

*DANIELA CORTE PAROLA*

**“HERPESVÍRUS HUMANO 5,6 E 7 (HHV-5, HHV-6 E HHV-7)  
EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE DE  
MEDULA ÓSSEA”**

*CAMPINAS*

*2007*

**DANIELA CORTE PAROLA**

**“HERPESVÍRUS HUMANO 5,6 E 7 (HHV-5, HHV-6 E HHV-7)  
EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE DE  
MEDULA ÓSSEA”**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para a obtenção do título de Mestre em Clínica  
Médica , área de concentração em Ciências Básicas.*

**ORIENTADORA: PROF<sup>A</sup>. DR<sup>A</sup>. 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

P244d Parola, Daniela Corte  
“ Detecção dos herpesvírus humano 5,6 e 7 (HHV-5,HHV-6 e HHV-7) em receptores de transplante de medula óssea” / Daniela Corte Parola. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

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

1. Infecções por citomegalovirus. 2. Humano herpesvirus 6. 3. Humano herpesvirus 7. 4. Transplante de medula óssea. 5. Infecção. I. Costa, Sandra Cecília Botelho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Human herpesvirus (cytomegalovirus, HHV-6 and HHV-7) in bone marrow transplantation patients**

**Keywords:** • Cytomegalovirus infections  
• Human herpesvirus 6  
• Human Herpesvirus 7  
• Bone marrow transplantation

**Titulação: Mestre em Clínica Médica**  
**Área de concentração: Ciências Básicas**

**Banca examinadora:**

**Profa. Dra Sandra Cecília Botelho Costa**  
**Prof. Dr. Fernando Lopes Alberto**  
**Profa. Dra. Maria de Lourdes Rios Barjas Castro**

**Data da defesa: 13 - 08 - 2007**

---

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

---

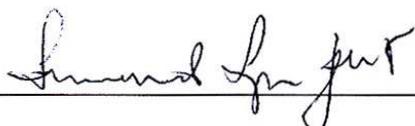
**Orientador(a): *Profa Dra. Sandra Cecília Botelho Costa***

---

---

**Membros:**

---

1. Prof(a). Dr(a) .Fernando Lopes Alberto 
2. Prof(a). Dr(a). Maria de Lourdes Rios Barjas Castro 
3. Prof(a). Dr(a). Sandra Cecília Botelho Costa 

---

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,  
da Faculdade de Clínica Médica da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 13/08/2007**

---

## **DEDICATÓRIA**

*A Deus, por tudo...*

*Aos meus pais, Reinaldo e Margarida, por serem o exemplo de todas as minhas conquistas...*

*Em especial a minha inesquecível mãe, Margarida, que partiu em 12 de agosto de 2006 para o plano espiritual, por me dar força e coragem para viver e continuar lutando a cada dia, instantes, minutos e segundos pelos meus objetivos. Saudades...*

*À minha irmã, Débora, pelo companheirismo, amizade, colaboração, incentivo e principalmente pelo amor de irmã que temos uma pela outra...*

*À minha sobrinha, Lorena, que é minha pérola preciosa, minha força de sobrevivência, minha alegria...*

*A Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa, pela oportunidade de realização do mestrado, pela confiança em meu trabalho; pela amizade, respeito, conselhos e, principalmente, pelo exemplo.*

## **AGRADECIMENTOS**

---

A amiga, bióloga e professora Dra. Sandra Helena Alves Bonon, responsável pelo laboratório onde foi realizado o trabalho, meus sinceros agradecimentos pela ajuda, ensinamentos e experiências adquiridas, obrigada...

Ao amigo Ronaldo Luis Thomasini, pelo companheirismo, e pela ajuda a este trabalho.

À amiga Bruna Maria Roesler, pelo companheirismo, respeito, confiança, ajuda a este trabalho e pela ajuda incondicional em todas as horas que precisei, principalmente no dia que minha mãe partiu para o plano espiritual, obrigada...

Aos amigos do laboratório: Bruna Maria Roessler, Telma Barbosa de Oliveira, Juliana Pasquotto, Cristiane Mudinutti, Carla Aparecida Tavares, Débora Dieamant e Ronaldo Luis Thomasini. Aos novos amigos...

À amiga Ana Maria Sampaio, pela amizade e período de convivência...

À amiga Dioze Guadagninni, pelos conselhos, amizade, companheirismo, pelas viagens de ônibus à UNICAMP durante as madrugadas para alcançar nossos objetivos e pela força no momento da despedida de minha mãe, obrigada...

Ao amigo e motorista da Prefeitura Municipal de Leme, Antônio (Tonhão) pela dedicação durante todos os anos de estudo e principalmente por ser uma pessoa carinhosa com todos os pacientes e pela convivência diária ao longo dos anos, meus sinceros agradecimentos...

A toda equipe da Casa de Oração Santa Aliança (Leme) pelo carinho, incentivo, amor e acreditar em nossas forças espirituais, meus sinceros agradecimentos ao Pai Janjão por ser meu intermediário na comunicação com minha mãe no plano espiritual, obrigada...

À Dona Dora, responsável pela Casa de Oração Santa Aliança (Leme), que me ajudou muito no momento em que mais precisei, obrigada...

À Márcia, que também faz parte da Casa de Oração Santa Aliança (Leme), por me dar conforto e carinho, obrigada...

À querida Rosana (Pê), que nos auxilia em casa, obrigada pelos anos de convivência e principalmente pelo carinho que você tem pela nossa princesinha Lorena. Adoramos você...

À Vilminha, que também nos auxilia em casa há muitos anos, obrigada...

Ao Prof. Dr. Lício Velloso, a secretária da Pós-Graduação Cristiane, meu especial agradecimento.

A todos os meus professores de graduação da Fundação Hermínio Ometto - UNIARARAS e aos de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, que me ensinaram ao longo dos anos.

A todos os pacientes que participaram deste estudo, transplantados, seus doadores e familiares.

*"Existem pessoas que se sentem ofendidas, magoadas por qualquer coisa: as mais leves contrariedades se sentem humilhadas... Ora, nós não viemos a este mundo para nos banhar em águas de rosas... Somos espíritos altamente endividados - dentro de nós o passado ainda fala mais alto... ... Não podemos ser tão suscetíveis assim..."*

*"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar... As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito."*

*"Abençoemos aqueles que se preocupam conosco, que nos amam, que nos atendem as necessidades... Valorizemos o amigo que nos socorre, que se interessa por nós, que nos escreve, que nos telefona para saber como estamos indo... A amizade é uma dádiva de Deus ... Mais tarde, haveremos de sentir falta daqueles que não nos deixam experimentar solidão!"*

*"Devemos aceitar a chegada da chamada morte, assim como o dia aceita a chegada da noite - tendo confiança que, em breve, de novo há de raiar o sol..."*

*"Nenhuma atividade no bem é insignificante... As mais altas árvores são oriundas de minúsculas sementes. A repercussão da prática do bem é inimaginável... Para servir a Deus, ninguém necessita sair do seu próprio lugar ou reivindicar condições diferentes daquelas que possui."*

**Fonte: "O Evangelho de Chico Xavier" de Carlos A. Baccelli**

*Trabalho realizado no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) com a colaboração do Serviço de Transplantes de Medula Óssea do Centro de Hematologia e Hemoterapia (HEMOCENTRO/UNICAMP).*

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xliii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xlvii</i>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	51
<b>1.1- Histórico</b> .....	53
<b>1.2- Classificação</b> .....	55
<b>1.3- Estrutura Viral</b> .....	56
<b>1.4- Fisiopatologia e Patogênese</b> .....	59
<b>1.5- Replicação</b> .....	61
<b>1.6- Epidemiologia e Transmissão</b> .....	66
<b>1.7- Manifestações Clínicas</b> .....	71
<b>1.8- Diagnóstico Laboratorial</b> .....	77
1.8.1- Microscopia Eletrônica.....	77
1.8.2- Isolamento Viral por Cultura Clássica.....	77
1.8.3- Métodos Sorológicos.....	79
1.8.4- Detecção de Antígenos Virais (Antigenemia).....	81
1.8.5- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	84
<b>1.9- Tratamento da Infecção Ativa pelos Herpesvírus 5 (HCMV), 6 (HHV-6) e 7 (HHV-7)</b> .....	87
<b>1.10- Fatores de Risco</b> .....	89
<b>1.11- Histórico dos Transplantes de medula Óssea HEMOCENTRO /UNICAMP</b> .....	92

<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>95</b>
<b>2.1- Objetivos do presente trabalho.....</b>	<b>97</b>
<b>3-CASUÍSTICA e MÉTODOS.....</b>	<b>99</b>
<b>3.1- Casuística.....</b>	<b>101</b>
3.1.1- Característica dos doadores.....	101
3.1.2- Característica dos receptores.....	102
3.1.3- Protocolo de Acompanhamento para a realização das coletas.....	103
3.1.4- Grupo Controle para o estudo molecular do HHV-6.....	104
3.1.5- Grupo Controle para o estudo molecular do HHV-7.....	104
3.1.6- Pacientes Transplantados.....	105
3.1.7- Critério utilizado para definição de Infecção Ativa por HCMV, HHV-6 e HHV-7.....	105
3.1.8- Critérios para caracterizar doença por HCMV.....	106
3.1.9- Critérios para caracterizar provável doença por HHV-6 e HHV-7.....	107
<b>3.2- MÉTODOS.....</b>	<b>108</b>
3.2.1- Extração de DNA de sangue total.....	108
3.2.2- Lise de leucócitos.....	109
3.2.3- Extração de DNA de soro.....	109
<b>3.3- Reação em cadeia da polimerase utilizando primers para detecção                 do gene da betaglobina humana para controle interno da reação..</b>	<b>110</b>
<b>3.4- Detecção do DNA do citomegalovírus humano (HCMV) pela                 reação em cadeia da polimerase.....</b>	<b>111</b>
<b>3.5- Detecção do DNA do Herpesvírus Humano 6 (HHV-6) pela reação                 em cadeia da polimerase.....</b>	<b>114</b>

3.6- Detecção do DNA do Herpesvírus Humano 7 (HHV-7) pela reação em cadeia da polimerase.....	114
3.7- Padronização da Nested-PCR para detecção do HHV-6.....	116
3.8- Padronização da Nested-PCR para detecção do HHV-7.....	117
3.9- Pacientes Transplantados.....	121
3.10- Normas de biossegurança utilizadas para evitar contaminação nas amostras.....	121
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>123</b>
4.1- Total de exames realizados durante a monitorização.....	125
4.2- Incidência da Infecção Ativa por HCMV, HHV-6 (sangue periférico), HHV-6 (soro) e HHV-7 (soro) e da co-infecção entre si em todos os pacientes estudados.....	129
4.3- Incidência da doença pelo HCMV.....	129
4.4- Comparação entre “GVHD” e Infecção Ativa pelo HCMV, HHV-6 e HHV-7.....	131
4.5- Gravidade da Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (GVHD agudo).....	131
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>133</b>
<b>6- CONCLUSÃO.....</b>	<b>139</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>143</b>
<b>8- ANEXOS.....</b>	<b>163</b>
A- Aprovação deste protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética da FCM/UNICAMP.....	165
<b>9- APÊNDICES.....</b>	<b>167</b>
A- Consentimento Pós-Infirmação.....	169
B- Características dos pacientes que apresentaram doença por HCMV.....	170

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b><math>\gamma</math></b>	Gama
<b><math>^{\circ}\text{C}</math></b>	Graus Celsius
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	Micromol
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	Microgramas
<b>5' <math>\rightarrow</math> 3'</b>	Sentido da transcrição
<b>A</b>	Base Nitrogenada Adenina
<b>AA</b>	Anemia Aplástica
<b>AAG</b>	Anemia Aplástica Grave
<b>AIDS ou SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>ALT</b>	Alamina-amino-transferase
<b>C</b>	Base Nitrogenada Citosina
<b>CD4</b>	Determinante de Grupamento-4
<b>Cd8+</b>	Determinante de Grupamento-8
<b>CMV</b>	Citomegalovírus
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono (Gás Carbônico)
<b>CPP</b>	Célula Periférica Progenitora
<b>D-</b>	Doador HCMV - soronegativo
<b>D/R</b>	Doador/Receptor
<b>D+</b>	Doador HCMV - soropositivo

<b>dATP</b>	Desoxirribonucleotídeo Adenina Trifosfato
<b>dCTP</b>	Desoxirribonucleotídeo Citosina Trifosfato
<b>DEAFF</b>	Técnica da Cultura de Centrifugação ou <i>Shell Vial</i> (“ <i>Detection of early antigen fluorescent foci</i> ”)
<b>DECH ou GVHD</b>	Doença do enxerto contra hospedeiro ou graft <i>versus</i> host disease
<b>dGTP</b>	Desoxirribonucleotídeo Guanina Trifosfato
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>dTTP</b>	Desoxirribonucleotídeo Timidina Trifosfato
<b>E</b>	<i>Early</i> (Fase precoce do ciclo de replicação do HCMV)
<b>EA</b>	Antígenos precoces (“Early antigens”)
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético
<b>ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
<b>EX1</b>	Iniciador EX1 (primer)
<b>EX2</b>	Iniciador EX2 (primer)
<b>G</b>	Base Nitrogenada Guanina
<b>g/cm<sup>3</sup></b>	Gramas por centímetro cúbico
<b>gB</b>	Glicoproteína B
<b>gp110</b>	Glicoproteína 110
<b>gp160</b>	Glicoproteína 160
<b>h</b>	horas
<b>HBLV</b>	Vírus Linfotrópico Humano tipo B
<b>Hcl</b>	Ácido Clorídrico
<b>HCMV</b>	Citomegalovírus Humano ou Herpesvírus Humano 5
<b>HEMOCENTRO</b>	Centro de Hematologia e Hemoterapia

<b>HHV-5</b>	Herpesvírus Humano tipo 5 ou Citomegalovírus Humano
<b>HHV-6</b>	Herpesvírus Humano 6
<b>HHV-7</b>	Herpesvírus Humano 7
<b>HPN</b>	Hemoglobinúria Paroxística noturna
<b>IE</b>	<i>Immediately Early</i> (Fase imediatamente precoce do ciclo de replicação do HCMV)
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IgG</b>	Imunoglobulina da classe G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina da classe M
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IN-3</b>	Iniciador IN-3 (primer)
<b>IN-4</b>	Iniciador IN-4 (primer)
<b>IRL/IRS</b>	Seqüências invertidas repetidas do genoma do HCMV (“Inverted Repeats”)
<b>JI</b>	Cepa “JI” do Herpesvírus Humano 7
<b>Kb</b>	Quilobases
<b>KDa</b>	Quilodaltons
<b>Kg</b>	Quilogramas
<b>L</b>	Fase tardia do ciclo de replicação do HCMV
<b>LA</b>	<i>Late antigens</i> (Antígenos Tardios)
<b>LH</b>	Linfoma de Hodgkin
<b>LLA</b>	Leucemia Linfóide Aguda
<b>LMA</b>	Leucemia Mielóide Aguda
<b>LMC</b>	Leucemia Mielóide Crônica

<b>LNH</b>	Linfoma não Hodgkin
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligramas
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>MIE</b>	<i>Major Immediate-Early Antigen</i> (Antígeno Imediatamente precoce principal)
<b>ml</b>	Mililitros
<b>MM</b>	Mieloma Múltiplo
<b>mM</b>	MiliMolar
<b>mm<sup>3</sup></b>	Milímetro cúbico
<b>MO</b>	Medula Óssea
<b>n</b>	Número de Indivíduos (estatístico)
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>Nested-PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase tipo “nested” ou PCR dupla
<b>P ou p</b>	Valor Alfa (estatístico)
<b>PBS</b>	Solução Salina Fosfatada Tamponada
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase
<b>pH</b>	Logaritmo da recíproca da concentração de íons Hidrogênio presentes em uma dada solução
<b>pp65</b>	Proteína matricial de peso molecular 65 Kd do HCMV
<b>pp85</b>	Fosfoproteína-85
<b>R-</b>	Receptor HCMV – soronegativo
<b>R+</b>	Receptor HCMV - soropositivo

<b>RK</b>	Cepa “RK” do Herpesvírus Humano 7
<b>RNAm</b>	Ácido ribonucléico mensageiro ou ARN mensageiro
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>RPMI-1640</b>	Meio de Cultura Celular – RPMI-1640
<b>SDS</b>	Duodecil Sulfato de Sódio
<b>SG</b>	Sarcoma Granulocítico
<b>SST</b>	Solução Salina com Fosfatos
<b>STMO</b>	Serviço de Transplantes de Medula Óssea
<b>SupT1</b>	Linhagem Celular Contínua Linfoblásticoide T
<b>T</b>	Base Nitrogenada Timina
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i> (polimerase)
<b>TCPH</b>	Transplante de Células Progenitoras Hematopoéticas
<b>TGI</b>	Trato Gastrointestinal
<b>TGO</b>	Transaminase glutâmico-oxalacética
<b>TGP</b>	Transaminase glutâmico-pirúvica
<b>TKM1/TKM2</b>	Tampões de lise celular
<b>TMO</b>	Transplante de Medula Óssea
<b>TRIS</b>	Tris-Hidroximetilaminometano
<b>TRL/TRS</b>	Seqüências de terminações repetidas do genoma do HCMV (“Terminal Repeats”)
<b>U/mL</b>	Unidade por mililitro
<b>UL</b>	Seqüência única longa (“Unique Long”) do genoma do HCMV
<b>US</b>	Seqüência única curta (“Unique Short”) do genoma do HCMV

		<b>PÁG.</b>
<b>Tabela 1-</b>	Protocolo de Tratamento Precoce de Infecção Ativa pelo HCMV e doença guiada pela positividade dos testes de monitorização.....	89
<b>Tabela 2-</b>	Risco de doença por HCMV após TCPH alogênico em relação ao <i>status</i> sorológico doador/receptor.....	90
<b>Tabela 3-</b>	Gradação e estado clínico da <i>GVHD aguda</i> .....	91
<b>Tabela 4-</b>	Fatores de risco (primários/secundários) pós transplante para doença por HCMV.....	92
<b>Tabela 5-</b>	Características gerais dos pacientes estudados, incluindo idade, sexo, sorologia, doença de base que motivou o transplante e tipo de enxerto.....	102
<b>Tabela 6-</b>	Esquema de coletas das amostras de sangue e soro dos pacientes incluídos no estudo.....	103
<b>Tabela 7-</b>	Manifestações Clínicas possivelmente associadas à infecção por HHV-6 e HHV-7 em receptores de transplante. Efeitos diretos e efeitos indiretos.....	108
<b>Tabela 8-</b>	Demonstra-se em seguida a seqüência de primers utilizados, que flanqueiam uma região conservada do gene da betaglobina humana.....	111
<b>Tabela 9-</b>	Demonstra-se em seguida a seqüência dos primers externos e internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HCMV, utilizados na PCR e na nested PCR.....	112
<b>Tabela 10-</b>	Demonstra-se em seguida a Seqüência dos primers externos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HHV-6, utilizados na PCR e na nested PCR.....	114

<b>Tabela 11-</b>	Demonstra-se em seguida a seqüência dos primers externos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HHV-7, utilizados na PCR e na nested PCR.....	115
<b>Tabela 12-</b>	Total de exames realizados nos pacientes monitorizados.....	125
<b>Tabela 13-</b>	Resultados da Nested-PCR para HCMV, HHV-6 e HHV-7 em pacientes que não apresentaram doença por HCMV.....	126
<b>Tabela 14-</b>	Resultados da Nested-PCR para HCMV, HHV-6 e HHV-7 em pacientes que apresentaram doença por HCMV.....	128
<b>Tabela 15-</b>	Distribuição dos casos de infecção ativa por HCMV, HHV-6 (sangue periférico), HHV-6 (soro) e HHV-7 (soro) e de co-infecções entre si em todos os pacientes estudados.....	129
<b>Tabela 16-</b>	Distribuição dos casos de infecção ativa por HCMV, HHV-6 (sangue periférico), HHV-6 (soro) e HHV-7 (soro) e de co-infecções entre si em todos os pacientes que apresentaram doença por HCMV no Trato Gastrointestinal comprovados por biópsia.....	130
<b>Tabela 17-</b>	Distribuição dos casos de infecção ativa por HCMV, HHV-6 e HHV-7 e de co-infecções entre si com os casos de infecção oportunista.....	130
<b>Tabela 18-</b>	Casos de GVHD com infecção ativa por HCMV, HHV-6 e HHV-7 nos pacientes estudados.....	131

	<i>PÁG.</i>
<b>Figura 1-</b> Estrutura dos Herpesvírus Humanos.....	57
<b>Figura 2-</b> Organização do genoma do Citomegalovírus Humano.....	58
<b>Figura 3-</b> Genoma do HHV-6 e HHV-7.....	59
<b>Figura 4-</b> Mecanismo de infecção do HCMV nas células do hospedeiro.....	63
<b>Figura 5-</b> Ciclo infeccioso do HHV-6.....	65
<b>Figura 6-</b> Efeitos citopáticos provocados pelo HHV-7 em cultura de células SupT1 (Ablashi et al., 1998).....	79
<b>Figura 7-</b> Reação em Cadeia da polimerase.....	85
<b>Figura 8-</b> Eletroforese em gel agarose 2% corado com brometo de etídeo, demonstrando a amplificação de um fragmento de 258pb do DNA do HHV-6 com os primers IN-3 e IN-4 (produto da “N-PCR”) em pacientes transplantados de medula óssea.....	117
<b>Figura 9-</b> 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.....	118
<b>Figura 10-</b> Fotomicrografias óticas de lâminas preparadas a partir de cultivos celulares infectados por HHV-7 após reação de imunocitoquímica.....	119
<b>Figura 11-</b> Gel de agarose visto à luz ultravioleta exibindo fragmentos de amplificação obtidos por Nested-PCR para HHV-7.....	119
<b>Figura 12-</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.....	120

	<i>PÁG.</i>
<b>Gráfico 1-</b> Percentual de indivíduos que apresentaram resultados positivos para HHV-7 por Nested-PCR no grupo controle (leucócitos de sangue periférico).....	120

***RESUMO***

O membro protótipo da subfamília dos betaherpesvírus, o citomegalovírus humano (HCMV), é o patógeno mais importante em pacientes transplantados, incluindo aqueles que receberam células de medula óssea ou enxerto de células tronco. Testes diagnósticos para identificar precocemente a infecção ativa pelo HCMV e uma terapia antiviral pré-clínica são medidas significantes para o controle desse vírus. Dois betaherpesvírus descobertos recentemente, o herpesvírus humano 6 (HHV-6) e o herpesvírus humano 7 (HHV-7) são geneticamente mais próximos um ao outro do que ao HCMV. Ambos têm alta prevalência na população em geral. Esses vírus não são tão patogênicos quanto o HCMV, porém o HHV-6 pode causar doenças como encefalite, hepatite e supressão da medula óssea. O objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto clínico desses três vírus em transplantados de medula óssea. A monitorização pela N-PCR é importante método precoce para o controle da infecção ativa ou da doença pelo HCMV. A reação em cadeia da polimerase tipo nested (N-PCR) foi utilizada prospectivamente na monitorização de 43 pacientes para identificar as infecções ativas e a doença causada pelo HCMV, HHV-6 e HHV-7 por um período superior a 150 dias pós-transplante. Quarenta e um pacientes receptores adultos de células de medula óssea ou células tronco, com doença maligna e dois pacientes com doença não-maligna foram incluídos nesse estudo. Aciclovir foi administrado em baixas doses, como terapia profilática para infecção por herpesvírus tipo 1. Pacientes com infecção ativa por HCMV receberam terapia pré-clínica com ganciclovir. As incidências de positividade para infecção ativa por HCMV no sangue periférico, HHV-6 e HHV-7 no soro detectadas por N-PCR foram de 72%, 4,6% e 13,9%, respectivamente. A doença por HCMV ocorreu em 8 dos 43 pacientes (18,9%), no trato gastrintestinal e todos apresentaram N-PCR positiva para infecção por HCMV e um apresentou N-PCR positiva para HHV-6 no soro. Nenhum dos pacientes com doença por HCMV apresentou infecção ativa por HHV-7. A infecção ativa foi por HHV-6 e HHV-7 foi baixa em nossa casuística. A doença por HCMV permanece a mais a causa mais importante de impacto clínico após o transplante de medula óssea. Estudos adicionais necessitam serem feitos para uma melhor compreensão da relação entre os herpesvírus HCMV, HHV-6 e HHV-7 nos pacientes transplantados de medula óssea e células tronco periféricas.

