

ANA MARIA SAMPAIO

**DETECÇÃO E MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA
POR HERPESVÍRUS HUMANO HHV-5, HHV-6 E HHV-7
EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE FÍGADO**

CAMPINAS

2007

ANA MARIA SAMPAIO

**DETECÇÃO E MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA
POR HERPESVÍRUS HUMANO HHV-5, HHV-6 E HHV-7
EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE FÍGADO**

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

Orientador: Prof^ª. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

CAMPINAS

2007

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

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

UNIDADE BC
Nº CHAMADA: T/UNICAMP Sa47d
V. _____ EX. _____
TOMBO BCCL 77160
PROC 16.129.08
C _____ D x
PREÇO 11,00
DATA 17-06-08
BIB-ID 437385

Sa47d Sampaio, Ana Maria
Detecção e monitorização da infecção ativa por Herpesvírus Humano HHVS, HHV-6 e HHV-7 em pacientes transplantados de fígado / Ana Maria Sampaio. Campinas, SP: [s.n.], 2007.

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

1. Rejeição de enxerto. 2. Citomegalovírus. 3. Reação em cadeia da polimerase. I. Costa, Sandra Cecília Botelho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Human herpesvirus 5, 6 and 7 as potential pathogens after liver transplant

Keywords: • Graft Rejection

- Cytomegalovirus
- Polymerase chain reaction

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Profa. Dra. Maria de Lourdes Rios Barjas Castro

Profa. Dra. Andréa Mendonça Gusmão Cunha

Data da defesa: 31-01-2007

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Membros:

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

Profa. Dra. Maria de Lourdes Rios Barjas Castro

Profa. Dra. Andréa Mendonça Gusmão Cunha

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

Data: 31/01/2007

200811940

Ao precursor desta minha realização profissional, que foi meu marido e amigo, grande pai e brilhante profissional, Mauro Dantas Neder (*em memória*) à quem eu devo muito das minhas realizações como pessoa e profissional, na sua presença e mesmo na ausência física, pois sempre esteve como uma luz que me guiava e protegia nessa maravilhosa caminhada.

Em especial meus filhos Luana e Gabriel, por toda a compreensão pelos diversos momentos os quais estive ausente em busca do meu objetivo, hoje finalmente alcançado, também são os donos das minhas vitórias!

A minha avó Maria Francisca (em memória), pelos ensinamentos os quais estarão sempre nas lembranças de minha infância.

A minha mãe Ana Rosa pela minha existência, formação e dedicação.

Aos meus enteados Yumi e Fabio, seres que chegaram à minha vida e permaneceram com suas doces presenças.

Aos seres especiais na minha vida Egleizer, pela presença e apoio, Pedro e Vitória presentes no meu coração.

Aos meus amigos irmãos que compartilham todos os momentos mostrando a verdadeira amizade, amor e companherismo, Anali, Keila, Jivan, Gustavo, Camila, Carolzinha, Vagner, Beatris, Fernanda e Lilian.

A querida amiga Andréa um ser humano dos mais brilhantes que já conheci!

À equipe da Cirurgia Cardíaca Dr. Reinaldo, Dr. Orlando, Dr. Pedro, Dr. Lindenberg, os Perfusionistas Nilson e Márcio, as instrumentadoras Dalva e Lídia, a secretária Terezinha profissionais brilhantes e seres humanos que tenho grande respeito e estima, uma família que ganhei nestes anos pela oportunidade de ter chegado aqui e conhecido pessoas tão especiais.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente à DEUS que é o autor do meu raciocínio, da minha vida e de tudo que nela acontece. É de sua autoria esse presente maravilhoso e de valor inestimável. Obrigado Senhor DEUS pelos dias de dúvidas, incertezas, angústia e felicidade, das noites mal dormidas. Obrigada pela perseverança e pelo amadurecimento que essa pesquisa me proporcionou.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Sandra Cecília Botelho Costa, a grande responsável pela materialização desta obra, meus profundos agradecimentos por toda confiança, oportunidade, paciência e apoio em momentos difíceis, que Deus sempre a ilumine.

À Prof^a Dr^a Ilka F. F. S. Boin, pela confiança, amizade e incentivo, pelo apoio, conselhos e valorização deste estudo, pela partilha de conhecimentos, em especial, pelo interesse sempre demonstrado, serei eternamente grata!

Aos Professores membros da banca de defesa Profa Dra Maria de Lourdes Castro, Profa Dra Andrea Gusmão, Profa Dra Monica de Mello, Prof Dr Reinaldo Vieira, pela participação e partilha de conhecimentos.

Com essa obra tive um ótimo direcionamento científico e de vida. Tive inúmeras provas de amizade, carinho, amor e desprendimento, dos amigos que souberam ouvir e respeitar meu estresse.

Aos familiares dos doadores, pela permissão da doação do ente querido, pelo exemplo de determinação e amor ao próximo, meu eterno respeito e admiração.

Ainda para todas aquelas almas que fizeram o BEM e deram um pedaço de si para salvar a vida do seu irmão.

Em especial aos meus pacientes, por terem aceitado participar deste estudo, com vocês muito aprendi, cresci como ser humano, minha eterna admiração pela força e coragem da luta de viver.

Ao Chefe da Equipe de Transplante de Fígado, Prof. Dr. Luis Sergio Leonardi pela permissão de coletas das amostras realizadas no Centro Cirúrgico e Ambulatório de Transplante.

A Prof^a Dr^a Marília Iracema Leonardi pelo incentivo e colaboração na partilha de conhecimentos.

A querida Prof^a Dr^a Raquel Stuchi pela amizade, colaboração, atenção e valorização deste trabalho.

Ao Prof Dr Claudio Lúcio Rossi pelo ensinamento e direcionamento compartilhado no decorrer do projeto.

A Prof^a Dr^a Ana Laura Remédio Beretta por sua amizade e apoio.

A equipe de alunos de pós-graduação que estiveram envolvidos neste estudo, Ronaldo Thomasini, Carol Guardia, Fernanda Costa, meus profundos agradecimentos pela amizade e partilha de idéias.

As estagiárias que muito se empenharam e contribuíram Renata Borges e Cristiane de Oliveira, no decorrer do estudo.

A Paula Durante, responsável técnica do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular, pelo acolhimento, apoio nos momentos de dificuldades, alguém que muito admiro como ser humano e profissional, por todo conhecimento, equilíbrio e postura.

A Sandra Bonon, responsável técnica do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnica de Antigenemia pela contribuição.

As amigas Daniela Parola e Bruna Roesler pela amizade, carinho e respeito, seres iluminados!

Aos amigos e companheiros de pós-graduação Sheila, Gláucia, Emanuel, Angélica, Dias, Daniela, Aglécio, Breno, Conceição, Gustavo e Claudia, mesmo indiretamente contribuíram para a realização deste estudo, apenas com suas presenças, sempre demonstrando o sorriso, amizade, respeito, solidariedade nessa trajetória.

Aos ex-alunos da Iniciação Científica agora residentes Vagner, Marcelo Soki e Everton Patrocínio, pela sintonia no início do trabalho, como também pela amizade que cresceu e se solidificou.

Aos alunos de Iniciação Científica Dayane Martins e Alan pela amizade, o trabalho realizado em equipe e discussão de casos.

Aos estagiários do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas e Biologia Molecular, Manoel e Camila pela amizade e valorização do estudo.

As alunas do programa de Ciências e Artes nas Férias Jaqueline e Fabiana.

A amiga Dulcinéia responsável técnica do Laboratório de Hemoglobina e Genoma, pela amizade e partilha de conhecimentos.

A doutoranda Janaina do Laboratório de Genética Molecular do Câncer Geemoca, pela amizade e partilha de conhecimentos.

Ao corpo de enfermagem da Gastroclínica, Gastrocirurgia, e Unidade de Terapia Intensiva (UTI) pela colaboração na realização de coletas de amostras, em especial as enfermeiras Luzia e Luiza por toda contribuição.

A todos os residentes que passaram pela equipe do Transplante de Fígado no decorrer desse estudo, pela amizade, pelas informações prestadas que foram de grande valia.

As funcionárias do Ambulatório de Transplante de Fígado, as enfermeiras Marina, Bete e Rosangela, a psicóloga Belinha e a secretária Deuza, por toda colaboração no decorrer do estudo e amizades que se solidificaram.

A Dr^a Ângela da gastropediatria, pela amizade, atenção e esclarecimentos sempre prestados.

As funcionárias do Laboratório de Tolerância a Lactose, a enfermeira Célia por sua colaboração em momentos de dificuldades no procedimento de coletas, a biomédica Dr^a Célia pela participação e a bióloga Helena por sua atenção e amizade.

A Dr^a Elza responsável pelo laboratório de Tolerância a Lactose pela permissão da utilização do espaço nos procedimentos de coletas semanais.

Ao Marcos do Departamento de Cirurgia – UTI pelo armazenamento das amostras.

A Rose responsável técnica do Laboratório de Reumatologia pelo armazenamento de amostras.

Aos circulantes de sala do transplante de fígado do centro cirúrgico Enoc, Cida e em especial a dona Jô à qual muitas vezes me orientou e contribui para captação de amostras em dias de transplante.

Aos meus alunos que muito contribuem mesmo que indiretamente me incentivando sempre com suas palavras de carinho e respeito.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma, meus sinceros agradecimentos!

*Cuidar dos outros é tão necessário
quanto o oxigênio é uma
necessidade biológica!!!*

(Patch Adams)

*É possível espalhar
“bactérias” ou “vírus” do amor entre as pessoas,
infectando-as de boas intenções e
proporcionando, dessa forma,
melhores ações por parte de todas elas!*

(Patch Adams)

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xxxix</i>
ABSTRACT.....	<i>xlili</i>
1- INTRODUÇÃO.....	47
1.1- Histórico do Transplante de Fígado.....	49
1.2- Histórico dos Herpesvírus Humano (HHV-5, HHV-6, HHV-7).....	50
1.3- Características Biológicas do HHV-5, HHV-6 e HHV-7.....	53
1.3.1- Classificação e Estrutura.....	53
1.4- Replicação e Patogênese do HHV-5, HH-6 e HHV-7.....	57
1.5- Transmissão e Epidemiologia do HHV-5, HH-6 e HHV-7.....	60
1.6- Manifestações Clínicas.....	62
1.7- Diagnóstico Laboratorial.....	64
1.7.1- Técnicas Citoplasmáticas e Histopatológicas.....	65
1.7.1a-Técnicas Citoplasmáticas.....	65
1.7.1b- Técnicas Histopatológicas.....	65
1.7.2- Isolamento Viral.....	66
1.7.3- Sorológicos.....	67
1.7.3a- Imunofluorescência.....	68
1.7.3b- Imunoensaios.....	69
1.7.3c- Método de Avidéz para anticorpos para HHV-7.....	70
1.7.3d- Método Western Blot para HHV-7.....	70

1.7.4- Antigenemia.....	70
1.7.4a- Antigenemia para HHV-5.....	70
1.7.4b- Antigenemia para HHV-6 e HHV-7.....	72
1.7.5- Nested PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	73
1.8- Tratamento e Prevenção da Infecção ativa pelo HHV-5, HHV-6 e HHV-7.....	74
2- OBJETIVOS.....	77
2.1- Principais.....	79
2.2- Secundários.....	79
3- CASUÍSTICA.....	81
3.1- Critérios para Diagnóstico de Infecção Ativa para HHV-5.....	84
3.2- Critérios para Diagnóstico de Infecção Ativa para HHV-6 e HHV-7.....	84
3.3- Critérios para Diagnóstico de Co-infecção para HHV-5, HHV-6 e HHV-7.....	84
3.4- Critérios para Caracterizar Provável Doença por HHV-5.....	84
3.5- Critérios para Caracterizar Provável Doença por HHV-6.....	85
3.6- Critérios de Inclusão no Estudo.....	86
3.7- Critérios de Exclusão.....	86
4- MÉTODOS.....	87
4.1- Antigenemia.....	89
4.1.1- Antigenemia para HHV-5.....	89
4.1.2- Extração de polimorfonucleares.....	89
4.1.3- Preparação das lâminas.....	90

4.1.4- Reação das lâminas.....	90
4.1.5- Coloração das lâminas.....	91
4.1.6- Leitura das lâminas.....	91
4.1.7- Interpretação das lâminas.....	91
4.2- Antigenemia para HHV-6 e HHV-7.....	91
4.2.1- Extração de células mononucleares (1ª parte).....	91
4.2.2- Preparação das lâminas.....	92
4.2.3- Reação das lâminas para HHV-6 (2ª parte).....	92
4.2.4- Reação das lâminas para HHV-7 (2ª parte- em padronização).....	93
4.2.5- Coloração das lâminas.....	93
4.2.6- Interpretação da leitura.....	93
4.3- Nested-PCR para HHV-5 e HHV-6.....	94
4.3.1- Extração do DNA em sangue periférico.....	94
4.3.2- Nested-PCR para HHV-5.....	94
4.3.2.1- Primers utilizados para reação de Nested-PCR para HHV-5.....	95
4.3.3- Nested-PCR para HHV-6.....	96
4.3.3.1- Primers utilizados para reação de Nested-PCR para HHV-6.....	97
4.4- Nested-PCR para HHV-7.....	98
4.4.1- Extração de DNA em soro.....	98
4.4.2- Nested-PCR para o HHV-7.....	98
4.4.3- Primers utilizados para reação de Nested-PCR - HHV-7.....	99
4.5- Estatística.....	100

5- RESULTADOS.....	101
5.1- Interpretação dos resultados.....	103
5.1.1- Antigenemia.....	105
5.1.2- Nested-PCR para HHV-5.....	106
5.1.3- Nested-PCR para HHV-6.....	107
5.1.4- Nested-PCR para HHV-7.....	108
6- DISCUSSÃO.....	123
7- CONCLUSÃO.....	131
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
9- APÊNDICES.....	153
9.1- Apêndice 1.....	155
9.2- Apêndice 2.....	157
9.3- Apêndice 3.....	159
9.4- Apêndice 4.....	161
9.5- Apêndice 5.....	163
9.6- Apêndice 6.....	165

°C	Graus Celsius
AGM	Antigenemia
AIDS ou SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
dATP	Desoxirribonucleotídeo adenina trifosfato
dCTP	Desoxirribonucleotídeo citosina trifosfato
dGTP	Desoxirribonucleotídeo guanina trifosfato
dTTP	Desoxirribonucleotídeo timina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico ou ADN
E	Fase precoce do ciclo de replicação do HHV-5
EA	Antígenos precoces (“Early antigens”)
EBV	Epstein-Barr Vírus
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay ou Ensaio Imunoenzimático
g	Gramas
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HHV-5	Herpesvírus Humano 5 (citomegalovírus)
HHV-6	Herpesvírus Humano Tipo 6
HHV-7	Herpesvírus Humano Tipo 7
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IE	Fase imediatamente precoce do ciclo de replicação do HHV-5
IEA	Antígenos imediatamente precoces (“Immediatery early antigens”)

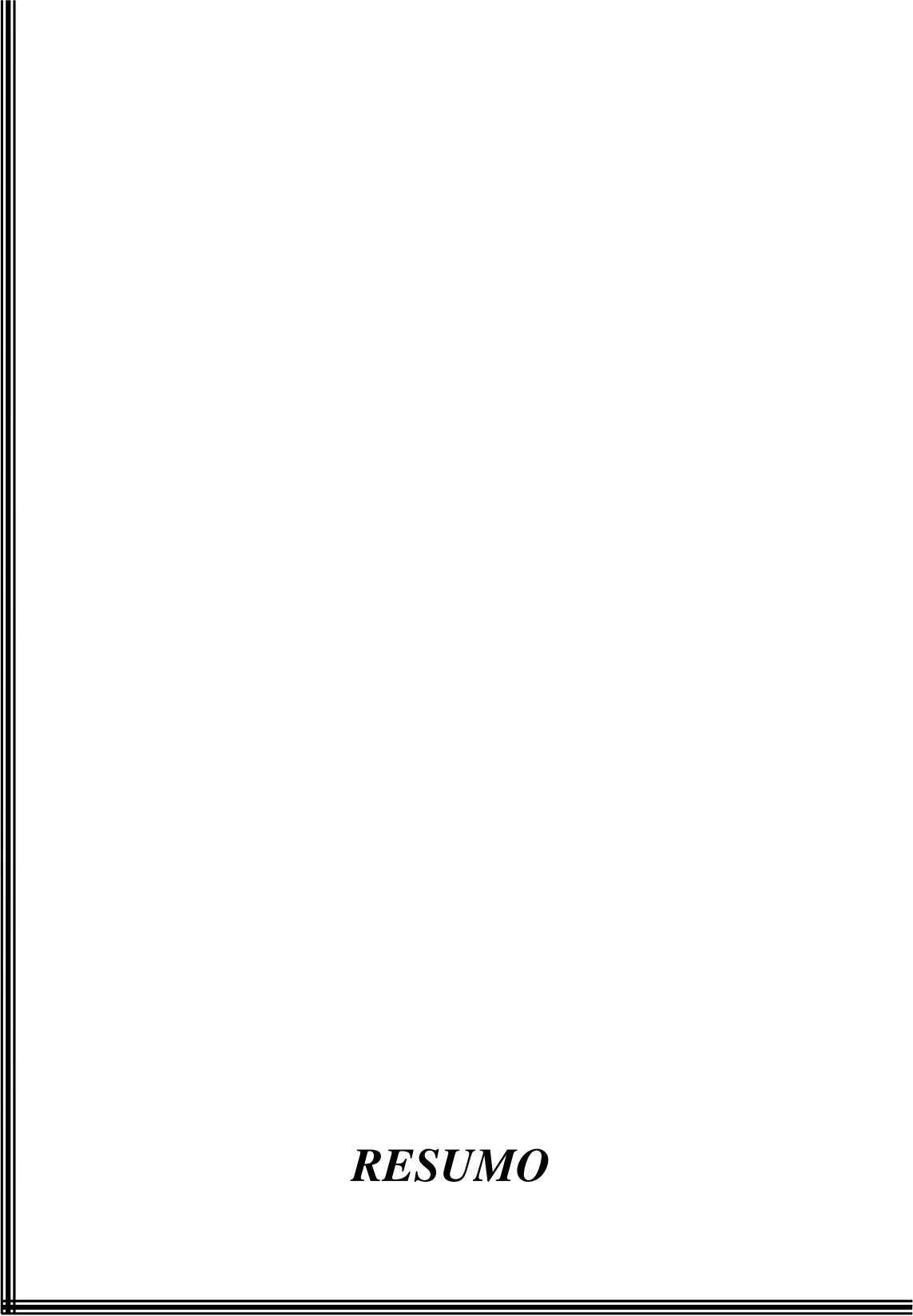
IgG	Imunoglobulinas da classe G
IgM	Imunoglobulinas da classe M
IL	Interferon
L	Fase tardia do ciclo de replicação do HHV-5
LA	Antígenos Tardios (“Late antigens”)
Nested-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ou dupla PCR
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TOF	Transplante ortotópico de fígado

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Sequência dos primers utilizados para a PCR para o HHV-5.....	95
Tabela 2 Sequência dos primers utilizados para a Nested-PCR para o HHV-5.....	95
Tabela 3 Sequência dos primers utilizados para a PCR para o gene da β -Globina.....	96
Tabela 4 Sequência dos primers utilizados para a PCR para o HHV-6.....	97
Tabela 5 Sequência dos primers utilizados para a Nested-PCR para o HHV-6.....	98
Tabela 6 Sequência dos primers utilizados para a PCR para o HHV-7.....	99
Tabela 7 Sequência dos primers utilizados para a Nested-PCR para o HHV-7.....	99
Tabela 8 Características dos receptores de transplante hepático em relação ao sexo e idade.....	103
Tabela 9 Características dos pacientes estudados em relação à doença de base.....	104
Tabela 10 Panorama geral dos resultados obtidos, durante a monitorização do HHV-5, HHV-6 e HHV-7 após o transplante hepático.....	109
Tabela 11 Infecção ativa pelo HHV-5, HHV-6, HHV-7 e co-infecção HHV-5/HHV-6, co-infecção HHV-5/HHV-7, co-infecção HHV-6/HHV-7 e co-infecção HHV-5/HHV-6/HHV-7.....	114

Tabela 12	Relação entre provável doença por HHV-5, alterações clínicas e laboratoriais, infecção ativa por HCMV, co-infecção ativa por HHV-5 e HHV-6, co-infecção ativa por HHV-5/HHV-7 e co-infecção ativa por HHV-5/HHV-6/HHV-7.....	116
Tabela 13	Relação entre infecção ativa por HHV-5, co-infecção ativa entre HHV-5 e HHV-6, infecções oportunistas e rejeição do enxerto.....	119
Tabela 14	Pacientes que tiveram rejeição mediante laudo anatomopatológico.....	121
Tabela 15	Resultados obtidos na padronização da antigenemia para HHV-6 e demais resultados para HCMV, HHV-6 e HHV-7.....	163

