITE LL & VILLELA LH Prevalence of cytomegalovirus infection in different patient groups of an urban university in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1995;28:105-108.

TAKAHASHI Y, YAMADA M, NAKAMURAJ, TSUZAKI T, PADILLA J, KITAMURA T, et al. Transmission of human herpesvirus 7 through multigenerational families in the same household. *Pediatr Infec Dis.* 16:975-978, 1997.

TANAKA K, KONDO T, MUKAI T, MIYOSHI H, YAMAMOTO Y, OKADA S, et al. Seroepidemiological study of human herpesvirus-6 and 7 in children of different ages and detection of these two viruses in throat swabs by polymerase chain reaction. *J Med. Virol* 48:88-94, 1996.

TANAKA K, KONDO T, TORIGOE S, OKADA S, MUKAI T, YAMANISHI K. Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exathem subitum). *J Pediatr.* 125:1-5, 1994.

TANAKA-TAYA K, SASHIARA J, KURAHASHI H, AMO K, MYAGAWA H, KONDO K, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol.* 73:465-473, 2004.

THE TH, VAN DER PLOEG M, VAN DER BERG AP, VLIETGER AM, VAN DER GIESSEN M, VAN SON WJ. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes. A review of antigenemia assay and polimerase chain reaction. *Transplantation,* 54:193-198, 1992.

TOKIMATSU I, TASHIRO T, NASU M Early diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus pnemonia in patients with adult T-cell leukemia by DNA amplication in serum. *Chest* 1995;107: 1024-1027.

TORIGOE S, KOIDE W, YAMADA M, MIYSHIRO E, TANAKA TK, YAMAISHI K. Human herpesvirus 7 infection associated with central nervous system manifestations. *J Pediatr.* 129:301-305, 1996.

- TORIGOE S, KUMAMOTO T, KOIDE W, TAYA K, YAMANISHI K. Clinical manifestation associated with human herpesvirus 7 infection. *Arch Dis Child*. 72:518-519, 1995.
- TYLER KL. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: the continuing conundrum. *J Infect Dis*. 187:1360-1364, 2003.
- VAN DEN BERG JS, VAN ZEIJL JH, ROTTEVEEL JJ, MELCHERS WJ, GABREELS FJ, GALAMA JM. Neuroinvasion by human herpesvirus type 7 in a case of exanthem subitum with severe neurologic manifestations. *Neurology*. 52: 1077-1079, 1999.
- WAGNER E, HEWLETT M, 1999. *Basic Virology*. Blackwell Science, Inc.; USA.
- WARD KN- The natural history and laboratory diagnosis of human herpesvirus-6 and -7 infections in the immunocompetent. *J Clin Virol*. 32:183-193, 2005.
- WARD KN, GRAY JJ. Primary human herpesvirus-6 infection is frequently overlooked as a cause of febrile fits in young children. *J Med Virol*. 42:119-123, 1994.
- WARD KN, TURNER DJ, PARADA X, THIRUCHELVAN AD. Use of immunoglobulin G antibody avidity for differentiation of primary human herpesvirus 6 and 7 infections. *J Clin Microbiol*. 39:959-963, 2001.
- WYATT LS, FRENKEL N. Human herpesvirus 7 is a constitutive inhabitant of adult human saliva. *J Virol*. 66: 3206-3209, 1992.
- WYATT LS, RODRIGUEZ WJ, BALACHADRAN N, FRENKEL N. Human herpesvirus 7: antigenic properties and prevalence in children and adults. *J Virol*. 66:3206-3209, 1992.
- YOSHIKAWA T, SUGA Y, ASANO Y, YAZAKI T, KODAMA H, OZAKI T. Distribution of antibodies to a causative agent of exanthem subitum (human herpesvirus-6) in healthy individuals. *Pediatrics*. 84:675-677, 1989.
- YOSHIKAWA T. Human herpesvirus-6 and 7 infections in transplantation. *Pediatr Transpl*. 7:11-17, 2003.
- ZHANG Y, DE BOLLE L, AQUARO S, VAN LOMMEL A, CLERCQ E, SCHOLS D. Productive infection of primary macrophages with human herpesvirus 7. *J Virol*. 75(21):10511-10514, 2001.