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

***ABSTRACT***

The prototype member of the Betaherpesvirus subfamily, human cytomegalovirus (HCMV), is the most important infectious pathogen in transplant recipients, including those receiving bone marrow (BM) or stem cell (SC) grafts. Rapid diagnostic tests to identify active CMV infection, and pre-emptive therapy are significant improvements in the management of CMV. Two newly identified betaherpesviruses, human herpesvirus-6 (HHV-6) and human betaherpesvirus-7 (HHV-7), are genetically more closely related to each other than to CMV. Both are highly prevalent in the general population. These viruses are not as pathogenic as CMV but HHV-6 can cause disease such as encephalitis, hepatitis and bone marrow suppression. The aim of this study was to evaluate the clinical impact of these three viruses in bone marrow and stem cell transplantation patients. Monitorization with Nested-PCR is important in the control of active CMV infection or disease. Nested polymerase chain reaction (N-PCR) was used prospectively to monitor 43 patients for evidence of active infections and diseases caused by HCMV, HHV-6 and HHV-7 for up to 150 days after transplant. Forty-one adult recipients of BM or SC graft with malignant diseases and two patients with non-malignant diseases, and with a risk for CMV disease (D+/R+; D+/R-) were enrolled in this study. Aciclovir was used before the transplant at low doses, as prophylactic therapy for HHV-1. Patients with active CMV infections received pre-emptive therapy with ganciclovir. The incidence of positive active HCMV in blood, HHV-6 and HHV-7 in serum detected by Nested-PCR was 72%, 4.6% and 13.9%, respectively. HCMV disease occurred in 8/43 patients (18.6%), in the gastrointestinal tract and all presented positive N-PCR for active HCMV infection and one presented active infection by HHV-6 detected in serum. None of the patients presented active HHV-7 infection. Co-infection by HHV-6 and HHV-7 was low. CMV disease remains the most important disease after BMT. Future studies can be made to a better understanding in relationship between HCMV, HHV-6 and HHV-7 in BM or SC transplantation recipients.

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

## ***1- INTRODUÇÃO***

## 1.1- Histórico

O **citomegalovirus humano (HCMV)** foi inicialmente identificado por Ribbert (1904), que observou a presença de grandes inclusões celulares no rim de um natimorto com sífilis em 1881. Sua observação não foi registrada até 23 anos mais tarde, quando as primeiras ilustrações dessas células, semelhantes a protozoários, observadas nos rins, pulmões e fígado de outro natimorto com sífilis, foram publicadas (Ribbert, 1904).

Em 1921, Goodpasture e Talbot (1921) foram os primeiros a sugerir que as alterações celulares observadas eram similares às lesões de pele causadas pela varicela e que a citomegalia poderia ser provocada pelo efeito indireto de um agente similar. Esses pesquisadores também observaram que as inclusões nucleares estavam algumas vezes associadas com inclusões no citoplasma.

Lipschutz (1921) também descreveu, em 1921, inclusões similares, que foram associadas com lesões em humanos e coelhos infectados com herpes simples. Ele afirmou que as estruturas constituíam uma reação específica da célula contra algum tipo de vírus. Farber e Wolbach (1932) foram os primeiros a usar o termo doença do vírus das glândulas salivares, devido à propensão do vírus em induzir inclusões nucleares características em linhagens celulares de epitélio do ducto de glândulas salivares (Hanshaw, 1985).

Evidências experimentais confirmando a etiologia viral da doença foram feitas por Cole e Kuttner (1926) em cobaias, levando à hipótese de que essa infecção seria espécie-específica.

Farber e Wolbach (1932) em estudo retrospectivo, revisaram 183 necrópsias de crianças, sendo que 22 (12%) apresentaram inclusões nas glândulas submaxilares, 2 crianças mais velhas com inclusões na parótida e glândula submandibular e duas outras com inclusões no pulmão, fígado, rins e pâncreas. Em 13 de 22 casos, sintomas de pneumonia foram observados. Os dois casos com inclusões viscerais apresentaram sintomas de doença hemorrágica e eritroblastose, respectivamente.

Smith e Vellios (1950) analisaram 89 casos de doença de inclusão citomegálica e constataram que a maioria dos casos de infecção generalizada ocorreu durante os primeiros 2 anos de idade, concluindo que a infecção poderia ocorrer no útero ou no período neonatal.

O isolamento do citomegalovírus humano (HCMV), ocorreu nos anos de 1956 e 1957, de maneira quase simultânea, a partir dos experimentos de três pesquisadores. Smith (1956) isolou o agente a partir de material precedente de duas crianças, tendo uma delas falecido com a Doença de Inclusão Citomegálica generalizada. Rowe e colaboradores (1956) isolaram o vírus de tecidos de adenóides, após adenoidectomia; Weller (1957) recuperou o vírus de fígado e urina de crianças com doença de inclusão citomegálica generalizada.

Em 1960, com o progresso nos transplantes, a infecção pelo HCMV passou a ser considerada uma entidade de grande importância clínica (Rubbin, 1990). Nesta mesma época, a denominação citomegalovírus foi proposta por Weller e colaboradores (1960), substituindo as denominações anteriores de “vírus das glândulas salivares” ou “vírus da doença de inclusão citomegálica”, entre outras, utilizadas. A partir desta fase, o HCMV foi pela primeira vez reconhecido como principal patógeno em hospedeiros imunossuprimidos. (Costa, 1999; Riley, 1997).

O **herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6)** foi primeiramente isolado em 1986, por Salahuddin e col. (1986) de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com desordens linfoproliferativas (Leach *et al.*, 2002, Sashihara *et al.*, 2002, Taniguchi *et al.*, 2000) e de pessoas com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Braun *et al.*, 1997). Foi subseqüentemente, nomeado de vírus linfotrópico humano tipo B (HBLV), pois parecia apresentar um tropismo pelo linfócito B (Santos, 2000). A microscopia eletrônica do HBLV revelou características morfológicas consistentes com a classificação dos herpesvírus. Análises do genoma deste vírus também levaram à conclusão de que este herpesvírus se distinguia de outros herpesvírus humanos, tendo sido, portanto, classificado como herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6). O nome do vírus foi trocado para HHV-6, um nome independente do seu tropismo celular, ficando de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (Braun *et al.*, 1997). A

primeira publicação que correlacionou uma doença clínica com o HHV-6 surgiu no Japão (Yamanishi *et al.*, 1988). Foi demonstrada a soroconversão para este vírus em crianças com diagnóstico clínico de exantema súbito (Asano *et al.*, 1994; Santos, 2000).

O **herpesvírus Humano tipo 7 (HHV-7)** foi isolado em 1990 (Konemam *et al.*, 2002) a partir de linfócitos T purificados de células mononucleares do sangue periférico de um doador sadio após ativação destas células, tendo esta cepa sido denominada RK (Frenkel *et al.*, 1990). Outra cepa denominada 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). Posteriormente, foi descrito como causador de processos exantemáticos em crianças (Exantema súbito ou *Roseola infantum*). Essa é considerada uma afecção benigna, mas o vírus integra seu material genético (DNA) às células linfóides do hospedeiro conduzindo a uma infecção latente controlada eficazmente pelo sistema imune em pacientes imunocompetentes. No caso de pacientes imunossuprimidos, pode se reativar e, em associação com outros herpesvírus causar danos tanto ao órgão transplantado, como ao estado geral do paciente (Konemam *et al.*; 2002).

## 1.2- Classificação

O **HCMV** foi originalmente classificado como um betaherpesvírus, com base em critérios morfológicos e bioquímicos. A morfologia dos vírus do grupo herpes era desconhecida até 1960, quando foi observado o formato icosaédrico através de microscopia eletrônica. Devido à semelhança morfológica e à presença do DNA de fita dupla, o citomegalovírus foi considerado um membro do grupo herpes. Em 1973, o Grupo de Estudos dos Herpesvírus do Comitê Internacional para Nomenclatura dos Vírus decidiu não utilizar o termo “citomegalovírus” e recomendou que fosse dado um número arábico a todos os herpesvírus: o citomegalovírus humano ficou classificado como Herpesvírus Humano 5 (HHV-5). Em 1979 este mesmo Comitê reabilitou o nome citomegalovírus e dividiu a família *Herpesviridae* em 3 subfamílias, representando os vírus herpes simples (*Alphaherpesvirinae*), citomegalovírus, herpesvírus humano tipo 6 e tipo 7

(*Bethaherpesvirinae*) e o grupo dos vírus linfoproliferativos (*Gammaherpesvirinae*) (Ho, 1991; Brown & Abernathy, 1998).

O **HHV-6** é um novo membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvírus*, relacionando-se com o citomegalovírus (HCMV), sendo muito similar a este em suas bases biológicas e nas análises moleculares.

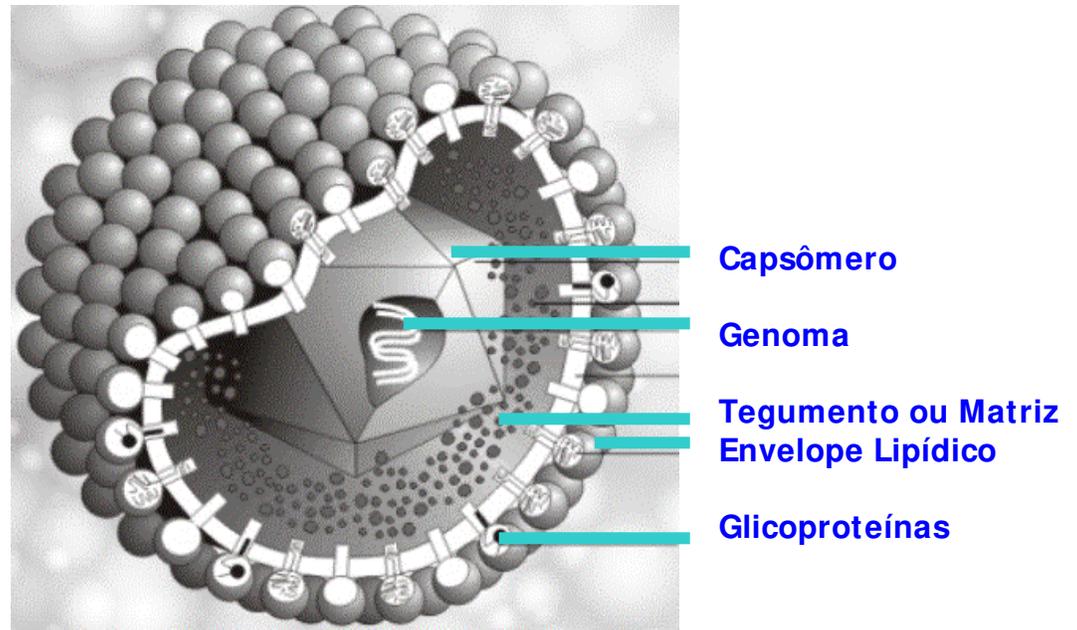
O HHV-6 foi relacionado etiologicamente à doença humana em 1988, quando Yamanishi e col. (1988) descobriram a associação desse vírus com o exantema súbito (*roseola infantum*). Exantema Súbito ou Roseola Infantum é uma síndrome exantemática caracterizada classicamente por febre e erupção cutânea, principalmente em crianças menores e é tipicamente acompanhada de leucopenia (neutrófilos e linfócitos, concomitantemente) e por vezes de plaquetopenia e hepatite (Ward, 2005).

O **HHV-7** é muito semelhante ao Herpesvírus Humano Tipo 6 (HHV-6) no nível genético. O HHV-7 não foi classificado até agora, embora sua genética e propriedades biológicas pareçam ser similares à classificação do HHV-6, que é do gênero *Roseolovirus*, da subfamília *Betaherpesvírus* (Dewhurst *et al*, 1997).

### 1.3- Estrutura Viral

Todos os Herpesvirus, apresentam 4 elementos estruturais principais (Brennan, 2001):

- (1) Um nucleocapsídeo icosaédrico com capsômeros protéicos;
- (2) Uma estrutura protéica eletrodensa contendo o DNA viral;
- (3) Um envelope derivado da membrana celular e contendo glicoproteínas virais e proteína integral, e
- (4) Um tegumento, localizado entre o nucleocapsídeo e o envelope (Figura 1)



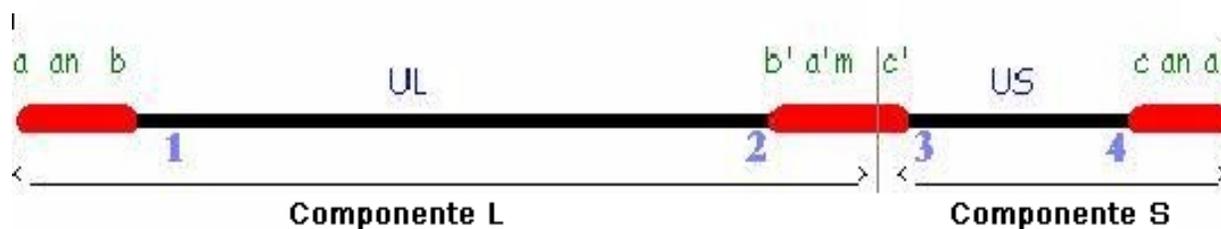
*Copyright 1994 – 97 Marko Reschke*

**Figura 1-** Estrutura dos Herpesvírus Humanos.

O genoma do **HCMV** é de aproximadamente 230 Kilobases (229.354 pares de bases – GeneBank NC001347) com massa molecular relativa de  $150-155 \times 10^6$  e densidade de  $1,716-1,717 \text{ g/cm}^3$ , correspondente a 58% de guanossina e citosina.

Este grande genoma codifica mais de 200 proteínas e é composto de duas regiões únicas definidas como longa (UL) e curta (US), flanqueadas por seqüências repetidas invertidas localizadas internamente (IRL e IRS) e nas extremidades (TRL e TRS) (Chee *et al*, 1990; Stinski, 1990) (Figura 2).

## Sequência Gênômica do HCMV

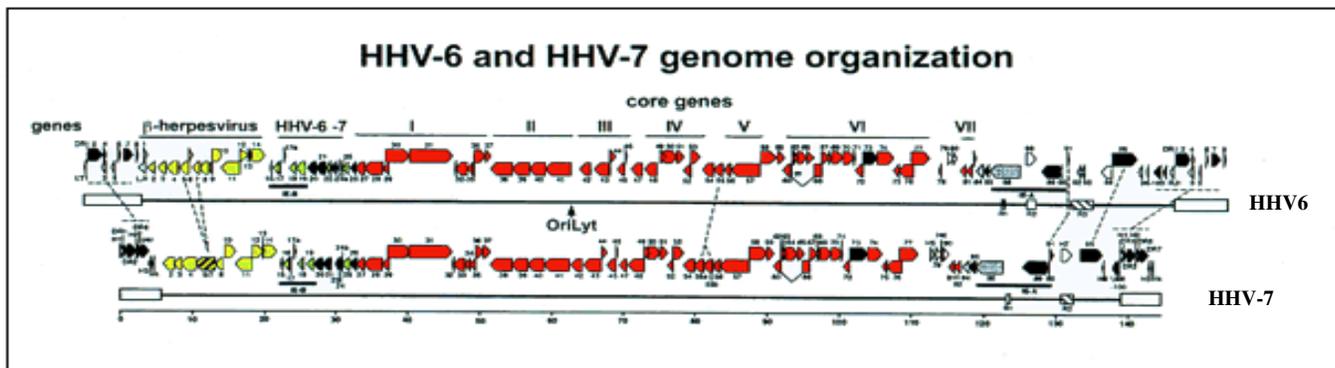


**Figura 2-** Organização do genoma do Citomegalovírus Humano.

(<http://www.science.mcmaster.ca/Biology/Virology>)

O genoma do **HHV-6** contém 160-162 kb, com uma região central única (U) de 143-144 kb, contendo estruturas de leitura aberta (ORFs) U1-100. O genoma contém 7 regiões de genes conservados em todos os herpesvirus, um grupo de genes descobertos somente nos  $\beta$ -herpesvirus e genes específicos para o gênero *Roseolavirus* (Clark, 2000). Estima-se que o HHV-6 possua mais de 100 genes que codificam proteínas (Yamanishi, 2000). A transcrição de genes é semelhante ao padrão das herpesviroses, com proteínas expressas imediatamente precoces (IE), precoces (E) e tardias (L) (Mirandola *et al*, 1998; Dockrell, 2003).

O HHV-6 pertence ao *Roseolavirus* gênero e possui o genoma colinear ao Herpesvirus Humano Tipo 7. A homologia é de 46,6 a 84,9%. Os blocos vermelhos representam o gene core do herpesvirus, numerado de I a VII. Os blocos amarelos representam genes específicos da subfamília Betaherpesvírus (de U2 a U14). Blocos verdes indicam genes presentes somente no *Roseolavirus* gênero; i.e., em HHV-6 e HHV-7. Somente 3 ORFs (U22, U83 e U94) estão presentes no HHV-6 e ausentes no HHV-7 (Campadelli-Fiume *et al.*, 1999) (Figura 3).



**Figura 3-** Genoma do HHV-6 e HHV-7 (Campadelli-Fiume *et al.*, 1999).

O **HHV-7** foi completamente seqüenciado e apresenta 145 kilobases (Kb) de extensão. O genoma viral é colinear com o genoma do Herpesvírus Humano Tipo 6 (HHV-6), compartilhando características genéticas importantes com a família Betaherpesvírus (Nicholas, 1996).

O genoma do HHV-7 é aproximadamente 10% menor do que o genoma do HHV-6, e consiste de uma única região longa (aproximadamente 133 Kb), em ambos os lados (elementos repetitivos diretos). A organização em toda parte do genoma do HHV-7 é, conseqüentemente, idêntica à do HHV-6 (Secchiero *et al*, 1995).

#### 1.4- Fisiopatologia e Patogênese

O **HCMV** é um vírus lítico que causa um efeito citopático *in vitro* e *in vivo*. Quando o hospedeiro é infectado, o DNA do HCMV pode ser encontrado em todas as diferentes linhagens celulares e órgãos do corpo. Na infecção inicial, o HCMV infecta as células epiteliais das glândulas salivares, resultando em uma infecção persistente e um local de latência viral. O HCMV também infecta o sistema geniturinário, especificamente os túbulos proximais do rim das áreas corticais. A virúria é muito comum e tem pouca conseqüência clínica. Apesar da replicação viral no rim, é raro ocorrer disfunção renal. Uma exceção pode acontecer em indivíduos que receberam transplante de rim, no qual o

HCMV é associado com glomerulopatia, sendo uma possível causa de rejeição do enxerto (Goodrich, 2001).

O HCMV pode penetrar em uma variedade de células sem que ocorra a replicação (Stinsk, 1990; Plachter *et al.*, 1996) e compartilha com outros herpesvirus a capacidade de permanecer latente no hospedeiro, disseminar-se célula a célula em presença de anticorpos circulantes, reativar-se em condições de imunossupressão e induzir imunossupressão transitória ao receptor (Drago *et al.*, 2000).

Para iniciar a infecção, é necessário que o HCMV seja absorvido pelos receptores de superfície da célula hospedeira e que haja fusão do envelope viral com a lamela externa da membrana citoplasmática, ou via fagócito. Partículas infecciosas são detectáveis por microscópio eletrônico no intervalo de um a vários dias após a inoculação. Além disto, tanto o DNA viral como proteínas podem ser detectados na célula infectada antes da replicação viral estar completa. As partículas virais são produzidas e reunidas no núcleo e atingem o envelope através da membrana nuclear interna para serem transportadas através da rede do complexo de Golgi. A gB é o produto do gene UL55 e é a glicoproteína predominante no envelope do HCMV. No processo de formação do envelope, ocorre a projeção de glicoproteínas virais que constituirão sítios antigênicos para anticorpos neutralizantes e serão responsáveis pelo estímulo da imunidade humoral e celular do hospedeiro (Ho, 1991).

O **HHV-6** é um vírus linfotrópico, usa o receptor celular CD46 e pode também infectar outras células, como os monócitos, células endoteliais, epiteliais (Harma *et al.*, 2003), células da glia e fibroblastos (Desachy *et al.*, 2001).

O mecanismo patogênico do HHV6 é pouco explorado (Gentile, 2000). Sabe-se que esse vírus infecta células mononucleares sendo que o aumento de sua replicação induz ao aumento da produção de interferon alfa (INF- $\alpha$ ) (Kikuta *et al.*, 1990), de interleucina-1B (IL-1B) e de TNF- $\alpha$  (Flamand *et al.*, 1991). Em adição, a infecção por HHV6 em células mononucleares de sangue periférico resulta em supressão da função dos linfócitos T, o que é demonstrado pela redução da síntese de Interleucina 2 (IL-2) e de proliferação celular (Flamand *et al.*, 1995).

O HHV6 induz a um sinal de efeito citopático em células T (CD4 e CD8, e células T gama e delta) e células NK (Lusso & Gallo, 1995) sugerindo que isto possa causar imunossupressão pela infectividade, destruindo células T ou seus precursores. Recentemente, o HHV6 foi associado à imunodeficiência grave e progressiva em pacientes portadores de HIV (Knox et al, 1995), além de ser um potencial co-fator na progressão da AIDS (Lusso & Gallo, 1995).

O **HHV-7** é um vírus linfotrópico com tropismo específico para células T-CD4+ e linhagem celular SupT1 (célula T linfoblastóide de linhagem contínua). Até o ano de 1997, segundo Dewhurst e col. (1997), o HHV-7 não infectava monócitos, sendo o receptor CD4 necessário, mas não suficiente para a entrada do vírus na célula (Dewhurst *et al.*, 1997).

O epítipo CD4 está presente em células das glândulas salivares, o que explica a alta frequência de isolamento desse vírus na saliva de seres humanos adultos sadios (Koneman *et al.*, 2001).

A patogênese e a associação do HHV-7 com doenças são derivadas de alguns poucos casos relatados que podem (ou não) ser representativos da variedade da resposta do hospedeiro à infecção pelo vírus (Dewhurst *et al.*, 1997).

## **1.5- Replicação**

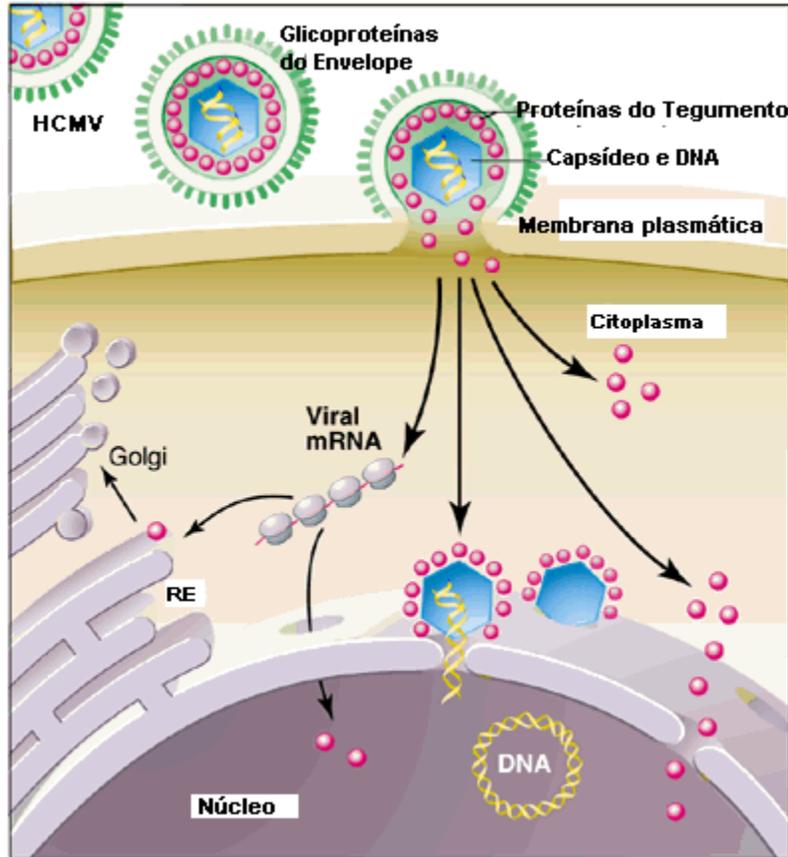
O ciclo de replicação do **HCMV** é lento em cultura celular e rápido no hospedeiro (Emery *et al.*, 1999), no qual persiste latente por muitos anos, sendo um agente oportunista quando diminuem as defesas do organismo infectado. O HCMV é citopático, podendo produzir destruição tecidual em vários tecidos, como, por exemplo, do trato gastrointestinal, pulmões, cérebro, etc (Alford & Britt, 1990).

O ciclo replicativo do HCMV apresenta padrão similar ao dos demais herpesvírus, no qual, após infecção e incorporação do material genético, um pequeno número de genes é transcrito, codificando proteínas que regulam sua expressão; estas

proteínas são denominadas antígenos imediatamente precoces (IEA) e estimulam a produção de proteínas denominadas de antígenos precoces (EA). Os antígenos são expressos nas membranas celulares e, em seguida, nas nucleares. Antígenos tardios (LA) têm função constitucional e são expressos após replicação do DNA (Straus, 1990; Colimon & Michelson, 1990).

O Citomegalovírus Humano e outros tipos de CMV que infectam outras espécies de animais são espécies altamente específicas, mas suas características de replicação e síndromes da doença que acarretam são similares (Alford & Britt, 1990; HO, 1991; Panutti, 1984.) Muitas cepas de HCMV circulam continuamente na população em geral (Van Der Merr *et al*, 1996).

Bresnahan e Shenk (2000), relataram que as partículas de HCMV não contêm só DNA, mas também quatro tipos de RNA mensageiro (RNAm), os quais são transcritos de um gene imediatamente precoce (*immediately-early*), dois genes precoces (*early*) e um gene tardio (*late*). Ao penetrar na célula do hospedeiro, o capsídeo viral é transportado ao poro nuclear, onde sua carga de DNA é lançada ao núcleo (Figura 4). Os quatro RNAm estão provavelmente localizados no tegumento viral, que é uma capa de proteína localizada entre o capsídeo e o envelope (Roizman, 2000; Bresnahan & Shenk, 2000).