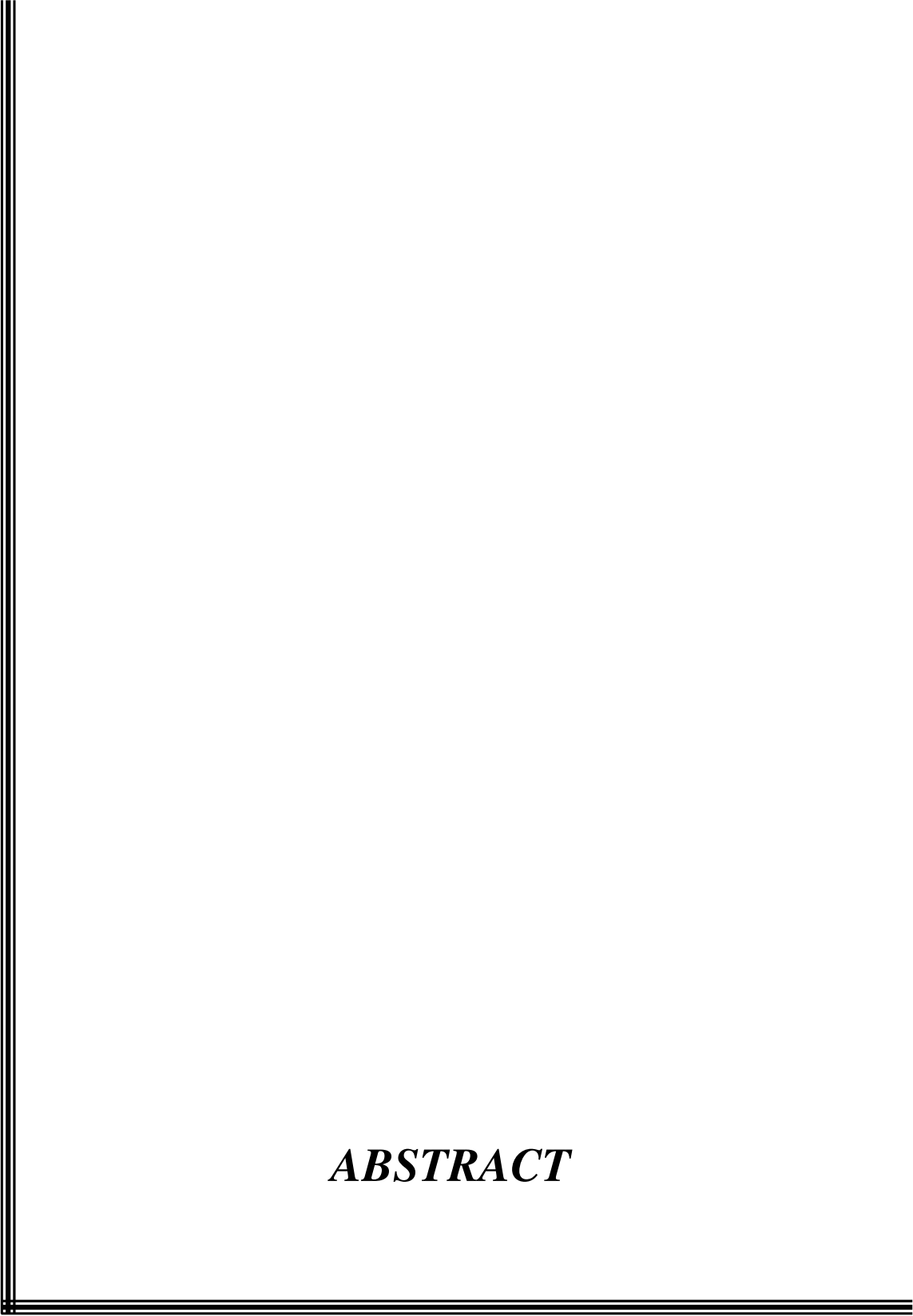
	<i>Pág.</i>
Figura 1 Estrutura Morfológica dos Herpesvírus.....	54
Figura 2 Ciclo de Replicação.....	58
Figura 3 Inclusão do HHV-5 em tecido.....	65
Figura 4 Leucócito de sangue periférico HHV-5 positivo.....	105
Figura 5 Linfócito de sangue periférico HHV-6-positivo.....	105
Figura 6 Nested-PCR positiva para HHV-5.....	106
Figura 7 Nested-PCR positiva para HHV-6.....	107
Figura 8 Nested-PCR positiva para HHV-7.....	108
Figura 9 Ilustração da lâmina de antigenemia para o HHV-6 padronizada neste estudo (Linfócito HHV-6 positivo).....	161

	<i>Pág.</i>
Gráfico 1 Distribuição dos pacientes transplantados hepáticos quanto ao sexo.....	103
Gráfico 2 Indicações para Transplante Hepático.....	105
Gráfico 3 Taxa de infecção ativa pelo HHV-5, HHV-6 e o HHV-7 no presente estudo.....	112
Gráfico 4 Comparação entre a média dos tempos de início da detecção da infecção ativa pelo HHV-5, HHV-6 e HHV-7.....	113
Gráfico 5 Comparação entre a média dos tempos de início da detecção da infecção ativa pelo HHV-5 pelas técnicas de Nested-PCR e antigenemia (AGM).....	113
Gráfico 6 Relação entre infecção ativa por HHV-5, HHV-6 e HHV-7, co-infecção ativa por HHV-5 e/ou HHV-6 e/ou HHV-7, provável doença por HCMV, infecção oportunista, rejeição do enxerto e óbito (n=53).....	122



RESUMO

O Herpesvirus Humano 5 (HHV-5), Herpesvirus Humano 6 (HHV-6) e o Herpesvírus Humano 7 (HHV-7), são vírus universais pertencentes à subfamília betaherpesvirinae, e apresentam alta prevalência na população brasileira. Em adultos saudáveis, após infecção primária, esses vírus permanecem latentes, podendo ser reativados em um período de imunossupressão, como acontece em pacientes submetidos a transplantes, o que pode causar complicações graves, que vão desde rejeição de enxertos ao óbito. Esse estudo visou a monitorização da co-infecção pelo HHV-5, HHV-6 e HHV-7 em pacientes submetidos a transplante hepático no Hospital das Clínicas da UNICAMP e a correlação dos dados obtidos com o impacto clínico nesse grupo de pacientes para compreender melhor os aspectos que envolvem a infecção ativa pelo HHV-5, HHV-6, HHV-7 e suas inter-relações, utilizando técnicas laboratoriais que fazem diagnóstico precoce de infecção ativa, avaliação da terapia antiviral específica e prevenção da doença causada por esses vírus. Foram monitorizados 53 pacientes transplantados hepáticos através de testes de antigenemia e NESTED-PCR (N-PCR) em sangue periférico para a detecção do HHV-5, NESTED-PCR em sangue periférico para a detecção do HHV-6, NESTED-PCR em soro para detecção do HHV-7, que foram realizadas no pré-operatório e periodicamente no pós-operatório. Com essa metodologia 33/53 (62,3%) dos pacientes apresentaram infecção ativa por HHV-5, 21/53 (39,6%) por HHV-6 e 23/53 (43,4%) por HHV-7. A co-infecção ocorreu em 8/53 (15,1%) para HHV-5/HHV-6, e 5/53 (9,4%) para HHV-5/HHV-7, 2/53 (3,8%) por HHV-6/HHV-7, e 1/5 (1,9%) pelos três vírus estudados (HHV-5/HHV-6/HHV-7). Apresentaram infecções oportunistas 31/53 (58,5%) dos pacientes estudados, e destes 21/31 (39,6%) tiveram infecção ativa isoladamente por HHV-5, 14/31 (26,4%) tiveram infecção ativa isoladamente por HHV-6, e 11/31 (20,8%) tiveram infecção ativa isoladamente por HHV-7. Os resultados obtidos e os inúmeros estudos sobre o impacto clínico da detecção e tratamento desses betaherpsvírus em pacientes transplantados hepáticos mostram a importância de estudarmos sua prevalência, métodos diagnósticos e seu impacto clínico em nosso meio.



ABSTRACT

The human herpesvirus 5, human herpesvirus 6 e human herpesvirus 7 to the β -herpesvirus subfamily of the Herpesviridae family. They show a hight prevalence in the population. Many times the infection remains assintomatic in healthy adults and can be reactivated from immunosuppression period especially after organ transplantation, as it happens to patients that underwent an organ transplantation, though it can cause several complication that are since allograft rejection to mortality. This study shows the monitoring of concurrent infection by HHV-5, HHV-6 and HHV-7 in patients that had been undergone to liver transplantation and the results among them with the clinic impact in this infection by HHV-5, HHV-6 and HHV-7 and its concurrent, using lab tecnica that present an early diagnostic of the active infection, management of specific therapy antiviral and prevention of the deseases caused by these virus. Fifty three patients posttranplanted were assisted though antigenemia and nested-pcr tests in peripheral blood to detection of HHV-5, and N-pcr in peripheral blood to detection of HHV-6 and N-pcr in serum to detection of HHV-7 that were done during before transplantation and always in the posttransplantation in these patients and its medical record analysis. The antigenemia to the HHV-6 and HHV-7 was (standard) for the first part of the test and the part is in the standard time. With this methodological, 62,3% of the patients showed active infection by HHV-5, 39,6% by HHV-6 and 43,4% by HHV-7, 15,1% of the patients, showed (co-infection) HHV-5 and HHV-6, 9,4% by HHV-5/HHV-7, 3,8% by HHV-6/HHV-7 and 1,9% by three virus (HHV-5/HHV-6/HHV-7). 58,5% of the patients studied showed opportunistics infections, and 39,6% showed isoled active infection by HHV-5, (26,4%) showed isoled active infection by HHV-6 and (20,8%) showed isoled active infection by HHV-7. (58,5%) showed oportunites infection , 29% showed any kind of allograft rejection, 44,4% showed active infection by HHV-5, 44,4% showed active infection by HHV-6 and 33,3% by HHV-7.

Human herpesvirus (HHV) 6 and 7 are novel members of the β -herpesvirus family that maintain latency in the human host after primary infection. Reactivation from latency and/or increased degree of viral replication occurs during periods of immune dysfunction. The clinical effect of HHV-6 and HHV-7 reactivation in recipients of liver transplants is now being recognized. A growing body of evidence suggests that the more important effect of HHV-6 and HHV-7 reactivation on the outcomes of liver transplantation may be mediated indirectly by their interactions with the other β -herpesvirus - cytomegalovirus (HHV-5) we conducted a prospective study in fifty three liver transplant patients to detect active infection by HHV-5, 6 and 7, using Nested PCR and antigenemia tests. Active infection with HHV-5 was detected in 62,3% by HHV-6 in 39,6% and 43,4% by HHV-7. Co- infection by HHV-5/HHV-6 occurred in 15,1% of the patients, by HHV-5/HHV-7 in 9,4%, by HHV-6/HHV-7 in 3,8% and by HHV-5/HHV-6/HHV-7 in 1,9%. Fifty eight percent of the patients studied showed opportunistic infections, of this 39,6% had isolated active infection by HHV-5, 26,4% isolated active infection by HHV-6 and 20,8% isolated active infection by HHV-7. In conclusion, HHV-5, HHV-6 and HHV-7 active infection, are frequent in liver transplant patients and early diagnose to prevent clinical impact are necessary.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico do transplante de fígado

O transplante de fígado representa a única forma efetiva de tratamento de uma série de doenças hepáticas terminais. Em 1955, foi realizado pela primeira vez um transplante hepático pelo uso da técnica heterotópica, pela qual o fígado do doador foi colocado no abdômen inferior e o fígado do receptor foi deixado em sua posição original. O primeiro transplante ortotópico de fígado (TOF), em que o fígado do doador substitui o do receptor, foi realizado em cães nos laboratórios de MOORE, em Boston, e STARZL, em Chicago, respectivamente em 1959 e 1960 (**Ringe, 1994**). Em 1963, Starzl, realizou o primeiro transplante ortotópico de fígado em humanos. Nos quatro anos seguintes, realizou um total de sete cirurgias, porém em nenhum caso a sobrevida foi maior que 23 dias (**Starzl, 1981**).

No Brasil, o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, realizou várias tentativas por duas equipes diferentes (**Raia, 1969**). Como aconteceu nos demais países, os resultados não foram os esperados e praticamente interrompeu-se o programa. Apenas quatro serviços permaneceram desenvolvendo programas de transplante de fígado até o final da década de 80: Os serviços de Thomaz Starzl, nos Estados Unidos (**Starzl, 1984**), o de Roy Calne, na Inglaterra (**Rolles, 1984**), o de Ruud Krom, na Holanda (**Krom, 1984**), e o de Rudolf Pichlmayr, na Alemanha (**Pichlmayr, 1984**), porém, os índices de mortalidade, ainda eram bastante elevados.

Até a década de 70 não existiam perspectivas de tratamento para pacientes com doenças de fígado em estágio avançado. Dispunham-se apenas de medidas paliativas, que eram capazes de diminuir o sofrimento do indivíduo durante a fase final da evolução da doença. Entretanto o transplante de fígado abriu perspectivas animadoras, representando, o maior progresso da hepatologia moderna.

Alguns centros com maior experiência referem 90% de alta hospitalar e 70% de sobrevida aos 5 anos pós-transplante (**Raia, 1989**).

O aumento de sobrevida pós-transplante hepático ocorreu em 1978 em Cambridge com o grupo liderado por Roy Calne onde foram introduzidos novos agentes imunossupressores para controle de rejeição (**Starzl, 1981**).

No início dos anos 80, o transplante hepático passou de um procedimento experimental para a terapêutica de escolha no tratamento das doenças crônicas ou agudas do fígado (**Raia, 1989**).

No Brasil o primeiro transplante de fígado bem sucedido foi realizado em 1º de Setembro de 1985 no Hospital das Clínicas da Faculdade Médica USP. A partir de então, a Unidade de Fígado passou a realizar, rotineiramente, o procedimento e até 1989, numa quantidade de 4 à 6 transplantes por ano. Em 1988, o grupo descreveu o primeiro transplante *inter vivos* de fígado (**Raia, 1989**).

O segundo grupo no Brasil à realizar transplante de fígado com sucesso, foi o do Instituto da Criança, em 1989, que também pertence ao Hospital das Clínicas da Faculdade Médica USP. A partir daí, diversos outros grupos passaram a se interessar pelo procedimento, inicialmente em São Paulo e, depois, em outros Estados.

A Unidade de Transplante Hepático do HC da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP passou a realizar transplante no início de setembro de 1991, sendo o primeiro grupo a realizar transplante no interior do Estado de São Paulo.

Até hoje foram realizados 330 transplantes de Fígado pela Equipe da Unicamp, em média de 20 a 30 cirurgias por ano.

1.2- Histórico dos herpesvírus humanos (HHV-5, HHV-6, HHV-7)

O Herpesvírus Humano 5 (HHV-5), o Herpesvírus Humano 6 (HHV-6) e o Herpesvírus Humano 7 (HHV-7) são universais pertencem à subfamília Betaherpesvirinae, da família *Herpesviridae* (**Lautenschlager, 2002; Miller et al., 2005**).

A soroprevalência do HHV-5 pode variar de 40% à 60%, em populações de alto nível sócio econômico, enquanto que em populações de nível sócio econômico mais baixo a soroprevalência é maior, variando de 80% à 100% . Para o HHV-6 a soroprevalência também é muito alta, em crianças a soroprevalência pode variar de 45% a 63%, e em adultos de 52% a 97% (**Miller et al., 2005; Mendelson et al., 2006**).

Desde que o HHV-7 foi isolado, ele tem sido relacionado à processos de exantema súbito em crianças, encefalopatia e encefalite quando acomete pacientes transplantados hepáticos (**Ward et al., 2005**). Em pacientes imunossuprimidos o HHV-7 pode se reativar e, em associação com outros herpesvírus causar danos tanto no órgão transplantado, como ao estado geral do paciente (**Ward et al., 2005**).

Esses vírus são universais e após infecção primária permanecem latentes, podendo ser reativados por um período de imunossupressão (**Mendelson et al., 2006; Griffiths, 1999; Griffiths, 2000**).

O Herpesvirus Humano 5 (HHV-5) foi inicialmente relacionado por Ribbert em 1904, ao agente etiológico da "Doença de Inclusão Citomegálica", cuja denominação deriva-se do efeito citopático característico, representado pelos aumentos dos volumes celulares pôr inclusões intranucleares e citoplasmáticas observadas nos tecidos infectados (**Weller, 1970; Murray, 1997**).

A primeira evidência experimental do provável agente etiológico da "Doença de Inclusão Citomegálica" foi proposta por Cole e Kuttner em 1926, quando demonstraram a transmissão da doença em cobais e sugeriram que este agente possuía características de vírus e que há infecção era tipo espécie-específica. O trabalho de Farber e Wolbach (1932) mostrou a primeira evidência de que o vírus de glândula salivar era relativamente frequente e demonstraram ter encontrado células citomegálicas típicas em 12% de crianças estudadas. Em 1954, usando a infecção salivar de camundongo como modelo, Smith conseguiu isolar o vírus em cultura de tecidos (Smith, 1956). Em 1956/57, o isolamento do Citomegalovírus Humano foi relatado quase que simultaneamente pôr três pesquisadores: Smith em St. Louis, Rowe em Bethesda e Weller em Boston, que utilizaram técnicas de cultura celular em amostras de urina e tecido de crianças com provável infecção causada pelo vírus (**Weller, 1970**). Weller listou 3 critérios para identificação do HHV-5: (a) tendência em causar infecção em glândula salivar; (b) crescimento lento, somente em linhagens celulares derivadas de seus hospedeiros naturais e (c) formação de inclusões citoplasmáticas, além das inclusões nucleares (**Weller, 1970**).

O HHV-5 foi originalmente classificado como herpesvírus, baseando-se em critérios morfológicos e bioquímicos. 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 HHV-5 ficou classificado como Herpesvírus Humano Tipo 5 (HHV-5). Em 1979, o mesmo Comitê reabilitou o nome citomegalovírus. A família Herpesviridae foi dividida em três subfamílias: vírus simples (Alphaherpesvirinae), citomegalovírus (Bethaherpesvirinae) e o grupo dos vírus linfoproliferativos (Gammaherpesvirinae) **(Ho, 1991; Brown e Abernathy, 1998).**

O Herpesvírus Humano tipo 6 (HHV-6) foi primeiramente isolado em 1986, pôr Salanhuddir et al, de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com desordens linfoproliferativas **(Leach et al, 2002; Sashihara et al, 2002; Taniguch et al, 2000)** e de pessoas com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) **(Braun et al, 1997)**, e subsequentemente nomeado de vírus linfotrópico B humano (HBLV), pois parecia apresentar um tropismo pelo linfócito B **(Santos, 2000).**

A microscopia eletrônica do HBLV revelou características morfológicas consistentes com uma classificação de herpesvírus. Foram realizadas análises do genoma deste vírus, e chegou-se a uma conclusão, de que este herpesvírus se distinguia de outros herpesvírus humanos e foi designado Herpesvírus Humano Tipo 6 (HHV-6), ficando de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus. **(Braun et al., 1997).**

Existem duas cepas do HHV-6 (A e B) e elas têm sido identificadas baseadas no mapa de enzimas de restrição, por reações de anticorpos monoclonais específicos e cultura de células **(Abdel e Asmar, 2004; Leen et al., 2005).**

No Japão em 1988, ocorreu a primeira publicação correlacionando doença clínica com HHV-6, na qual demonstrou-se a soroconversão para este vírus em crianças com diagnóstico clínico de exantema súbito **(Knowles e Gardner, 1988; Santos, 2000).**

O HHV-7 foi isolado em 1990 e tem sido relacionado a processos exantemáticos em crianças (Exantema súbito ou *Roseola infantum*), encefalopatia e encefalites quando acomete pacientes transplantados **(Ward et al., 2005;**

Razonable e Paya, 2002). É considerada uma afecção benigna, mas insere seu material genético (DNA) em 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 transplantados, como ao estado geral do paciente (**Ward et al., 2005; Thomasini et al, 2007**).

Estudos recentes têm sugerido que a associação entre o HHV-6 e HHV-5 pode elevar o nível de imunossupressão e aumentar a incidência de rejeição, possivelmente devido a uma potencialização do efeito do HHV-5 ou modulação do sistema imune do receptor (**Tong et al., 2000**). Esta imunomodulação pode predispor a outras infecções oportunistas como invasão fúngica (**Griffiths, 2000; Razonable et al., 2002**)

Ao longo do tempo os estudos e observações *in vivo* e *in vitro* tornaram evidente a importância do HHV-6 e do HHV-7 como patógenos ou co-patógenos após transplantes.