**Figura 4-** Mecanismo de infecção do HCMV nas células do hospedeiro (Bresnahan & Shenk, 2000) .

Após fusão do envelope viral com a membrana plasmática, o capsídeo (com algumas proteínas associadas ao tegumento) é transportado para o poro nuclear onde o DNA viral é lançado no núcleo. Neste, o DNA forma um círculo e é transcrito pelo maquinário de transcrição celular. Outras proteínas do tegumento permanecem no citoplasma ou são transportadas independentemente ao núcleo. O RNAm viral é transportado para a célula hospedeira com o capsídeo e é traduzido no citoplasma. Pelo menos uma das proteínas codificadas pelo RNAm viral está associada com a cadeia retículo endoplasmático-Complexo de Golgi (Bresnahan & Shenk, 2000) .

Ambos, CMV murino e humano, têm três famílias de genes,  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta) e  $\gamma$  (gama), expressos nas fases imediatamente precoces (IE), precoces (E) e tardia (L) do ciclo de replicação das células infectadas. Cada uma das famílias de genes imediatamente precoce e precoce tem uma função regulatória no ciclo celular (Sweet, 1999).

- ❖  $\alpha$  (IE) – nesta fase os genes são transcritos através de enzimas nucleares; os RNAm são transportados para o citoplasma e são traduzidos, ocorrendo a produção de certas proteínas regulatórias que são transportadas para o núcleo e que permitem ao vírus ter controle da síntese macromolecular da célula hospedeira. Os genes transcritos nessa fase podem ter influência na expressão de outros genes virais, nos seus próprios genes e, possivelmente, nos genes celulares;
- ❖  $\beta$  (E) – inicia-se após o período IE e é caracterizada pela replicação do DNA viral, produção de proteínas nas células infectadas e produção da progênie;
- ❖  $\gamma$  (L) – fase em que componentes estruturais ou de maturação dos vírus produzidos e o vírus infectante são eliminados da célula (Mustafa, 1994).

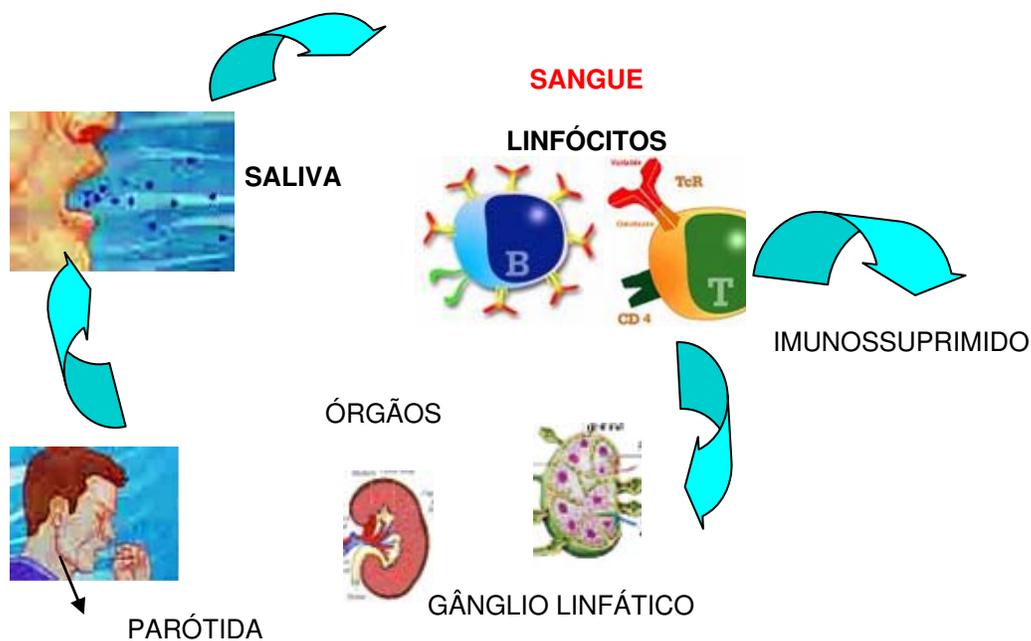
São características da infecção pelo **HHV-6**: 1) tropismo por células linfóides; 2) indução do receptor CD4 em algumas células; 3) supressão da resposta imune; 4) indução de citocinas; 5) transativação de outros vírus; 6) capacidade de transformar certas células em cultura; 7) capacidade, em alguns casos, de aumentar a replicação do HIV (Levy, 1997).

Linfócitos T e B, monócitos/macrófagos, e megacariócitos são suscetíveis à infecção pelo HHV-6, contudo, linfócitos T – CD4 representam uma população de células em que este vírus se replica com maior eficiência (Flamand et al., 1995). O HHV-6 pode infectar também outras linhagens de células de origem epitelial, fibroblástica e neural com diferente eficiência. Na infecção primária, o vírus 6 estabelece latência em diferentes células e órgãos incluindo monócitos/macrófagos, glândulas salivares, cérebro e rins (Abdel & Asmar, 2004). Vários estudos têm demonstrado que o HHV-6 possui atividade imunomodulatória por induzir a secreção de interleucina-1  $\beta$  (IL -  $\beta$ ), fator de necrose

tumoral -  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) e interferon-  $\alpha$  (IFN-  $\alpha$ ) em culturas de linfócitos *in vitro* (Flamand et al., 1995). O HHV-6 pode ser considerado um herpesvírus imunotrópico emergente, que pode infectar diretamente ou interferir na função de alguns componentes críticos do sistema imune (Singh & Carrigan, 1996).

Três estágios podem ser identificados na história natural da infecção por HHV-6. O primeiro é representado pela infecção primária aguda na infância. O segundo estágio ocorre em crianças e adultos saudáveis, no qual o vírus replica em glândulas salivares e é secretado na saliva, sem induzir patologias evidentes, permanecendo latente ao mesmo tempo em linfócitos e monócitos, e persiste em vários tecidos, possibilitando um alto nível de replicação. O terceiro estágio ocorre com menos frequência, tipicamente em pessoas imunocomprometidas, e está ligado à reativação do vírus ou à reinfeção (Fernandez & Fernandez) (Figura 5).

## PATOGENIA HHV-6



**Figura 5-** Ciclo infeccioso do HHV-6 (Fernandez & Fernandez)

Após a contaminação há um período de replicação viral local, seguido de viremia. O período de incubação é indeterminado até o momento (Santos, 2000).

O primeiro efeito da replicação do HHV-6 é o aumento no tempo de sobrevivência da célula, que varia de oito a doze dias a mais que em células não infectadas. Isso deve-se à interrupção da síntese de DNA celular, após 65h de infecção, e ao estímulo da síntese de proteínas celulares. O efeito final é um modesto aumento de células, com acentuada síntese de proteínas celulares, antes do efeito lítico e da morte celular (Santos, 2000).

A replicação viral do **HHV-7** induz à perda do receptor CD4 na superfície celular. Estudos demonstram que o HHV-7 *in vitro* pode competir com o HIV (vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida tipo 1), interferindo negativamente na replicação deste último em cultura. Mas, *in vivo*, o efeito sobre a replicação do HIV-1 permanece incerto e merece investigação, principalmente em crianças com infecção primária pelo HHV-7 (Dewhurst *et al.*, 1997; Koneman *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) e com adição de interleucina-2 e polibrene, esta última, uma substância que facilita a infecção celular pelo HHV-7. A transferência dos vírus (isolados a partir de células do cordão umbilical) para linhagem celular contínua T linfoblásticoide – Células Sup T1 para estudos e produção de antígenos virais tem sido utilizada devido ao fato de ser mais fácil de trabalhar com células de linhagem contínuas do que manter sempre disponível células de cordão umbilical viáveis e livres de contaminação (Ablashi *et al.*, 1998).

## **1.6- Epidemiologia e Transmissão**

A infecção pelo **HCMV** ocorre comumente na maioria da população, sendo que o vírus infecta de 0,5 a 1,0% de todos os recém-nascidos e aproximadamente 50% dos adultos nos países desenvolvidos. É de baixa prevalência em países europeus, na Austrália e na América do Norte (40 a 60% dos indivíduos são infectados), enquanto que em

populações de nível sócio-econômico mais baixo, a prevalência é significativamente maior, variando entre 80 a 100%. A prevalência de anticorpos contra o HCMV (anti-HCMV) eleva-se com a idade, atingindo níveis máximos após os 25 anos (Pannuti, 1984; Hardy *et al.*, 1985).

No Brasil, os dados epidemiológicos disponíveis são restritos a algumas áreas urbanas, tais como o estado de São Paulo. Estudos utilizando amostras de soro coletadas de indivíduos saudáveis de diferentes grupos de idade em São Paulo e testadas para anticorpos anti-HCMV mostraram que em crianças de 0-4 anos de idade, a soroprevalência é de 60%, com um lento aumento após os 15 anos de idade. Para indivíduos com idade entre 51 e 60 anos, a soroprevalência encontrada é de 80% (Almeida *et al.*, 2001). A incidência nos Estados Unidos e no norte da Europa é de 50 a 60% e no Brasil é de aproximadamente 93% (Nichols & Boeckh, 2000).

Aproximadamente 10% das infecções primárias em pacientes imunocompetentes estão associadas com a síndrome da mononucleose, caracterizada por mal-estar, febre e linfocitose atípica. A grande maioria das infecções primárias passa despercebida. O vírus permanece latente no endotélio e em células mononucleares do sangue periférico, durante todo o tempo de vida do hospedeiro, controlado pela imunovigilância mediada por células (Nichols & Boeckh, 2000).

O HCMV é transmitido por: a) via parenteral, através de sangue ou seus derivados; b) contato inter-humano; c) via materno-fetal, através do canal de parto, contágio pós-parto ou transmissão intra-uterina e, d) transplantes de órgãos (Veronesi *et al.*, 1991).

Os humanos são os únicos reservatórios do HCMV e a transmissão ocorre através do contato pessoa-a-pessoa. Recém-nascidos e crianças podem se tornar infectados durante o nascimento pela passagem através do cérvix uterino contaminado, durante o período pós-natal através do leite materno ou durante a infância através de contato direto com outras crianças em berçários ou creches. Essa infecção pode estar associada à seqüelas graves, já que representa a causa mais comum de retardo mental e distúrbios da audição em

crianças. Após a puberdade, as transmissões salivar e sexual representam o modo mais importante de infecção por HCMV (Jong *et al.*, 1998).

Com relação à epidemiologia em grupos de alto risco, sabe-se que pacientes imunossuprimidos, como os transplantados, os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e aqueles que são submetidos à quimioterapia têm maior risco de desenvolver a doença por HCMV (Costa, 1999).

O HCMV é o mais importante patógeno que ocorre entre os receptores de transplantes, sendo que a infecção é evidenciada em 2/3 dos casos, embora a doença clínica seja encontrada com menor frequência (Rubin, 1993; Camargo *et al.*, 1996).

Existem três padrões epidemiológicos da infecção por HCMV em receptores de órgãos transplantados: *infecção primária*, *reativação de infecção latente* e *reinfecção* (Rubin, 1990).

- ❖ Na infecção primária, a fonte viral pode ser pré-natal (transmissão transplacentária) (Epps *et al.*, 1995), transfusão intrauterina (Vilmer & Pérol, 1984), perinatal (secreção cervical) e pós-natal (urina infectada, saliva, leite materno) (Epps *et al.*, 1995), transfusão de sangue e transplante de órgãos (Tegtmeier, 1989; Forman & Zaia, 1994). Geralmente, a infecção é mais fácil de ser adquirida em condições precárias de higiene. Drago e col. (2000) relatam que, os indivíduos com condições sócio-econômicas baixas, a grande maioria das crianças têm sido infectada antes do início da puberdade.

Após a infecção primária, o HCMV permanece em uma condição de infecção latente, porém, ocasionalmente, torna-se reativado e os vírions infecciosos aparecem na saliva e/ou urina. Essas *reativações* temporárias são assintomáticas, mas permitem que o vírus se espalhe horizontalmente e, ainda, verticalmente se a reativação ocorrer durante a gestação (Drago *et al.*, 2000).

- ❖ A reativação é induzida pela alteração no relacionamento parasita-hospedeiro devido a mecanismo fisiológico, tal como ocorre na gravidez, por um decréscimo natural das defesas imunológicas; nas doenças debilitantes ou no emprego de drogas imunossupressoras e procedimentos cirúrgicos (Drago *et al.*, 2000).
- ❖ A reinfeção é devida a um vírus novo com um diferente tipo antigênico (Tegmeier, 1989). Embora seja epidemiologicamente importante distinguir *reinfeção* e *reativação*, ambas são clinicamente similares. O termo infecção *recorrente*, portanto, é freqüentemente usado para descrever ambas as possibilidades (Leshner, 1988).

Em crianças com infecção primária, anticorpos **anti-HHV-6** são detectados num período que varia de 3 a 7 dias (Dockrel *et al.*, 1999). Ocorre produção de IgM na segunda semana após a infecção e o pico se mantém por 2 meses (Dockrel, 2003). Anticorpos IgG aumentam por 2 semanas pós infecção e são detectados por toda a vida em 90% ou mais dos adultos (Yamanishi *et al.*, 1988, Dockrel *et al.*, 1999).

A infecção por HHV6 é onipresente nos primeiros 2 anos de vida. A incidência de "pico" de infecção varia de 6 a 9 meses (Caserta *et al.*, 2001). Estudos soropidemiológicos, como os realizados por Saxinger e col. (1988) e Levy e col. (1990) sugerem que mais de 90% dos adultos são soropositivos para a infecção pelo HHV6. A infecção ocorre em todo o mundo, sem restrição geográfica (Okuno *et al.*, 1989; Krueger *et al.*, 1998). Pode ocorrer queda dos títulos de IgG com o passar dos anos, gerando a falsa impressão de infecção primária em grupos de idosos (Brow *et al.*, 1988). Estudos de soroprevalência proporcionam poucos dados de infecção variante específica (Dockrel, 2003).

Estudo realizado no Brasil, em Belém do Pará, mostrou a soroprevalência do HHV-6. A soroprevalência global foi de 90%, com taxa de soropositividade variando entre 75% a 100% nos diferentes grupos estudados entre idade e sexo (Freitas & Linhares, 1997). Outro estudo realizado no Brasil, em Recife, na região Nordeste, entre brasileiros e imigrantes japoneses também mostrou a soropositividade global para HHV-6 com uma

pequena diferença entre os dois grupos, sendo 76,5% de soropositividade para o grupo de brasileiros e 77,2 para o grupo de imigrantes japoneses. A soroprevalência global foi mais alta em mulheres do que em homens (Linhares *et al.*, 1991).

O modo de transmissão não é completamente conhecido, mas o HHV-6 está presente tanto na saliva quanto nas células epiteliais de cavidade oral, sugerindo que a secreção oral contribui para a transmissão, especialmente do sub grupo HHV6-B (Levy *et al.*,1990; Clark, 2000). A análise de cepas de HHV-6 isolado de mães e filhos sugerem que este tipo de transmissão possa ocorrer (Van Loon *et al.*,1995).

Evidências sugerem que a transmissão do HHV-6 ocorra através do doador. Um estudo realizado no Japão por Yoshida e col. (1992) documentou a transmissão do vírus através do órgão transplantado. A latência *in vivo* no rim também pode acontecer (Singh & Carrigan, 1996). Outras vias de contaminação ainda não apresentam evidências convincentes (Dockrel, 2003).

A incidência de infecção por HHV-6 pós-transplante varia de acordo com o tipo de transplante, sendo mais freqüente em receptores de medula óssea (48%, variação de 28 a 75%), e incidindo em cerca de 32% (0-82%) dos receptores de órgãos sólidos (Dockrel *et al.*,2001).

A prevalência da infecção primária pelo **HHV-7** na população em geral é alta, sendo de cerca de 5 infectados para cada 7 crianças (71%) segundo relatos de Tanaka e col. (1994). No Brasil, 93% dos indivíduos adultos e das crianças maiores de dez anos de idade apresentam anticorpos de classe IgG contra o HHV-7, segundo estudos de Freitas e col. (2004). A primo infecção pelo HHV-7 incide em idades entre 5 e 6 anos de vida, um pouco mais tarde do que ocorre para o Herpesvírus Humano Tipo 6 (HHV-6), a qual ocorre aos 2 anos, aproximadamente (Ward *et al.*, 2001). A infecção pelo HHV-7 pode ocorrer tardiamente em regiões tropicais, como, o Brasil (Oliveira *et al.*, 2003).

A transmissão horizontal do HHV-7 se dá, provavelmente, através da saliva como foi demonstrado por Takahashi e col. (1997). O índice de isolamento do HHV-7 a partir da saliva é muito alto, cerca de 75% (Canadá Communicable Disease Report, 2000).

O HHV-6 tem, possivelmente, a mesma forma de transmissão (Mukai *et al.*, 1994), mas é encontrado apenas ocasionalmente na saliva (Hall *et al.*, 1998) e sua forma exata de transmissão permanece desconhecida. Se o HHV-6 for transmitido pela saliva como o HHV-7, também não fica explicado o motivo pelo qual a infecção por este último 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% dos cromossomos de pacientes japoneses e 1,6% das células de cordão umbilical possuem DNA do HHV-6 incorporado ao seu genoma, o que pode acontecer também com o HHV-7 (Daiabata *et al.*, 2004; Tanaka-Taya *et al.*, 2004).

Segundo Black e Pellett (1999), outra possibilidade de transmissão do HHV-7 é através do leite materno.

A transmissão nosocomial ou iatrogênica pode ocorrer através de transfusão de sangue, células progenitoras hematopoéticas e órgãos transplantados, causando infecção primária ou infecção recorrente (Ward, 2005).

### **1.7- Manifestações Clínicas**

A doença por **HCMV** em imunocompetentes, quando se manifesta, assume forma semelhante à mononucleose infecciosa, classicamente caracterizada por febre de duração prolongada, fraqueza, sudorese, mialgia, hepatomegalia, esplenomegalia, ou ambos, e adenopatia. Linfonodomegalia e exsudato amigdaliano são pouco encontrados, ao contrário do que se verifica na mononucleose infecciosa causada pelo vírus Epstein-Barr. Icterícia e exantema maculopapular podem ser eventualmente observados. Em relação aos exames laboratoriais, o hemograma pode apresentar linfocitose relativa e absoluta e presença de grande número de linfócitos atípicos. As enzimas hepáticas (TGO e TGP) podem estar moderadamente elevadas em cerca de 80% dos casos (Weller, 1971a; Weller, 1971b; Panutti *et al.*, 1987; Panutti *et al.*, 2001).

Porém, o vírus pode ser um importante patógeno no feto humano, em pacientes com defeitos de imunidade celular (SIDA, leucemia, linfoma), em receptores de TMO, CPP e de órgãos sólidos e aqueles submetidos à quimioterapia antineoplásica. Uma vez ocorrida a infecção, o HCMV pode permanecer latente, em equilíbrio com o organismo infectado, reativando a atividade viral quando houver diminuição da imunidade do hospedeiro, o que caracteriza o HCMV como agente oportunista. Um dos fatores que mais têm contribuído para o aumento da ocorrência da infecção por HCMV é o emprego cada vez mais comum de drogas imunossupressoras (Panutti *et al.*, 1984; Ho, 1990; Myers & Amsterdam, 1997). Com o aumento da prevalência de AIDS, a infecção por HCMV transformou-se em um grave problema de saúde pública em vários países do mundo. Devido à profunda e complexa deficiência imunológica causada pelo HIV, o HCMV freqüentemente causa doença disseminada nesse grupo de doentes. Além disso, a co-infecção entre HCMV e outros patógenos é muito comum nos pacientes com AIDS (Costa, 1999).

Em pacientes transplantados, com câncer e outros imunossuprimidos, a freqüência e a gravidade da infecção e de suas manifestações clínicas são bastante variáveis. Elas dependem do tipo de transplante, das condições clínicas do doador, da presença ou não de reações devido à incompatibilidade dos antígenos de histocompatibilidade, da natureza e duração da quimioterapia e do regime de imunossupressão utilizado (Grundy, 1990). Nestes pacientes a doença se apresenta com sinais de síndrome de mononucleose sendo que o achado principal é febre de duração variável. Em ordem de freqüência podem ser observados: hepatomegalia, esplenomegalia, mialgia e/ou artralgia, elevações de enzimas hepáticas e linfocitose. Linfócitos atípicos são menos evidentes nesses pacientes e, particularmente, devido à imunossupressão, a leucopenia ocorre mais freqüentemente que a leucocitose, juntamente com anemia e trombocitopenia. Após a síndrome da mononucleose, a pneumonia por HCMV é a mais freqüente manifestação em pacientes imunossuprimidos, principalmente em transplantados de medula. A infecção concomitante por fungos, bactérias gram-negativas e/ou *Pneumocystis carinii* é comum. Hepatite com hepatomegalia, anormalidades de testes de função hepática e icterícia são observados em taxas de 7 a 16% dos transplantes renais. Coriorretinite secundária ao HCMV é outra entidade clínica cuja freqüência tem aumentado em pacientes imunossuprimidos, especialmente nos portadores de HIV. O trato

gastrointestinal vem cada vez mais sendo atingido pelo HCMV, principalmente nos pacientes com AIDS. O cólon é o local mais frequentemente acometido, seguido pelo esôfago, reto e intestino delgado. As manifestações clínicas no trato gastrointestinal dependem do nível e grau de acometimento do órgão, bem como da ocorrência ou não de infecções concomitantes ou tumores (Costa, 1999).

A pneumonia por citomegalovírus é uma das mais importantes infecções oportunistas nos hospedeiros imunocomprometidos, sendo a doença particularmente grave em receptores de transplantes alogênicos de medula óssea (Ljungman, 1995). Nos anos 80, foi considerado o maior problema infeccioso nestes pacientes porque foi observada uma taxa de mortalidade maior do que 80%, mesmo após a introdução do ganciclovir, o primeiro antiviral com boa atividade contra o citomegalovírus, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Sheep *et al.*, 1985).

Atualmente, o tratamento da pneumonia intersticial pelo HCMV compreende o uso de ganciclovir e imunoglobulina endovenosa. Mesmo com este tratamento, uma vez instalada a pneumonia, pouco mais de metade dos casos poderão ser curados (Ljungman & Einsele, 1994). Em contraste ao ganciclovir que é fornecido pelo Ministério da Saúde no Brasil e está disponível para todos os pacientes com doença por HCMV, o governo não oferece subsídios para a aquisição de imunoglobulina endovenosa (IgIV-HCMV) e seu alto custo tem sido limitado, o que torna seu uso restrito a um pequeno número de pacientes (Machado *et al.*, 2000).

A maioria das infecções por **HHV-6** é assintomática, mas 20% das crianças apresentam febre, associada a erupções cutâneas (*Roseala infantum* ou exantema súbito), abscessos e outras manifestações clínicas (Braun *et al.*, 1997).

A reativação do HHV-6 tem sido descrita na presença de estados de imunossupressão, como após transplante de órgãos e em indivíduos com AIDS. Parece também estar associada à ocorrência de esclerose múltipla, síndrome da fadiga crônica e hipersensibilidade a medicamentos (Yamanishi, 2000), além de manifestações clínicas ocorrerem em pacientes com doenças neoplásicas e doenças do colágeno (Braun *et al.*, 1997).

Em indivíduos imunocompetentes, como no caso de crianças com exantema súbito, a viremia pelo HHV-6 é geralmente de curta duração, de aproximadamente quatro dias. Viremia prolongada, persistindo por até 1 mês, tem sido relatada apenas em receptores de transplantes (Frenkel *et al.*, 1994).

Estudos prospectivos detectaram o DNA do HHV-6 pelas técnicas de PCR ou de cultura viral em amostras seqüenciais de pacientes após o transplante, demonstrando uma forte evidência de infecção por HHV6 (Dockrel, 2003).

Pacientes com transplante de órgãos recebem altas doses de medicamentos imunossupressores, aumentando o risco de infecções por Herpesvirus. Assim, a associação do HHV-6 e a apresentação clínica pós-transplante são agravadas por vários fatores, dentre os quais a alta soroprevalência de HHV-6, a presença concomitante de outros herpesvirus oportunistas e a escassez de estudos com uma amostragem grande (Gentile, 2000).

Após a infecção primária, o vírus replica nas glândulas salivares e está presente na saliva permanecendo latente nos monócitos/macrófagos (Kando *et al.*, 1991) e persistindo em uma variedade de tecidos como pele, pulmão e cérebro (Campadelli *et al.*, 1999).

O HHV-6 é uma causa importante para supressão idiopática da medula após transplante de medula óssea (Carrigan & Knox, 1992; Drobyshi *et al.*, 1993), e foi isolado em cultura de sangue de 38% dos receptores adultos de transplante de medula óssea (Drobyshi *et al.*, 1993).

Febres inexplicadas com profunda trombocitopenia após transplante de fígado (Singh *et al.*, 1995) e leucopenia grave após transplante de rim estão sendo associadas à infecção por HHV-6 (Morris *et al.*, 1989), assim como pneumonites intersticiais em receptores de transplante de medula óssea (Campadelli *et al.*, 1999).

Encefalites por HHV-6 são bem documentadas em indivíduos não transplantados (Cullers *et al.*, 1996) e o HHV6 tem sido detectado em fluido cerebrospinal de crianças com exantema súbito (Yoshikawa *et al.*, 1992).