1.3- Características biológicas do HHV-5, HHV-6 E HHV-7

1.3.1- Classificação e Estrutura

Como todos os herpesvírus, possuem quatro elementos estruturais: um core eletrôn-denso, um capsídeo com simetria icosaédrica, um tegumento composto por proteínas amorfas, e um envelope bilipídico embebido por glicoproteínas e proteínas de membrana (**Figura 1**) (**Braun, 1997**).

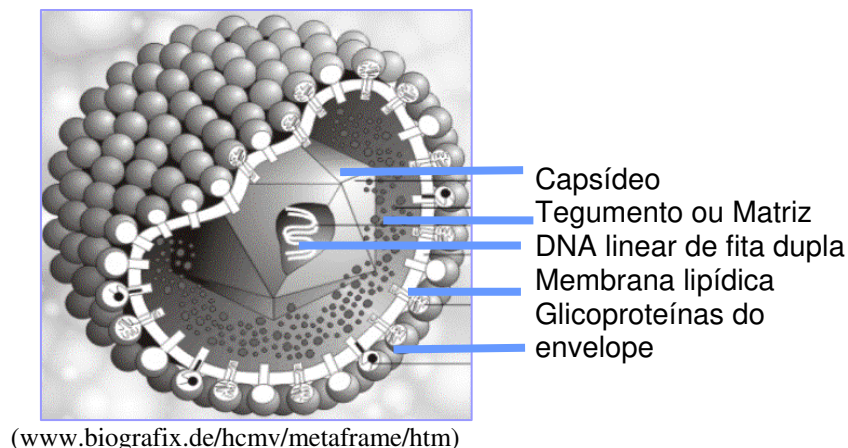


Figura 1- Estrutura Morfológica dos herpesvírus

O HHV-5 é considerado o maior membro da família *Herpesviridae* sendo o agente etiológico da citomegalovirose (**Mocarski et al., 1990; Brow e Abernathy, 1998; Costa, 1999**). O genoma viral do HHV-5 é composto por uma cadeia dupla de DNA (ácido desoxirribonucleico) linear contendo aproximadamente 240 kb (**Mendelson et al., 2006**), que codifica 33 proteínas estruturais e um número indefinido de proteínas não estruturais, sendo algumas delas conhecidas por serem imunogênicas e desencadearem resposta humoral específica. Quando as fitas de DNA do vírus são desnaturadas, tendem a se anelar e formar “loop”, indicando que as moléculas possuem dois pares de repetições invertidas subdividindo o genoma em um segmento grande, correspondendo a uma única região (UL, 174 kpb) a qual está inserida entre repetições invertidas (IRL / TRL) e um segmento pequeno (US), que é uma sequência única de 35,6 kpb flanqueada por repetições curtas invertidas (IRS/TRS) (**Spector et al., 1990**). Foi observado recentemente que RNA era purificado das partículas virais. Este mecanismo permite que os genes virais sejam imediatamente expressos no interior da célula que está infectada, logo após a entrada do vírus, e na ausência de transcrição do genoma viral (**Bresnahan e Shenk, 2000**).

O vírion completo mede entre 180 e 250nm de diâmetro; possui um envelope glicolipídico que envolve toda estrutura viral, um capsídeo icosaédrico de 110nm, com 162 capsômeros que envolvem o núcleo composto por DNA de dupla hélice com 240 kb (**Stink, 1990**).

O HHV-5 é bastante termolábil e sua vida média a 37°C é de apenas 45 minutos, sendo totalmente inativado a 56°C durante 30 minutos, pH menor que 5, pela exposição ao éter a 20% por 2 horas, pela luz ultravioleta por 5 minutos, ciclos de congelamento e descongelamento; é mais estável na urina à 4°C. A infectividade do HHV-5 é melhor preservada por estocagem em diluente de bicarbonato de sódio na presença de 35% de sorbitol à menos 90°C; as células infectadas com o vírus, suspensa em meio “Eagle” com 10 a 20% de soro fetal e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO), podem ser estocadas, por tempo indefinido, em nitrogênio líquido à menos 190°C **(Drew (a), 1988; Brow e Abernathy, 1998).**

Para ocorrer o início da infecção na célula, é necessário que o vírus seja adsorvido aos receptores de superfície celular e haja fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática celular. Posteriormente, o capsídeo é transportado para os poros nucleares e o DNA é liberado no núcleo celular, ocorrendo a transcrição do DNA viral e produção de novos vírions **(Silva, 2000).**

Durante a infecção natural, a replicação do vírus pode ocorrer em células epiteliais, endoteliais, musculares, mesenquimais, hepatócitos, granulócitos e macrófagos **(Mocarski et al., 1990; Hoppe et al., 2004).**

Os genes virais são expressos por períodos coordenados e é regulado por uma cascata de eventos transcricionais que levam à síntese de três categorias de proteínas virais denominadas: imediatamente precoce ou IE (immediate early) de duração de 0 a 2 horas, precoce ou E (early), de 2 a 24 horas, e tardio ou L (late), com 24 horas pós infecção e, as proteínas são classificadas como alfa, beta ou gama, respectivamente. As proteínas sintetizadas durante os períodos IE e E são geralmente associadas à regulação da replicação do vírus, enquanto as sintetizadas no período L são estruturais **(Straus, 1990; Silva, 2000; Colimom e Michelson, 1990; Landolfo et al., 2003).**

Estudos in vivo com células de pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos mostram que os leucócitos polimorfonucleares são as células sanguíneas mais freqüentemente infectadas pelo HHV-5 e representam importante sítio de replicação **(Dankener et al., 1990).** Além de infectar o homem, o HHV-5 é encontrado no mundo

animal, em camundongos, cobais e macacos, mas estas cepas são espécies-específicas, de forma que as cepas de animais não infectam o homem.

O HHV-6 difere dos outros herpesvírus por suas propriedades antigênicas e seu conteúdo genético e apresenta duas variantes (6A e 6B) (**Braun et al., 1997; Flamand et al., 1995**). As variantes diferem 8% em nível de nucleotídeo, mas também nas características clínicas e epidemiológicas e no potencial patogênico. A maioria dos sintomas ocasionados por infecção pelo HHV-6, incluindo roseola infantum, têm sido associados à variante B e as alterações neurológicas, têm sido associadas à variante A (**Razonable e Paya, 2002**) sendo a segunda mais prevalente em indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). O HHV-6 A demonstra maior virulência com a imunossupressão, comparado ao HHV-6B (**Singh e Carrigan, 1996**).

O HHV-6 é composto por uma fita de DNA linear com aproximadamente 160 kb, envolvido por capsídeo icosaédrico constituído por 162 capsômeros e envelopado (**Levy, 1997; Santos, 2000**). Foi demonstrado através dos nucleotídeos 66% de homologia entre a sequência do DNA do HHV-6 e HHV-5 (**Singh e Carrigan, 1996**). É um vírus linfotrópico, utiliza receptor celular CD46 e pode infectar outras células, como os monócitos, células endoteliais, epiteliais, células da glia e fibroblastos (**Härma, 2003; Desachy et al., 2001**).

O ciclo completo da replicação do HHV-6 ocorre em torno de 5 dias, quando o vírus pode ser detectado no interior de vacúolos citoplasmáticos e extracelularmente. Nos 3 primeiros dias de infecção, o capsídeo e o DNA viral podem ser observados no interior do núcleo. O envelope surge por brotamento de vacúolos citoplasmáticos, posteriormente fundem-se à membrana citoplasmática liberando partículas maduras. O HHV-6 pertence a *Roseolovirus* genus e possui o genoma colinear ao Herpesvírus Humano Tipo 7 (HHV-7), a homologia é de 46.6 a 84,9% (**Campadelli Fiume et al., 1999**).

O HHV-7 é um vírus linfotrópico, tem tropismo por células T CD4+ e linhagem celular SupT1 (célula T linfoblastóide de linhagem contínua). Não infecta monócitos e o receptor CD4 é necessário, mas não suficiente para a entrada do vírus na célula

(Dewhurst et al., 1997). O epitopo CD4 está presente em células glandulares, o que explica o isolamento deste vírus em saliva de humanos ao introduzir seu DNA nestas células, permanecendo latente.

Em estudos do HHV-7 tem sido bastante utilizado a transferência dos vírus que são isolados à partir das células de cordão umbilical para linhagem celular contínua T linfoblástico - SupT1, devido ao fato de ser mais confiável trabalhar com células de linhagens contínuas do que manter sempre disponíveis células de cordão umbilical viáveis e livres de contaminação (Ablashi et al., 1998).

Embora, seja mais confortável trabalhar com culturas celulares de linhagem contínua, os antígenos de HHV-7 aparecem, em cultivo celular, entre 4 e 7 dias após células de sangue de cordão terem sido infectadas; já as células SupT1 demoram de 7 a 14 dias para demonstrarem antígenos sugerindo maior susceptibilidade das células de sangue de cordão à infecção por este vírus do que as células SupT1. Outras linhagens celulares T linfoblásticas que se mostram eficientes para o isolamento do HHV-6 (linhagens HSB2, MolT-3, J-Jhan, MolT-4 Jurkat) não são susceptíveis a infecção pelo HHV-7, pelo menos, não o suficiente para serem úteis para o cultivo. O grau de infectividade e demonstração de antígenos é similar (45-60% de células infectadas) nos dois tipos de células - Células de sangue de cordão e SupT1 (Ablashi et al., 1998).

Não há relatos de cepas de HHV-7 que infectem e causem doenças em animais, tal como acontece com o HHV-5, até o presente momento.

1.4- Replicação e patogênese do HHV-5, HHV-6 e HHV-7

Todos os herpesvírus induzem latência em seus hospedeiros naturais por toda a vida e o mecanismo da infecção latente ainda não foi totalmente elucidado, porém, sabe-se que para alguns herpesvírus, a latência ocorre em tipos específicos de células que permitem a entrada do vírus, mas bloqueiam sua replicação (Figura 3) (Silva, 2000; Miller et al., 2005).

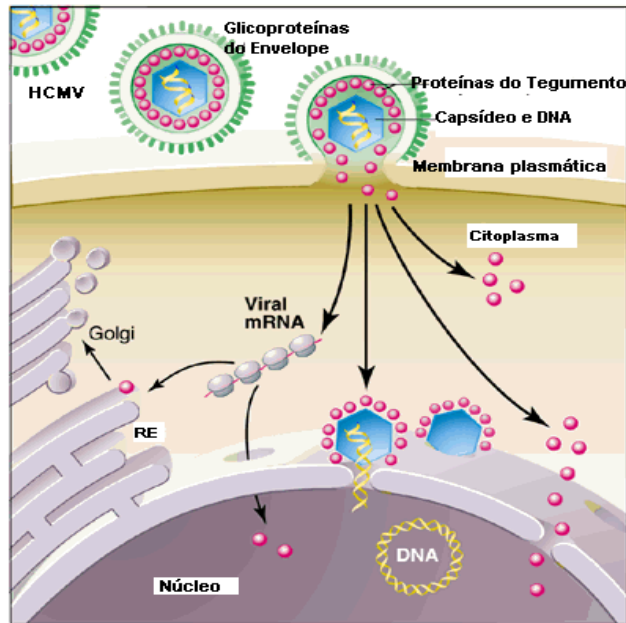


Figura 2- Ciclo de Replicação (<http://utsouthwestern.edu/bresnahan.com>)

Análises de determinados genes que permanecem ativos sugerem que eles atuem como reguladores, e podem manter o vírus em estado de latência ou ativo para a recorrência (**Silva, 2000**).

Os herpesvírus têm a capacidade de infectar diferentes tipos celulares, apresentando tropismo por determinados tecidos. O HHV-5 compartilha com outros herpesvírus a capacidade de permanecer em estado latente no hospedeiro, disseminar-se célula a célula, reativando em condições de imunossupressão e induzindo imunossupressão transitória ao receptor (**Drago et al., 2000; Miller, 2005**).

Normalmente a infecção pelo HHV-5 é subclínica (**Hoppe, 2004**), porém, em certas condições, como naquelas encontradas em pacientes com deficiência imunológica ou em crianças desnutridas ou com infecções congênitas, o quadro clínico apresentado pode ser grave e muitas vezes conduzir à morte. Este vírus tem sido causa de grande morbidade e mortalidade em imunocomprometidos (**Szczepura et al., 2006; Koch et al., 2006; Hernando et al., 2005; Lassener et al., 2000; Ihira et al., 2001**) e a

utilização de imunossupressores tem contribuído para o aumento das infecções por herpesvírus **(Drago et al., 2000)**.

As características da infecção pelo HHV-6 são o tropismo por células linfóides, indução de receptor CD4 em algumas células, supressão da resposta imune, indução de citocinas, transativação de outros vírus, capacidade de transformar certas células em cultura e em alguns casos a capacidade de aumentar a replicação do HIV **(Levy, 1997)**.

Os monócitos, macrófagos e megacariócitos são suscetíveis à infecção por HHV-6, contudo os linfócitos T representam uma população de células em que este vírus se replica com maior eficiência **(Flamand et al., 1995)**, mas pode infectar outras linhagens de células de origem epitelial, fibroblástica e neural.

O HHV-6 estabelece latência após infecção primária em diferentes células e órgãos **(Abdel e Asmar, 2004)**.

Na infecção natural por HHV-6 podem ser identificados três estágios: 1º) primário agudo na infância, 2º) ocorre em crianças e adultos saudáveis, onde o vírus replica em glândulas salivares e é secretado na saliva (variante B), não induz patologias evidentes, permanece latente ao menos em linfócitos e monócitos, e persiste em vários tecidos, possibilitando um alto nível de replicação. 3º) Ocorre com menos frequência, tipicamente em indivíduos imunocomprometidos e está ligado à reativação do vírus ou à reinfeção. Alguns estudos tem relacionado o HHV-6 a patologias como, esclerose múltipla, tumores, síndrome da fadiga crônica, **(Campadelli-Fiume et al., 1999; Santos, 2000)**.

Em pacientes submetidos ao transplante, é comum o aparecimento da infecção por HHV-6, e geralmente ela aparece antes da infecção por HHV-5. O período da detecção pelo HHV-6 é em torno de 20 dias após o transplante e para o HHV-5 de 25 à 35 dias **(Abdel e Asmar, 2004; Lautenschlager et al., 2006)**.

A co-infecção pelo HHV-5 e HHV-6 está associada às manifestações clínicas e à disfunção do enxerto. Alguns estudos demonstram que a infecção pelo HHV-6 altera o sistema imune do hospedeiro podendo favorecer a reativação do HHV-5 **(Abdel e Asmar, 2004; Lautenschlager et al., 2006)**.

1.5- Transmissão e epidemiologia do HHV-5, HHV-6 E HHV-7

A elevada soroprevalência do HHV-5 é observada em diferentes regiões geográficas, infectando em torno de 0,5 a 1,0% de todos os recém-nascidos e cerca de 50% da população adulta em países desenvolvidos. Vários estudos realizados de soroprevalência demonstraram que a infecção por HHV-5 ocorre praticamente em todas as regiões do mundo e a prevalência de anticorpos aumenta com a idade, **(Brown e Abernathy, 1998)**. A soroprevalência do HHV-5 não depende tanto da área geográfica, mas sim do nível sócio econômico das comunidades estudadas. Quanto menor o nível sócio econômico maior a prevalência do HHV-5. **(Hunter, 1983; Pannuti et al., 1987)**.

A soroprevalência na América do Norte e na Europa está em torno de 50% e no Japão e alguns países da América do Sul ou África está em torno de 100% **(Ho, 1991)**. No Brasil, a soroprevalência é alta, em média 90% de contaminação em populações adultas **(Suassuna et al., 1995; Camargo et al., 1996; Costa et al., 1999; Aquino e Figueiredo, 2001)**.

Uma vez infectado o indivíduo não elimina mais o vírus, permanecendo em estado de latência podendo ser reativado em condições especiais **(Shen et al., 1996; Bruggeman et al., 1999; Gupta et al., 2003; Lassener et al., 2000)**.

O HHV-5 infecta somente a população humana, e sua transmissão ocorre via transmissão horizontal e vertical, tais como; contato com secreções orofaríngeas, lágrimas e vaginais, líquido seminal, leite materno, urina, fezes e sanguínea. Ao lado de várias formas de infecção natural, o HHV-5 pode ser transmitido iatrogenicamente, por meio de transfusões de sangue e através do transplante de órgãos. **(Alford e Britt, 1990; Bruggeman, 1993; Brown e Abernathy, 1998)**.

As pesquisas correlacionando a idade e as prevalências da infecção pelo HHV-5 sugerem dois períodos de maior incidência da infecção; o período perinatal, via canal do parto, leite materno, banco de leite e contato com crianças contaminadas e o período de maturidade sexual, em contatos homossexuais ou heterossexuais **(Drew, 1988; Brown e Abernathy, 1998)**.

A doença clínica causada por HHV-5 ocorre por três padrões epidemiológicos: 1) infecção primária, quando ocorre em pacientes previamente soronegativos; 2) secundária quando ocorre a reativação da infecção latente e 3) secundária por reinfeção por outras linhagens do vírus (**Hibberd e Snyderman, 1995; Murray, 1997; Patel e Paya, 1997; Maya e Azulay, 2000**). A sintomatologia é diferente nestas três formas de apresentação da infecção, cerca de dois terços dos pacientes com infecção primária são sintomáticos, menos de 20% na reativação viral tem sintomas e cerca de 40% dos reinfetados têm sintomatologia atribuível ao HHV-5 (**Costa, 1999**).

Estudos demonstram que o HHV-5 acomete com frequência os transplantados de órgãos (**Razonable et al., 2002**), afetando dois terços desses pacientes, independente do órgão transplantado (**Rubin et al., 1979**).

A infecção citomegálica constitui a maior causa de morbidade e mortalidade durante as primeiras 14 semanas pós-transplante, aumentando custos de permanência do paciente no hospital, uma vez que favorece à superinfecção por patógenos oportunistas e aumenta riscos de rejeição do enxerto (**Sutherland et al., 1992; Paya, 2002**). Nos transplantados hepáticos, a infecção pelo HHV-5 constitui a rejeição do implante. Nos pacientes com infecção ativa, cerca de 80% desenvolverão manifestações clínicas da doença e essa taxa pode ser maior quando o receptor é soronegativo e o doador soropositivo (**Gane et al., 1997**).

O HHV-6 também é comum na população humana, estima-se uma soroprevalência em torno de 95% na população em geral. A infecção pelo HHV-6 ocorre, quase sempre, antes de 2 anos de idade, seguida por persistência viral com eliminação através da saliva. A transmissão da infecção pelo vírus pode ser horizontal ou vertical (**Silva, 2000**).

No Brasil a soroprevalência está em torno de 78% e esta taxa tem sido prevalente principalmente no nordeste do País (**Freitas e Linhares, 1997**).

Nos 3 primeiros anos de vida, a infecção primária do HHV-6 é detectada através de fluido cerebrospinal, isto sugere que o sistema nervoso central possa ser um sítio de latência da infecção causada pelo vírus. Em transplantados de órgãos sólidos, a infecção pelo HHV-6 ocorre em 14 a 82% dos casos (**Dockrell et al., 1999**).

A soroprevalência da infecção por HHV-7 é de 5 para cada 7 crianças na população geral. No Brasil a soroprevalência em adultos e em crianças maiores que 10 anos é de 93% (**Tanaka et al., 1994; Freitas et al., 2004**).

A transmissão pode ser horizontal ou vertical, a primeira provavelmente ocorre através de contato com saliva, transfusões sanguíneas e através de órgãos transplantados, a segunda forma de transmissão ocorre provavelmente através da placenta (**Taya et al., 2004**) e leite materno (**Freitas et al., 2004**).

1.6- Manifestações clínicas

Na maioria das vezes a doença por HHV-5 é subclínica (**Lassener et al., 2000**), mas quando se manifesta em indivíduos imunocompetentes, ela pode ser similar à mononucleose infecciosa caracterizando-se por febre, fraqueza, sudorese, mialgia, hepatomegalia, esplenomegalia e adenomegalias (**Capulong et al., 1998**). Icterícia e exantema maculopapular também podem ser observados. Entre os achados laboratoriais, pode ocorrer aumento de enzimas hepáticas TGO e TGP, linfocitose e presença de número aumentado de linfócitos atípicos (**Pannuti et al., 1987; Pannuti et al., 2001; Weller, 1971 a; Weller, 1971b**).

Os pacientes que representam grupo de risco para o vírus HHV-5 são: crianças com infecção congênita, pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, pacientes submetidos a tratamento quimioterápico, principalmente de leucemias e linfomas e receptores de órgãos. (**Pannuti et al., 1984; Ho, 1990**).

A gravidade da infecção por HHV-5 nos transplantados, irá depender do status sorológico do doador e receptor, do regime de imunossupressão empregado e da duração do tratamento quimioterápico (**Grundy, 1990**).

As evidências de replicação viral e sintomas clínicos em transplantados ocorrem principalmente no decorrer do 1º ao 4º mês pós-transplante e são manifestações clínicas mais comuns a pneumonia intersticial, esofagite, gastrite, colite, retinite, febre,

demora na pega do enxerto nos casos de transplantes de medula óssea, e nos transplantes de órgãos sólidos como (rim, fígado, e coração) pode ocorrer a rejeição **(Ljungman e Plotkin, 1995)**.

Em pacientes transplantados a doença pode apresentar-se com sinais de síndrome de mononucleose, tendo como achados febre, hepatomegalia, esplenomegalia, mialgia, e achados laboratoriais como, enzimas hepáticas elevadas, linfocitose, leucopenia sendo mais comum devido a imunossupressão.

Nos pacientes transplantados hepáticos, o HHV-5 é a principal causa de infecção após a cirurgia, sendo sua prevalência de 20 a 60% nesses pacientes. Entre os pacientes com infecção ativa, aproximadamente 80% desenvolvem manifestações clínicas da doença **(Cope et al., 1997)**. Estes valores aumentam consideravelmente quando o receptor é soronegativo antes do transplante e o doador é soropositivo **(Gane et al., 1997)**.

O HHV-6 estabelece infecção latente no hospedeiro por toda a vida, e pode reativar durante imunossupressão. A reativação do HHV-6 após transplante é comum, e está associado a infecções oportunistas, doença citomegálica e possíveis episódios de rejeição aguda **(Deborka et al., 2003; Jacobs, 2003)**.

Vários estudos demonstram que a infecção pós-transplante por HHV-6 tem sido implicada como causa de hepatite, pneumonite, encefalite e síndromes virais febris **(Mendez et al., 2001; Razonable e Paya, 2002)**.

Os pacientes imunossuprimidos manifestam efeitos diretos e indiretos decorrentes da infecção viral, por HHV-6. São efeitos diretos, febre com erupções cutâneas, mielossupressão, pneumonite intersticial e quadros de encefalites. Os efeitos indiretos resultam em exacerbação da infecção e doença causada por HHV-5, com aumento da frequência de infecções por agentes oportunistas **(Razonable e Paya, 2002)**.

Foram observadas evidências sorológicas de reativação simultânea de HHV-5 e HHV-6 após o transplante **(Ratnamohan et al., 1998)**.

Em pacientes transplantados hepáticos com soroconversão para HHV-6, e foi identificado um significativo fator de risco para o desenvolvimento dos sintomas da doença por HHV-5 **(Humar et al., 2000)**.

A infecção primária por HHV-7 caracteriza-se por Exantema Súbito ou Roséola, muito comum em crianças. A doença se apresenta com um quadro de febre alta que dura poucos dias, e erupções cutâneas em média de 24 á 48 horas (Lautenschlager et al., 2002).

Em indivíduos imunossuprimidos que receberam transplante de órgãos pode ocorrer reativação em cerca de 14 a 46% dos transplantados. Essa variação é devido à condição clínica do paciente, tipo de imunossupressão e o método de detecção viral utilizado (Yoshikawa et al., 2003; Razonable et al., 2002).

O HHV-7 mantém latência, com baixo nível de replicação viral, após infecção primária, podendo se reativar após um período de disfunção imune.

Nos pacientes imunossuprimidos os fatores que controlam a reativação do HHV-7 não está estabelecida, mas parece estar associada ao grau de imunossupressão. Sugere-se que os fatores que controlam a reativação ou aumento da replicação do HHV-7 em indivíduos imunossuprimidos pode ser similar ao previamente identificado para o HHV-5 (Mendez et al., 2000).

A reativação do HHV-7 tem sido também associada com febre, mielossupressão e encefalite (Feldstein et al., 2003).

1.7- Diagnóstico laboratorial

As múltiplas formas clínicas da citomegalovirose, tornam o diagnóstico clínico bastante difícil sendo extremamente necessário a utilização de exames laboratoriais complementares.

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por meio de 5 categorias de métodos: citológicos e histológicos, isolamento do vírus, sorológicos, identificação de antígenos virais e métodos moleculares. (Chou, 1990; Myers, 1997; Lautenschlager et al., 2000).

1.7.1- Técnicas Citopatológicas e Histopatológicas

1.7.1.a- Técnicas Citológicas

Estes métodos para identificação do HHV-5 podem ser realizados em materiais aspirados de tecidos e secreções (**Drew 1988; Suassuna e Machado, 1992; Maya e Azulay, 2000**). Baseiam-se na pesquisa de células com inclusões citoplasmáticas típicas; entretanto, por apresentarem baixa sensibilidade atualmente tem pouquíssimo uso na prática clínica.

1.7.1b- Técnicas Histológicas

Este método de detecção é realizado por visualização das inclusões típicas nos tecidos. A detecção de inclusões típicas permite muitas vezes correlacionar o HHV-5 a disfunção ou lesão do órgão estudado. Porém, este método apresenta de baixa sensibilidade. As vantagens desta técnica são o baixo custo, simplicidade e disponibilidade da utilização do equipamento (Figura 3) (**Suassuna e Machado, 1992; Maya e Azulay, 2000**).

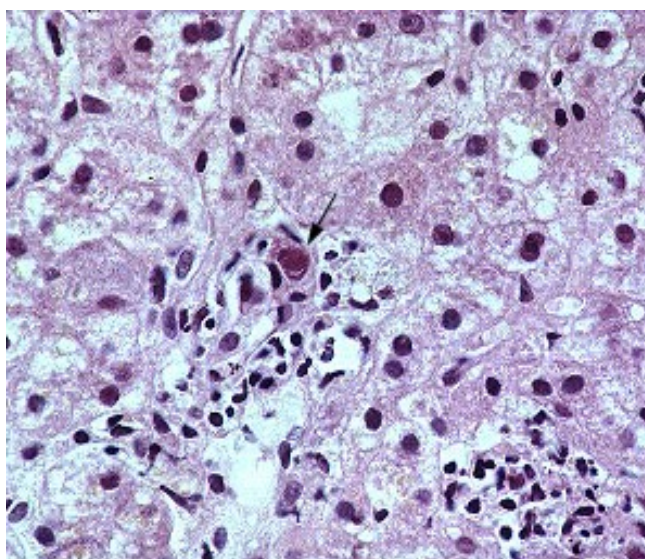


Figura 3- Inclusão do HHV-5 em tecido

1.7.2- Isolamento Viral

O isolamento do HHV-5 pode ser feito dos fluidos biológicos como urina, saliva, sangue, secreções cervicais, leite materno, lavados e aspirados de órgãos, e biópsias (Weller e Hanshaw, 1962). Ao serem coletados, os mesmos devem ser processados imediatamente, por serem termolábeis. Caso haja necessidade de transporte do material este deverá ser realizado em condições ideais de temperatura. O método de cultura independente do material a ser estudado, constitui um processo lento, em torno de 25 dias, devido à replicação viral (Pannuti, 1984; Costa, 1999). O diagnóstico clássico para demonstrar infecção ativa por HHV-5 é a cultura viral, inoculação do material suspeito em cultura de fibroblastos humanos, única linhagem celular que permite sua replicação *in vitro*. Porém, os métodos de cultura celular são complexos e o efeito citopático é observado após muitos ciclos de replicação (Chou, 1990; Ho, 1991).

Como o HHV-5, a cultura celular pode ser usada para isolar e identificar o HHV-6 com base na aparência dos efeitos citopáticos específicos (Singh e Carrigan, 1996). O HHV-6 pode ser isolado de linfócitos de crianças durante a febre e a fase pré-eruptiva do exantema súbito (ES) (Braun, 1997).

O isolamento do HHV-6 foi a técnica originalmente utilizada para identificação desse novo 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.

Um rápido ensaio 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, marcados com antisoro específico para o principal antígeno do HHV-6 (Singh e Carrigan, 1996).

O isolamento do HHV-7 pode ser feito em células mononucleares de sangue umbilical ativadas com fitohemaglutinina (agente que induz transformação blástica em células T) e com adição de interleucina-2 e popibrene, esta última, uma substância que facilita a infecção celular pelo HHV-7. A transferência das culturas para linhagem celular T linfoblastóide – Células SupT1 tem sido descrita (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 deve ser feita com seringa após o cordão ter sido cortado e o sangue é introduzido em tubos estéreis contendo heparina. Posteriormente os tubos devem ser encaminhados para análises, e o processamento do material realizado de forma rápida para garantir a viabilidade celular.

As células mononucleares são isoladas com utilização de gradientes de densidade (Ficcoll-Hypaque), lavadas em PBS e cultivadas a 37°C em meio de cultura RPMI-1640 contendo soro fetal bovino. A cultura do material é inoculada e incubada em estufa de CO₂ ou sistema fechado.

1.7.3- Sorológicos

Quando ocorre infecção primária, os anticorpos de classe IgM são os primeiros a serem sintetizados, seguidos posteriormente, pelos de classe IgG. Estes últimos permanecem pelo resto da vida do indivíduo (memória imune). A detecção de anticorpos da classe IgG indica contato prévio ou antigo.

As duas principais razões para o uso clínico dos testes sorológicos para HHV-5 em transplantados de órgãos são a determinação da susceptibilidade à infecção primária (mais frequentemente sintomática no receptor) e a avaliação do sangue do doador quanto à prévia exposição ao HHV-5 (potencial de transmissão do HHV-5 latente) (**Chou, 1990**).

Vários métodos sorológicos são utilizados para a detecção de anticorpos contra o HHV-5. Os métodos clássicos não discriminam anticorpos IgM e IgG e dentre estes há a neutralização viral e a fixação do complemento. Os métodos sorológicos modernos detectam anticorpos da classe IgM e IgG contra o HHV-5 por técnicas sorológicas variadas como Elisa e Imunofluorescência Indireta.

Para o HHV-7 ocorre também os aumentos de títulos de IgM na infecção primária e posteriormente aparece IgG, a qual permanece pelo resto de vida do indivíduo, indicando a memória imunológica para o vírus.

Pesquisa e quantificação de anticorpos das classes IgM e IgG anti- HHV-7 tem sido muito utilizadas por pesquisadores para determinar a soroprevalência desse vírus na população em geral. No entanto, a utilidade da sorologia para monitorização de pacientes imunossuprimidos ainda não está bem definida. A reação cruzada entre HHV-7 e o HHV-6 é um fator preocupante, porque a maioria dos soros humanos têm anticorpos para os dois vírus (**Ablashi et al., 1998**).

1.7.3.a- Imunofluorescência

Apresenta elevada sensibilidade, além de detectar diferentes classes de imunoglobulina (**Reynalds et al., 1979**) Os testes de imunofluorescência podem ser classificados em direto ou indireto. O ensaio de imunofluorescência direta (IFD) é empregado na pesquisa e na localização de antígeno em células ou tecidos, através de um anticorpo específico marcado com fluorocromos (conjugado). O conjugado se fixa ao antígeno, formando um complexo estável. O anticorpo não ligado é removido por lavagens e o preparado é observado em microscópio de imunofluorescência. Este ensaio requer o preparo de um conjugado específico para cada sistema que se queira estudar. O ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) apresenta várias vantagens, pois é sensível, específico e reprodutível, de padronização e execução simples. O mesmo conjugado pode ser utilizado em sistemas diferentes e podem-se determinar as classes e subclasses de anticorpos utilizando-se conjugados específicos. A necessidade de microscópio de imunofluorescência, a subjetividade na leitura e não automação representam limitações do teste (**Roitt et al., 1999**).

A imunofluorescência indireta (IFI) tem sido empregada com frequência no diagnóstico sorológico do HHV-7. Para confecção das lâminas, células de sangue do cordão umbilical ou células T1 infectadas com cepas de HHV-7 são depositadas no centro da lâmina de microscopia, secas e fixadas. As lâminas são recobertas com diluições adequadas da amostra do paciente (soro ou plasma) e incubadas em câmara úmida a 37°C por tempo indeterminado. Após, a incubação, elas são lavadas com tampão para retirar os anticorpos e outras proteínas que não se ligaram aos antígenos virais. Em seguida as lâminas devem ser recobertas com anticorpos anti-IgG ou anti-IgM específico marcados com fluoresceína, incubadas e lavadas novamente.

Na presença de anticorpos na amostra eles se ligarão às proteínas virais presentes na superfície das células fixadas e os anticorpos marcados com fluoresceína se ligarão aos anticorpos específicos para revelar a reação acrescentados depois. As lâminas são levadas ao microscópio de fluorescência onde se observam células com coloração fluorescente esverdeada quando positiva.

1.7.3b- Imunoensaios

O Imunoensaio tipo Elisa (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tem sido descrito como método para avaliação sorológica de vários agentes infecciosos. A técnica baseia-se na utilização de antígenos ou anticorpos com enzimas e permitem a detecção, titulação e quantificação de substâncias de interesse biológico. Neste ensaio a reação antígeno-anticorpo é monitorada por medida da atividade enzimática. Este teste foi desenvolvido como uma alternativa ao radioimunoensaio, o qual utiliza isótopos radioativos, para a detecção de antígenos e anticorpos. O teste detecta quantidades extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos específicos, podendo ter elevada precisão se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados. No teste de Elisa indireto, amplamente empregado para pesquisa de anticorpos, antígenos purificados são imobilizado numa placa de plástico, onde o soro a ser testado deverá ser adicionado. Se na amostra existirem anticorpos contra o antígeno imobilizado, ocorrerá a ligação entre os dois imunorreagentes. A seguir, o sistema é lavado, para remoção dos anticorpos não ligados. Na etapa seguinte, adiciona-se um conjugado à placa (anti-imunoglobulina humana, marcada com uma enzima). Finalmente, acrescenta-se um substrato que sofre a ação da enzima, gerando um produto colorido, detectado visualmente ou por fotometria. A técnica permite detectar quantitativamente diferentes classes de imunoglobulinas, possuindo boa sensibilidade e especificidade (**Ablashi, 1999; Roitt et al, 1999**).

Métodos de Elisa para o HHV-7 usando lisado de células SupT1 infectadas por este vírus e concentrados de partículas virais foram descritos (**Ablashi et al., 1998**). Método similar utilizando células mononucleares de cordão umbilical infectadas com uma cepa diferente de HHV-7 já foi descrito (**Black et al., 1996**).

1.7.3c- Método de Avidéz para detecção de anti HHV-7

No teste de avidéz, uma titulação de anticorpos IgG é realizada e repetida na amostra após o tratamento com solução tampão contendo uréia. Os anticorpos de classe IgG quando começam a serem sintetizados possuem baixa avidéz pelo antígeno produzindo ligações antígeno-anticorpo fracas e sensíveis á ação da uréia que é capaz de desfazer essas ligações. Os anticorpos que estão sendo sintetizados por mais tempo produzem ligações antígeno-anticorpo mais fortes, pouco ou nada sensíveis à ação da uréia.

1.7.3d- Método Western Blot para HHV-7

Neste método, proteínas do sobrenadante de cultivo celular do HHV-7 (centrifugado e filtrado) são separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (duodecil-sulfato de sódio) e transferidas para membranas de nitrocelulose. Este método de eletroforese separa as proteínas de acordo com seus pesos moleculares.

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

O teste tem sido considerado imunologicamente específico para o HHV-7 (**Black et al., 1996**), sendo utilizado como útil para resolver problemas de reatividade sorológica cruzada.

1.7.4- Antigenemia

1.7.4a- Antigenemia para HHV-5

Este método tem sido amplamente utilizado, para diagnóstico da infecção ativa pelo HHV-5 em transplantes de órgãos. A identificação de antígenos específicos do HHV-5 em amostras de sangue periférico tem sido aplicado como principal marcador precoce de

infecção ativa. Sua eficácia é boa por ser uma técnica rápida, direta e sensível, sendo considerada uma técnica quantitativa, pois permite correlacionar viremia com gravidade da doença clínica (**The et al., 1990; van der Berg et al, 1991; The et al, 1992; Lo et al, 1997; Niubó et al, 1996**). Para técnica da Antigenemia se faz necessário a utilização de anticorpos monoclonais (C10 e C11) que detectam o antígeno viral pp65, que é uma proteína estrutural expressa em leucócitos durante da fase precoce na replicação viral. São extremamente específicos pois, não são detectadas em reação cruzada de células infectadas com outros vírus pertencentes a família Herpesvirinae, e também não reagem com outras células humanas (**Boeckh et al., 1998**).

Este teste consiste em varias fases incluindo isolamento dos leucócitos do sangue periférico, lise direta dos linfócitos, separação dos polimorfonucleares, preparação de lâminas microscópicas, imunocoloração com a utilização dos anticorpos monoclonais, fixação feita com formaldeído e permeabilizador e avaliação microscópica (**The et al, 1990; Boeckh et al, 1994; Gerna et al, 1992**).

A vantagem da Antigenemia é por ser um método que pode ser facilmente quantificada, revelando a carga viral, que é útil na diferenciação de doença pelo HHV-5 de outras complicações, na avaliação da eficácia da terapia antiviral e posteriormente na detecção precoce da resistência ao medicamento. Existem relatos que demonstram que a detecção de 2 a 5 células coradas por 50.000 polimorfonucleares analisados, apresentam um risco de 10% de desenvolver doença pelo HHV-5, mas se houver 50 células por 50.000 polimorfunucleares, o risco é superior a 70% (**The et al., 1992; Lo et al., 1997**).

O método é sensível para detecção da carga viral, é um teste de boa escolha para laboratórios com baixo a médio volume de testes, sendo considerado o mais adequado para a orientação na terapia precoce e para monitorização laboratorial eficaz num acompanhamento clínico e para controle da resposta terapêutica com o ganciclovir (**Gondo et al., 1994**).

A desvantagem da referida técnica é por se fazer necessário a rapidez no processamento do material coletado, sendo recomendável de 6 à 8 horas, para que não ocorra diminuição de sensibilidade; nos pacientes com neutropenia, este exame não pode

ser realizado, devido a contagem baixa dos granulócitos, sendo nesta situação recorrer a testes moleculares os quais também tem como vantagem a possibilidade do material a ser investigado poder ser estocado em torno de 72 horas na temperatura ambiente sem ocorrer diminuição significativa dos níveis de DNA (Boeckh e Boivin, 1998; Boeckh et al., 1992; Maya e Azulay, 2000; Roberts et al., 1997).

1.7.4b- Antigenemia para HHV-6 e HHV-7

A técnica de antigenemia também pode ser empregada para determinar infecção ativa por HHV-6 e HHV-7. Pode ser utilizado anticorpos, contra diversas proteínas virais, o essencial é que se utilize anticorpos contra as proteínas específicas para os diferentes herpesvírus de interesse médico (HHV-5 , HHV-6 e HHV-7) (Launtenschager et al., 2002).

O método para determinação da antigenemia para HHV-6 e HHV-7, consiste na separação de células mononucleares de sangue periférico colhido com anticoagulante EDTA (Launtenschager et al., 2002). É realizada a preparação das lâminas através de gradiente de densidade (Ficcol-Hypaque) e citocentrifugação em lâminas de microscopia. As lâminas são fixadas e recobertas com anticorpos monoclonais de rato contra os antígenos precoce e tardio.

A reação de imunoperoxidase é realizada utilizando anticorpos anti-rato de coelho e de cabra anti-coelho, conjugados coelho anti IgG camudongo e de soro de cabra anti-IgG de coelho marcado com peroxidase como segundo e terceiro anticorpos.

A reação é revelada pela adição de 3-amino-9ethyl-cabazole e peróxido de hidrogênio usando hematoxilina de Mayer como contra-corante. As lâminas devem ser observadas em microscópio óptico para a verificação e contagem das células que exibirem reação positiva. As células positivas (linfócitos) apresentarão coloração amarelo escuro ou marrom em seu citoplasma.

1.7.5- Nested PCR (Reação Dupla em Cadeia da Polimerase)

A amplificação gênica é um método de biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA, a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas (**Saiki et al., 1985; Shibata et al, 1988; Demmeler et al, 1988; Olive et al, 1989; Costa et al, 1992**).

Este procedimento consiste em repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de dois iniciadores (“primers”), sendo segmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos, com sequências complementares as duas extremidades do fragmento alvo, e levados por uma reação enzimática mediada por polimerase, com atividade em altas temperaturas (“taq DNA polimerase”). Os “primers” flaqueiam a região alvo do DNA à ser duplicada, este produto é utilizado como um substrato para o outro, resultando em ciclos. Portanto o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial, facultando, no final de 30 ciclos, um acréscimo na ordem de 106 cópias, valendo-se de uma única célula. Cada ciclo da reação de amplificação é constituído por três fases distintas: Desnaturação, onde ocorre a separação das hélices do DNA a ser amplificado, Anelamento, onde ocorre a ligação complementar entre os primers e o DNA a ser amplificado e Extensão que faz síntese do DNA pela Taq DNA polimerase (**Saiki et al., 1985; Shibata, 1988**).

Após alguns ciclos, as fitas de DNA que correspondem a sequência-alvo estarão presentes em maior quantidade do que as fitas de comprimento variável. Os fragmentos com comprimento variável correspondem a uma pequena fração de todas as cópias de DNA (**Pozo e Tenório, 1999**).