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção pelo **HHV-7** causa Exantema Súbito ou Roseola infantum; é uma síndrome exantemática caracterizada classicamente por febre e erupção cutânea, principalmente em crianças menores e 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 dar sem a presença de erupção cutânea (Ward, 2005).

É definida como infecção primária ou primo infecção o primeiro contato com uma das cepas do Herpesvírus Humano Tipo 7 (HHV-7). Convulsões, encefalite e encefalopatia têm sido associadas a doenças febris bem antes do exantema súbito ter sido caracterizado. Relação entre infecção primária pelo HHV-6 e manifestações acima descritas foram confirmadas por alguns autores (Asano *et al.*, 1994; Hall *et al.*, 1994; Ward & Gray, 1994), porém para o HHV-7 foi bem menos documentada (Torigoe *et al.*, 1996; Caserta *et al.*, 1998). Uma infecção primária associada com encefalopatia foi documentada por Van Den Berg e col. (1999) na qual a criança recuperou-se. A infecção pelo HHV-7 é caracterizada por febre alta que dura poucos dias e erupções que aparecem em 24 à 48 horas. A doença é efetivamente controlada pela imunidade mediada por células. Assim como os demais herpesvírus, o HHV-7 pode estabelecer uma infecção latente por toda a vida do indivíduo e se reativar durante estados de imunossupressão (Lautenschlager *et al.*, 2002).

O Herpesvírus Humano Tipo 6 (HHV-6) tem sido associado a quadros subclínicos em indivíduos imunocompetentes e a várias doenças diferentes (Braun *et al.*, 1997). A ligação do HHV-6 com Esclerose Múltipla e Síndrome de Fadiga Crônica é controversa (Tyler, 2003). Devido à estreita relação entre o HHV-6 e o HHV-7, pode-se pensar que estas características também se apliquem ao HHV-7. A relação do HHV-7 com *Pityriasis rósea* permanece sem provas (Chuh *et al.*, 2004).

Em indivíduos que receberam transplantes de órgãos pode ocorrer reativação, similarmente ao que ocorre com outros herpesvírus (Yoshikawa *et al.*, 2003).

Após a infecção primária, os vírus do grupo herpes estabelecem latência e o DNA viral persiste sem expressão protéica, o que poderia ser alvo para uma resposta imune. Intermitentemente, o genoma viral latente pode tornar-se ativo e produzir virions infectantes (IHMF – Management Strategies Workshop and 3rd Annual Meeting, 1996).

No caso do HHV-7, em pacientes imunossuprimidos, farmacologicamente, os fatores que controlam a sua reativação não são ainda muito claros, mas parecem estar associados ao grau de imunossupressão. Sugere-se que os fatores que controlam a reativação ou o aumento da replicação do HHV-7 em indivíduos imunossuprimidos sejam similares aos previamente identificados para o HCMV (Mendez *et al.*, 2000). A reativação do HHV-7 tem sido associada com febre, mielossupressão, encefalite e pneumonia intersticial (Feldstein *et al.*, 2003).

Um fator que pode causar confusão na análise do HHV-7 em sangue periférico e em outros órgãos, usando a PCR é a detecção potencial de infecção latente (Griffiths *et al.*, 2000). Contudo, a detecção do HHV-7 em soro ou plasma é indicativa de replicação viral ativa (Canadá Communicable Disease Report, 2000).

Após imunossupressão farmacológica em transplantes de órgãos o vírus pode-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 ocorrerem 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 no caso de 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 reinfecção adquirida podem também ocorrer, concomitantemente, no mesmo indivíduo (Canadá Communicable Disease Report, 2000).

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 método de detecção de infecção ativa utilizado; testes sorológicos, cultura ou Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Razonable *et al.*, 2002).

## **1.8- Diagnóstico Laboratorial**

### 1.8.1- Microscopia Eletrônica

A vantagem deste método é sua rapidez, pois pode dar um resultado positivo em 15 a 30 minutos, além da possibilidade de se examinar materiais eventualmente contaminados por fungos ou bactérias, que não são apropriados para isolamento viral. Contudo, além de necessitar de equipamento sofisticado e pessoal altamente treinado, possui uma sensibilidade relativamente baixa, só detectando os herpesvírus em amostras que tenham altas concentrações virais. Não é exame usado na rotina (Panutti, 2001).

### 1.8.2- Isolamento Viral por Cultura Clássica

O HCMV pode ser isolado de materiais biológicos variados: urina, saliva, secreções cervicais, sêmen, leite, sangue, lavado e aspirado de órgãos e homogenados de tecidos sólidos. Por ser um vírus lábil, o material colhido deve ser processado imediatamente. Caso haja necessidade de conservação ou transporte, é aceitável uma temperatura em torno de 4°C procurando-se evitar o congelamento. Independentemente do material clínico, o isolamento do HCMV em cultura é demorado (Costa, 1999).

O diagnóstico clássico utilizado para demonstrar infecção ativa por HCMV é a inoculação do material suspeito em cultura de fibroblastos humanos, única linhagem celular que permite sua replicação “in vitro”. Porém, além da complexidade envolvida com os métodos de cultura celular, a lenta replicação do vírus faz com que seja necessário um período mínimo de 25 dias para o resultado final (Weller, 1962; Weller, 1971, Panutti, 1984).

O isolamento do HHV-6 foi a técnica originalmente utilizada para identificação desse herpesvírus. O isolamento é realizado cultivando-se, em conjunto, células mononucleares (CMN) do sangue periférico do paciente com CMN obtidas do sangue do cordão umbilical de recém nascidos (Inoue et al., 1993). Cultura de HHV-6 pode ser obtida por co-cultivação de amostras clínicas com linfoblastos ou preparado de linfócitos de cordão (Singh & Carrigan, 1996).

Foi desenvolvido um rápido ensaio (antígenos precoces) que pode detectar infecção ativa do HHV-6 em 72 horas. Nesse ensaio, células mononucleares de sangue periférico são inoculadas em fibroblastos diplóides humanos por 48 horas, sendo estes fibroblastos, marcados com antisoro específico para o principal antígeno do HHV-6 (Singh & Carrigan, 1996).

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 adicionadas ao meio de cultura, o número de células que apresenta 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 linfoblastóide – Células SupT1 foi descrita em detalhes por Ablashi et al. (1998).

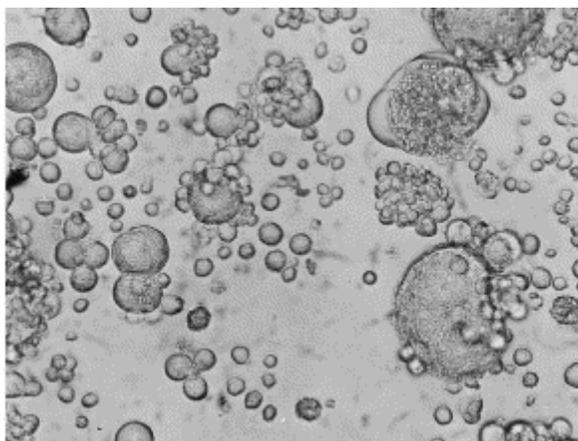
Para que se possa fazer o isolamento do HHV-7 é necessário dispor de células mononucleares de cordão umbilical. Estas células precisam ser coletadas na sala de parto tão logo quanto possível. A coleta é feita com seringa após o cordão ter sido cortado e o sangue é introduzido em tubos estéreis contendo 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 6) pode aparecer e consiste de pleomorfismo, formação de sincício e de células gigantes, que atingem 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 na 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 6-** Efeitos citopáticos provocados pelo HHV-7 em cultura de células SupT1 (Ablashi et al., 1998).

### 1.8.3- Métodos Sorológicos

Os métodos sorológicos detectam anticorpos IgM e IgG contra o HCMV e são importantes na identificação da fase da infecção (Chou, 1990), porém apresentam algumas limitações importantes, como, por exemplo, no caso de pacientes imunossuprimidos, que

podem apresentar infecção grave e, dependendo do grau de imunossupressão, ocorrem resultados falso-negativos. Além disso, a detecção por métodos sorológicos nunca é precoce e necessita muitas vezes de acompanhamento com exames periódicos para definição diagnóstica. Mais recentemente, o uso de testes imunoenzimáticos (ELISA) com anticorpos monoclonais para a detecção de partículas virais na urina ou soro tem sido feito (Mckeating, 1985).

A introdução de testes laboratoriais rápidos e precoces permite aos clínicos detectar a replicação viral e diagnosticar, conseqüentemente, a infecção ativa por HCMV antes do início da doença. Isso proporciona a oportunidade de iniciar o tratamento antiviral precocemente (Sia & Patel, 2000). Essa terapia chamada de precoce (“pre-clínica”) é definida como tratamento altamente efetivo, administrado por um curto período em indivíduos que se apresentam com alto risco de desenvolver doença por HCMV (Rubin, 1991).

O diagnóstico precoce da infecção por HCMV pode ser realizado por: imunocitoquímica de fibroblastos humanos infectados, o DEAFF (detection of early antigen fluorescent foci) ou “shell vial” (Griffiths et al, 1984); por antigenemia, com a expressão da fosfoproteína de 65 kDa (pp65) da matriz do HCMV em leucócitos do sangue periférico (van der Bij *et al.*, 1988a, van der Bij *et al.*, 1988b); pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de seqüências de ácidos nucléicos virais (Demmler *et al.*, 1988; Shibata *et al.*, 1988; Jiwa *et al.*, 1989; Einsele *et al.*, 1995) e por outros métodos moleculares, tais como a PCR quantitativa, Nuclisens *pp67* Nasba, e Captura híbrida (Recommendations of CDC, 2000).

Quando ocorre a infecção primária pelo HHV-7 em indivíduos imunocompetentes, os anticorpos da 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 dos anticorpos da classe IgG indica contato prévio, recente ou antigo com o 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 minimizar 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 a 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 um 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 (Tomasini *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 certa reatividade cruzada entre o HHV-7 e o HHV-6. Por isso, consideram-se aceitáveis 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 quando 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).

#### 1.8.4- Detecção de Antígenos Virais (antigenemia)

O método da antigenemia foi considerado um grande avanço no diagnóstico da infecção por **HCMV** em transplantes de órgãos. A presença de leucócitos do sangue periférico na antigenemia proporciona um marcador precoce de infecção ativa pelo HCMV

e é um teste rápido (Van der Berg *et al.*,1991). Esse método depende do uso de anticorpos monoclonais que detectam o antígeno viral pp65, uma proteína estrutural expressa nos leucócitos do sangue durante a fase precoce do ciclo de replicação do HCMV.

Este teste é limitado à detecção de antígenos virais nos leucócitos. O resultado não somente qualitativo, mas também quantitativo, correlaciona a viremia com a gravidade da doença clínica (Lo *et al.*, 1997; Niubó *et al.*,1996; The *et al.*,1992).

O teste de antigenemia consiste em: isolamento dos leucócitos do sangue periférico pela sedimentação com dextran, lise direta de leucócitos, preparação de lâminas microscópicas, imunocoloração com o uso de anticorpos monoclonais (C10 e C11) contra o HCMV, avaliação microscópica e contagem quantitativa (Erice *et al.*,1995; Ho *et al.*,1998; The *et al.*, 1990; The *et al.*,1995). As lâminas citocentrifugadas contêm um dado número de células que são preparadas por centrifugação com um sobrenadante rico em leucócitos. A fixação das lâminas é feita com acetona ou formaldeído; sendo que resultados superiores foram obtidos com a fixação com formaldeído (Boeckh *et al.*, 1994; Gerna *et al.*,1992; The *et al.*,1992).

A imunodeteção do antígeno do HCMV é possível através dos métodos de imunoperoxidase indireta ou imunofluorescência indireta (The *et al.*,1995). Em 1988, Win Van der Bij acreditava que diagnósticos rápidos de infecção ativa por HCMV eram de grande importância para evitar o excesso de tratamento com drogas imunossupressoras (em receptores de transplantes) e guiar a terapia antiviral. A demonstração do HCMV em amostras de sangue é particularmente importante porque a viremia por HCMV é considerada um marcador de infecção ativa, demonstrando boa correlação com doença grave. A detecção do antígeno de HCMV em leucócitos do sangue periférico (antigenemia) é demonstrada como uma técnica rápida (5 h) e sensível na detecção de HCMV (Van der Bij *et al.*,1988a; The *et al.*,1990).

O teste de antigenemia é um método sensível para a estimativa da carga viral sistêmica do HCMV. O método é uma boa escolha para laboratórios que possuem volume baixo a médio de testes, sendo considerado o mais adequado para guiar a início da terapia precoce e para a monitorização da eficácia do tratamento com ganciclovir

(Gondo *et al.*, 1994). A desvantagem é que a amostra deve ser processada em curto espaço de tempo, sendo recomendável até 8 horas após a coleta para não haver a diminuição da sensibilidade. Em pacientes com grave neutropenia o exame não pode ser realizado devido à baixa contagem de granulócitos. Alternativamente, a PCR para HCMV no plasma ou soro pode ser realizada nessa situação (Solano *et al.*, 2001; Boeckh & Boinvin, 1998; Boeckh *et al.*, 1992).

O teste de antigenemia para detecção de antígenos virais do **HHV-6**, é um método que detecta o antígeno do vírus específico em PBMCs (células mononucleares de sangue periférico). As PBMCs são isoladas por gradiente de densidade (Ficoll-Paque) e centrifugadas em cortes microscópios. A presença dos antígenos virais nas citopreparações é demonstrada por coloração indireta da imunoperoxidase e por anticorpos monoclonais (MAB8533 e MAB8535) contra um antígeno específico para HHV-6 precoce (A e B) (Launtenschager *et al.*, 2002). A especificidade dos anticorpos encontra-se descrita na literatura do fabricante (Chemicon). A imunoglobulina G (IgG) do rato normal é utilizada como controle negativo para ligação não-específica. Um anticorpo monoclonal e um conjugado (anti-anticorpo) são usados como segundo e terceiro anticorpos. A reação é, então, revelada com uma solução de 3-amino-9 etil carbazol contendo peróxido de hidrogênio, e uma solução de hematoxilina de Mayer como contra-corante.

Um método para determinação da antigenemia para **HHV-7** (monoclonal) 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 rato contra os antígenos precoce e tardio do HHV-7 gp110/160, respectivamente.

O HHV-7, quando utiliza os linfócitos para se replicar, induz, obviamente, a produção de proteínas virais, as quais podem ser detectadas através da reação com anticorpos monoclonais. Podem ser utilizados anticorpos contra várias proteínas do vírus, mas é essencial que se usem anticorpos contra proteínas específicas do HHV-7 (anticorpos monoclonais).

A reação de imunoperoxidase é realizada usando anticorpos anti-camundongo de coelho e de cabra anti-coelho conjugados à peroxidase como segundo e terceiro anticorpos. 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 7). A reação positiva é encontrada, usualmente, em linfócitos (Launtenschager *et al.*, 2002, Härmä *et al.*, 2006).

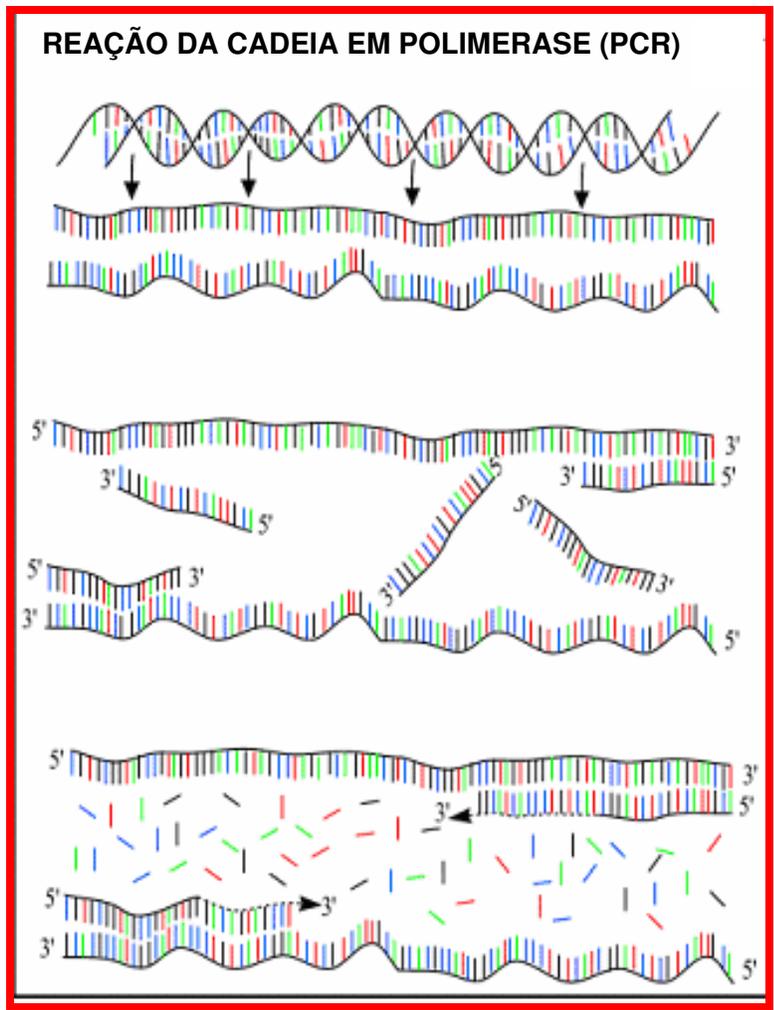
#### 1.8.5- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas (Pozo & Tenório, 1999).

O procedimento consiste de repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de dois “primers” ou oligonucleotídeos iniciadores, com orientações opostas, isto é, dois segmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos com seqüências complementares às duas extremidades do fragmento-alvo e levados a efeito por uma reação enzimática mediada pela polimerase de atividade em elevadas temperaturas (Taq polimerase).

Cada ciclo de reação de amplificação é constituído por três fases distintas:

- **Desnaturação:** separação da dupla fita do DNA a ser amplificado;
- **Anelamento:** ligação complementar entre os iniciadores (primers) e o DNA;
- **Extensão:** síntese do DNA pela enzima Taq-polimerase, que é utilizada para replicar as fitas do DNA.



**Etapa 1:  
DESNATURAÇÃO**

**Etapa 2:  
ANELAMENTO**

**Etapa 3:  
EXTENSÃO**

**Figura 7-** Reação em Cadeia da polimerase (Andy Vierstraete, 1999).

(<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>) – com modificações

O tipo de amostra e o método de extração de DNA devem ser cuidadosamente escolhidos, pois extratos de DNA não bem preparados podem conter proteínas que inibem a PCR (Griffiths *et al.*, 1999).

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 pouca ou nenhuma mutação para que não haja reações falso-negativas (Griffiths *et al.*, 1999).

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 alvos do vírus (Griffiths *et al.*, 1999).

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).

Com a introdução da amplificação de DNA por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Saiki *et al.*, 1985), a detecção do **HCMV** foi levada a efeito em amostras contendo pequeno número de cópias do vírus (Shibata *et al.*, 1988; Demmler *et al.*, 1988; Olive *et al.*, 1989). 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 presente na amostra analisada (Costa *et al.*, 1992).

O DNA do **HHV-6** pode ser detectado pela PCR (Kadokia *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1996; Drobyski *et al.*, 1993) sendo que infecção latente pelo HHV-6 pode ser detectada pela PCR se for utilizado DNA extraído de células do sangue periférico (Carrigan, 1996). Assim, a detecção do DNA do HHV-6 em soro ou plasma pela PCR é uma alternativa para o diagnóstico da infecção ativa pelo HHV-6 (Secchiero *et al.*, 1996).

No caso do HHV-7, admite-se que o DNA extraído de soro ou plasma seja o mais 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). 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).

A PCR é um método rápido (4-6 h), específico e extremamente sensível, porém, devido à sua alta sensibilidade, os principais problemas são os resultados falso-positivos que podem ocorrer por contaminação durante a execução do teste. Resultados falso-negativos podem ser causados pela variabilidade genética das cepas ou pela presença de inibidores (The *et al.*, 1992). Uma importante vantagem da PCR é que as amostras podem ser estocadas em temperatura ambiente por períodos maiores do que 72 horas, sem que haja uma diminuição significativa nos níveis de DNA (Roberts *et al.*, 1997).

O aumento da especificidade e sensibilidade da PCR foi alcançado pela “Nested-PCR”, na qual o produto da primeira PCR é submetido à nova reação de amplificação utilizando-se um par de “primers” internos ao primeiro (Brytting *et al.*, 1991).

### **1.9- Tratamento da Infecção Ativa pelos Herpesvírus 5 (HCMV), 6 (HHV-6) e 7 (HHV-7)**

A incidência de doença precoce pelo **HCMV** (dentro dos primeiros 100 dias após o transplante) tem diminuído substancialmente com o uso de profilaxia ou de terapia precoce com ganciclovir. Infelizmente, essa estratégia tem sido acompanhada por um aumento na incidência de doença tardia pelo HCMV (Boeckh *et al.*, 1996a; Boeckh *et al.*, 1999). Estudos têm demonstrado que a utilização precoce da terapia antiviral atrasa a reconstituição da imunidade do hospedeiro contra o vírus, colocando os pacientes

em risco de doença tardia quando tal terapia é descontinuada (Li *et al.*, 1994; Boeckh *et al.*, 1996b).

O tratamento da doença ativa causada por este vírus está limitado no Brasil a pacientes imunocomprometidos e restrita a dois agentes antivirais: ganciclovir e foscarnet, ambos com ação inibidora da replicação viral (Balfour, 1990).

Uma vez que a infecção aguda por **HHV-6** em imunocompetentes geralmente segue um curso benigno e autolimitado em crianças e adultos, raramente há necessidade de tratamento antiviral específico. Em imunodeprimidos, o curso da infecção pelo HHV-6 ainda não está bem determinado. Vários estudos *in vitro* avaliaram a eficácia de diversos agentes antivirais na replicação deste herpesvírus (Santos, 2000).

A susceptibilidade antiviral do HHV-6 geralmente se parece com a do citomegalovírus: O HHV-6 é menos sensível ao aciclovir, mas é suscetível ao ganciclovir e ao foscarnet. Ambos são eficazes, *in vitro*, contra o HHV-6. O aciclovir não é eficaz para o tratamento de infecção pelo HHV-6, segundo relatos de estudo *in vitro* (Singh & Carrigan, 1996).

O ganciclovir pode causar granulocitopenia, trombocitopenia, azoospermia e elevação da creatinina sérica (Crumpacker, 1996).

Não há ainda um consenso em relação à eficácia da terapia antiviral para a infecção pelo **HHV-7**. Estudos *in vitro* sugerem que o ganciclovir usado de forma oral não afeta a replicação do HHV-7. 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 dificulta um estudo randomizado de atividade antiviral no período pós-transplante (Razonable *et al.*, 2003).

Terapia precoce (*terapia pré-clínica*), refere-se ao programa que dá início à terapia com ganciclovir a partir dos testes de monitorização com resultados positivos para infecção ativa por HCMV em pacientes assintomáticos (Avery, 2000).

Após a implantação do protocolo de diagnóstico e monitorização da Infecção ativa por HCMV nos pacientes do Serviço de Transplante de Medula Óssea da UNICAMP/HEMOCENTRO a partir do trabalho de Bonon e col. (2005), o STMO passou a utilizar a terapia precoce (pré-emptive therapy) como estratégia de prevenção da doença por HCMV após o transplante (Bonon *et al.*, 2005).

**Tabela 1-** Protocolo de Tratamento Precoce de Infecção Ativa pelo HCMV e doença guiada pela positivação dos testes de monitorização.

ESQUEMA	DOSE - GANCICLOVIR
❖ Tratamento da Infecção Ativa	10 mg/kg/dia, por 7 dias + manutenção
❖ Manutenção	5 mg/kg/dia, 3 vezes por semana até 12 doses
❖ Tratamento da Doença	10 mg/kg/dia, por 21 dias + manutenção
❖ Manutenção	5 mg/kg/dia, 3 vezes por semana até 12 doses

### 1.10- Fatores de Risco

Conhecer o status sorológico em relação ao HCMV de um indivíduo imunossuprimido é importante, já que a soropositividade reflete uma infecção anterior e, portanto, todos os indivíduos soropositivos abrigam o HCMV de forma latente, sendo que o vírus pode reativar a qualquer momento. No receptor de transplante de órgãos, o conhecimento do status sorológico pré-transplante é necessário para permitir relacionar, quando possível, doadores HCMV-negativos com receptores soronegativos. A relação entre o soro-status/HCMV do doador e do receptor reduz significativamente a incidência de doença por HCMV nesses pacientes (Pillay, 1993).

Antes do uso do ganciclovir profilático, a citomegalovirose era a causa mais comum de morbidade e mortalidade após o transplante de células progenitoras hematopoiéticas. Na ausência da profilaxia antiviral, a doença pelo HCMV ocorria entre 30 a 100 dias após o transplante em 70% dos receptores HCMV soropositivos e em 25 a 40% dos receptores HCMV soronegativos recebendo medula soropositiva ou produtos sanguíneos não filtrados (Bowden *et al.*, 1986; Miller *et al.*, 1991).

O uso de produtos sanguíneos HCMV soronegativos tem reduzido a incidência de infecção por HCMV em receptores HCMV soronegativos em aproximadamente 3% a 6% (Miller *et al.*, 1991).

Os pacientes que têm um risco menor são os pacientes HCMV-soronegativos com um doador soronegativo. Nestes pacientes, o maior fator de risco de infecção pelo HCMV é o uso de produtos sanguíneos de doadores soropositivos (Tabela 2) (Stochi *et al.*, 1998). O risco de doença é primariamente dependente do risco da infecção ativa por HCMV (Meyers, 1990). Os fatores secundários incluem doença grave do enxerto contra o hospedeiro (GVHD ou DECH) (Winston *et al.*, 1990), o transplante de um doador não-relacionado (Marks *et al.*, 1993) e o atraso na reconstituição da resposta da célula T citotóxica HCMV-específica (Li *et al.*, 1994).

**Tabela 2-** Risco de doença por HCMV após TCPH alogênico em relação ao *status* sorológico doador/receptor.

Anticorpos HCMV		Risco de doença por HCMV	
Doador	Receptor	Doador Relacionado	Doador Não-Relacionado
		<b>Muito Baixo</b>	<b>Muito Baixo</b>
Negativo	Negativo	(Herman <i>et al.</i> , 1982; Bowden <i>et al.</i> , 1986)	(Herman <i>et al.</i> , 1982; Bowden <i>et al.</i> , 1986)
		<b>Moderado</b>	<b>Moderado</b>
Negativo	Positivo	(Meyers <i>et al.</i> , 1986; Goodrich <i>et al.</i> , 1994)	(Meyers <i>et al.</i> , 1986; Goodrich <i>et al.</i> , 1994)
		<b>Alto</b>	<b>Muito Alto</b>
Positivo	Negativo	((Meyers <i>et al.</i> , 1986; Goodrich <i>et al.</i> , 1994)	(Meyers <i>et al.</i> , 1986; Goodrich <i>et al.</i> , 1994)

A graduação clínica da doença aguda do enxerto contra o hospedeiro é baseada no estadiamento clínico, levando-se em consideração, a percentagem da superfície corporal que apresenta envolvimento cutâneo com confirmação histológica, os níveis sanguíneos de bilirrubinas e o volume diário de diarreia (Pzepiorka *et al.*, 1995). Baseado então neste estadiamento clínico, a graduação desta reação pode ser dividida em graus que variam de 0 a IV. O grau zero significa ausência de GVHD; o grau I (leve) compreende apenas

envolvimento cutâneo, variando de 25% de comprometimento da superfície corpórea; no grau II (moderado) a alteração da pele pode variar de 25% até a 50% eritrodermia máculopapular generalizada, o nível sérico de bilirrubinas entre 3 e 6 mg/dL e o volume diarréico de 1.000 mL - 1.500 mL ao dia; o grau III (grave) compreende o envolvimento cutâneo de eritrodermia generalizada, níveis séricos de bilirrubinas entre 3 a 15 mg/dL, e o volume de diarréia de mais de 1500 mL ao dia; o grau IV representa uma situação de extremo risco de vida, onde o comprometimento de eritrodermia generalizada com descamação e formação de bolhas cutâneas, sendo que o nível de bilirrubinas maior de 15 mg/dL, e o volume diário de diarréia acima de 1.000 mL, até o aparecimento de dor abdominal e de íleo paralítico (Dulley, 1997).

A graduação deste tipo de reação apresenta interesse tanto para definir a conduta terapêutica, como para avaliar as porcentagens de sobrevida e as incidências de infecções. A Tabela 3 ilustra a graduação e o estadiamento clínico desta reação (Thomas *et al.*, 1975; Pzepiorcka *et al.*, 1995).

**Tabela 3-** Graduação do estadiamento clínico da *GVHD aguda*.

<i>Graduação Clínica da GVHD aguda</i>			
	<b>Pele</b>	<b>Fígado</b>	<b>Intestino</b>
+	Eritema máculopapular <25% SAC*	Bilirrubina 2-3mg/dl	Diarréia 500-1000ml/dia
++	Eritema máculopapular 25-50% SAC*	Bilirrubina 3-6mg/dl	Diarréia 1000-1500ml/dia
+++	Eritrodermia generalizada	Bilirrubina 6-15mg/dl	Diarréia >1500ml/dia
++++	Descamação e bolhas	Bilirrubina >15mg/dl	Dor abdominal ou íleo paralítico
*SAC	Superfície de área corpórea		

<i>Graduação da GVHD aguda</i>				
	<b>Estágio</b>			<b>Dano Funcional</b>
<b>Graus</b>	<b>Pele</b>	<b>Fígado</b>	<b>Intestino</b>	
<b>0 (nenhum)</b>	0	0	0	0
<b>I (leve)</b>	+ a ++	0	0	0
<b>II (moderado)</b>	+ a +++	+	+	+
<b>III (grave)</b>	++ a +++	++ a +++	++ a +++	++
<b>IV (risco de vida)</b>	++ a ++++	++ a ++++	++ a ++++	+++

(Thomas *et al.*, 1975)

**Tabela 4-** Fatores de risco (primários/secundários) pós transplante para doença por HCMV.

Fatores Primários		Fatores Secundários	
D+/R-	(Meyers, 1990)	GVHD	(Winston <i>et al.</i> , 1990)
Infecção Ativa	(Meyers, 1990)	Transplante de doador não-relacionado	(Marks <i>et al.</i> , 1993)
		Atraso na reconstituição da resposta da célula T citotóxica HCMV-específica	(Li <i>et al.</i> , 1994)

### 1.11- Histórico dos Transplantes de Medula Óssea no Hemocentro/Unicamp

No nosso controle histórico, a utilização do protocolo de profilaxia universal usando ganciclovir endovenoso em baixas doses em receptores alogênicos de medula óssea e de células progenitoras periféricas começou a ser realizada em Setembro de 1993. Quarenta e quatro pacientes receberam ganciclovir quando a contagem de neutrófilos atingiu  $1.000 \text{ mm}^3$  e plaquetas  $30.000 \text{ mm}^3$ . A dose utilizada foi de  $5\text{mg/kg/dia}$ , 3 dias por semana, através de cateter central ou veia periférica até o dia +75. O status sorológico não foi utilizado como critério de exclusão ou inclusão no estudo. Não foram utilizadas técnicas de monitorização de infecção ativa pelo HCMV no período pós-transplante. Se a infecção ativa fosse suspeitada, o teste de PCR era realizado em amostras de sangue e/ou urina e/ou lavado brônquico. A detecção do DNA do HCMV por PCR ocorreu em 5 pacientes (11%). Somente 2 pacientes, destes 5 (4,5%) tiveram diagnóstico confirmado de doença por HCMV: 01 teve pneumonia intersticial e o outro colite. Ambos se recuperaram com a instituição de tratamento com ganciclovir em doses convencionais. Sete óbitos ocorreram (16%), porém, nenhuma morte foi atribuída ao HCMV ou à toxicidade pelo ganciclovir (Azevedo *et al.*, 1996).

A monitorização laboratorial da infecção ativa pelo citomegalovírus nos pacientes transplantados de medula óssea e células precursoras periféricas começou a ser realizada a partir do segundo semestre de 1996, sendo feita com PCR semanal e sorologia mensais em 42 pacientes até 150 dias após o transplante. A profilaxia foi realizada com um

protocolo de ganciclovir em 5mg/Kg/dia desde a pega do enxerto até 150 dias após o transplante. Os resultados preliminares deste protocolo foram apresentados na 2ª Reunião da Sociedade Européia de Hematologia (Br J Haematol 1996, 93 (supp.2), p.250). Durante a monitorização, entre os 42 pacientes, 18 apresentaram 2 ou mais PCR positivos (42,8%), caracterizando infecção ativa pelo HCMV. Desses, 3 pacientes apresentaram doença por HCMV (7,14%). Foi confirmado diagnóstico de doença por HCMV no trato gastrointestinal (TGI) em 3 desses pacientes. Destes, um óbito por HCMV ocorreu (33,3%).

No Serviço de Transplante de Medula Óssea da UNICAMP/HEMOCENTRO, foram utilizadas estratégias híbridas, porém, a profilaxia universal com ganciclovir ocorreu em 5mg/Kg/dia, com a intenção de minimizar os efeitos colaterais da droga, tais como a neutropenia.

Anteriormente à conclusão do trabalho Bonon e col. (2004), ganciclovir universal era administrado neste Serviço, em todos os pacientes TCHP, exceto naqueles com diagnóstico de anemia aplástica ou com o padrão sorológico IgG-HCMV doador e receptor negativos (Br J Haematol 1996, 93 (supp.2), p.250). Com a implantação do protocolo de diagnóstico e monitorização da infecção ativa por HCMV nestes pacientes a partir do trabalho de Bonon e col. (2004), o Serviço de Transplantes passou a utilizar a terapia precoce (*pre-emptive therapy*) como estratégia de prevenção da doença por HCMV após o transplante (Bonon *et al.*, 2002; Bonon *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 (Ihira *et al.*, 2001).

A possibilidade de se fazer diagnóstico precoce é o melhor indicativo para um tratamento também precoce mais eficiente (Maya & Azulay, 2001).

## ***2- OBJETIVOS***

## **2.1- Os objetivos do presente trabalho**

- 1- Monitorizar, prospectivamente pacientes submetidos a TCPH em relação à infecção ativa causada pelos  $\beta$ -herpesvírus (HCMV, HHV-6, HHV-7) utilizando as técnicas de nested PCR para esses vírus;
- 2- Avaliar o impacto clínico destas viroses nos pacientes transplantados estudados.

### ***3- CASUÍSTICA E MÉTODOS***

### 3.1- Casuística

O presente estudo foi aprovado e acompanhado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

Foram estudados prospectivamente, 43 pacientes submetidos a transplantes alogênicos de medula óssea (MO) e/ou de célula precursora periférica (CPP), acompanhados no Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO) do Hospital das Clínicas da UNICAMP/HEMOCENTRO.

A monitorização teve início no dia zero do transplante e foi realizada até 150 dias após este (ou até o óbito), semanalmente.

Foram coletadas amostras de sangue em tubos contendo como anticoagulante EDTA e amostras de soro em tubo estéril seco, de todos os pacientes submetidos ao transplante durante o período de estudo.

Os pacientes incluídos no presente estudo foram submetidos a transplantes alogênicos de medula óssea (MO) e/ou células precursoras periféricas (CPP).

Além disso, houve a disponibilidade da coleta semanal de amostras de sangue e de soro de todos os pacientes receptores, no dia do transplante e no pós-transplante.

Todas as amostras usadas estavam em condições adequadas para a realização dos testes laboratoriais necessários ao presente estudo: nested PCR para detecção dos vírus HCMV, HHV-6 e HHV-7.

A análise estatística foi realizada através de estatística descritiva e pela comparação das variáveis categóricas usando o Teste Exato de Fisher. Valor de  $p < 0,05$  foi considerado, estatisticamente, significativo.

#### 3.1.1- Características dos doadores

Foram avaliados 43 doadores (referentes aos receptores incluídos no estudo), irmãos, HLA idênticos, sendo que 23 foram doadores do sexo masculino (53,5%) e 20 foram doadores do sexo feminino (46,5%). A soropositividade, ELISA IgG para o HCMV entre os doadores foi de 100%.

### 3.1.2- Características dos receptores

Participaram do protocolo de monitorização 43 receptores alogênicos de medula óssea e/ou de células progenitoras periféricas, sendo que 23 foram receptores do sexo masculino e 20 do sexo feminino. A idade mediana dos receptores foi de 38 (variação 22 - 63 anos) (Tabela 5).

**Tabela 5-** Características gerais dos pacientes estudados, incluindo idade, sexo, sorologia, doença de base que motivou o transplante e tipo de enxerto.

Características	N=43
Idade Mediana	38 (22-63)
Sexo (Masculino/Feminino)	23/20
Sorologia p/ CMV	
D+/R+	39(90,7%)
D+/R-	4(9,3%)
Doenças de Base:	
Leucemia Mielóide Crônica (LMC)	18(41,9%)
Leucemia Mielóide Aguda (LMA)	8(18,6%)
Mieloma Múltiplo (MM)	6(14,0%)
Leucemia Linfóide Aguda (LLA)	3(6,9%)
Linfoma Não Hodgkin (LNH)	2(4,65%)
Anemia Aplástica Grave (AA)	3(6,9%)
Sarcoma Granulocítico (SG)	1(2,3%)
Linfoma de Hodgkin (LH)	1(2,3%)
Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN)	1(2,3%)
Tipo de Enxerto:	
Células Periféricas Primordiais (CPP)	26(60,5)
Medula Óssea (MO)	17(39,5)

D+/R+ : doador positivo/receptor positivo  
D+/R- : doador positivo/receptor negativo

### 3.1.3- Protocolo de acompanhamento para a realização das coletas

O protocolo de acompanhamento para a realização das coletas de sangue periférico foi o seguinte (Tabela 6):

- ❖ No dia do transplante: foram coletadas amostras de sangue total e de soro do receptor;
- ❖ Coletas semanais subseqüentes foram realizadas no receptor a partir do dia +7 até o dia +150 após o transplante sempre que possível ou até o óbito ou a perda do enxerto, ocorridos após o primeiro mês de seguimento regular;
- ❖ As amostras foram coletadas durante o período de internação na Enfermaria de Transplante de Medula Óssea do HC/UNICAMP e durante os retornos dos pacientes ao Ambulatório de Transfusão e Quimioterapia do HEMOCENTRO/UNICAMP, pela equipe de enfermagem especializada;
- ❖ As amostras de sangue e de soro foram enviadas após a coleta ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular/FCM/UNICAMP, onde foi realizada a nested PCR para detecção do HCMV, HHV-6 e HHV-7.

**Tabela 6-** Esquema de coletas das amostras de sangue e soro dos pacientes incluídos no estudo.

---

<b>PÓS - TRANSPLANTE</b>
<b>(até dia + 150 - receptor)</b>
❖ PCR semanal (sangue periférico) para detecção do HCMV e HHV-6
❖ PCR semanal (soro) para detecção do HHV-6 e HHV-7

---

#### 3.1.4- Grupo Controle para o estudo molecular do HHV-6 em sangue periférico e soro

Foram estudados 33 indivíduos clinicamente saudáveis, com uma mediana de 27 anos, para realização da “N-PCR” para o HHV-6 e comparação com os resultados dos transplantados estudados.

A padronização procedeu-se após a extração de DNA de sangue periférico e em seguida à realização da amplificação gênica (PCR e Nested-PCR). A reação seguiu o método descrito por Secchiero e col (1995), com algumas modificações padronizadas neste estudo.

Dos 30 voluntários, coletou-se 1 amostra de sangue e 4 ml foram colocados 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. Todos os pacientes clinicamente estudados saudáveis foram negativos para N-PCR no soro, obtendo apenas positividade para o controle da detecção do HHV-6 positivo.

#### 3.1.5- Grupo Controle para o estudo molecular do HHV-7 em sangue periférico e soro

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 e 4 ml foram colocados 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 coletadas amostras de saliva para Nested-PCR e isolamento do vírus HHV-7 (controle positivo). O produto da Nested-PCR foi submetido ao sequenciamento de bases para comprovação da identidade da banda com o genoma viral do HHV-7.

### 3.1.6- Pacientes transplantados

Participaram do protocolo de monitorização 43 receptores alogênicos de medula óssea e/ou de células progenitoras periféricas, sendo que 23 foram receptores do sexo masculino e 20 do sexo feminino. A idade mediana dos receptores foi de 38 anos (variação 22 - 63 anos). Os pacientes não fizeram profilaxia universal para HCMV.

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 e em média semanalmente até o final do estudo (150 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-6 e 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 Transplante de Medula Óssea.

### 3.1.7- Critério utilizado para definição de infecção ativa por HCMV, HHV-6 e HHV-7

- Infecção ativa pelo vírus HCMV foi considerada quando ocorreu reação positiva por Nested-PCR em duas ou mais amostras de DNA consecutivas extraídas de granulócitos de sangue periférico, critério de consenso internacional (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 em duas ou mais amostras consecutivas. Não há até o momento consenso internacional para essa detecção;
- Infecções ativas para o HHV-7 e HHV-6 no soro foram definidas 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 infecção recorrente/reinfecção ou reativação foram avaliadas apenas para o HCMV devido ao fato de sorologia para HHV-6 e HHV-7 não terem sido realizadas.

### 3.1.8- Critérios para caracterizar doença por HCMV

Para caracterização de doença por HCMV, além das evidências laboratoriais de infecção ativa fez-se necessária a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo HCMV (Ljugman, Griffiths & Paya, 2002), a saber:

- Pneumonite: com sintomatologia respiratória e achados radiológicos, combinado com a detecção do HCMV, em lavado brônquico-alveolar ou tecido de pulmão obtido por biópsia;
- Doença gastrointestinal: com sintomatologia compatível com colite, gastrite ou esofagite, associado com histologia ou imuno-histoquímica positiva para HCMV de biópsias de lesões macroscópicas do trato gastrintestinal;
- Hepatite ou colangite: o vírus deve ser demonstrado em biópsias hepáticas, em combinação com aumento de pelo menos duas vezes o valor máximo normal de alanina-amino-transferase (ALT) e achados histopatológicos consistentes com hepatite ou colangite;

- Doenças Neurológicas: sintomatologia compatível com quadro de encefalite, mielite ou doença difusa do sistema nervoso central, juntamente com detecção do HCMV em líquido cefalorraquidiano, por cultura, detecção do antígeno ou PCR;
- Retinite: devem ser observadas lesões oftálmicas típicas, com ou sem provas virológicas, por oftalmologista experiente;

### 3.1.9- Critérios utilizados para caracterizar provável doença por HHV-6 e HHV-7

Para caracterização de provável doença por HHV-6 e HHV-7, além das evidências de infecção ativa citadas anteriormente, é necessária a presença de manifestações clínicas que podem ser divididas em “diretas” e “indiretas”. As primeiras incluem febre, exantema cutâneo, pneumonia intersticial, hepatite, encefalite e citopenias por supressão medular (Boutolleau *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 1996). As mais importantes manifestações clínicas desses vírus são os denominados “efeitos indiretos”. Estes podem resultar de uma ativação de fenômenos imunológicos que podem causar disfunção e rejeição do enxerto e infecções oportunistas (Griffiths *et al.*, 2001; Ljungman, 2002) (Tabela 7).

**Tabela 7-** Manifestações Clínicas possivelmente associadas à infecção por HHV-6 e HHV-7 em receptores de transplante. Efeitos diretos e efeitos indiretos.

Efeitos	Manifestações clínicas
Diretos	Febre Exantema súbito Mielossupressão Hepatite Encefalite Pneumonite Síndrome viral
Indiretos	Doença Invasiva por HCMV Interação e coinfeção com outros vírus Aumento de infecções oportunistas Disfunção e Rejeição de enxerto

(Griffiths *et al.*, 2001; Ljungman, 2002)

## 3.2- Métodos

### 3.2.1- Extração de DNA de sangue total

Foram coletados de 5 a 10 mL de sangue em tubo contendo como anticoagulante EDTA. Este material foi transferido para tubos de plástico de 15 mL (tipo Falcon). Os leucócitos foram, então separados por sedimentação com dextran a 5% diluído em PBS, pH 7.4 (sangue/dextran na proporção 4:1), homogeneizando-se gentilmente as amostras por inversão e colocando-as em estante inclinada para tubos em ângulo de 45 graus por 30 minutos, sendo mantidas em estufa à temperatura de 37° C. Após esse período, usando Pipeta tipo Pasteur, o sobrenadante rico em leucócitos polimorfonucleares foi transferido para outro tubo de plástico de 15 mL e centrifugado 10 minutos a 1200 rpm. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi agitado em vórtex vigorosamente. Para remoção das células vermelhas persistentes, o sedimento celular foi suspenso em 10 mL de solução de cloreto de amônio gelado, pH 7.4, homogeneizado e mantido à temperatura de 4° C por 10 minutos, sendo realizada a

centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado novamente e o sedimento celular lavado com PBS e centrifugado 10 minutos a 1200 rpm, sendo esse procedimento realizado por duas ou três vezes. O sedimento celular foi então ressuspenso em volume de 200 mL a 1000 mL de PBS.

### 3.2.2- Lise de Leucócitos

O precipitado de leucócitos foi centrifugado e o pellet lisado em solução de TKM1 (Tris - HCl 10 mM (pH 7.6); KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM e EDTA 20 mM), 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, após isso descartado e ao precipitado foi adicionada uma solução de TKM2, 8 mL de solução contendo Tris - HCl 10 mM (pH 7.6); NaCl 0,4 M; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; KCl 10 mM; EDTA 2 mM e 0,025 mM de duodecil sulfato de sódio (SDS) 20%. Em seguida, o material foi incubado por 40 minutos a uma temperatura de 56° C e, após a incubação foi adicionado um volume de 0,3 mL de NaCl 5 M, sobrenadante e transferindo o precipitado para outro tubo.

Depois da transferência da fase aquosa para outro tubo, foi realizada a precipitação do ácido nucléico 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 água destilada, deionizada e estéril e deixado em banho-maria a 37°C por 8 horas.

### 3.2.3- Extração de DNA de soro

O material biológico (soro, saliva ou cultura) foi incubado em tubos tipo Eppendorf por 2 horas a 56 °C com Proteinase K-Tampão (composto por Tampão Tris HCl pH 8,3 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DODECIL sulfato de sódio (SDS)10%, Proteinase K 10 mg/ mL) na seguinte proporção:

- Material Biológico 200 µl

- Proteinase K –Tampão 100 µl

Adicionaram-se 200 µl de uma solução de fenol-clorofórmio (na proporção de 1:1), homogeneizando-se a mistura por 15 segundos em agitador mecânico e centrifugando-se a 15.000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada à 10°C.

Removeu-se o sobrenadante para outro tubo, sendo este processo realizado por mais duas vezes.

Ao sobrenadante, adicionaram-se 25 µl de Acetato de Sódio 3M gelado e 900 mL de etanol absoluto. Agitou-se bem e incubou-se em banho de gelo por 10 minutos. Centrifugou-se a 15.000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e sendo o precipitado seco com os tubos invertidos e protegidos da exposição a contaminantes por 8 horas. O precipitado foi ressuspensão em 25 µl de Tampão Tris-EDTA-Borato. O DNA, assim obtido, foi mantido congelado até o momento da análise (Sechiero et al, 1995).

### **3.3- Reação em cadeia da polimerase utilizando primers para detecção do gene da betaglobina humana para controle interno da reação**

A amplificação de um fragmento do gene da Beta-Globina ( $\beta$ -Globina) humana foi utilizada a fim de verificar a qualidade do DNA em todas as amostras testadas. O produto obtido, de 110 pares de bases indicou principalmente a presença de DNA nas amostras e a qualidade do DNA extraído, mostrando que não há substâncias inibidoras da reação e, garantindo assim, um controle interno de qualidade do experimento, indispensável à segurança dos resultados obtidos.

A reação em cadeia da polimerase para detecção do gene da beta globina humana seguiu o método descrito por Saiki e col. (1988).

Foram realizados 40 ciclos de amplificação para cada amostra em termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA), obedecendo-se às seguintes temperaturas e seus respectivos tempos: desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos, desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 55° C por 1 minuto, extensão a 72° C por 2 minutos e, para finalizar, extensão final a 72° C por 8 minutos.

Foram utilizados os primers PCO3 e PCO4, obtendo-se um produto final de amplificação de 110 pares de bases.

**Tabela 8-** Demonstra-se em seguida a seqüência de primers utilizados, que flanqueiam uma região conservada do gene da betaglobina humana.

Primer	Seqüência (5' → 3')	Sentido
PCO3	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC	Sense
PCO4	CAA CTT CAT CCA CGT TTC ACC	Antisense

### 3.4- Detecção do DNA do citomegalovírus humano (HCMV) pela reação em cadeia da polimerase

A Reação em Cadeia da Polimerase seguiu o método descrito por Saiki e col. (1988), com algumas modificações. Cada reação de amplificação utilizou de 0,5 a 1 µg do DNA (obtido pelo método de extração de DNA anteriormente descrito) em volume total de 20 mL, contendo 50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris (pH 8.4), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 0,1 mM de cada “primer”, 200 mM da mistura desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 2 unidades de Taq DNA polimerase.

Foram complementados 30 ciclos de amplificação para cada amostra e cada ciclo foi constituído de 3 etapas: a) separação das hélices de DNA por aquecimento a 94°C durante 1 minuto; b) ligação complementar entre os “primers” e o DNA em temperatura de 55°C por 1 minuto (anelamento) e c) síntese do DNA pela Taq polimerase, em temperatura de 72°C por 1 minuto (extensão).

Os ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler” - Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn, EUA), sendo as amostras aquecidas inicialmente a 94°C por 7 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que pudesse interferir com a reação enzimática . Após o último ciclo, o período de extensão final 72°C foi de 7 minutos.

Foram usados dois pares de iniciadores que flanqueiam uma região conservada nas diversas cepas de vírus HCMV, não amplificando o DNA de outros herpesvírus.

**Tabela 9-** Demonstra-se em seguida a seqüência dos primers externos e internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HCMV, utilizados na PCR e na nested PCR.

<i>Primers externos *</i>	Seqüência (5' → 3')	Localização do produto amplificado no genoma §
<b>MIE 4</b>	CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C	731-755
<b>MIE 5</b>	CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTG G	1165-1141

\*MIE = Principal antígeno imediatamente precoce - *Human cytomegalovirus (Towne) major immediate-early antigen (MIE) gene, exon 4. (GeneBank HS5MIE4).*

§ Expresso como número de nucleotídeos. Os nucleotídeos são numerados seqüencialmente dentro de cada gene.