Alguns estudos têm sugerido que a técnica de Nested PCR para diagnóstico da infecção pelo HHV-5 produz resultados compatíveis à cultura clássica, atingindo 100% de especificidade e 93% de sensibilidade, sendo uma metodologia mais rápida (**Olive et al., 1989; Evans et al., 1997**). Em todos os trabalhos os resultados foram alcançados após hibridização do produto da amplificação simples, com sondas específicas marcadas com P3 (**Maya e Azulay, 2000**).

Com base nos trabalhos pioneiros (**Shibata et al., 1988**), a técnica de PCR foi introduzida na literatura para o diagnóstico da infecção pelo HHV-5 em vários grupos de risco para esta doença.

Diversos métodos de PCR são utilizados atualmente: PCR simples, “Nested” PCR (dupla PCR), RT-PCR (PCR após transcrição reversa); a técnica de PCR pode ser qualitativa ou quantitativa, entretanto sua padronização não está bem estabelecida, diferentes laboratórios amplificam diferentes regiões do genoma utilizando diferentes pares de primers (**Gerna et al., 1996**).

O aumento da especificidade e sensibilidade da PCR foram alcançados pela “Nested-PCR” (**Brytting et al., 1991**). Esta variação da PCR é uma técnica que amplifica uma sequência alvo em dois passos, na primeira, utiliza-se um par de “primers” específicos para um fragmento alvo desejado; uma alíquota da 1ª reação, é submetido à nova reação de amplificação utilizando um par de primers internos ao primeiro, por isso ocorre o aumento da sensibilidade e especificidade da reação. Este produto final é detectado em gel agarose (**Britting et al., 1991; Fox et al., 1995; Ehrnst, 1996**).

1.8- Tratamento e prevenção da infecção ativa pelo HHV-5, HHV-6 E HHV-7

O tratamento da infecção ativa causada por HHV-5 está na atualidade, limitada a pacientes imunocomprometidos e restrita no Brasil a dois agentes antivirais: ganciclovir e foscarnet, ambos com ação inibidora da replicação viral (**Balfour, 1990**). Porém, os vírus latentes, permanecem na forma episomal no interior das células infectadas não sendo eliminados. Consequentemente, os vírus não podem ser removidos do organismo e recorrências são possíveis, mesmo após tratamento efetivo (**Smith et al., 1997**).

A administração do ganciclovir, que é um análogo da guanina, tem potente atividade contra o HHV-5, inibindo a replicação viral. O ganciclovir pode causar também granulocitopenia, trombocitopenia, azoospermia e elevação da creatinina sérica e nefrotoxicidade (**Crumpacker, 1996**).

O foscarnet é um análogo do pirofosfato que inibe a síntese da DNA polimerase, tem como efeito colateral a nefrotoxicidade, elevando os níveis de creatinina sérica causando hipercalemia, hipofosfatemia, podendo ocorrer convulsões e úlceras penianas ou vulvares (**Balfour, 1990; Drew, 1992**).

Algumas alternativas terapêuticas são utilizadas na prática clínica para prevenir doença por HHV-5 em receptores de órgãos, uma delas a administração de ganciclovir em todos os pacientes soropositivos, porém este tratamento expõe número substancial de pacientes a um medicamento potencialmente tóxico, a outra alternativa é a utilização de métodos laboratoriais para diagnóstico precoce, como a antígeno para a detecção de replicação viral ativa, contribuindo para minimizar custos e toxicidade da terapia desnecessária (**Goodrich et al., 1991; Schmidt et al., 1991, Winston et al., 1993**).

Os pacientes transplantados que são submetidos ao tratamento com o ganciclovir, têm uma melhora no quadro clínico. Nos pacientes transplantados, o ganciclovir e foscarnet demonstram decréscimo da carga viral do HHV-6, similar ao decréscimo da carga viral do HHV-5 (**Abdel e Asmar, 2004**).

Estudos recentes tem sugerido que a infecção por HHV-6 e HHV-7 pode ser uma importante causa de morbidade em pacientes transplantados hepáticos (**Lautenschlager et al., 2000**). Tem sido observado em alguns estudos a associação entre HHV-5, HHV-6 e HHV-7 em receptores de medula, transplante renal e hepático (**Ihira et al., 2001; Feldsteis et al., 2003**).

Foi demonstrado que HHV-6 após infectar o fígado implantado, pode causar disfunção do enxerto, como também ocasionar a rejeição (**Lautenschlager et al., 2002**).

As inter-relações dos herpesvírus HHV-5, HHV-6 e HHV-7 e seu impacto clínico nos pacientes que são submetidos à transplantes de órgãos têm sido pouco estudadas no Brasil.

2- OBJETIVOS

Baseando-se na importância clínica da infecção ativa pelos herpesvírus de interesse médico, este estudo visou monitorizar prospectivamente receptores de transplante de fígado em relação à infecção ativa pelo HHV-5 e a correlação com o HHV-6 e HHV-7, utilizando técnicas de Antigenemia e Nested-PCR.

2.1- Principais

- Monitorização da Infecção Ativa por HHV-5 pela antigenemia e Nested-PCR (sangue periférico);
- Monitorização da Infecção Ativa por HHV-6 por Nested-PCR através de (sangue periférico);
- Monitorização da Infecção Ativa por HHV-7 por Nested-PCR (soro).

2.2- Secundários

- Padronização da Antigenemia para HHV-6 (sangue periférico);
- Padronização da Antigenemia para HHV-7 (sangue periférico).

3- CASUÍSTICA

No presente estudo, foram acompanhados 70 pacientes de ambos os sexos, de qualquer fenótipo e etnia submetidos a transplante de fígado no Hospital das Clínicas da Unicamp, no período de 2004 à 2006. Destes apenas 53 fazem parte dessa casuística, os 17 restantes foram excluídos deste estudo por não se enquadrarem nos critérios de inclusão descritos abaixo.

A monitorização dos pacientes foi realizada prospectivamente desde o pré-transplante no ato cirúrgico e pós-transplante, semanal no 1º mês, quinzenal do 2º ao 3º mês e mensal do 3º mês até o final do 1º ano.

Os pacientes foram recrutados pelos responsáveis pela Unidade de Fígado e Transplante Hepático do Hospital das Clínicas da UNICAMP e o sangue encaminhado ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Médica.

Todos os pacientes que participaram deste trabalho foram informados sobre os procedimentos a serem adotados e concordaram com a coleta do material necessário para o estudo mediante assinatura do termo de consentimento.

- Termo de Consentimento (Livre e Esclarecido) foi preenchido e assinado pelo paciente ou responsável no momento da coleta.

O esquema de imunossupressão padronizado no setor de transplante hepático seguiu os seguintes parâmetros:

- Metilprednisona: 1,0g I.V no intra operatório, com redução até 20mg ao redor do 5º dia;
- Prednisona: 20 mg no intra operatório com redução até 20mg ao redor do 6º ao 30º dia, 15 mg do 31º ao 60º, 10mg do 61º ao 180º dia, com retirada gradativa. (com exceção dos pacientes portadores de doença auto imune);
- Ciclosporina: 0,4 a 0,8 mg por kg ao dia procurando-se alcançar níveis sanguíneos entre 200-300ng/ml;
- FK (tracolumus F506): 0,1 mg/kg/dia entre 8 a 12 ng/ml.

Todos os receptores de transplante hepático desse estudo fizeram profilaxia para infecção por Herpes Simples com Aciclovir – 200 mg 12/12h ou 8/8h – durante 60 dias. Os pacientes não fizeram profilaxia para HHV-5. Quando apresentaram infecção ativa para o vírus, receberam ganciclovir, mesmo na ausência de sintomas (Tratamento precoce).

3.1- Critérios para diagnóstico de infecção ativa para HHV-5

- 2 ou mais N-PCR positivos consecutivos (intervalo dentro de 30 dias) e/ou antigenemia positiva (1 ou mais células positivas).

3.2- Critérios para diagnóstico de infecção ativa pelo HHV-6 e HHV-7

- Para o HHV-6 ainda não há consenso na literatura e, portanto, seguimos as mesmas especificações adotadas para o HHV-5. Para o HHV-7 como a Nested PCR foi realizada no soro consideramos infecção ativa pelo menos uma reação positiva.

3.3- Critérios para diagnóstico de co-infecção por HHV-5, HHV-6 e HHV-7

- Infecção ativa simultânea por esses vírus.

3.4- Critérios para caracterizar provável doença por HHV-5

Para caracterização de provável doença por HHV-5, além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas anteriormente, fez-se necessário a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo HHV-5 (Ljugman e Einsele, 1994). (** indica as manifestações mais comuns encontradas em nosso grupo de pacientes)*b*

- a) ** *Leucopenia* (glóbulos brancos < $3,5 \times 10^9/L$), *trombocitopenia* (plaquetas < $100 \times 10^9/L$) e *atipia linfocitária* igual ou maior que 3%;
- b) ** *Febre* maior ou igual a 38°C por no mínimo 3 dias sem foco detectado;
- c) *Pneumonia intersticial*: sintomatologia de pneumonia (achados radiológicos e/ou hipoxemia);
- d) ** *Doença Gastrintestinal*: pode causar um grande número de sintomas desde inflamação difusa até hemorragias, os mais comuns são esofagite, gastrite e colite;
- e) *Hepatite ou Colangite*: pode ser uma manifestação inicial de infecção por HHV-5, sendo ainda mais freqüente em transplantados hepáticos;
- f) *Doenças neurológicas*: geralmente sintomas como encefalite, meningite e mielite, associadas com detecção de HHV-5 por PCR em líquido cérebro-espinhal;
- g) *Retinite*: manifestação tardia e incomum da infecção por HHV-5 ocorre geralmente após 6 meses do transplante, podendo levar a hemorragia e conseqüentemente cegueira;
- h) *Nefrite*: “nefrite por HHV-5” pode ser definida pela detecção da infecção pelo HHV-5 sempre com a identificação histológica em biópsia de rim obtida do paciente com disfunção renal;
- i) *Miocardite*: sempre com identificação histológica convencional em biópsia de coração obtida de pacientes com miocardite.

3.5- Critérios para caracterizar provável doença por HHV-6

Foram consideradas manifestações clínicas compatíveis com a infecção por HHV-6 as observadas nos pacientes com testes positivos para HHV-6 e febre alta (>38°C), erupções cutâneas, disfunção hepática (alanina aminotransferase > 100IU/ml), disenteria, pneumonite intersticial, microangiopatia trombótica, encefalite e, principalmente, mielossupressão.

Segundo um estudo feito por Sashihara et al., 2002, foram observados em receptores de “stem cells” durante infecção ativa por HHV-6, sintomas e condições que incluem febre alta ($>39,0^{\circ}\text{C}$), erupções cutâneas, disfunção hepática (alanina aminotransferase >100 IU/ml), disenteria, pneumonite intersticial, e microangiopatia trombótica, encefalite e mielossupressão.

3.6- Critérios de inclusão no estudo

- Assinatura do Termo de Consentimento livre e esclarecido do paciente para a coleta de amostras de sangue para análise pré-transplante e monitorização pós-transplante por um período de 6 meses a um ano;
- Sobrevida dos pacientes transplantados e do fígado de pelo menos 1 mês após o transplante hepático;
- Acompanhamento regular.

3.7- Critérios de exclusão no estudo

- Foram excluídos os pacientes que evoluíram a óbito no ato cirúrgico ou que não sobreviveram ao primeiro mês pós-transplante;
- Foram excluídos os pacientes que não tiveram um acompanhamento regular adequado pós-transplante.

Assim, foram analisados 53 pacientes, com seguimento satisfatório e com um mínimo de 1 mês de acompanhamento. A mediana de idade dos pacientes foi de 41,8 anos (mínima de 5 e máxima de 64 anos) e mais da metade deles 35 (66%) pertenciam ao sexo masculino (Tabela 1 e Gráfico 1).

4- MÉTODOS

Em tubos com EDTA foram colhidos 4 ml de sangue de pacientes no centro cirúrgico (pré-transplante) e no ambulatório da Unidade de Fígado e Transplante Hepático do Hospital das Clínicas da UNICAMP (Pós-Transplante). Os testes laboratoriais foram realizados no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnica de Biologia Molecular da FCM-UNICAMP.

A monitorização da infecção ativa pelo HHV-5 foi feita utilizando-se a detecção de antígenos virais em células do sangue periférico (Antigenemia) e a detecção de fragmentos de DNA virais extraídos de células do sangue periférico e amplificados pelo método N-PCR.

A monitorização da infecção ativa pelo HHV-6 foi feita a partir de amostras de DNA extraídos do sangue periférico amplificando-se o DNA viral com o método N-PCR. Também, foi realizada a padronização da antigenemia para o HHV-6, e análise de amostras de 4 pacientes.

A monitorização da infecção ativa por HHV-7 foi feita utilizando-se soro para a realização da Nested-PCR para o HHV-7

4.1- Antigenemia

4.1.1- Antigenemia para HHV-5

O teste de antigenemia foi realizado a partir dos métodos descritos por Van der Bij *et al*, 1988; Boeckh, M., 1992, com algumas modificações.

As amostras de sangue (4ml) foram coletadas em tubos contendo como anticoagulante EDTA e processadas no prazo de até 6 horas após coleta.

4.1.2- Extração de polimorfonucleares

Os leucócitos foram sedimentados com dextran a 6% (sangue/dextran na proporção 4:1). O sobrenadante (rico em leucócitos polimorfonucleares) foi removido e centrifugado. Para remoção das hemácias persistentes, foi usada uma suspensão de cloreto de amônio a 4°C, seguido de centrifugação. O sobrenadante foi então desprezado

novamente e o sedimento celular lavado com PBS, centrifugado e então foi ressuspendido em 200µl a 1000µl de PBS.

4.1.3- Preparação das lâminas

Após a extração, os leucócitos foram contados em câmara de Newbauer e preparada uma suspensão com $1,5$ a 2×10^6 células/ML. 100µl desta suspensão foram colocados em citofunil e centrifugados em citocentrífuga (Marca Revan-mod. Citociclo).

4.1.4- Reação das lâminas

A seguir, as lâminas (feitas em duplicata) foram secas, fixadas com Paraformaldeído, lavadas com PBS e soro fetal bovino e permeabilizadas com Nonidet P-40. Após nova lavagem, as lâminas foram secas e a área de reação delimitada com esmalte e estocada à temperatura de -80°C . O anticorpo monoclonal utilizado foi o CLONAB do laboratório BIOTEST AG (Dreieck-W. – Germany), contendo uma combinação de anticorpos monoclonais C-10 e C-11, que reconhecem o antígeno pp65 do HHV-5. Foi aplicado 35µl do monoclonal diluído 1:10 em PBS por área de reação e incubado em câmara úmida à temperatura de 37°C . A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS. O conjugado utilizado foi o anti-mouse (Horse Radish Peroxidase labeled goat anti-mouse Ig(G) do laboratório BIOTEST AG. Foi aplicado 35µl do “anti-mouse peroxidase” diluído 1:80 em PBS na área da reação. Em seguida, as lâminas foram incubadas à temperatura 37°C em câmara úmida e depois lavadas com PBS. Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com a solução de AEC (amino-etil-carbazol-Sigma), recém-preparada (20 mg de AEC dissolvida em 5 ml de dimetilformamida-Sigma) e em 100 ml de tampão (acetato de sódio 0,1 M, pH 4.9) e adicionado 50 µl de H_2O_2 a 30% e deixadas no escuro, à temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas com tampão de acetato de sódio 0.1 M, pH 4.9.

4.1.5- Coloração das lâminas

Após serem lavadas com PBS, foram coradas com hematoxilina de Mayer, marca MERCK, e a seguir montadas com glicerina tamponada.

4.1.6- Leitura das lâminas

Foi utilizado um microscópio óptico, marca Nikon.

4.1.7- Interpretação da leitura

Células positivas: núcleo marrom, coloração total ou perinuclear em polimorfonucleares e ocasionalmente em monócitos.

Células negativas: núcleo azul.

4.2- Antigenemia para HHV-6 e HHV-7

Foram coletadas amostras de sangue em 2 tubos contendo EDTA e em uma grade com superfície reta foram colocados 3 tubos falcon etiquetados (para cada amostra).

4.2.1- Extração de células mononucleares (1ª parte)

No primeiro tubo adicionou-se sangue e soro fisiológico ou PBS em partes iguais e a mistura foi homogenizada por inversão lentamente.

No segundo tubo adicionou-se o Ficoll-Paque na mesma proporção do sangue mais soro.

Transferiu-se o sangue que foi misturado juntamente ao soro com o auxílio de pipeta pasteur deixando escorrer na parede do tubo sobre o Ficoll, obtendo-se 3 partes na mesma proporção. A seguir o tubo foi levado à centrifugação por 25 min à 1900 RPM.

As células resultantes foram coletadas com auxílio de pipeta pasteur (estas células se agrupam como uma nuvem branca concentrada no meio do material entre hemácias e sobrenadante. Transferiu-se este material para o terceiro tubo, completando para 10 ml de soro ou PBS e centrifugando durante 7 minutos à 2200 rpm.

O pellet que fica no cone do tubo são as células resultantes que devem ser lavadas de três à quatro vezes de acordo com a proporção do mesmo (pellet).

Na ultima lavagem deixou-se o pellet secar e adicionou-se 0,5 ml de soro ou PBS, ressuspendeu-se com pipeta pasteur até a homogenização de 25 ul deste material + 500 ul de soro ou PBS. A seguir foram adicionados em tubo de eppendorf de 1,5 ul e levado para a contagem na camara de Newbawer .

4.2.2- Preparação das lâminas

Adicionou o material no citofunil conforme o nº de células desejado e para a citocentrifugação por 10 min à 800 rpm.

Retirou-se as lâminas do citoclipes e fez-se a fixação com imersão em acetona absoluta gelada por 15 minutos.

Preparou-se a câmara úmida para a colocação das lâminas.

4.2.3- Reação das lâminas para HHV-6 (2ª parte)

Foi aplicado em cada lâmina 35 ul dos respectivos anticorpos monoclonais (MAB8533 e MAB8535) diluidos 1:20 sobre o spott e incubadas a 37°C por 40 minutos ou deixadas Overnight.

As lâminas foram mergulhadas 3 vezes em PBS e ficaram imersas no mesmo por 5 minutos.

Foi aplicado 35 µl do 1º (conjugado) soro de coelho anti-IgG de camundongo (nas duas lâminas) (DAKO,Z0456) e diluído 1:50 em PBS, pH 7,5, e levado a estufa à 37°C em câmara úmida por 40 minutos. Em seguida as lâminas foram mergulhadas 3 vezes em PBS por 5 minutos. Foi aplicado 35 µl do 2º (conjugado) soro de cabra anti-IgG de coelho marcado com peroxidase diluído a 1:200 (ZYMED, 81-6120)

em cada lâmina, que ficaram incubadas pôr 1 hora à 37 °C. Outra lavagem foi feita para retirada de excesso de reagente seguindo o mesmo procedimento da lavagem anterior.

Foi aplicado solução AEC/peróxido de hidrogênio e esperou-se 10 minutos, ficando em local escuro. A seguir as lâminas ficaram mergulhadas em uma cuba contendo solução tampão acetato 1 vez por 10 minutos.

4.2.4- Reação das lâminas para HHV-7 (2ª Parte - a ser padronizada)

O protocolo de reação para HHV-7 seguirá o descrito para a reação de antigenemia para HHV-6 com algumas alterações dos reagentes utilizados. Serão utilizados anticorpos monoclonais (gp 110/160) para detectar antígenos precoces e tardios do HHV-7 respectivamente e mais 2 conjugados marcados com peroxidase das marcas Dako e Zymed como segundo e terceiros anticorpos. A reação será revelada com AEC contendo peróxido de hidrogênio e a contra-coloração será feita com hematoxilina de Mayers.

4.2.5- Coloração das lâminas

Após o procedimento citado acima foram feitas 3 lavagens consecutivas com a água destilada, deixando as lâminas mergulhadas por 1, 3 e 5 minutos. Em seguida foi feita a coloração das lâminas com Hematoxilina de Mayer, por 2 minutos. As lâminas foram enxaguadas em água corrente gentilmente, para não danificar a integridade do spott. Após este procedimento foi aplicada a glicerina e em seguida realizada a leitura e interpretação em microscópio óptico, em objetiva 40 x (vezes).

4.2.6- Interpretação da leitura

Positivo: citoplasma da célula corado em marrom;

Negativo: citoplasma da célula corado em azul.

4.3- NESTED-PCR para HHV-5 E HHV-6

4.3.1- Extração do DNA em sangue periférico

O precipitado de leucócitos remanescente do teste de antigenemia foi lisado em solução de TKM1 (Tris-HCl 10mM (pH 7.6); KCl 10mM; MgCl₂ 10mM e EDTA 20mM), centrifugados por 10 minutos a 2.500 rpm, por duas vezes consecutivas, quando foi adicionado 3 gotas de Nonidet P-40 na primeira lavagem. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionada a solução de TKM2, 8 ml da solução contendo Tris-HCl 10 mM (pH 7,6); NaCl 0,4M; MgCl₂ 10mM; KCl 10 mM; EDTA 2 mM e 0,025 de duodecil sulfato de sódio (SDS) 20%. Em seguida o material foi incubado por 40 minutos a uma temperatura de 56°C e após incubação adicionou-se 0,3 ml de NaCl 5M, descartando o 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.