O par de primers denominados “primers MIE” amplificam uma seqüência de 435 pares de bases do DNA do HCMV que codifica uma porção do antígeno “major immediate-early” (MIE) do HCMV (cepa Towne). A porção do gene MIE que é amplificada está contida no exon 4 deste gene ( Demmler *et al.*, 1988).

Utilizando-se do mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação foi reamplificado utilizando um par de “primers” interno (Tabela 9).

**Tabela 9-** Seqüência de primers internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HCMV utilizados na nested PCR.

<i>Primers internos</i> *	Seqüência (5' → 3')	Localização do produto amplificado no genoma §
<b>IE 1</b>	CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC	926-945
<b>IE 2</b>	CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC	1087-1067

\* IE = antígeno imediatamente precoce - Human cytomegalovirus (Towne) immediate-early antigen (IE) gene, exon 4. (GeneBank HS5MIE4).

§ Expresso como número de nucleotídeos. Os nucleotídeos são numerados seqüencialmente dentro de cada gene.

O par de primers denominados “primers IE” amplificam uma seqüência de 159 pares de bases do DNA do HCMV que codifica uma porção do antígeno “immediate-early” (IE) do HCMV (cepa Towne). A porção do gene IE que é amplificada está contida no exon 4 deste gene (Stenberg *et al.*,1984).

Utilizando-se uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação, o fragmento foi reamplificado com o uso de um par de “primers” interno, nas mesmas condições da primeira reação de amplificação (PCR).

Após essas 2 reações, 5 mL do produto da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, para visualização do fragmento sob luz ultravioleta. Nas amostras positivas foi observado um fragmento de DNA de 159 pb ao passo que, nas amostras negativas, não foi observado nenhum fragmento.

Em todos os experimentos realizados houve o uso de um controle positivo da reação, a cepa AD-169 do HCMV, e um controle negativo, a água.

### 3.5- Detecção do DNA do Herpesvírus Humano 6 (HHV-6) pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase para o HHV-6 foi realizada. Este consiste de um par de primers externos, EX1 e EX2 e um par de primers interno, IN3 e IN4. Os primers EX1 e EX2 definem uma seqüência alvo de 520 pares de base, enquanto que as partes IN1 e IN2 amplificam um fragmento de 258 pares de base.

**Tabela 10-** Seqüência dos primers externos e internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HHV-6, utilizados na PCR e na nested PCR.

Primers externos *	Seqüência (5' 3')
EX1	GCGTTTTCAGTGTGTAGTTCGGCAG
EX2	TGGCCGCATTCGTACAGATACGGAGG
Primers internos *	Seqüência (5' 3')
IN3	GCTAGAACGTATTTGCTGCAGAACG
IN4	ATCCGAAACAACACTGTCTGACTGGCA

### 3.6- Detecção do DNA do Herpesvírus Humano 7 (HHV-7) pela Reação em Cadeia da Polimerase

As condições da reação seguiram a metodologia clássica da Reação em Cadeia de Polimerase. A Nested-PCR seguiu o método descrito por POZO e col. (1999). Algumas modificações na técnica foram realizadas. O DNA extraído do soro foi processado na quantidade de 5 microlitros 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 primer (sense e antisense), e 1,25 U de Taq DNA Polimerase num total de 50 microlitros 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 de 72°C por 5 minutos.

Uma segunda PCR foi realizado usando 1 microlitro do produto do primeiro PCR e 49 microlitros 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 primer (sense e antisense) , e 1,25 U de Taq DNA Polimerase . As condições da reação foram as mesmas da PCR anterior, com exceção da temperatura de anelamento que será de 47°C. Foeam aplicados 10 microlitros do segundo PCR em gel de Agarose a 2% em tampão TEB (TRIS-EDTA-BORATO) 1 x contendo 0.5 µg/mL de Brometo de Etídio e submetido a eletroforese em imersão e posterior visualização em lâmpada ultravioleta para a comprovação de bandas de DNA de 122 pb usando DNA Ladder 100pb Gibco BRL como padrão de peso molecular.

**Tabela 11-** Seqüência dos primers externos e internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HHV-7, utilizados na PCR e na nested PCR.

<b>Primers externos *</b>	<b>Seqüência (5' 3')</b>
<b>HHV-71+</b>	GCGTTTTTCAGTGTGTAGTTCGGCAG
<b>HHV-7 1-</b>	TGGCCGCATTCGTACAGATACGGAGG
<b>Primers internos *</b>	<b>Seqüência (5' 3')</b>
<b>HHV-7 2+</b>	GCTAGAACGTATTTGCTGCAGAACG
<b>HHV-7 2-</b>	ATCCGAAACAACGTGTCTGACTGGCA

### 3.7- Padronização da Nested-PCR para detecção do HHV-6

Para a 1ª reação de PCR utilizou-se 3,0 µl de DNA a ser estudado em um volume total de 25 µl por reação. Foram adicionados 50 mM de cloreto de potasio, 10 mM de Tris-HCL (pH=8,4); 4,0 mM de cloreto de magnésio; 2,0 pmol de cada primer EX1 e EX2, que flanqueiam 520pb; 0,4 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dTTP, dGTP); 1U de Taq DNA polimerase e água esterilizada suficiente para se completar o volume final de reação de 25 µl.

Quarenta e cinco ciclos foram realizados automaticamente em Termociclador MJ. Os ciclos foram procedidos por um período de desnaturação inicial a 94°C durante 10 minutos e ao final, 10 minutos a 72°C para extensão final.

Os ciclos de amplificação empregados para cada amostra compreenderam:

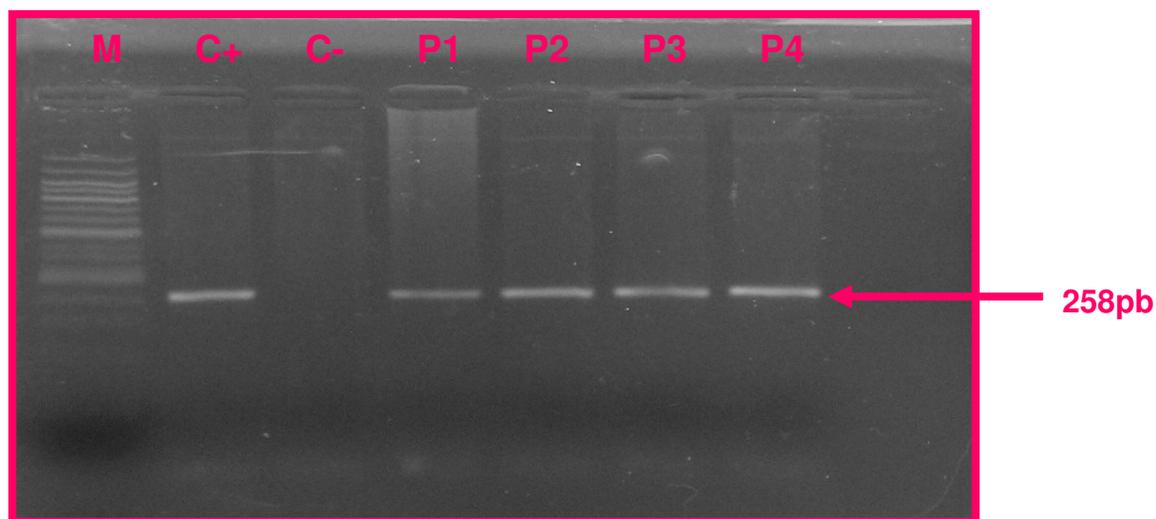
- Desnaturação: 94°C – 1 minuto
- Anelamento: 54°C – 1 minuto
- Extensão: 72°C – 1 minuto

Para a “Nested PCR” as condições foram as mesmas utilizadas na 1ªPCR, sendo que para 2ªreação, uma alíquota de 2,5 µl foi reamplificada com um par de primers (IN3 e IN4), que flanqueiam 258pb, um fragmento interno ao amplificado na 1ª reação.

Quarenta e cinco ciclos foram realizados automaticamente em Termociclador MJ. Os ciclos foram procedidos por um período de desnaturação inicial a 96°C durante 10 minutos e ao final, 10 minutos a 72°C para extensão final.

- Desnaturação: 96°C – 30 segundos
- Anelamento: 56°C – 40 segundos
- Extensão: 72°C – 30 segundos

A “Nested PCR” foi aplicada para detecção de seqüências de DNA do HHV-6 em amostras de sangue periférico e soro de pacientes transplantados de medula óssea.



**Figura 8-** Eletroforese em gel agarose 2% corado com brometo de etídeo, demonstrando a amplificação de um fragmento de 258pb do DNA do HHV-6 com os primers IN-3 e IN-4 (produto da “N-PCR”) em pacientes transplantados de medula óssea.

M (Marcador de peso molecular); C+ (controle positivo); cepa do HHV-6 gentilmente cedida pelo Departamento de Virologia da USP – São Paulo; C- (controle negativo); P1,P2,P3,P4 (pacientes positivos para HHV-6).

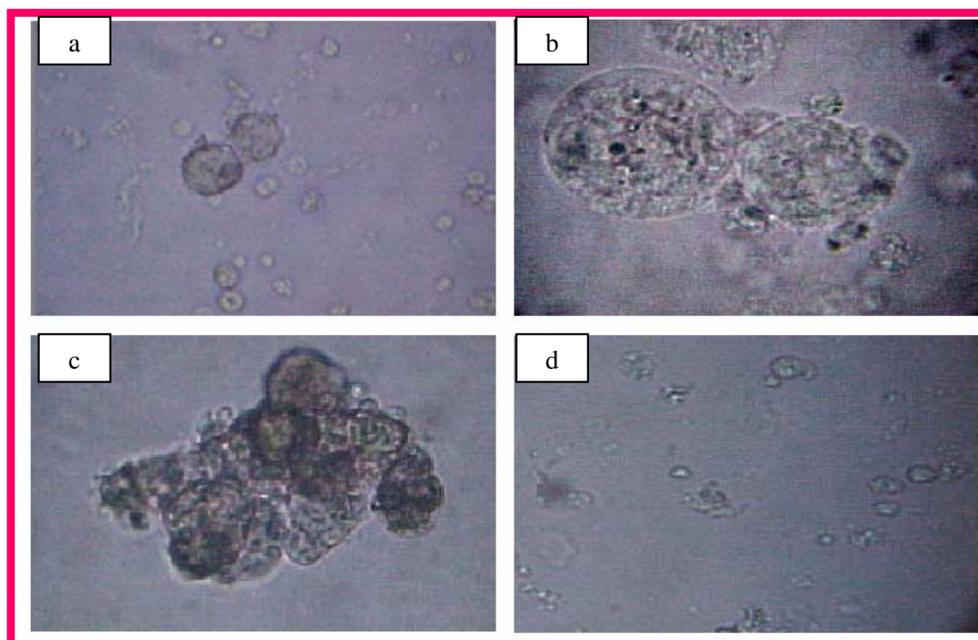
### 3.8- Padronização da Nested-PCR para detecção do HHV-7

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 9 exhibe 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.

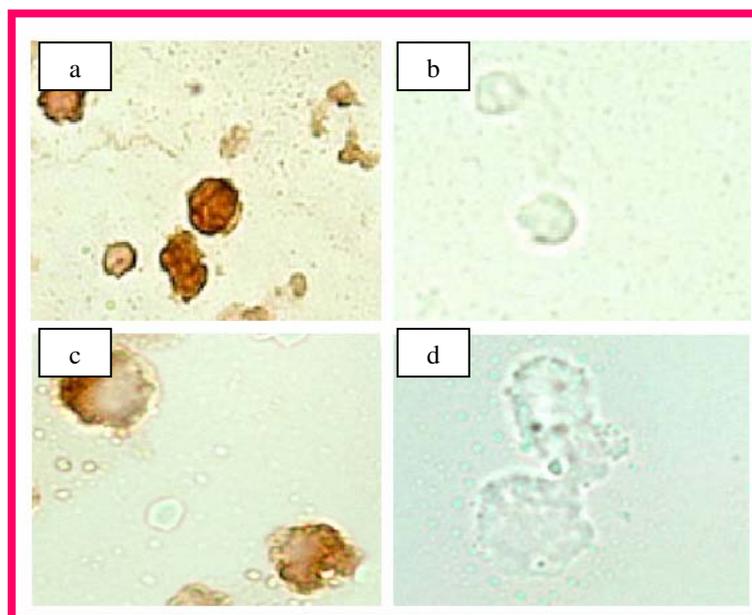
Todas as culturas, tanto as positivas como as negativas, foram submetidas à imunocitoquímica e somente as culturas que exibiram efeito citopático foram positivas para antígenos do HHV-7.

A Figura 9 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.

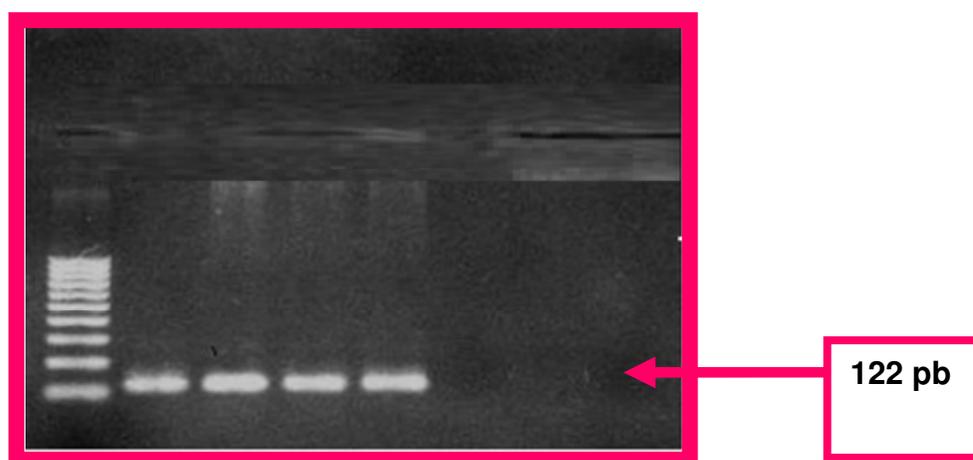
Todas as amostras de DNA extraídas de cultivo celular e diretamente das amostras de saliva foram submetidas à Nested-PCR para HHV-7 resultando em bandas de 122 pares de bases (Figura 11). Todas as 7 amostras de saliva que apresentaram efeito citopático à cultura resultaram positivas pela Nested-PCR para DNA extraído a partir da cultura celular e, também, para DNA extraído diretamente da saliva.



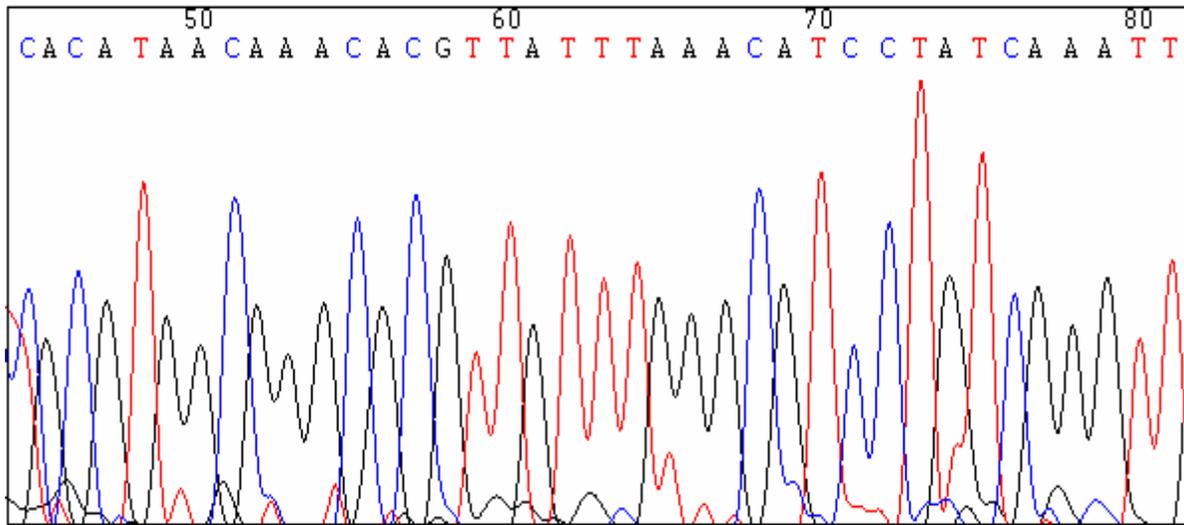
**Figura 9-** Fotomicrografias óticas de cultivo celular após procedimento para isolamento do HHV-7 exibindo efeito citopático em isolamentos positivos e sem alterações morfológicas em isolamentos negativos. Em (a) e (b) – aumento do tamanho celular, em (c) – formação de sincício e, em (d) – células cultivadas sem alterações morfológicas (400x).



**Figura 10-** 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.

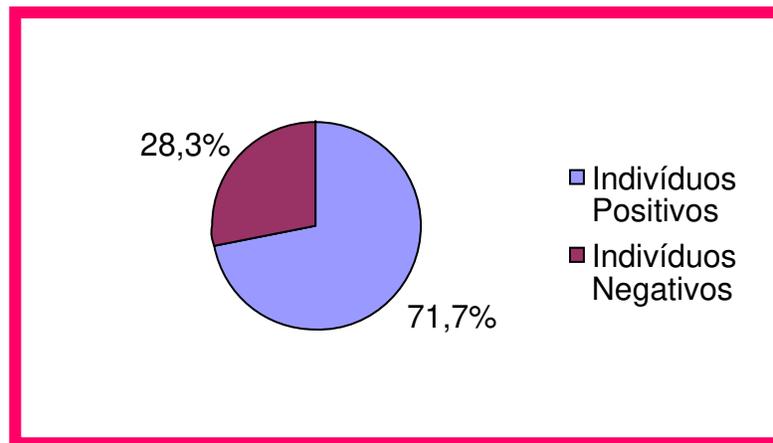


**Figura 11-** Gel de agarose visto à luz ultravioleta exibindo fragmentos de amplificação obtidos por Nested-PCR para HHV-7. A figura 9 mostra nas colunas: 1 – Padrão de peso molecular (Ladder), 2,3,4 e 5 amostras positivas para HHV-7 (122 pb) e, em 6,7,8 amostras negativas para HHV-7.



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

**Figura 12-** 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.



**Gráfico 1-** Percentual de indivíduos que apresentaram resultados positivos para HHV-7 por Nested-PCR no grupo controle (leucócitos de sangue periférico).

Nenhum indivíduo apresentou do grupo controle apresentou resultado positivo de N-PCR no soro.

### **3.9- Pacientes Transplantados**

Treze pacientes transplantados dos 43 monitorizados foram a óbito pós-transplante, sendo que somente um deles foi a óbito por doença disseminada pelo HCMV (paciente 6).

Trinta e nove receptores e todos os doadores eram soropositivos para HCMV e 4 receptores eram soronegativos com doador soropositivo.

### **3.10- Normas de biossegurança utilizadas para evitar a contaminação nas amostras**

Durante todos os procedimentos e técnicas utilizados para o desenvolvimento da presente pesquisa foram tomados diversos cuidados a fim de evitar qualquer tipo de contaminação das amostras e mesmo dos pesquisadores do laboratório. Abaixo encontram-se relacionados os principais cuidados:

- a-) manipulação em locais diferentes para extração do DNA; preparo das amostras e amplificação;
- b-) reagentes e materiais preparados e utilizados em ambientes diferentes daquele destinado à amplificação da sequência alvo;
- c-) uso de bancadas com fluxo laminar e ultra-violeta para manipulação das amostras a serem amplificadas;
- d-) antes da abertura dos tubos tipo “eppendorf” contendo as amostras, estes foram passados no vórtex e centrifugados a fim de se evitar a dispersão por aerossóis;
- e-) todos os materiais plásticos utilizados no preparo das amostras para amplificação, incluindo as ponteiras e os tubos “eppendorf”, eram novos e estéreis;

- f-) trocas constantes de luva durante todo o processo de manipulação;
- g-) uso de hipoclorito a 10% e etanol a 70% nos períodos anteriores e posteriores ao uso das bancadas;
- h-) uso de ponteiras com filtro;
- i-) uso de jogos de pipetas diferentes para cada local;
- j-) uso de luvas, máscara, avental, óculos e capacete de proteção.
- k-) prática laboratorial meticulosa.

## ***4- RESULTADOS***

#### 4.1- Total de exames realizados durante a monitorização

Foram realizados neste estudo, **2.055 exames**, incluindo os exames de N-PCR para HCMV (685), HHV-6 (soro) (685) e HHV-7(soro) (685) nos 43 pacientes monitorizados (Tabela 12).

**Tabela 12-** Total de exames realizados nos pacientes monitorizados.

	NÚMEROS DE AMOSTRAS	POSITIVOS	NEGATIVOS
N-PCR/HCMV		171/685(25%)	514/685 (75%)
N-PCR/HHV-6 (soro)		7/685 (1%)	678/685 (99%)
N-PCR/HHV-7 (soro)		10/685 (1,5%)	675/685 (98,5%)
Total	2.055	188/2.055 (9,1%)	1.867/2.055 (90,9%)

**Tabela 13-** Resultados da N-PCR para HCMV, HHV-6 e HHV-7 em pacientes que não apresentaram doença por HCMV.

Paciente Nº	N-PCR		
	HCMV	HHV-6 (soro)	HHV-7 (soro)
1	43,57,71,155	-	-
2	106	-	-
3	68	-	-
4† (84)•	51,58, <u>65</u> ,72	-	8,29,44, <u>65</u>
7•	35	-	-
9† (23)	-	-	0
10	0,14,26,33, 40,47	-	-
11† (105) •	46,62,67	-	-
12	21,24,33	-	-
13† (138) •	-	-	-
14•	36,52,57	-	-
15† (26)	0,7,16,21	-	-
16† (79)	55,64,69	-	-
17•	30,60	-	-
19•	40,49, <u>54</u> ,63	-	<u>54</u> ,140
20•	-	-	-
23	-	-	-
24† (176)	14,42,49,54	-	-
26	-	-	-
27•	23,32,40,46	-	0
28† (76) •	42,49,58	-	49
29•	26,28,35,42, 49,57	-	-

**Tabela 13 (Continuação)**

Paciente Nº	N-PCR		
	HCMV	HHV-6 (soro)	HHV-7 (soro)
30	54,61,68,75,84	-	-
31	33,56	-	-
32† (60) •	<u>7,14</u> ,21,42, 56	<u>0,7,14</u>	-
34	21,30,42,49, 56	-	-
35 •	49,56,63,68,82	-	-
36	-	-	43
37 •	28,84,93,100, 105,114,135	-	-
38	19,37,59	-	-
39 •	33,40,49,55, 61,68	-	-
40 •	33,42,48,54,63, 77,84,91,98, 133	-	-
41 •	40,49,54,61,68	-	-
42 •	23,28,35,42,51, 93,128,133, 140,147,156, 160	-	-
43	-	-	-

Números indicam dia do evento (dias pós-transplante) e os em vermelho sublinhados indicam co-infecção.

† Óbito;

• Tratados com ganciclovir;

**Tabela 14-** Resultados da Nested-PCR para HCMV, HHV-6 e HHV-7 em pacientes que apresentaram doença por HCMV.

Paciente Nº	N-PCR			Tipo de doença por HCMV
	HCMV	HHV-6 (soro)	HHV-7 (soro)	
5† (167)	<b>47,54,6168,138.</b>	-	-	TGI (144)•
6 †*(157)	63,79,86,93, 98,104,109, 119,128,135, 142.	-	-	TGI (119)•
8	<b>54,61,68.</b>	-	-	TGI (40)•
18† (85)	0,26,33,47, 54,62,69.	-	-	TGI (69)•
21	40,47,54,61, 68,84,89,102, 110,117,124, 131,138,143.	-	-	TGI (36)•
22	47,54,63,70, 82.	-	-	Síndrome Viral e TGI• (105)
25	64,71,78,115, 122, <u>154</u> ,170.	<u>154</u>	-	TGI (160)•
33†	24,33,47,60,68, 82,91,145.	-	-	TGI (102)•

Números indicam dia do evento (dias pós transplante) e os em vermelho sublinhados indicam co-infecção.

†\* Óbito por doença disseminada (pneumonia por P. carinii e HCMV no TGI);

† Óbito;

• Tratados com ganciclovir;

TGI: Trato Gastrointestinal.

#### 4.2.- Incidência de infecção ativa por HCMV, HHV-6 (soro) e HHV-7 (soro) e de co-infecções entre si em todos os pacientes estudados

Nos pacientes estudados, o aparecimento de infecção ativa pelo HCMV foi detectada em 31/43 (72%), pelo HHV-6 (soro) em 2/43 (4,6%) e pelo HHV-7 (soro) em 6/43 (13,9%).

O aparecimento de co-infecções ocorreu entre HCMV/HHV-6 (soro) em 2/43 (4,6%) e entre HCMV/HHV-7 (soro) em 4/43 (9,3%). A tabela 15 apresenta a distribuição da infecção ativa e de co-infecções nos pacientes estudados.

**Tabela 15-** Distribuição dos casos de infecção ativa por HCMV, HHV-6 (soro) e HHV-7 (soro) e de co-infecções entre si em todos os pacientes estudados.

N=43	
<b>Infecção ativa</b>	
HCMV (sangue)	31/43 (72%)
HHV-6 (soro)	2/43 (4,6%)
HHV-7 (soro)	6/43 (13,9%)
HCMV/HHV-6 †	2/43 (4,6%)
HCMV/HHV-7 †	4/43 (9,3%)

† co-infecção.

#### 4.3- Incidência de doença pelo HCMV

Dos 43 pacientes estudados, a doença pelo HCMV ocorreu no TGI (comprovado por biópsia) em 8 deles (18,6%).

Infecção ativa por HCMV foi associada estatisticamente à doença por HCMV, resultando em  $p < 0,05$ .

**Tabela 16-** Distribuição dos casos de infecção ativa por HCMV, HHV-6 (soro) e HHV-7 (soro) e de co-infecções entre si em todos os pacientes que apresentaram doença por HCMV no Trato Gastrointestinal comprovados por biópsia.

N=43	Doença por HCMV		
	Presente	Ausente	
<b>Infecção ativa</b>			
HCMV (sangue)	8/8	21/35	<b><u>0,02</u></b>
HHV-6 (soro)	1/8	1/35	0,34
HHV-7 (soro)	0/8	5/35	0,32
HCMV/HHV-6 †	1/8	1/35	0,34
HCMV/HHV-7 †	0/8	4/35	0,42

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

**Tabela 17-** Distribuição dos casos de infecção ativa por HCMV, HHV-6 e HHV-7 e de co-infecções entre si com os casos de infecção oportunista.

N=43	Infecção Oportunista		P*
	Presente	Ausente	
<b>Infecção ativa</b>			
HCMV (sangue)	16/16	15/27	<b><u>0,001</u></b>
HHV-6 (soro)	0/16	0/27	1,0
HHV-7 (soro)	1/16	0/27	0,37
HCMV/HHV-6 †	0/16	0/27	1,0
HCMV/HHV-7 †	1/16	0/27	0,37

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

Infecção oportunistas foi associada à infecção ativa pelo HCMV ( $p=0,001$ ). De 31 pacientes tiveram infecção ativa pelo HCMV e 16 apresentaram infecção oportunista, sendo que dos 31 pacientes, 16 apresentaram infecção ativa positiva e infecção oportunista.

O total de infecção ativa por HHV-6 e HHV-7 em soro ou suas co-infecções não foram estatisticamente associadas à infecção oportunista.

#### 4.4- Comparação entre “GVHD” e infecção ativa pelo HCMV, HHV-6 e HHV-7

Observando a tabela 18, estatisticamente não há correlações entre as infecções ativas pelo HCMV, HHV-6 e HHV-7 e Doença de Enxerto Contra o Hospedeiro (GVHD) nos pacientes transplantados de medula óssea.

**Tabela 18-** Casos de GVHD com infecção ativa por HCMV, HHV-6 e HHV-7 nos pacientes estudados.

N=43	GVHD agudo		p*
	Presente	Ausente	
<b>Infecção Ativa</b>			
HCMV	15/22	13/21	0,45
HHV-6 (soro)	1/22	1/21	0,74
HHV-7 (soro)	3/22	3/21	0,64

\* teste exato de Fisher

#### 4.5- Gravidade da Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (GVHD) agudo.

A graduação clínica da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda foi baseada no estadiamento clínico, onde se levou em consideração, a percentagem da superfície corporal que apresentava envolvimento cutâneo com confirmação histológica, os níveis sanguíneos de bilirrubinas e o volume diário de diarreia (Pzepiorka *et al.*, 1995).

## ***5- DISCUSSÃO***

O Citomegalovírus Humano (HCMV) é membro da família dos vírus *Herpesviridae* e têm em comum as propriedades biológicas de latência e reativação. Cerca de 1% de todos os recém-nascidos têm infecção congênita pelo HCMV e o aumento da soroprevalência ocorre nos primeiros cinco anos de vida (Nichols & Boeckh, 2000). Na adolescência, cerca de 80% - 100% dos indivíduos nos países em desenvolvimento terão anticorpos anti-HCMV detectáveis. No entanto, a incidência média nos Estados Unidos e oeste da Europa é de aproximadamente 50 -60% (Nelson & Demmler, 1997). A grande maioria das infecções primárias passa despercebida. Após a infecção, o vírus permanece em latência nas células endoteliais e mononucleares do sangue periférico do hospedeiro e é controlado pela imunovigilância mediada por células. Em pacientes portadores de AIDS e nos imunossuprimidos devido a transplantes de células hematopoéticas primordiais e de órgãos sólidos, a infecção pelo HCMV é uma causa importante de complicação infecciosa, aumentando a morbidade e mortalidade nesses grupos de risco (Nichols & Boeckh, 2000; Reusser, 1996).

A reação em cadeia da polimerase foi primeiramente utilizada por Saiki e colaboradores, em 1985 (Saiki, 1985), e atualmente tem sido muito utilizada no diagnóstico de várias doenças infecciosas. Em 1988, Demmler e Shibata foram os que inicialmente utilizaram a PCR no diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV. Eles demonstraram que a PCR simples seguida de hibridização com sondas específicas era mais sensível do que a cultura viral clássica para a detecção do HCMV (Demmler & Shibata, 1988).

No Brasil, o primeiro estudo que utilizou a PCR na identificação da infecção ativa pelo HCMV foi o trabalho de Costa e col. (1999), utilizando a PCR simples seguida de hibridização específica em amostras de urina de 37 pacientes transplantados renais. Os resultados foram comparados com testes sorológicos (ELISA e Imunofluorescência) e mostraram que 32/37 pacientes (86,48%) apresentaram evidências de infecção ativa pelo HCMV; destes, 16 (43,2%) apresentaram manifestações clínicas sugestivas de provável doença pelo HCMV. Este estudo confirma a relevância da infecção ativa pelo HCMV após o transplante renal.

Escolhemos a N-PCR na tentativa de se aumentar à sensibilidade e especificidade da PCR simples. Nesta técnica ocorre a amplificação de uma seqüência alvo em duas etapas: na primeira utiliza-se um par de primers específicos para um fragmento alvo desejado; a partir do produto da primeira amplificação, um novo par de primers é utilizado para uma região interna ao fragmento anterior (Fox *et al.*, 1995; Sumimoto *et al.*, 1998; Abecassis *et al.*, 1997).

A alta incidência da infecção ativa pelo HCMV por N-PCR nesse grupo de pacientes foi semelhante a dados prévios obtidos para TCPH (Chakrabarti *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2000). Embora a proporção de doadores ou receptores soronegativos para HCMV tenha sido nula, quase todos os resultados positivos de N-PCR foram obtidos de pacientes soropositivos.

A pesquisa laboratorial indicou que a doença por HCMV foi detectada previamente em todos os pacientes, independente de terapia preventiva, sendo a incidência geral de doença de 18,6%. Esses achados são similares a incidências reportadas de 0 a 16% (Goodrich *et al.*, 1991; Machado *et al.*, 2001; Manteiga *et al.*, 1998). Todos os pacientes com doença por HCMV tinham pelo menos um dos fatores de risco. O órgão mais comumente afetado pela doença por HCMV foi o trato gastrointestinal, como reportado em outros estudos (Reusser, 1996), e é um problema no transplante de medula óssea.

Diversas técnicas são disponíveis para a detecção precoce dos betaherpesvírus, incluindo a PCR em Tempo Real (Locatelli *et al.*, 2003; Gautheret-Dejean *et al.*, 2002), a detecção do RNAm (Gautheret-Dejean *et al.*, 2002) e a captura híbrida (Hebart *et al.*, 2001). Essas técnicas ainda não foram adequadamente comparadas com outras disponíveis (Ljungman, 2002) e apresentam custo muito elevado. Estudos prévios indicaram que a reativação do HCMV, HHV-6 e HHV-7 ocorreram, respectivamente, em mais de 58%, 66% e 46% dos pacientes pós-transplante (Dockrell *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1996). Em nosso estudo, encontramos 72%, 13,9% e 13,9%, respectivamente.

A ocorrência de infecção oportunista e da doença produzida pelo CMV foi estatisticamente significativa. O HCMV é considerado um vírus imunomodulador e demonstra facilitar superinfecções com infecções oportunistas. As disfunções provocadas

pelo CMV nas células T, nos macrófagos e na função fagocitária e a produção de citocinas supressivas são possíveis bases para o efeito imunossupressor (Chatterjee *et al.*, 1978; Rand *et al.*, 1978; George *et al.*, 1997; Falagas *et al.*, 1996; Van den Berg *et al.*, 1996; Nina *et al.*, 2005).

No presente estudo, uma baixa incidência e a prevalência de infecções ativas por HHV-6 and HHV-7 foram observadas (13,9%). Embora as diferenças na incidência entre estudos possam ser relacionadas pelas características dos pacientes e pela falta de pesquisas padronizadas, é razoável a hipótese de que a baixa incidência de DNAemia de HHV-6 e HHV-7 no presente estudo possa estar relacionada ao uso de antivirais profilaticamente.

O maior significado clínico da DNA viremia do HHV-6 e HHV-7 após transplante relaciona-se à capacidade de esses vírus influenciarem a patogênese da doença por HCMV (Mori *et al.*, 2000; Razonable *et al.*, 2003; Mendez *et al.*, 2001; Humar *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 1998). Nesse estudo, 8/43 (18,6%) dos pacientes apresentaram doença por HCMV no trato gastrointestinal, a qual foi comprovada por biópsia, após o transplante. Todos os pacientes com doença por HCMV tiveram o diagnóstico da infecção realizado por N-PCR, 2/8 (25%) co-infecção por HCMV/HHV-6 (no sangue periférico), 1/8 (12,5%) co-infecção por HCMV/HHV-6 (no soro) e nenhum paciente teve infecção ativa pelo HHV-7. Apenas um desses pacientes faleceu devido a doença por HCMV disseminada.

Muitas questões permanecem sobre esses vírus (HHV-6 e HHV-7). Dentre estas, um melhor atendimento do impacto clínico incluindo efeitos diretos, interações com o HCMV, e outros efeitos imunomoduladores. Em pacientes com sintomas diretamente atribuíveis a um desses vírus, o tratamento pode ser iniciado com ganciclovir com uma redução na imunossupressão (Smith *et al.*, 2001). Em nosso estudo, todos os pacientes receberam aciclovir para prevenção de infecções do herpesvírus simples.

Terapia pré-clínica foi usada em doses terapêuticas para os pacientes com infecção ativa por HCMV detectada por N-PCR em duas ou mais amostras consecutivas. Isso pode ter protegido os pacientes contra a ocorrência de infecções pelo HHV-6 e pelo HHV-7.

A ocorrência de pneumonia intersticial (IP) foi nula. O órgão mais acometido foi o trato gastrointestinal. O uso de terapia preemptiva com ganciclovir foi efetiva na prevenção da pneumonia intersticial (Laskin *et al.*, 1987).

A contribuição do HHV-6 e HHV-7 para o desenvolvimento da doença em receptores de transplante de medula óssea não está completamente elucidada.

Estudos adicionais necessitam serem feitos para uma melhor compreensão da relação entre os herpesvírus HCMV, HHV-6 e HHV-7 nos pacientes transplantados de medula óssea.

## ***6- CONCLUSÃO***

- Infecção ativa pelo HCMV foi detectada em 72% dos pacientes estudados;
- Infecção ativa pelo HHV-6 no soro foi detectada em 4,6% dos pacientes estudados;
- Infecção ativa pelo HHV-7 esteve presente no soro em 13,9% dos pacientes estudados;
- A co-infecção ativa entre HCMV (sangue periférico) e HHV-6 (soro), ocorreu em 2 (4,6%) dos pacientes estudados, destes, 1 evoluiu para doença no TGI comprovado por biópsia;
- A co-infecção ativa entre HCMV (sangue periférico) e HHV-7(soro), ocorreu em 6 (13,9%) dos pacientes estudados;
- A monitorização laboratorial é extremamente importante no acompanhamento dos pacientes após o transplante em relação aos betaherpesvírus, porém ainda o principal causador de impacto clínico é o HCMV.

## ***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

Abdel-Haq N M & Asmar B I. *Human herpesvirus 6 (HHV-6) infection*: Indian J Pediatr 2004; 71(1): 89-96.

Ablashi D V, Handy M, Bernbaum J, Chatlynne L G, Lapps W, Kramarsky B, Berneman Z N, Komaroff A L, Whitman J E. Propagation and characterization of *human herpesvirus-7 (HHV-7)* isolates in a continuous T-lymphoblastoid cell line (SupT1). J Virol Methods 1998; 73(2):123-40.

Alford C A & Britt W J - *Cytomegalovirus* in: Fields, B.N. & Knipe, D.M. Virology 2 ed., Nova Iorque, Raven Press: 1990, 1981-2010.

Almeida L N B, Azevedo R S, Amaku M, Massad E. *Cytomegalovirus* seroepidemiology in an urban community of São Paulo, Brazil. Rev Saúde Pública 2001; 35(2): 124-129.

Asano Y, Yoshikawa T, Suga S, Kobayashi L, Yazaki T et al. Clinical features of infantis with *primary human herpesvirus 6* infection (exanthema subitum, roseola infantum). Pediatrics 1994; 93: 104-108.

Berneman Z N et al. *Human herpesvirus 7 (HHV-7) strain JI*: independent confirmation of HHV-7. J Infect Dis 1992; 166: 690-691.

Black J B, Pellett P E. *Human Herpesvirus 7*. Rev Med Virol 1999; 9: 245.

Black J, Burns D A, Goldsmith C S, Feorino P M, Kite-Powell K, Schinazi R, Krug P W, Pellet P E. Biologic properties of *human herpesvirus 7* strain SB. Virus Research 1997; 52(1):25-41.

Boeckh M, Boivin G. Quantitation of *Cytomegalovirus*: Methodologic Aspects and Clinical Applications. Clin Microbiol 1998; Rev 11(3): 533-554.

Boeckh M, Bowden R A, Goodrich J M, Pettinger M, Meyers J D. *Cytomegalovirus* Antigen Detection in Peripheral Blood Leukocytes After Allogeneic Marrow Transplantation. Blood 1992; 80(5): 1358-1364.

Boeckh M, Bowden R A, Gooley T, Myerson D, Corey L. Successful modification of a pp65 antigenemia-based treatment strategy for prevention of CMV disease in allogeneic marrow transplant recipients. Blood 1999 (letter); 93: 1781-1782.

Boeckh M, Gooley T A, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden R A. *Cytomegalovirus* pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood* 1996a; 88: 4063-4071.

Boeckh M, Riddell S R, Cunningham T et al. Increased incidence of late *CMV* disease in allogeneic marrow transplant recipients after ganciclovir prophylaxis is due to a lack of *CMV*-specific T-cell responses. *Blood* 1996b; 88 (Suppl. 1): 302a.

Bonon SHA, Menoni SMF, Rossi CL et al. Surveillance of cytoemaglovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. *J Infection* 2005; 50: 130-137.

Bowden R A, Sayers M, Flournoy N et al. *Cytomegalovirus* immune globulin and seronegative products to prevent primary cytomegalovirus infection after marrow transplantation. *N Engl J Med* 1986; 314: 1006-1010.

Braun D K, Dominguez G & Pellet P E. *Human herpesvirus 6*. *Clinical Microbiology Review* 1997; 10 (3): 521-567.

Brennan D C. *Cytomegalovirus* in renal transplantation. *J Am Soc Nephrology* 2001; 12: 848-855.

Bresnahan W A & Schenk T A. Subset of Viral Transcripts Packege Within Human *Cytomegalovirus* Particles. *Science* 2000, 288: 2373-2376.

Brow H L & Abernathy M P. *Cytomegalovirus infection*. *Seminars in Perinatology* 1998; 22 (4): 260-266.

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* 1991; 32: 127-138.

Camargo L F A, Granato C F H, Tomyiama H T, Cobo E, Ajzen H, Pestana J O M. Infecção pelo *CMV* em pacientes submetidos a transplante renal: Estudo de 20 casos. *J Bras Nefrol* 1996; 18(2): 130-136.

Campadelli-Fiune G, Mirandola P, Menotti L. *Human Herpesvirus 6: Na Emerging Pathogen*. *Emerging Infectious Diseases* 1999; 5 (3): 353-366.

Canada Communicable Disease Report. Expert Working Group on *HHV-6 and 7* Laboratory Diagnosis and Testing 2000, 26(S4).

Carrigan D R & Knox K K. *Human herpesvirus 6 (HHV6) isolation from bone marrow: HHV6 associated bone marrow transplatation*. *Epidemiology, molecular biology, and clinical pathology* v4, New York, Elsevier 1992; 281-301.

Caserta M T, Mock D J, Dewhurst S. *Human herpesvirus 6*. *Clinical Infect Disease* 2001; 33: 829-833.

Caserta M T, Hall C B, Schnabel K, Long C E, D'Heron N. Primary human herpesvirus 7 infection: a comparison of *human herpesvirus 7 human herpesvirus 6 infection in children*. *J Pediatr* 1998; 133:386-389.

Chakrabarti S, Mackinnon S, Chopra R et al. High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. *Blood* 2002; 99: 4357-4363.

Chatterjee SN, Fiala N, Weiner J. Primary cytomegalovirus and opportunistic infections: incidence in renal transplant recipients. *JAMA* 1978; 240: 2446.

Chee M A, Bankier A T, Beck S et al. An analysis of the protein coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol* 1990; 154: 125-169.

Chuh A, Chan H, Zawar V. *Ptyriasis rosea-evidence for and against an infectious aetiology*. *Epidemiol Infect* 2004; 132:381-390.

Clark D A . *Human herpesvirus 6*. *Rev Med Virol* 2000; 10: 155-173.

Cole R, KUTTNER A G. Filterable virus present in the salivary glands of guinea pigs. *J Exp Med* 1926; 44: 855-873.

Colimon R & Michelson S. *Human Cytomegalovirus: pathology, diagnosis, and treatment*. *Adv Nephrol* 1990; 333-356.

Costa F F, Costa S C B. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): princípios e aplicações clínicas. *Rev Bras Reumatol* 1992; 32: 142-146.

Costa F F. Detection of cytomegalovirus infections by PCR in renal transplant patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1999; 32: 953-959.

Costa S C B. Infecção por citomegalovírus (CMV): Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento. *Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica* 1999, 25(1): 18-28.

Daibata M, Taguchi T, Nemoto Y, Taguchi H, Miyoshi I. Inheritance of chromosomally integrated *human herpesvirus 6* DNA. *Blood* 1999;94:1545-1549.

Demmler G J, Buffone G J, Schimbor C M, May R A. Detection of Cytomegalovirus in Urine from Newborns by Using Polymerase Chain Reaction DNA Amplification. *J. Infect. Dis* 1988; 158: 1177-1184.

Desachy A, Ranger-Rogez S, François B, Venot C, Traccard I, Gastinne H et al. Reactivation of HHV-6 in multiple organ failure syndrome. *Clin Infect Dis* 2001, 32: 197-203.

Dewhurst S, Skrinicosky D, Loon Van N. – *Human Herpesvirus 7*. Expert reviews in Medicine 1997; 1462-3994.

Dockrell D H, Smith T F, Paya C V. *Human Herpesvirus 6*. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 163.

Dockrell D H. *Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features*. *Journal Medical Microbiology* 2003; 52(1): 5-18.

Dockrell, D.H. & Paya, C.V. *Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation*. *Rev Med Virol* 2001; 11: 23-36.

Drago F, Aragone M G, Lugani C, Rebora A. *Cytomegalovirus* Infection in Normal and Immunocompromised Humans. *Dermatology* 2000, 200: 189-195.

Drobyski W R, Etrede M, Majewski D, Baxter-Lowe L A. Prevalence of *human herpesvirus 6* variant A and B in bone marrow transplant recipients as determined by polymerase chain reaction and sequence specific oligonucleotide probe hybridization. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1515-1520.

Drobyski, W.R.; Dunne, W.M.; Burd, E.M.; Knox, K.K.; Ash, R.C.; Horowitz, M.M.; et al. *Human herpesvirus 6 (HHV6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow suppressive role for HHV6 in vivo.* The Journal of Infect Disease 1993; 167: 735-739.

Dulley F L. Boletim COSAH, Coordenação de Sangue e Hemoderivados MS/SAS/DAPS - ano II,1997, n.14.

Falagas ME, Snyderman DR, Griffith J, et al, and the Boston Center for Liver Transplantation CMVIG Study Group. Exposure to cytomegalovirus from donated organ is a risk factor for bacteremia in orthotopic liver transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 468.

Einsele H, Ehninger G, Hebart 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* 1995; 86(7): 2815-2820.

Emery V C, Cope A V, Bowen E F et al. The Dynamics of *Human Cytomegalovirus Replication In Vivo.* J Exp Med 1999; 190 (2): 177-182.

Epps R E, Pittelkow M R, Su D W P: Torch syndrome. *Semin Dermatol* 1995; 14: 179-186.

Farber S, Wolbach S B. Intranuclear and cytoplasmic inclusions (iprotozoan-like bodies) in the salivary glands and other organs of infants. *Am J Pathol* 1932, 8:123-135.

Feldstein A E, Razonable R R, Boyce TG, et al. Prevalence and clinical significance of *human herpesvirus 6 and 7 active infection* in pediatric liver transplant patients. *Pediatric Transplantation* 2003; 7: 125-129.

Flamand L, Gosselin J, D'addario M, Hiscott J, Ablashi D V, Gallo R C & Menezes J. *Human herpesvirus 6* induces interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *Journal Virology* 1991, 65: 5105-5110.

Flamand L, Gosselin J, Stefanescu I, Ablashi D & Menezes J. Immunosuppressive effect of *human herpesvirus 6* on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood* 1995; 85: 1263-1271.

Forman S J, Zaia J A. Treatment and prevention of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: where do you stand? *Blood* 1994; 83: 2392.

Freitas R, Freitas M R, Oliveira C S, et al. *Human herpesvirus-7* as a cause of exanthematous illnesses in Belém, Pará, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 2004; 46 (3):139-143.

Frenkel N, Schirmer E C, Wyatt L S, Katsafanas G, Roffman E et al. Isolation of a new herpesvirus from CD4+ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 748-52.

Gautheret-Dejean A, Manichanh, Tgien-Ah-Koon F et al. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplantation patients. *J Virol Methods* 2002; 100: 27-35.

Gentile, G. *Post-transplant HHV6* disease. *Herpes* 2000; 7:1.

George MJ, Snyderman DR, Werner BG, et al, and the Boston Center for Liver Transplantation CMVIG-Study Group. The independent role of CMV as a risk factor for invasive fungal disease in orthotopic liver transplant recipients. *Am J Med* 1997; 103: 106.

Gondo H, Minematsu T, Harada M et al. Cytomegalovirus (CMV) antigenaemia for a rapid diagnosis and monitoring of CMV-associated disease after bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1994; 86 (1): 130-137.

Goodpasture E W, Talbot F B. Concerning the nature of protozoan-like cells in certain lesions of infancy. *Am J Dis Child* 1921; 21: 415-425.

Goodrich JM, Mori M, Gleaves et al. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1991; 235(23): 1601-1607.

Goodrich J M. *Cytomegalovirus*. *Medicine Journal* 2001, September 10; vol 2, n.9.

Griffiths P d, Clark D a, Emery Vc- *Betaherpesvirus in transplant recipients*. *J Antimicrob Chem* 2000; 45 (3): 29-34.

Griffiths P D, Panjwani D D, Stirk P R, Ganczakowski M, Ball M G, Blacklock H A, Prentice H G. Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients by detection of early antigen fluorescent foci. *Lancet* 1984 ii; 1242-1244.

Griffiths P D, Ait-Khaled M, Bearcroft C P, Clark D A, Quaglia A, Davies S E, et al. *Human herpesviruses 6 and 7* as potential pathogen after liver transplant: Prospective comparison with the effect of cytomegalovirus. *J Med Virol.* 1999; 59(4): 496-501.

Grundy J E. Virologic and pathogenetic aspects of cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 1990; 12(Suppl 7): 711-719.

Hall C B, Caserta M T, Schnabel K C, Long C, Epstein L G, Insel R A, et al. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clinic Infect Dis* 1998; 26:132-137.

Hall C B, Long C E, Schnabel K C, Caserta M T, McIntyre K M, Costanzo M A, et al. *Human herpesvirus-6 infection in children.* A prospective study of complications and reactivation. *N Engl J Med* 1994; 331:432-438.

Hanshaw J B, Didgeon J A, Marshall W C. *Viral Diseases of the Fetus and Newborn.* Philadelphia 1985, WB Saunders Co, 2nd Ed.

Hardy A M, Allen Jr, Morgan W M, Curran J W - The incidence rate of acquired immunodeficiency syndrome in selected populations. *Jama* 1985; 253: 215-220.

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

Hebart H, Wuchter P, Loccr J et al. Evaluation of the Murex CMV DNA hybrid capture assay version 2.0 for early diagnosis of cytomegalovirus infection in recipients of an allogeneic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 213-218.

Herman J, Meyers J D, Thomas E D, Buckner C D, Clift R. The effect of granulocyte transfusion on the incidence of cytomegalovirus infection after allogeneic marrow transplantation. *Ann Intern Med* 1982; 96: 149-152.

Ho M. *Cytomegalovirus: Biology and Infection*, 2.ed. New York, Plenum Publishing Corporation 1991: 1-440.