4.3.2- Nested-PCR para HHV-5

A reação em cadeia da polimerase seguiu o método descrito por Saiki e colaboradores (1988), com algumas modificações. Cada reação de amplificação conterá 0,5 a 1 µg do DNA estudado em volume total de 20 µl, 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 de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) e 2 unidades de Taq DNA polimerase.

Foram complementados 30 ciclos de amplificação para cada amostra e cada um deles compreenderá: separação de hélices de DNA (aquecimento a 94° durante 1 min); ligação complementar entre os primers e o DNA (temperatura de 55° por 1 min); extensão dos primers por ação da Taq DNA polimerase (72° durante 1 min).

Os ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA).

4.3.2.1- Primers utilizados para reação de Nested-PCR para HHV-5

Foram utilizados dois iniciadores que flaqueiam uma região constante do HHV-5 (Tabela 1):

Tabela 1- Seqüência dos primers utilizados para a PCR para o HHV-5

Primer	Seqüência	Localização no genoma
MIE 4	CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C	1122-1136
MIE 5	CAG CAC CAT CCT CCT CCT CCT CTG G	1122-1546

N-PCR: uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação é amplificado com o par de primers interno (Tabela 2):

Tabela 2- Seqüência dos primers utilizados para a Nested-PCR para o HHV-5

Primer	Seqüência	Localização no genoma
IE1	CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC	1307-1326
IE2	CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC	1449-1469

As condições da reação foram as mesmas da primeira reação.

Após as duas reações de amplificação e reamplificação, 5 µl do Nested-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio para visualização com luz ultravioleta.

Para a verificação da presença de DNA nas aostras foi feita a amplificação gênica pela PCR do gene da β -Globina (presente no DNA humano) utilizando primers que detectam esse gene. Foram utilizados dois primers que flaqueiam uma região constante do gene da β -Globina humana (Tabela 3):

Tabela 3- Sequência dos primers utilizados para a PCR para o gene da β -Globina

Primer	Sequência
PCO3	CTT CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC
PCO4	TCA CCA CCA ACT TCA TCC ACG TTC ACC

Em todas as amostras com DNA presente foram observados fragmentos de 110 pares de base correspondentes ao gene da β -Globina. A amplificação do fragmento do gene da β -globina humana evidencia a viabilidade do DNA da amostra e funciona como controle da reação de PCR. A não amplificação desse gene demonstra que o DNA presente na amostra avaliada não é viável e, portanto, deve ser excluído da reação.

Trinta ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado. As amostras foram aquecidas inicialmente a 94° C por 7 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que possa interferir com a reação enzimática e, no último ciclo o período de extensão (72° C) foi de 7 minutos.

4.3.3- Nested-PCR para HHV-6

As condições da reação seguem a metodologia clássica da Reação em Cadeia de Polimerase. A NESTED-PCR seguiu o método descrito para HHV-6 e HHV-7, com algumas modificações (Pozo et al., 1999).

O DNA extraído como descrito anteriormente foi processado na quantidade de 5 microlitros com 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 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. O PCR foi realizado em Termociclador - MJ Research -MA, com uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 53°C e 30 segundos a 72°C e, extensão final de 72°C por 5 minutos.

Um segundo PCR foi realizado usando 1 microlitro do primeiro PCR e 49 microlitros de uma mistura consistindo de 60 mM Tris-HCl (pH 8.5), 2 mM MgCl₂, 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 seguiu as mesmas da PCR anterior exceto que a temperatura de anelamento é de 47°C. Aplicação de 10 µl 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 submetida a eletroforese em imersão e posterior visualização em lâmpada ultravioleta para a comprovação de bandas de DNA de 194 bp usando DNA Ladder Gibco BRL como padrão de peso molecular.

4.3.3.1- Primers utilizados para reação de Nested-PCR para HHV-6

Os iniciadores (primers) utilizados para o primeiro PCR-HHV-6(A/B) foi (Tabela 4):

Tabela 4- Seqüência dos primers utilizados para a PCR para o HHV-6

Primer	Seqüência
HHV6(A/B) 1+	5' GCG TTT TCAGTG TGT AGT TCG GCA G 3'
HHV6(A/B) 1-	5' TGG CCG CAT TCGTAC AGA TAC GGA GG 3'

Os iniciadores (primers) utilizados para o segundo PCR-HHV-6(A/B) foi (Tabela 5):

Tabela 5- Seqüência dos primers utilizados para a Nested-PCR para o HHV-6

Primer	Seqüência
HHV6(A/B) 2+	5' GCT AGA ACG TAT TTG CTG CAG AAC G 3'
HHV6(A/B) 2-	5' ATC CGA AAC AAC TGT CTG ACT GGC A 3

4.4- NESTED-PCR para HHV-7

4.4.1- Extração de DNA em soro

Uma alíquota de 200 ul de soro foi transferida para um eppendorf e a ela foram adicionados 200 ul de Tampão proteinase K (10mM Tris HCl pH 8.3, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0,4% Duodecyl sulfato de sódio) e 1ul de Proteinase K (Solução de Proteinase K 10mg/ml) sendo incubado por 2 horas em banho-maria à 55°C. Em seguida a este tubo foi adicionado 200 ul de fenol clorofórmio (1:1), homogeneizado, e incubado em banho de gelo por 10 minutos. Após esta incubação foi centrifugado por 10 minutos a 15000 rpm, e o sobrenadante obtido foi transferido para outro tubo, repetindo os procedimentos citados acima por mais duas vezes. Ao sobrenadante foi adicionado 25ul de acetato de sódio 3M gelado e 900µl de etanol absoluto, agitando vigorosamente e incubando em banho de gelo por 20 minutos. Em seguida foi centrifugado por 10 minutos a 15000 rpm, descartando o sobrenadante. Foi adicionado 25ul de água deionizada e ressuspendido o pellet, conservando-o na geladeira por 1 dia.

4.4.2- Nested-PCR para o HHV-7

Foram realizadas 2 reações de amplificação (Nested-PCR) para HHV-7.

Na primeira reação foi utilizado 5ul do DNA extraído, 2ul de buffer, 0,6ul MgCL₂, 2ul de DNTP, 0,25ul de Taq DNA Polimerase e 0,3 ul de cada primer.

Na segunda reação foi utilizado 3ul do DNA extraído, 2ul de buffer, 0,6ul MgCL₂, 2ul de DNTP, 0,25ul de Taq DNA Polimerase e 0,3ul de cada primer.

Foram complementados 30 ciclos para cada amplificação e cada um deles compreendeu: separação de hélices de DNA (temperatura 94°C durante 30 segundos); ligação complementar entre os primers e o DNA (temperatura de 53°C na 1ª reação e 47°C na 2ª reação durante 1 minuto) e extensão dos primers por ação da Taq DNA polimerase (temperatura de 72°C por 30 segundos).

Os ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado Termociclador (RoboCycler – Stratagene)

4.4.3- Primers utilizados para reação de Nested PCR – HHV-7

Os iniciadores utilizados na primeira reação da Nested-PCR foram (Tabela 6):

Tabela 6- Sequência dos primers utilizados para a PCR para o HHV-7

Primer	Sequência
HHV-7 1+	5'GAG GTG ATT TAT GGT GAT ACT GA 3'
HHV-7 1-	5'AAC TTT CCA ATG TAA CGT TTC TT 3'

N-PCR: uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação é amplificado com o par de primers interno. Os iniciadores utilizados na segunda reação (Nested-PCR) foram (Tabela 7):

Tabela 7- Sequência dos primers utilizados para a Nested-PCR para o HHV-7

Primer	Sequência
HHV-7 2+	5' GTT ACT TTC AAA AAT GTT TGT CCC 3'
HHV-7 2-	5'GGA AAT AGG ATC TTT TCA AAT TC3'

4.5- Estatística

A avaliação utilizada dos dados obtidos foi através do teste Fischer (Siegel, 1975) estes testes avaliam diferenças entre dois grupos independentes em relação a uma variável qualquer que só admita duas alternativas como resposta (sim/nao-positivo/negativo). Permite calcular a probabilidade de associação das características que estão em análise. Foi considerado estatisticamente significativo, P-valor <0,05.

O teste de Fisher deve ser usado em casos em que, o número total de dados é pequeno, por se tratar de um teste mais sensível que o qui-quadrado.

O programa computacional utilizado foi: The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 8.02 SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC USA.

5- RESULTADOS

5.1- Interpretação dos resultados

Tabela 8- Características dos receptores de transplante hepático em relação ao sexo masculino (M), feminino (F) e idade

Total de receptores	Idade média (anos)	Sexo (M/F)
53	41,8	35/18

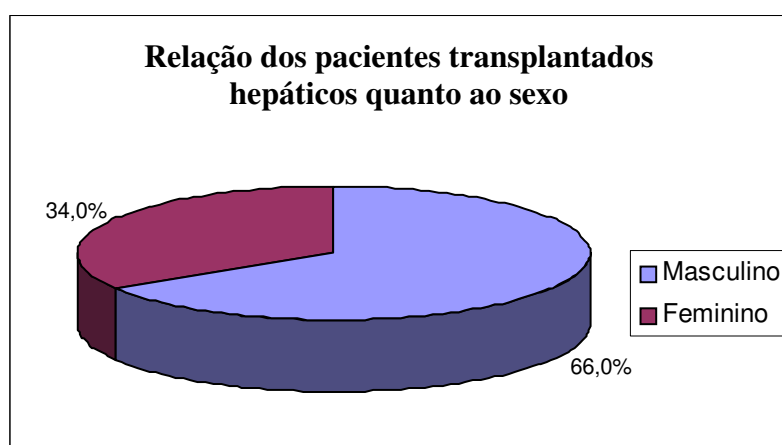


Gráfico 1- Distribuição dos pacientes transplantados hepáticos quanto ao sexo

As causas mais freqüentes que levaram os pacientes estudados a receberem um transplante hepático foram, na ordem de prevalência, Cirrose Hepática decorrente da infecção pelo Vírus C isoladamente (50,9%), Cirrose Hepática por Vírus B isoladamente (HBV) (11,3%) e Cirrose Hepática por Álcool isoladamente (9,4%) (Tabela 2 e Gráfico 2).

Tabela 9- Características dos pacientes estudados em relação à doença de base.

Doença de Base dos receptores	Pacientes	%
Cirrose Hepática por Vírus da Hepatite C isoladamente	27/53	50,9
Cirrose Hepática por Vírus da Hepatite B isoladamente	6/53	11,3
Cirrose Alcoólica isoladamente	5/53	9,4
Cirrose Biliar Primária	3/53	5,7
Criptogênica	3/53	5,7
Hepatite auto-imune	2/53	3,8
Insuficiência Hepática por Doença de Wilson	1/53	1,9
Hemocromatose	1/53	1,9
Cirrose Hepática por Atresia de Vias Biliares	1/53	1,9
Hepatite fulminante	1/53	1,9
Amiloidose familiar	1/53	1,9
Colangite esclerosante	1/53	1,9
Esteatose Hepática	1/53	1,9

(AUBEH)

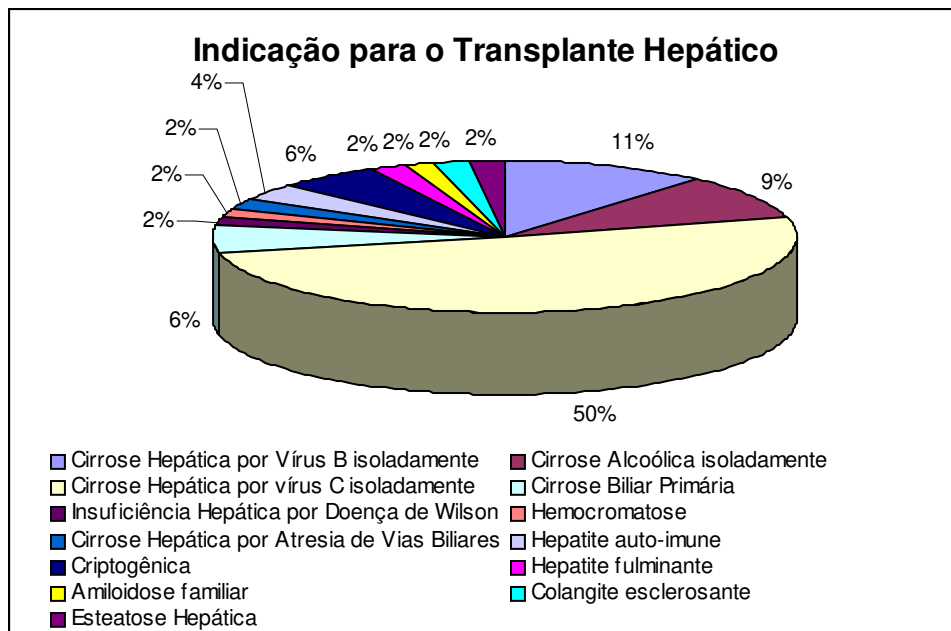


Gráfico 2- Indicações para Transplante Hepático

5.1.1- Antigenemia

O teste de antigenemia tanto para HHV-5 quanto para HHV-6 foi considerado positivo a partir de uma célula positiva (Polimorfonuclear apresentando o núcleo acastanhado para HHV-5 (Figura 4) e linfócitos com citoplasma acastanhado para HHV-6) (Figura 5)

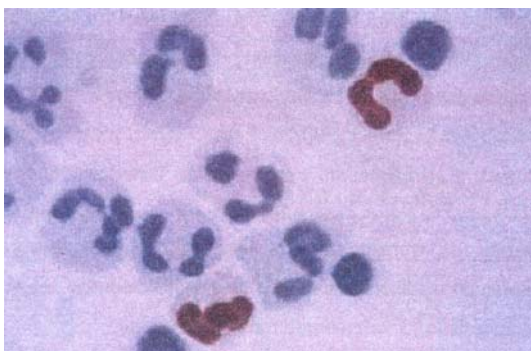


Figura 04- Neutrófilos de sangue periférico
HHV-5 positivo.

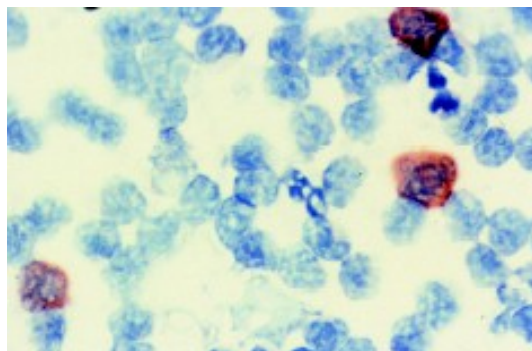


Figura 05- Linfócitos de sangue periférico
HHV-6-positivo (Harma *et al.*, 2006)

5.1.2- Nested-PCR para HHV-5

Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, demonstrando a amplificação de um fragmento de 159 pb do DNA do HHV-5 com os primers IE-1 e IE-2 (produto da “N-PCR”) em pacientes transplantados hepáticos, não foi amplificado nenhum fragmento nas amostras negativas (Figura 6).

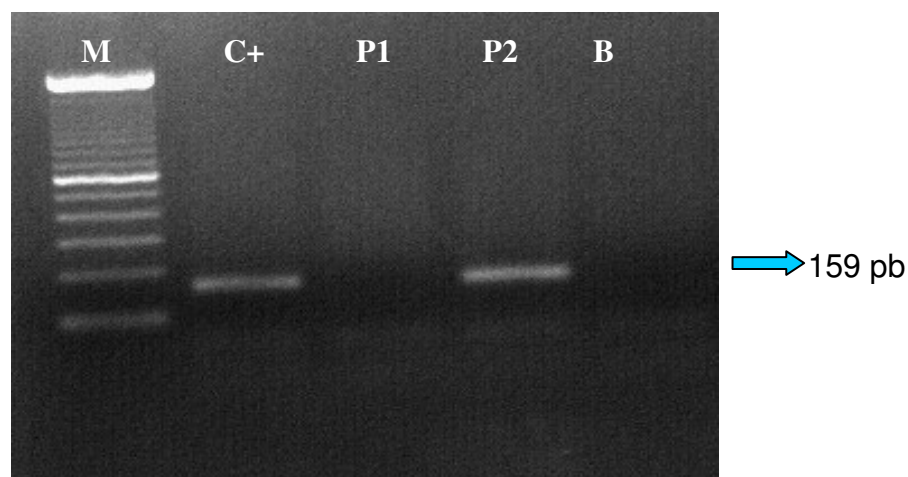


Figura 6- Nested-PCR positiva para HHV-5

Legenda referente à Figura 6

***M** (Marcador de peso molecular);*

***C+** (controle positivo);*

***P1** (paciente negativo para o HHV-5 por Nested-PCR);*

***P2** (paciente positivo para o HHV-5 por Nested-PCR);*

***B** (branco de reação - H₂O).*

5.1.3- Nested-PCR para HHV-6

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 hepáticos (Figura 7).

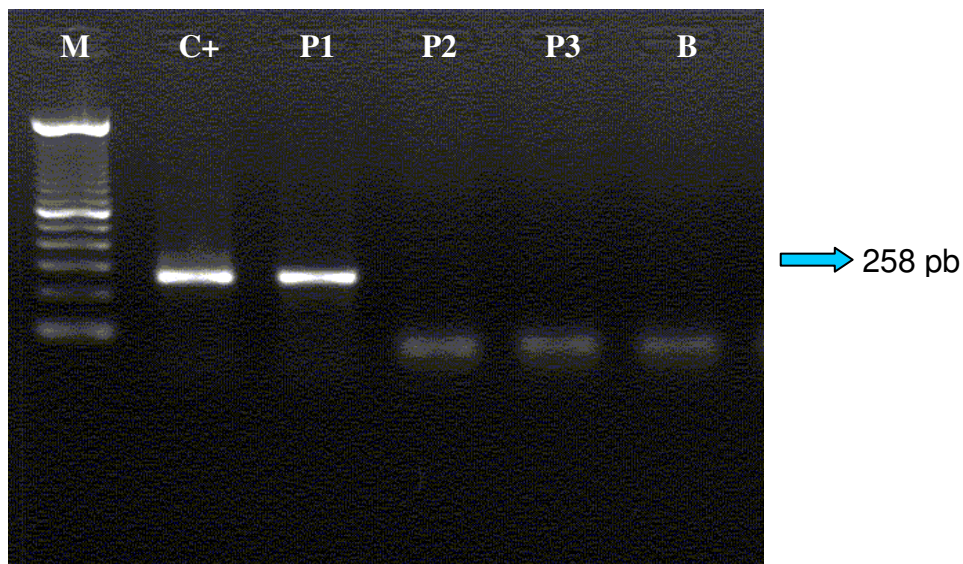


Figura 7- Nested-PCR positiva para HHV-6

Legenda referente à Figura 7

M (*Marcador de peso molecular*);

C+ (*controle positivo*);

P1 (*paciente negativo para o HHV-6 por Nested-PCR – resto de reagente*);

P2 (*paciente positivo para o HHV-6 por Nested-PCR*);

P3 (*paciente positivo para o HHV-6 por Nested-PCR*);

B (*branco de reação - H₂O*).

5.1.4- Nested-PCR para HHV-7

Eletroforese em gel agarose 2%, exibindo fragmentos de oligonucleotídeos (Amplicon) obtidos por Nested-PCR para HHV-7, foi considerada positiva amostra com fragmento de DNA de 122 pares de bases (Figura 8).