Hodinka R L, Friedman H M. *Human cytomegalovirus*. In Ballows A, Hausler Jr W J, Hermann K L, Isenberg H D, Shadomy H J, eds. *Manual of Clinical Microbiology* 1991, 5th ed., American Society for Microbiology, Washington D.C., pp.829-837.

IHMF- Management strategies workshop and 4th annual meeting. *Cytomegalovirus and human herpesvirus type 6 infections in the immunocompromised (NON-HIV) Host*, 1997.

Jiwa N M, Van der Rijke F M, Mulder A, Van der Bij W, The T H, Rothbarth Ph H, Velzing J, Van der Ploeg M, Raap A K. An improved immunocytochemical method for the detection of human cytomegalovirus antigens in peripheral blood leukocytes. *Histochemistry* 1989; 91: 345-349.

Jong M D, Galasso G J, Gazzard B, Griffiths P D, Jabs D A, Kern E R, Spector S A. Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Research* 1998; 39: 141-162.

*Journal of medical virology*. *J med. virol* 2004; 72 (4): 668-674.

Kadokia M P, Rybka W B, Stewart I A et al. *Human herpesvirus 6: infection and disease following autologous and allogeneic bone marrow transplant*. *Blood* 1996; 87: 5341-5354.

Kikuta H, Nakane A, Lu I I, Taguchi Y, Minagawa T, Matsumoto S. Interferon induction by *human herpesvirus 6* in human mononuclear cells. *The Journal of Infect Disease* 1990, 162(1): 35-38.

Knox K K, Pietryga D, Harrington D J, Franciose R, Carrigan D R. Progressive immunodeficiency and fatal pneumonitis associated with human herpesvirus 6 infection in an infant. *Clinical Infect Disease* 1995; 20(2): 406-413.

Krueger G R, Koch B, Leyssens N et al. Comparison of seroprevalences of human herpesvirus-6 and -7 in healthy blood donors from nine countries. *Vox Sanguinis* 1998; 75: 193-197.

Laskin OL, Stahl-Bayliss CM, Kalman CM et al. Use of ganciclovir to treat serious cytomegalovirus infections in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1987; 155: 323-327.

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* 2002; 25: S57-S61.

Lautenschlager I, Linnavuori K. & Höckerstedt K. *Human herpesvirus-6* antigenaemia after liver transplantation. *Transplantation* 2000; 69: 2561-2566.

Leach C T, Pollock B H, McClain K L, Parmley R T, Murphy S B, Jenson H B. HHV-6 and CMV infections in children with human immunodeficiency virus infections and cancer. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21 : 125-32.

Leshner J L. *Cytomegalovirus* infections and the skin. *J Am Acad Dermatol* 1988; 18: 1333-1338.

Levy J A, Landay A, Lennette E T. Human herpesvirus 6 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in cell culture. *Journal Clinical Microbiology* 1990; 28: 2362-2364.

Levy, J. A Tree new human herpesviruses (*HHV-6, HHV-7 and HHV-8*). *The Lancet* 1997; 349: 558-562.

Li C R, Greenberg P D, Gilbert M J, Goodrich J M, Riddell S R. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 1994; 83: 1971-1979.

Linhares M I, Eizuru Y, Tateno S, Minamishima Y. Soroprevalence of *human herpesvirus 6 infection* in Brazilian and Japanese populations in the north-east of Brazil. *Microbiol Immunol* 1991; 35: 1023-7.

Lipschutz B. Untersuchungen über die Aetiologie der Krankheiten d. herpes genitalis, etc. *Arch Dermatol Syphilol* 1921; 136: 428-482.

Ljungman & Einsele. *Cytomegalovirus infection*. *Curr Opin Hematol* 1994; Nov;1(6): 418-22. Review.

Ljungman P. *B-herpesvirus* challenges in the transplant recipient. *J Infect Dis* 2002; 186 (Suppl): 99-109.

Ljungman P. Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2002; 118: 44-57.

Lo C Y, Yuen K Y, Lui S L, Li F K, Chan T M, Lo W K and Cheng I K. Diagnosing cytomegalovirus disease in CMV seropositive renal allograft recipients: a comparison between the detection of CMV DNAemia by polymerase chain reaction and antigenemia by CMV pp65 assay. *Clin Transplant* 1997; 11: 286-293.

Locatelli G, Santoro F, Veglia F et al. Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA. *J Clin Microbiol* 2003; 38: 4042-4048.

Machado C M, Dulley F L, Vilas Boas L S, Castelli J B, Macedo M C A, Silva R L, Pallota R, Saboya R S and Pannutti C S. CMV pneumonia in allogeneic BMT recipients undergoing early treatment or pre-emptive ganciclovir therapy. *Bone Marrow Transplantation* 2000; 26: 413-417.

Machado CM, Menezes RX, Macedo MCA et al. Extended antigenemia surveillance and late cytomegalovirus infection after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 1053-1059.

Manteiga R, Martino R, Sureda A et al. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided pre-emptive treatment with ganciclovir after allogeneic stem transplantation: a single-center experience. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 89-904.

Marks D I, Culis J O, Ward K N et al. Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia using siblings and volunteer unrelated donors. *Ann Intern Med* 1993; 119: 207-214.

McKeating J A, Stagno S, Stirk P R, Griffiths P D. Detection of *Cytomegalovirus* in Urine by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Med. Virol* 1985; 16: 367-373.

Mendez J C, Dockrell D H, Espy M J, et al. *Human  $\beta$ -Herpesvirus* interactions in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 2001; 183:179-184.

Meyers J D, Ljungman P, Fischer L D. *Cytomegalovirus* excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplant: importance of cytomegalovirus viremia. *J. Infect. Dis* 1990; 162: 373-380.

Miller W J, McCullough J, Balfour H H, et al. Prevention of cytomegalovirus infection following bone marrow transplantation: a randomized trial of blood product screening. *Bone Marrow Transplantation* 1991; 7: 227-234.

Mirandola P, Menegazzi P, Merighi S, Ravaioli T, Cassai E, Luca D I. Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. *Journal Virology* 1998; 72: 3837-3844.

Mukai T, Yamamoto T, Kondo K, Okuno T, Kosuge H, et al. Molecular epidemiological studies of *human herpesvirus 6* in families. *J Med Virol* 1994; 42:224-227.

Nicholas J. Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus. *J. Virol* 1996; 70, 5975-5989.

Nichols W G, Boeckh M. Recent advances in the therapy and prevention of CMV infections. *Journal of Clinical Virology* 2000; 16: 25-40.

Niubó J, Perez J L, Martinez-Lacasa J T, Garcia A, Roca J, Fabregat J, Gil-Vernet S and Martin R. Association between quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. *Diagn. Microbiol Infect Dis* 1996; 24: 19-24.

Okuno T, Takahashi K, Balachandra K, Shiraki K, Yamanishi K, Takahashi M, Baba K. Seroepidemiology of *human herpesvirus 6* infection in normal children and adults. *Journal Clinical Microbiology* 1989; 27: 651-653.

Olive D M, Simsek M, Al-mufti S. Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1238-1242.

Oliveira S A, Turner D J, Knowlesw, Nascimento J P, Brown D W, Ward K N. Primary *human herpesvirus-6 and 7* infections, often coinciding, misdiagnosed as measles in children from a tropical region of Brazil. *Epidemiol Infect* 2003; 131:873-879.

Pannuti C S, Vilas Boas L S, Amato Neto V, et al. Detecção de anticorpos IgM nas infecções primárias e secundárias pelo citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante renal. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1987; 29: 317-22.

Pannuti C S – Citomegalia In: Ferreira A W, Ávila S L M eds. *Diagnóstico Laboratorial das principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*, 2a. edição, Editora Guanabara Koogan 2001, Cap. 5, p. 68-73.

Pannuti C S. Infecção por CMV. *Revisão e Ensaio. Pediat (S.Paulo)* 1984; 6: 144-153.

Peiris M. Human herpesvirus-6 (HHV-6) and HHV-7 infections in bone marrow transplant recipients. *Clinical Reviews in Oncology/Hematology* 1999; 32: 187-196.

Pillay D, Ali A A, Lui S F, Kops E, Swny P, Griffiths P D. The prognosis significance of positive CMV cultures during surveillance of renal transplant recipients. *Transplantation* 1993; 56: 103-8.

POZO, F. & TENORIO, A. Detecção and typing of lymphotropic herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *J of Virol methods* 1999; 79: 9-19.

Przepiorcka D, Weisdorf D, MARTIN P. et al. Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 825-828.

Rand KH, Pollard RB, Merigan TC. Increased pulmonary superinfections in cardiac-transplant patients undergoing primary cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 1978; 298: 951.

Razonable R R, Fanning C, Brown R A, Espy M J, Rivero A, Wilson J et al. Selective reactivation of HHV-6 variant A occurs in critically ill immunocompetent hosts. *J Infect Dis* 2002; 185:110-3.

Razonable R R, Paya C. The impact of *HHV-6 and 7* infection on the outcome of liver transplantation. *Liver Transplantation* 2002; 8:651-658.

Razonable R R, Rivero A, Brown R A, Hart G D, Espy M J, Van Crujisen H, Wilson J et al. Detection of simultaneous  $\beta$ -herpesvirus infections in clinical syndromes due to defined cytomegalovirus infection. *Clin Transpl* 2003; 17:114-120.

Recommendations of CDC, the Infectious Diseases Society of America, and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6: 659.

Reusser, P. The challenge of cytomegalovirus infection after Bone Marrow Transplantation: Epidemiology, Prophylaxis, and Therapy. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18 (Suppl 2): 107-109.

Ribbert H. Veber protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Negeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zentralbl Allg Pathol* 1904; 15: 945-948.

Riley Jr H D. History of the Cytomegalovirus. *Southern Medical Journal* 1997, February. <http://www.sma.org/smj/97feb4.htm>

Roberts TC, Buller R S, Gaudreault-Keener M, Sternhell K E, Garlock K, Singer G G, Brennan D C and Storch G. Effects of Storage Temperature and time on qualitative and Quantitative Detection of Cytomegalovirus in Blood Specimens by Shell Vial Culture and PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35 (9), p.2224-2228.

Rowe W P, Hartley J W, Waterman S et al. Cytopathogenic agent resembling salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 92: 418-424.

Rubin R H. Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Rev Infec Dis* 1990; 12(suppl 7): 754-766.

Rubin R H. Infectious disease complication in renal transplantation. *Kidney Int* 1993; 44: 221-236.

Rubin R H. Preemptive therapy in immunocompromised hosts. *N. Engl. J. Med.* 1991; 324: 1057-1059.

Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Erlich H A. Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.

Santos R L B. Propriedades gerais dos Herpesvírus. In: Lupi A, Silva A S, Pereira JR A C. – Hrepes Clínica, Diagnóstico e Tratamento, 1ª edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda 2000; cap 10, p.179-189.

Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G et al. High incidence of *human herpesvirus 6* infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood* 2002; 100 (6) : 2005-2011.

Saxinger C, Polesky H, Eby N, Grufferman S, Murphy R, Tegtmeir G, Parekh V, Memon S, Hung C. Antibody reactivity with HBLV (HHV-6) in US populations. *J Virol Methods* 1988; 21: 199-208.

Secchiero P, et al. Identification of human telomeric repeat motifs at the genome termini of *human herpesvirus 7*: structural analysis and heterogeneity. *J. Virol* 1995; 69, 8041-8045.

Shibata D, Martin W J, Appleman M D, Causey D M, Leedom J M, Arnheim N. Detection of Cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood of Patients Infected with Human Deficiency Virus. *J Infect Dis* 1988; 158: 1185-1192.

Sia I G & Patel R. New Strategies for Prevention and Therapy of Cytomegalovirus Infection and Disease in Solid-Organ Transplant Recipients. *Clinical Microbiology Reviews* 2000; 13: 83-121.

Singh N, Wannstedt C, Keyes L et al. Indirect Outcomes Associated with Cytomegalovirus (Opportunistic Infections, Hepatitis C Virus Sequelae, and Mortality) in Liver-Transplant Recipients with the Use of Preemptive Therapy for 13 Years. *Transplantation* 2005; 79: 1428–1434.

Singh N. & Carrigan D R. *Human Herpesvirus 6* in transplantation: An Emerging Pathogen. *Ann of Internal Med* 1996; 124: 1065-1071.

Singh N, Carrigan D R, Gaywsky T, Singh J, Marino I R. Variant B *human herpesvirus 6* associated febrile dermatosis with thrombocytopenia and encephalopathy in a liver transplant recipient. *Transplantation* 1995; 60: 1355-1357.

Smith M G, Vellios F. Inclusion disease or generalized salivary gland virus infection. *Arch Pathol* 1950; 50: 862-884.

Smith TF, Wilson JA, Harmsen WS et al. Human beta-herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* 2001; 183: 179-184.

Stinski M F. Cytomegalovirus and its replication. In: Fields B N, Knipe D M – *Virology*, 2 ed., New York, Raven Press Ltda 1990; p. 1959-1980.

Stocchi R, Szydlo R, Craddock C et al. A comparison of prophylactic vs pre-emptive ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after T-depleted volunteer unrelated donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 705-709.

Straus SE. - Introduction to *herpesviridae*. In: Mandel G L, Douglas Jr R G, Bennett J E. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 3ed., New York, Churchill Livingstone 1990; 1139-1144.

Suassuna J H R, Machado R D. Diagnóstico das Infecções por Citomegalovírus (CMV) em Pacientes com Deficiência Imunológica. *Revista da Associação de Medicina do Brasil* 1992; 38(1): 33-47.

Sweet C. The pathogenicity of *cytomegalovirus*. *FEMS Microbiology Reviews* 1999; 23: 457-482.

Takahashi Y, Yamada M, Nakamura J, Tsuzaki T, Padilla J, Kitamura T et al. Transmission of *human herpesvirus 7* through multigenerational families in the same household. *Pediatr Infect Dis* 1997; 16:975-978.

Tanaka K, Kondo T, Torigoe S, Okada S, Mukai T, Yamanishi K. Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthem subitum). *J Pediatr* 1994; 125:1-5.

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* 2004; 73:465-473.

Taniguchi T, Shimamoto T, Isegawa Y, Kondo K, Yamanishi K. Structure of Transcripts and proteins Encoded by U79-80 of *Human Herpesvirus 6* and Its Subcellular Localization in Infected Cells. *Virology* 2000; 271: 307-320.

Tegtmeier G E. Posttransfusion *cytomegalovirus* infections. Arch Pathol Lab Med 1989; 113: 236-245.

The TH, Van Der Ploeg M, Van Der Berg AP, Vlieger 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 1992; 54:193-198.

The T H, Van den Berg A P, Harmsen M C, Van der Bij W, Van Son W J. The cytomegalovirus antigenemia assay: a plea for standardization. Scand. J. Infect. Dis 1995; Suppl. 99: 25-29.

The T H, Van der Bij W, Van der Berg A P, Van der Giessen M, Weits J, Sprenger H G, Van Son W J. *Cytomegalovirus* Antigenemia. Rev. Infect. Dis. 1990; 12(7): 737-744.

The T H, Van der Ploeg M, Van der Berg A P, Vlieger A M, Van der Giessen M, Van Son W J. Direct detection of *cytomegalovirus* in peripheral blood leukocytes: a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. Transplantation 1992; 54(2): 193-198.

Thomas E D, Storb R, Clift R A, Fefer A, Johnson F L, Neiman P E, Lerner K G, Glucksberg H, Buckner C D. Bone Marrow Transplantation (second of two parts). N Engl J Med 1975; v. 292, p. 895-902.

Torigoe S, Koide W, Yamada M, Miyshiro E, Tanaka T K, Yamaishi K. *Human herpesvirus 7* infection associated with central nervous system manifestations. J Pediatr 1996; 129:301-305.

Tyler K L. *Human herpesvirus 6* and multiple sclerosis: the continuing conundrum. J Infect Dis 2003; 187:1360-1364.

Van den Berg AP, Klompmaker IJ, Haagsma EB et al. Evidence for an increased rate of bacterial infections in liver transplant patients with cytomegalovirus infection. *Clin Transplant* 1996; 10: 224.

Van den Berg J S, Van Zeijl J H, Rotteveel J J, Melchers W J, Gabreels F J, Galama J M. Neuroinvasion by *human herpesvirus type 7* in a case of exanthem subitum with severe neurologic manifestations. Neurology 1999; 52: 1077-1079.

Van den Berg A P, Klompaker I J, Haagsma E B, Scolten-Sampson A, Bijlevel CMA, Schirm J, Van der Giessen M, Slooff M J H, The T H. Antigenemia in the Diagnosis and Monitoring of Active Cytomegalovirus Infection after Liver Transplantation. *J Infect Dis* 1991; 164: 265-270.

Van der Bij W, Schirm J, Torensma R J, Van Son W, Tegzess A M and Hauw The T. Comparison between Viremia and Antigenemia for Detection of Cytomegalovirus in Blood. *J Clin Microbiology* 1988a; 26 (12): 2531-2535.

Van der Bij W, Torensma R, Van son W J, Tegzess A M, The T H. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. *J. Med. Virol.* 1988b; 25, 179-188.

Van der Meer J T M, Drew W L, Bowden R A, Galasso G J, Griffiths P D, Jabs D A, Katlama C, Spector A S, Whitley R J. Summary of the International Consensus Symposium on Advances in the Diagnosis, Treatment and prophylaxis of Cytomegalovirus Infection. *Antiviral Research* 1996; 32: 119-140.

Van Loon N M, Gummuluru S., Sherwood D J, Marentes R, Hall C B, Dewhurst S. Direct sequence analysis of *human herpesvirus 6 (HHV-6)* sequences from infants and comparison of HHV-6 sequences from mother/infant pairs. *Clinical Infect Disease* 1995; 21: 1017-1019.

Veronesi R, D M, D C. Citomegalia. *Doenças Infecciosas e Parasitárias* 1991; 8 ed.: 206-211.

Vilmer C, Pérol Y. Manifestations cutanées des infections à cytomegalovirus. *Ann Dermatol Vénéréol* 1984; 111: 119-125.

Wang F Z, Linde A, Hagghand I L, et al. Human herpesvirus 6 DNA in cerebrospinal fluid specimens from allogeneic bone marrow transplant patients: does it have clinical significance?. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 562-568.

Ward K N- The natural history and laboratory diagnosis of *human herpesvirus-6 and -7* infections in the immunocompetent. *J Clin Virol* 2005; 32:183-193.

Ward K N, Gray J J. Primary *human herpesvirus-6* infection is frequently overlooked as a cause of febrile fits in young children. *J Med Virol* 1994; 42:119-123.

Ward K N, Turner D J, Parada X, Thiruchelvan A D. Use of immunoglobulin G antibody avidity for differentiation of primary human herpesvirus 6 and 7 infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39:959-963.

Weller T H. The *cytomegaloviruses*: ubiquitous agents with protean clinical manifestations (First of two parts). *N. Engl J Med* 1971; 285: 203-214.

Weller H, Macauley J C, Craig J M, Wirth P. - Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illness resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1957; 94: 4-12.

Winston D J, Ho W G, Champlin R E. *Cytomegalovirus* infections after allogeneic bone marrow transplantation. *Rev Infect Dis* 1990; 12 (Suppl. 7): S776-792.

Yamanishi K. Human Herpesvirus 6: na Evolving Story. *Herpes* 2000; 7(3):70-75.

Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, Kurata T, et al. Identification of *human herpesvirus 6* as a causal agent for exanthem subitum. *The Lancet* 1988; 1(8594): 1065-1067.

Yoshikawa T. *Human herpesvirus-6 and 7* infections in transplantation. *Pediatr Transpl* 2003; 7:11-17.

Yoshukawa T, Suga S, Asano Y, Nakashima T, Yazaki T, Ono Y, et al. A prospective study of *human herpesvirus 6* infection in renal transplantation. *Transplantation* 1992; 54: 879-883.

***8- ANEXOS***

CEP. 25/07/06.  
(PARECER PROJETO 462/2003)

## PARECER

### I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “DETECÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA POR CITOMEGALOVÍRUS E HERPESVÍRUS HUMANO TIPO 6 E 7 PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sandra Helena Alves Bonon

### II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a Emenda que altera o título para “HERPESVÍRUS HUMANO 5, 6 E 7 (HHV-5, HHV-6, HHV-7) EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA”, bem como a responsabilidade que passa a ser da mestrandia Daniela Corte Parola, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de julho de 2006.

**Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 - Campinas - SP

FONE (019) 3788-8936  
FAX (019) 3788-7187  
cep@fcm.unicamp.br

## ***9- APÊNDICES***

## APÊNDICE A- CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, \_\_\_\_\_  
aceito colaborar com um estudo que está sendo realizado na Universidade Estadual de Campinas, para a pesquisa do Citomegalovírus Humano. Para isso, sei que colherão uma amostra de sangue (4-8 ml) para a realização da pesquisa.

Estou ciente que poderei desistir de participar deste estudo a qualquer hora, e que isto em nada irá prejudicar o meu tratamento.

Qualquer esclarecimento, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa - FCM/UNICAMP pelo telefone (019) 3788-7232.

Campinas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Paciente: \_\_\_\_\_

(responsável)

Médico: \_\_\_\_\_

## **APÊNDICE B- CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES QUE APRESENTARAM DOENÇA POR HCMV**

1) Paciente 5 (D+/R+) / óbito: Portador de LMC, apresentou N-PCR positiva para HCMV, HHV-6 (soro) e HHV-7 (soro), negando febre e náuseas. Realizou-se biópsia de pele (cavidade oral), diagnosticando GVHD. Evoluiu com doença por HCMV no TGI comprovado por biópsia a partir do dia +144. Utilizou tratamento com ganciclovir. Óbito no dia +189 por GVHD.

2) Paciente 6 (D+/R+) / óbito: Portador de LNH, começou a apresentar febre e vômitos no dia +63, mantendo este quadro até o dia +142. A PCR para HCMV tornou-se positiva no dia do aparecimento dos sintomas (+63). Fez tratamento com ganciclovir. Realizaram-se biópsias de boca e pele (diagnosticando GVHD agudo), fígado (necrose e hemorragia) e colonoscopia (processo inflamatório leve descontínuo, compatível com GVHD). Evoluiu com necrose gástrica, submetido a esplenectomia e com doença por HCMV no TGI comprovado por biópsia no dia + 119, pulmão, insuficiência renal e respiratória aguda. Óbito no dia +157 por doença por HCMV disseminada.

3) Paciente 8 (D+/R+) / vivo: Portador de LMA, apresentou N-PCR positiva para HCMV, HHV-6 (soro) e HHV-7 (soro), negando febre e náuseas. Diagnóstico por doença por HCMV no TGI comprovado por biópsia no dia +40. Utilizou tratamento com ganciclovir. Biópsia de fragmento da mucosa oral, compatível com GVHD.

4) Paciente 18 (D+/R+) / óbito: Portador de LMC apresentou febre de origem indeterminada no dia do transplante. Apresentando N-PCR positiva para HCMV no dia +26, mantendo este quadro até o dia +69. Utilizou tratamento com ganciclovir. Realizaram-se biópsias no dia +26: Duodeno, esôfago e estômago, sem alterações de GVHD. Evoluiu com doença por HCMV no Trato gastrointestinal (TGI) comprovado por biópsia no dia +69. Óbito no dia +85 por Insuficiência Respiratória Aguda sem etiologia.

5) Paciente 21 (D+/R+) / vivo: Portador de LMA começou a apresentar diarreia e febre alta no dia +29, com N-PCR positiva para HCMV no dia +40, mantendo o quadro de positividade até o dia +143. Biópsias: glândula salivar menor no dia +134 (compatível com GVHD agudo), fígado no dia +143 (hepatite aguda com necrose hepatocelular),

esôfago e estômago no dia +42 (compatível com GVHD). Evoluiu com doença por HCMV no Trato gastrointestinal (TGI) comprovado por biópsia no dia +36. Utilizou tratamento com ganciclovir.

6) Paciente 22 (D+/R+) / vivo: Portador de LMC começou a apresentar diarreia e vômito no dia +36 e N-PCR positiva para HCMV no dia +47, mantendo o quadro de positividade até o dia +82. Evoluiu com doença por HCMV no Trato gastrointestinal (TGI) comprovado por biópsia no dia +114. Utilizou tratamento com ganciclovir.

7) Paciente 25 (D+/R+) / vivo: Portador de MM começou a apresentar febre e diarreia no dia +64, mantendo o quadro clínico até o dia +170. A N-PCR para HCMV tornou-se positiva no dia do aparecimento dos sintomas (+64) e continuou até dia +170. Apresentou no dia +154 soro viremia para HHV-6. Utilizou tratamento com ganciclovir. Biópsias: Pele, boca e intestino no dia +93 (diagnosticando GVHD) e repetição das biópsias no dia +141 (diagnosticando também a presença de GVHD). Evoluiu com doença por HCMV no TGI comprovado por biópsia no dia +160.

8) Paciente 33 (D+/R+) / óbito: Portador de LMC começou a apresentar febre, emagrecimento, vômito e diarreia no dia +59. A N-PCR para HCMV tornou-se positiva no dia +24, mantendo o quadro de positividade e sintomas até o dia +145. Utilizou tratamento com ganciclovir. Realizaram-se biópsias gástrica (diagnosticando GVHD) e hepática (inconclusiva). Evoluiu com doença por HCMV TGI comprovado por biópsia. Óbito no dia +157 por choque hipovolêmico e parada cardíaca não especificada.