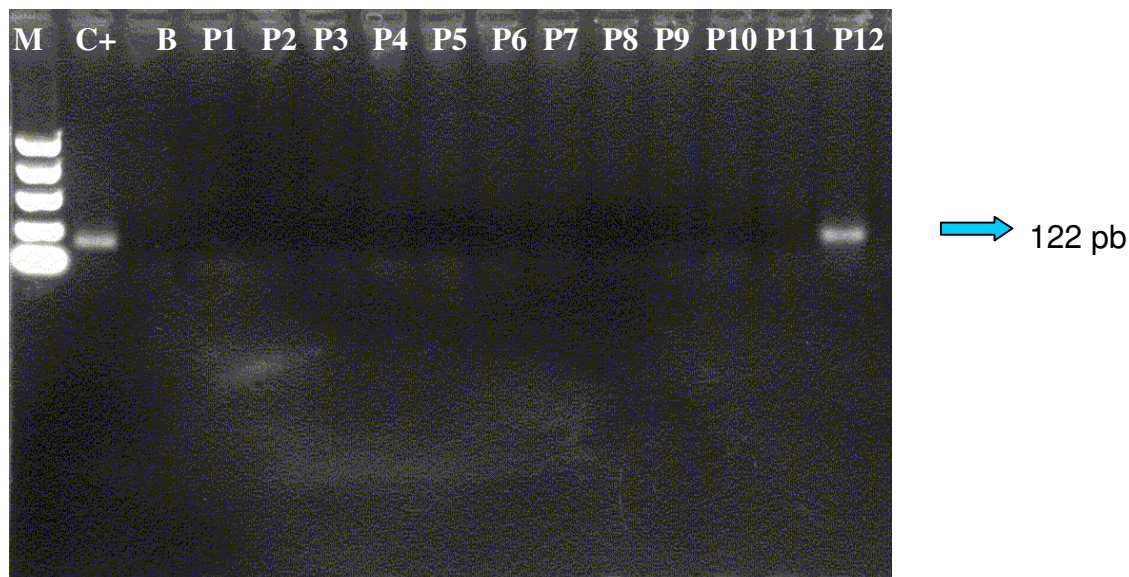


Figura 8- Nested-PCR positiva para HHV-7

Legenda referente à Figura 8

M (Marcador de peso molecular);	P6 (Paciente negativo para o HHV-7);
C+ (Controle positivo);	P7 (Paciente negativo para o HHV-7);
B (branco de reação H ₂ O);	P8 (Paciente negativo para o HHV-7);
P1 (paciente negativo para o HHV-7);	P9 (Paciente negativo para o HHV-7);
P2 (paciente negativo para o HHV-7);	P10 (Paciente negativo para o HHV-7);
P3 (Paciente negativo para o HHV-7);	P11 (Paciente negativo para o HHV-7);
P4 (Paciente negativo para o HHV-7);	P12 (Paciente positivo para o HHV-7).
P5 (Paciente negativo para o HHV-7);	

Dos 53 pacientes transplantados hepáticos monitorizados na Unidade de Fígado e Transplante Hepático do Hospital das Clínicas da UNICAMP, 44/53 (83,02%) apresentaram pelo menos 1 resultado positivo na Nested-PCR em sangue periférico para HHV-5 (83,02%). O diagnóstico para HHV-6 foi feito à partir de Nested-PCR de sangue periférico, observando-se uma positividade (pelo menos 1 resultado positivo) em 38/53 pacientes (71,7%) estudados. Para diagnosticar HHV-7 foi realizada Nested-PCR em soro (pelo menos 1 resultado positivo) observamos 23/53 pacientes positivos (43,4%).

Para a antigenemia (AgM) 13/53 (24,5%) pacientes apresentaram resultados positivos para HHV-5. A padronização da antigenemia para HHV-6 foi concluída (Apêndice 4.Tabela 16), enquanto a padronização para HHV-7 está em andamento.

Tabela 10- Panorama geral dos resultados obtidos, durante a monitorização da infecção ativa por HHV-5, HHV-6 e HHV-7 após o transplante hepático, nos pacientes estudados.

Pacientes	Antigenemia para HHV-5	N-PCR em sangue periférico para HHV-5	N-PCR em sangue periférico para HHV-6	N-PCR em soro para HHV-7
1. TS	-	29; 71; 92; 99; 112	337	197
2. JCR	-	72; 79; 99; 114 ; 135	45; 114	-
3. SR	-	-	-	39; 46; 165
4. WFC	-	137	36; 50	-
5. LPS	15 (+1)	22; 29; 36; 43; 50; 56; 64; 71; 78	-	-
6. FJC	<u>25</u>(+7); <u>28</u>(+1); <u>34</u>(+4)	<u>25</u>; <u>28</u>; <u>33</u>; <u>34</u>; 40; <u>46</u>; <u>53</u>	<u>33</u>; <u>46</u>; <u>53</u>	<u>28</u>; 74
7. PCS	-	35	77; 104	-
8. LAC	-	0 ; 24; 38; 52 ; 66; 76; 103	0 ; 10; 52	-
9. HLL	-	12; 18 ; 49	18 ; 26	-
10. LGS	-	20; 40	12; 96	-
11. IH	-	4 ; 12 ; 19 ; 26; 35; 40; 61	4 ; 12 ; 19	96
12. EFO	-	12 ; 17	12 ; 17	-
13. LAMC	<u>34</u> (+4); <u>55</u> (+5)	27; <u>34</u> ; <u>55</u> ; 167	-	-

Pacientes	Antigenemia para HHV-5	N-PCR em sangue periférico para HHV-5	N-PCR em sangue periférico para HHV-6	N-PCR em soro para HHV-7
14. AOR	<u>35</u> (+2); 47 (+1); 52 (+10)	0; 9; <u>35</u>	-	-
15. BMD	-	154	35; 49; 70; 105; 154 ; 203	-
16. AC	36 (+13)	49; 77	7; 21; 28; 36; 49 ; 63; 77 ; 84; 105; 154; 182	-
17. SEM	-	45; 59	-	-
18. YH	-	37; 51; <u>65</u> ; 72	-	<u>65</u>
19. DAF	-	29	29 ; 57; 71; 169	-
20. ESF	-	19 ; 28; 33; 40; 47	19; 47 ; 103	138
21. AMG	-	-	13	25
22. AM	<u>64</u> (+6); <u>70</u> (+3)	43; 62 ; <u>64</u> ; <u>70</u> ; 112	1; 50 ; 62	50
23. BR	<u>61</u> (+3)	-	7; 12; 26; 48; 56; <u>61</u> ; 68; 77	<u>61</u>
24. DS	-	<u>19</u> ; 28; 59; 74; 90; 167; 171; 185	146	<u>19</u> ; 68
25. HTT	-	46; 74	0; 6 ; 12; 74; 137	0; 6; 137 ; 158
26. ISN	-	-	49; 147	0
27. JB	-	87	-	0; 154
28. JVDP	-	0; 6; 24; 56; 76; 199; 272 ; 284; 306	272; 306	33
29. JRC	-	0; <u>4</u> ; 84; 95; 102; 112 ; 126; 378	112	<u>4</u>
30. MAV	-	33; 56; 70; 81; 91; 112 ; 231	18; 81; 91 ; 98; 112 ; 126; 356; 452	0; 161
31. MP	-	54; <u>110</u>	-	63; <u>110</u> ; 180; 194
32. NFS	180 (+4); <u>215</u> (+2)	21; <u>215</u>	7	410
33. NMS	-	62 ; 75; 285	28; 47; 62	14
34. OAF	<u>22</u> (+55); <u>120</u> (+28)	15; 18; <u>22</u> ; 36; 60; <u>120</u> ; 260	382; 486; 507	-
35. TAL	-	-	-	-
36. MMR	-	16	65; 86	-
37. AFS	-	3; 54	0; 20; 34; 39	-
38. JEA	98 (+4)	0	77; 104	-
39. CML	-	-	-	170
40. MCZ	-	27	0; 12; 27 ; 294	-

Pacientes	Antigenemia para HHV-5	N-PCR em sangue periférico para HHV-5	N-PCR em sangue periférico para HHV-6	N-PCR em soro para HHV-7
41. VPN	-	11; 18; 42	-	28; 193
42. TC	<u>143</u> (+38)	<u>59</u> ; <u>143</u> ; 181; 304; 332	332	<u>59</u>
43. SOP	-	16; 20; 23; 90; 153	356	-
44. JA	-	25; 128	-	-
45. MRS	-	180 ; 264	19; 180	-
46. JLS	-	-	15	-
47. FCL	-	<u>69</u> ; <u>83</u>	-	6; 55; <u>69</u> ; <u>83</u>
48. FPL	48 (+2)	43	181	-
49. JRAV	-	27	-	-
50. MFO	-	-	-	-
51. JF	-	14 ; 21 ; 28 ; 35; 42 ; 77	14 ; 21 ; 28 ; 42 ; 77	-
52. MVV	<u>32</u> (+21); <u>39</u> (+25)	25; <u>32</u> ; <u>39</u>	4; 11; 32 ; 39 ; 137	-
53. EAL	-	-	54	-

Os números da tabela expressam o dia pós-TX em que os resultados positivos foram obtidos;

Na coluna 2 o número entre parêntese significa o número de células positivas encontradas;

Os números sublinhados em negrito indicam concomitância de resultados positivos pela antigenemia e Nested-PCR para o HHV-5;

Os números em verde indicam concomitância de resultados positivos pela antigenemia para o HHV-5 e Nested-PCR para HHV-6;

Os números em vermelho indicam concomitância de resultados positivos pela Nested-PCR para o HHV-5 e Nested-PCR para HHV-6;

Os números em rosa indicam concomitância de resultados positivos pela Nested-PCR para o HHV-6 e Nested-PCR para o HHV-7;

Os números sublinhados em rosa indicam concomitância de resultados positivos pela Nested-PCR para o HHV-6 e Nested-PCR para o HHV-7;

(-) Significa que não houve detecção positiva para antigenemia e PCR.

A infecção ativa por HHV-5 foi diagnosticada em 33/53 paciente (62,3%) em média no dia 50 pós-transplante, com mediana de 36 dias (4–180). Comparando-se as 2 técnicas empregadas nesse diagnóstico, a Nested-PCR diagnosticou a infecção ativa pelo HHV-5 em média após 37 dias do transplante, com uma mediana de 30,5 dias (4-92), enquanto a antigenemia diagnosticou em média após 61 dias com mediana de 42 dias (15-180). A infecção ativa pelo HHV-6 foi diagnosticada em 21/53 pacientes (39,6%), em média no dia 62 pós-transplante com mediana de 34 dias (6 – 507) (Gráfico 4). Já a infecção ativa pelo HHV-7 foi diagnosticada em 23/53 pacientes (43,4%), em média no dia 65 pós-transplante com mediana de 33 dias (0 – 410) (Gráficos 3,4,5 e Tabela 11).

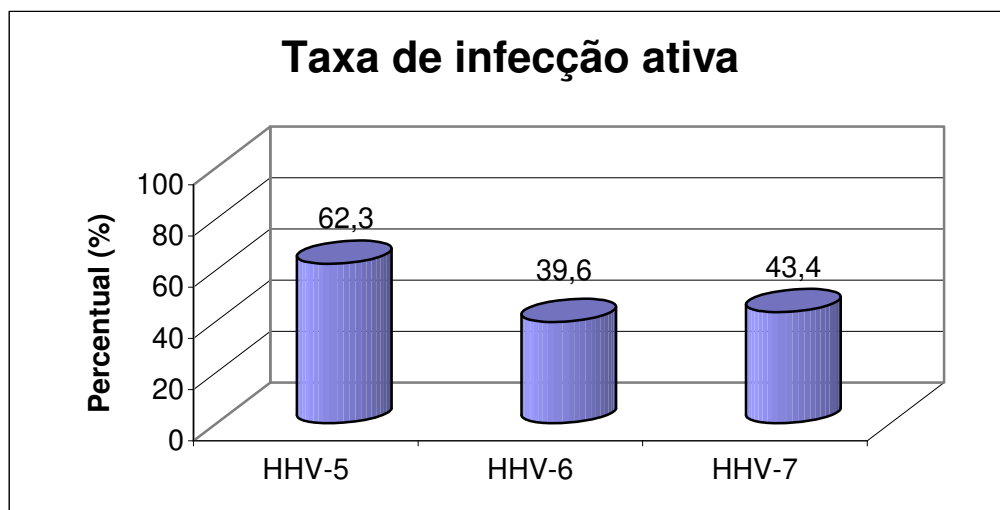


Gráfico 3- Taxa de infecção ativa pelo HHV-5, HHV-6 e o HHV-7 no presente estudo

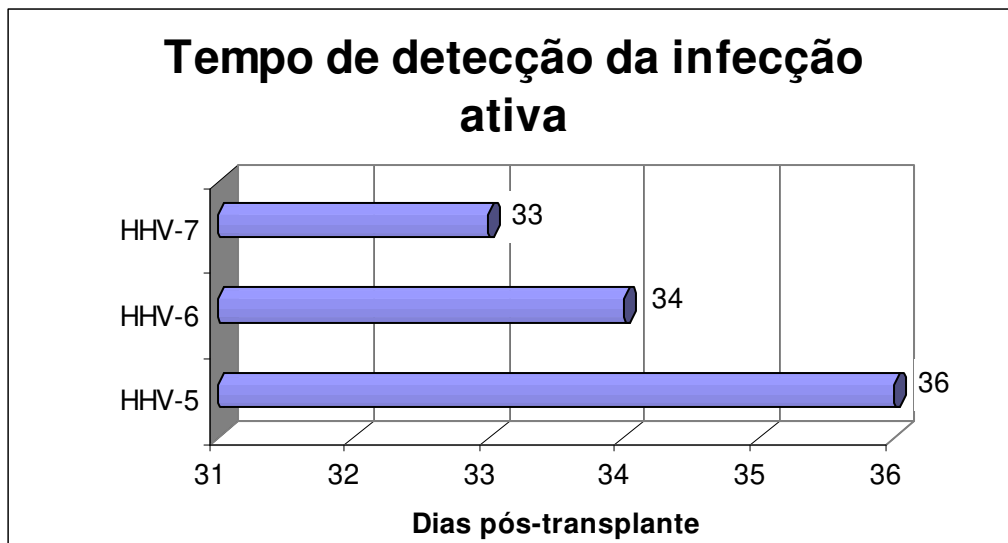


Gráfico 4- Comparação entre a mediana dos tempos de início da detecção da infecção ativa pelo HHV-5, HHV-6 e HHV-7

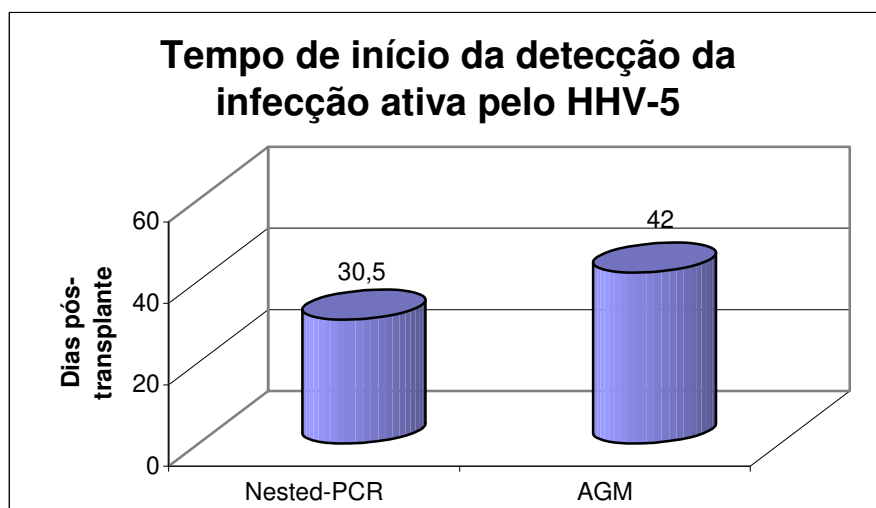


Gráfico 5- Comparação entre a mediana dos tempos de início da detecção da infecção ativa pelo HHV-5 pelas técnicas de Nested-PCR e antigenemia (AGM)

No presente trabalho foram diagnosticados 8/53 pacientes (15,1%) apresentando co-infecção ativa por HHV-5/HHV-6, 5/53 paciente (9,4%) por HHV-5/HHV-7, 2/53 pacientes (3,8%) por HHV-6/HHV-7 e 1/53 pacientes (1,9%) pelos três vírus estudados (HHV-5/HHV-6/HHV-7) (tabela 11).

Tabela 11- Infecção ativa pelo HHV-5, HHV-6, HHV-7 e co-infecção HHV-5/HHV-6, co-infecção HHV-5/HHV-7, co-infecção HHV-6/HHV-7 e co-infecção HHV-5/HHV-6/HHV-7

Paciente	Infecção ativa por HHV-5	Dia pós TXH	Infecção ativa por HHV-6	Dia pós TXH	Infecção ativa por HHV-7	Dia pós TXH	Co- infecção ativa HHV-5/ HHV-6	Co- infecção ativa HHV-5/ HHV-7	Co- infecção ativa HHV-6/ HHV-7	Co- infecção ativa HHV-5/ HHV-6/ HHV-7
1. TS	Sim	92, 99	Não	-	Sim	197	Não	Não	Não	Não
2. JCR	Sim	79, 99, 114, 135	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
3. SR	Não	-	Não	-	Sim	39, 46, 165	Não	Não	Não	Não
4. WFC	Não	-	Sim	50	Não	-	Não	Não	Não	Não
5. LPS	Sim	15, 22 29, 36, 43, 50, 56, 64, 71, 78	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
6. FJC	Sim	25, 28, 33, 34, 40, 46, 53	Sim	53	Sim	28, 74	Sim	Sim	Não	Não
7. PCS	Não	-	Sim	104	Não	-	Não	Não	Não	Não
8. LAC	Sim	76	Sim	10	Não	-	Não	Não	Não	Não
9. HLL	Sim	18	Sim	26	Não	-	Não	Não	Não	Não
10. LGS	Sim	40	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
11. IH	Sim	19; 26; 35; 40; 61	Sim	19	Sim	96	Sim	Não	Não	Não
12. EFO	Sim	17	Sim	17	Não	-	Sim	Não	Não	Não
13. LAMC	Sim	34, 55	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
14. AOR	Sim	35, 47, 52	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
15. BMD	Não	-	Sim	49, 70, 105	Não	-	Não	Não	Não	Não
16. AC	Sim	36	Sim	21, 28, 36, 49, 63, 77, 84, 105, 182	Não	-	Sim	Não	Não	Não
17. EMS	Sim	59	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
18. YH	Sim	51; 65; 72	Não	-	Sim	65	Não	Sim	Não	Não

Paciente	Infecção ativa por HHV-5	Dia pós TXH	Infecção ativa por HHV-6	Dia pós TXH	Infecção ativa por HHV-7	Dia pós TXH	Co- infecção ativa HHV-5/ HHV-6	Co- infecção ativa HHV-5/ HHV-7	Co- infecção ativa HHV-6/ HHV-7	Co- infecção ativa HHV-5/ HHV-6/ HHV-7
19. DAF	Não	-	Sim	57, 71	Não	-	Não	Não	Não	Não
20. ESF	Sim	28, 33, 40, 47	Não	-	Sim	138	Não	Não	Não	Não
21. AMG	Não	-	Não	-	Sim	25	Não	Não	Não	Não
22. AM	Sim	64, 70	Sim	62	Sim	50	Não	Não	Não	Não
23. BR	Sim	61	Sim	12, 26, 48, 56, 61, 68, 77	Sim	61	Sim	Sim	Sim	Sim
24. DS	Sim	28, 90, 171, 185	Não	-	Sim	19, 68	Não	Não	Não	Não
25. HTT	Sim	74	Sim	6, 12	Sim	0, 6, 137, 158	Não	Não	Sim	Não
26. ISN	Não	-	Não	-	Sim	0	Não	Não	Não	Não
27. JB	Não	-	Não	-	Sim	0, 154	Não	Não	Não	Não
28. JVDP	Sim	6, 76, 284, 306	Não	-	Sim	33	Não	Não	Não	Não
29. JRC	Sim	4, 95, 102, 112, 126	Não	-	Sim	4	Não	Sim	Não	Não
30. MAV	Sim	56, 70, 81, 91	Sim	91, 98, 112, 126	Sim	0, 161	Sim	Não	Não	Não
31. MP	Não	-	Não	-	Sim	63, 110, 180, 194	Não	Não	Não	Não
32. NFS	Sim	180, 215	Não	-	Sim	410	Não	Não	Não	Não
33. NMS	Sim	75	Sim	47, 62	Sim	14	Não	Não	Não	Não
34. OAF	Sim	18, 22, 36, 60, 120	Sim	507	Não	-	Não	Não	Não	Não
35. TAL	Não	-	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
36. MMR	Não	-	Sim	86	Não	-	Não	Não	Não	Não
37. AFS	Não	-	Sim	34, 39	Não	-	Não	Não	Não	Não
38. JEA	Sim	98	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
39. CML	Não	-	Não	-	Sim	170	Não	Não	Não	Não
40. MCZ	Não	-	Sim	12	Não	-	Não	Não	Não	Não
41. VPN	Sim	18, 272	Não	-	Sim	28, 193	Não	Não	Não	Não
42. TC	Sim	143, 332	Não	-	Sim	59	Não	Não	Não	Não
43. SOP	Sim	20, 23	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
44. JÁ	Não	-	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
45. MRS	Não	-	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
46. JLS	Não	-	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
47. FCL	Sim	83	Não	-	Sim	6, 55, 69, 83	Não	Sim	Não	Não
48. FPL	Sim	48	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
49. JRAV	Não	-	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
50. MFO	Não	-	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não
51. JF	Sim	21, 28, 35, 42, 77	Sim	21, 28	Não	-	Sim	Não	Não	Não
52. MVV	Sim	32, 39	Sim	11, 39	Não	-	Sim	Não	Não	Não
53. EAL	Não	-	Não	-	Não	-	Não	Não	Não	Não

A infecção ativa e co-infecção por patógenos como o HHV-5, HHV-6 e HHV-7 estão relacionadas a um significativo impacto clínico em pacientes imunossuprimidos. Dos 33 pacientes que apresentaram infecção ativa pelo HHV-5 25/33 (75,75%) apresentaram alterações clínicas e laboratoriais e destes 22/25 (88%) apresentaram provável doença por HHV-5, sendo que 8/33 (24,24%) foram assintomáticos.

A co-infecção por HHV-5 e HHV-6 acometeu 8/53 (15,09) pacientes. Destes 7/8 pacientes (87,5%) apresentaram alterações clínicas e laboratoriais. Para o HHV-5/HHV-7 a co-infecção acometeu somente 5/33 (15,15), destes 3/5 (60%) apresentaram alterações clínicas e laboratoriais 2/5 (40%) com provável doença. A co-infecção para o HHV-5/HHV-6/HHV-7 acometeu 1/33 (3,3%) dos pacientes, com provável doença. (Tabela 12 e Gráfico 6).

Tabela 12- Relação entre provável doença por HHV-5, alterações clínicas e laboratoriais, infecção ativa por HHV-5, co-infecção ativa por HHV-5 e HHV-6, co-infecção ativa por HHV-5/HHV-7 e co-infecção ativa por HHV-5/HHV-6/HHV-7.

Paciente	Provável Doença por HHV-5	Início do quadro	Sinais, sintomas e alterações laboratoriais	Infecção ativa por HHV-5	Co-infecção ativa HHV- 5/ HHV-6	Co- infecção ativa HHV-5/ HHV-7	Co- infecção ativa HHV-5/ HHV-6/ HHV-7
1. TS	Sim	100	enzimas hepáticas↑↑↑ leucopenia, plaquetopenia	71,92,99, 112	Não	Não	Não
2. JCR	Sim	97	↑GGT plaquetopenia leucopenia.+ disurbio Neurológico Encefalopatia Febre,vômito	79, 99, 114, 135	Não	Não	Não
3. SR	Não	—	enzimas hepáticas↑↑↑ leucopenia plaquetopenia	Não	Não	Não	Não
4. WFC	Não	—	plaquetopenia Leucitose, ↑enzimas hepáticas	Não	Não	Não	Não
5. LPS	Sim	15	plaquetopenia, ↑enzimas hepáticas encefalopatia,convulsão, choque séptico	15, 22 29, 36, 43, 50, 56, 64, 71, 78	Não	Não	Não
6. FJC	Sim	25	↑ enzimas hepáticas Leucopênia. Neutroênia, Febre, cefaléia	25,28,34,25, 28, 33, 34, 40, 46, 53	33,46,53	28	Não

Paciente	Provável Doença por HHV-5	Início do quadro	Sinais, sintomas e alterações laboratoriais	Infecção ativa por HHV-5	Co-infecção ativa HHV- 5/ HHV-6	Co- infecção ativa HHV-5/ HHV-7	Co- infecção ativa HHV-5/ HHV-6/ HHV-7
7. PCS	Não	-	plaquetopenia+leucop. ↑ linfopenia ↑enzimas hepáticas febre, alterações Intestinais	Não	Não	Não	Não
8. LAC	Sim	52	pancitopenia ↑enzimas hepáticas plaquetopenia+linfopenia + febre	24,38,52,6676,103	Não	Não	Não
9. HLL	Sim	18	Plaquetopenia Grave + pancitopenia ↑enzimas hepáticas + febre, herpes labial	12,18,49	Não	Não	Não
10. LGS	Sim	20	Plaquetopen leucocitose leucocitose ↑enzimas hepat + febre e diarreia	40,46	Não	Não	Não
11. IH	Sim	16	leucopenia ↑enzimas hepáticas ↑bilirrubina +febre, diarreia	4,12, 19, 26,35, 40	4,12,19	Não	Não
12. EFO	Sim	11	Plaquetopenia ↑enzimas hepáticas leucocitose ↑enzimas + febre	12,17	12,17	Não	Não
13. LAMC	Sim	9	Pancitopenia ↑enzimas hepáticas +febre e diarreia	34, 55 34,55	Não	Não	Não
14. AOR	Sim	56	↑enzimas hepáticas plaquetopenia Leucopenia neutrop. febril febre, náuseas + choque séptico	35, 47, 52, 35, 55	Não	Não	Não
15. BMD	Não	-	Assintomático	Não	Não	Não	Não
16. AC	Sim	34	plaquetopenia, leucopenia febre + diarreia	36,49	36,49,77	Não	Não
17. EMS	Não	—	Assintomático	45,59	Não	Não	Não
18. YH	Não	—	Assintomático	37,51; 65; 72	Não	65	Não
19. DAF	Não	-	Leucopenia, plaquetopenia ↑ enzimas hepáticas	Não	Não	Não	Não
20. ESF	Sim	32	↑ enzimas, plaquetopenia. Septicemia	28, 33, 40, 47	não	Não	Não
21. AMG	Não	—	Assintomático	Não	Não	Não	Não
22. AM	Sim	84	leucopenia,neutropenia + febre	62,64,64,70 70,112	Não	Não	Não
23. BR	Sim	29	Paquetopenia, encefalopatia hepática, quadro neurológico + febre.	61	26,48,56,61	61	61
24. DS	Sim	30	Leucopenia, plaquetopenia, diarreia, febre e lesões orais sugestivas de HHV-5	28, 59,74,90	Não	Não	Não
25. HTT	Não	-	Assintomático	46,74	Não	Não	Não
26. ISN	Não	-	Diarreia	Não	Não	Não	Não

Paciente	Provável Doença por HHV-5	Início do quadro	Sinais, sintomas e alterações laboratoriais	Infecção ativa por HHV-5	Co-infecção ativa HHV- 5/ HHV-6	Co- infecção ativa HHV-5/ HHV-7	Co- infecção ativa HHV-5/ HHV-6/ HHV-7
27. JB	Sim	49	Microabscesso sugestivos HHV-5, Colonoscop. com lesões sugestiva HHV-5 + diarreia – HD HHV-5	Não	Não	Não	Não
28. JVDP	Sim	290	↑enzimas hepáticas + diarreia febre	56,76,199,272,284, 306	Não	Não	Não
29. JRC	Não	-	Diarreia	95, 102, 112, 126	Não	112	Não
30. MAV	Sim	29	↑ enzimas hepáticas + febre	56, 70, 81, 91	81 , 91	Não	Não
31. MP	Não	-	Assintomático	Não	Não	Não	Não
32. NFS	Não	-	Assintomático	21,180,215,215	Não	Não	Não
33. NMS	Não	-	Assintomático	62,75	Não	Não	Não
34. OAF	Sim	21	Leucopenia Plaquetopenia.+ Diarreia	18, 22, 22,36, 60,	Não	Não	Não
35. TAL	Não	-	Pancitopenia ↑enzimas hepáticas Leucopenia	Não	Não	Não	Não
36. MMR	Não	-	leucopenia,plaquetopea	Não	Não	Não	Não
37. AFS	Não	-	Pancitopenia e leucocitose	Não	Não	Não	Não
38. JEA	Não	-	Assintomático	98	Não	Não	Não
39. CML	Não	-	Diarreia	Não	Não	Não	Não
40. MCZ	Não	-	febre e encefalite	Não	Não	Não	Não
41. VPN	Não	-	Assintomático	11,18, 42	Não	Não	Não
42. TC	Não	-	Leucopenia ↑ Enz Hep febre	143,143, 181	Não	Não	Não
43. SOP	Não	-	Leucopenia Plaquetopenia	16,20,23,90	Não	Não	Não
44. JÁ	Não	-	Plaquetopenia Leucopenia + febre	Não	Não	Não	Não
45. MRS	Não	-	Assintomático	Não	Não	Não	Não
46. JLS	Não	-	Pancitopenia	Não	Não	Não	Não
47. FCL	Não	-	Assintomático	69,83	Não	69,83	Não
48. FPL	Sim	47	↑ enzimas hepáticas	48	Não	Não	Não
49. JRAV	Não	-	Bilirrubina ↑, crialinina ↑, pancitopenia	Não	Não	Não	Não
50. MFO	Não	-	Leucocitose, leucopenia, plaquetopenia	Não	Não	Não	Não
51. JF	Sim	-	enzimas hepáticas esteatose hepáticas leve +leucocitose	21, 28, 35, 42, 77	21, 28	Não	Não
52. MVV	Não	-	Diarreia+vômito cefaleia enz hep	32, 39,32, 39	32,39	Não	Não
53. EAL	Não	-	Enzimas hepáticas ↑, bilirrubina ↑, plaquetopenia	Não	Não	Não	Não

*o número expresso em vermelho indica detecção ativa do HHV-5 por antigenemia; *HHV-5 x Provável Doença {p= 0.0001}

*HHV-5 x Alterações Laboratoriais {p= 0,49}

A infecção ativa e a co-infecção entre os herpesvírus podem causar impactos 1- direto e 2- indireto no quadro clínico dos pacientes que são: 1- pneumonias, gastroenterites, encefalites, retinites e hepatites, e 2- redução da sobrevida do paciente, disfunções agudas e crônicas no enxerto e aumento da pré-disposição a infecções oportunistas.

Dentre os 53 pacientes estudados 16/53 (30,3%) apresentaram rejeição ao enxerto, sendo que 11/16 (68,7%) apresentaram infecção ativa por HHV-5, 12/16 (75%) evoluíram à óbito sendo que destes 6/16 (37,5%) também tiveram rejeição ao enxerto. Dos 11 pacientes que apresentaram infecção ativa por HHV-5, 4 deles apresentaram co-infecção por HHV-5 e HHV-6 (36, 36%). Já o quadro de infecções oportunistas foi diagnosticado em 31/53 (58,5%) pacientes, destes 21/31 (67,7%) apresentaram quadro de infecção ativa para HHV-5 e 5/31 (16,1%) apresentaram co-infecção ativa por HHV-5 e HHV-6, 12/53 (22,6%) pacientes evoluíram que evoluíram à óbito 9/12 (75%) deles apresentaram infecções oportunistas, tendo como causa mais frequente a pneumonia e sepse, destes 4/9(44%) tiveram infecção ativa por HHV-5 e 1/4 (25%) apresentou a co-infecção por HHV-5 e HHV-6. (Tabela 13 e Gráfico 6).

Tabela 13- Relação entre infecção ativa por HHV-5, co-infecção ativa entre HHV-5 e HHV-6, infecções oportunistas e rejeição do enxerto.

Paciente	Infecção ativa por HHV-5	Co-infecção ativa HHV-5 HHV-6	Infecção Oportunista	Tipo	Rejeição do enxerto	Grau de rejeição	Início do quadro	Óbito
1. TS	92, 99	Não	Não	Não	Não	–	–	Não
2. JCR	79, 99, 114, 135	Não	Sim	Sepse e ITU	Não	–	–	Não
3. SR	Não	Não	Não	Não	Não	–	–	Não
4. WFC	Não	Não	Não	Não	Não	–	–	Não
5. LPS	15, 22 29, 36, 43, 50, 56, 64, 71, 78	Não	Sim	ITU por levedura	Não	–	–	Não
6. FJC	25, 28, 33, 34, 40, 46, 53	33, 46, 53	Sim	Sepse por S.aureus e Aeromonas R	Não	–	–	Não
7. PCS	Não	Não	Sim	Pneumonia	Não	–	–	Sim (302)

Paciente	Infecção ativa por HHV-5	Co-infecção ativa HHV-5 HHV-6	Infecção Oportunista	Tipo	Rejeição do enxerto	Grau de rejeição	Início do quadro	Óbito
8. LAC	76	Não	Sim	Pneumonia	Não	—	—	Não
9. HLL	18	Não	Sim	Sepse por P.aeruginosa e P.fluorescens, herpes labial	Sim	Moderada	7	Não
10. LGS	40	Não	Sim	Pneumonia	Não	—	—	Não
11. IH	19; 26; 35; 40; 61	19	Sim	Pneumonia e ITU por citrobacter	Sim	Leve	105	Não
12. EFO	17	17	Não	Não	Não	—	—	Não
13. LAMC	34, 55	Não	Sim	Pneumonia	Sim	Moderada	146	Não
14. AOR	35, 47, 52	Não	Sim	Pneumonia	Sim	Moderada	56	Sim (145)
15. BMD	Não	Não	Sim	Pneumonia	Não	—	—	Não
16. AC	36	36	Sim	Sepse e ITU por P. aeruginosa	Sim	Leve	2	Não
17. EMS	59	Não	Não	Não	Não	—	—	Não
18. YH	51; 65; 72	Não	Não	Não	Não	—	—	Não
19. DAF	Não	Não	Sim	Sepse por P. aeruginosa	Sim	Moderada	101	Não
20. ESF	28, 33, 40, 47	Não	Sim	Sepse por Klebsiella penumoniae, ITU P. aeruginosa e pneumonia	Sim	Leve	82	Não
21. AMG	Não	Não	Não	Não	Sim	Aguda	—	Sim (27)
22. AM	64, 70	Não	Sim	Infecção da parede abdominal, pneumonia e sepse	Não	—	—	Sim (140)
23. BR	61	61	Sim	Pseudomonas, Klebsiella em sec. abdominal	Sim	Moderada / grave	—	Sim (84)
24. DS	28, 90, 171, 185	Não	Sim	Cultura de líquido ascilítico positivo	Não	—	—	Não
25. HTT	74	Não	Sim	Pneumonia	Não	—	—	Não
26. ISN	Não	Não	Não	Não	Sim	Moderada	85	Sim (519)
27. JB	Não	Não	Não	Não	Não	—	—	Não
28. JVDP	6, 76, 284, 306	Não	Sim	Bacteremia	Sim	Leve	283	Não
29. JRC	4, 95, 102, 112, 126	Não	Não	Não	Não	—	—	Não
30. MAV	56, 70, 81, 91	91	Não	Não	Não	—	—	Não
31. MP	Não	Não	Não	Não	Não	—	—	Não
32. NFS	180, 215	Não	Sim	Pneumonia	Não	—	—	Não
33. NMS	75	Não	Não	Não	Não	—	—	Não
34. OAF	18, 22, 36, 60, 120	Não	Não	Não	Sim	Moderada/ Grave	493	Não
35. TAL	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	Não
36. MMR	Não	Não	Não	Não	Sim	Grave	98	Sim (98)

Paciente	Infecção ativa por HHV-5	Co-infecção ativa HHV-5 HHV-6	Infecção Oportunista	Tipo	Rejeição do enxerto	Grau de rejeição	Início do quadro	Óbito
37. AFS	Não	Não	Sim	Broncopneumonia nosocomial, Pneumonia intersticial	Não	-	-	Sim (54)
38. JEA	98	Não	Sim	UTI	Não	-	-	Sim (299)
39. CML	Não	Não	Sim	Infec parede abdominal	Não	-	-	Não
40. MCZ	Não	Não	Sim	Pneumonia	Não	-	-	Sim (718)
41. VPN	18, 272	Não	Não	Não	Não	-	-	Não
42. TC	143, 332	Não	Sim	Não	Não	-	104	Não
43. SOP	20, 23	Não	Não	Não	Não	-	-	Não
44. JA	Não	Não	Sim	Sarcoma de Kaposi Gástrico	Sim	Aguda leve	105	Sim (179)
45. MRS	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	Não
46. JLS	Não	Não	Sim	Pneumonia	Não	-	-	Sim (82)
47. FCL	83	Não	Não	Não	Sim	Moderada	565	Não
48. FPL	48	Não	Sim	Hep A sem coma + 42 dor abd, ↑enz)	Não	-	-	Não
49. JRAV	Não	Não	Sim	Pseudomonas	Não	-	-	Não
50. MFO	Não	Não	Não	Não	Não	-	-	Não
51. JF	21, 28, 35, 42, 77	21, 28	Sim	Não	Sim	Aguda moderada	33	Não
52. MVV	32, 39	39	Não	Não	Não	-	-	Não
53. EAL	Não	Não	Sim	Streptococcus agalactial, Enterococcus gallinarum, Klebsella	Não	-	-	Não

Infecção ativa por HHV-5 x Infecção oportunista: { p= 0.3189 }

Tabela 14- Pacientes que tiveram rejeição mediante laudo anatomopatológico.

PACIENTES QUE TIVERAM REJEIÇÃO DO ENXERTO						
N. 16/53 (30,3%)						
Infecção ativa				Co-infecção		
HHV-5	11	(68,75%)		HHV-5/HHV-6	4	(25%)
HHV-6	8	(50%)		HHV-5/HHV-7	2	(12,5%)
HHV-7	7	(43,75%)		HHV-5/HHV-6/HHV-7	1	(6,25)

16 indica número de pacientes que apresentaram rejeição

Rejeição x HHV-5 {p= 0,37}

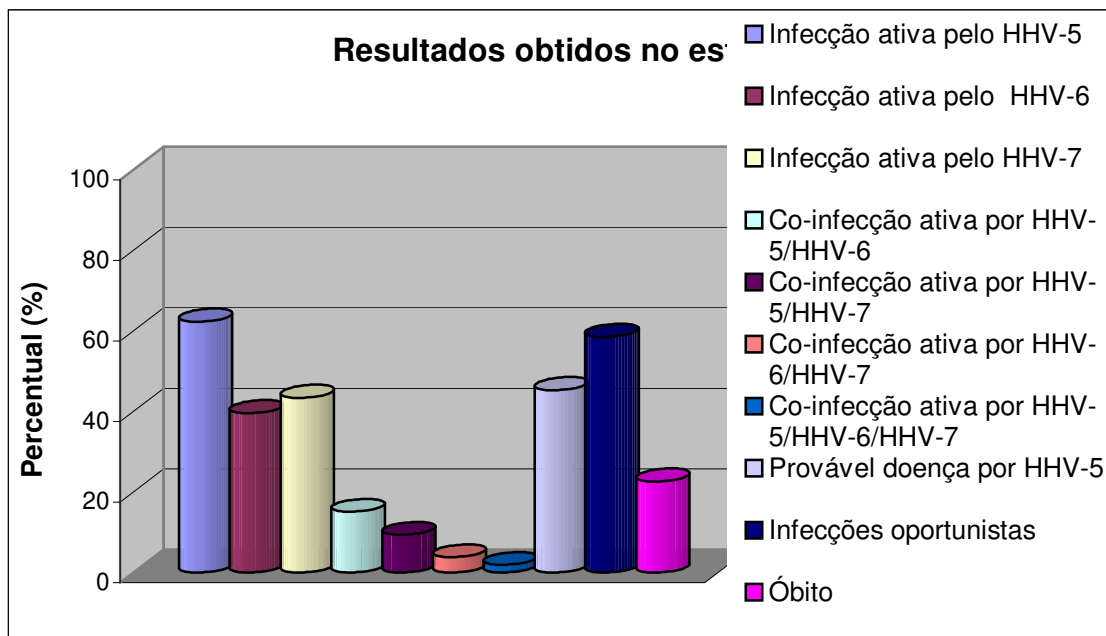


Gráfico 6- Relação entre infecção ativa por HHV-5, HHV-6 e HHV-7, co-infecção ativa por HHV-5 e/ou HHV-6 e/ou HHV-7, provável doença por HHV-5, infecção oportunista, rejeição do enxerto e óbito (n=53)

6- DISCUSSÃO

A grande parte da população mundial é soropositiva para o HHV-5 e geralmente, a infecção em indivíduos imunocompetentes não causa doença grave. Entretanto, a infecção em indivíduos imunossuprimidos, como os transplantados de órgãos, pode levar ao aumento da morbidade e mortalidade (**Ljungman, 1994; Patel e Paya, 1997**).

Vários estudos soroepidemiológicos realizados demonstram que a infecção por HHV-5 ocorre praticamente em todas as regiões do mundo e a prevalência não depende tanto de área geográfica, mas sim do nível sócio econômico das comunidades estudadas (Hunter, 1983; Pannuti et al., 1987). No Brasil, a soroprevalência do HHV-5 é alta, em média de 90% em populações adultas principalmente as pertencentes à classe social menos favorecida (**Suassuna et al., 1995; Camargo et al., 1996; Costa et al., 1999; Aquino e Figueiredo, 2001**).

Uma vez infectado o indivíduo não elimina mais o vírus (**Szcepura et al., 2006; Koch et al., 2006; Hara et al., 2002**), permanecendo em estado latente podendo ser reativado em condições especiais como é o caso dos transplantados de órgãos, portadores de HIV, pacientes submetidos à quimioterapia, portadores de doença auto-imune e recém nascidos. (**Hoppe et al., 2004; Shen et al., 1996, Bruggeman et al., 1999**).

Nos transplantados o HHV-5 têm sido reconhecido como significativo fator de risco para falência e perda do enxerto em vários estudos prospectivos. A observação da ocorrência de um episódio de rejeição aguda concomitante à infecção por HHV-5 tem permitido o estabelecimento de uma relação entre a infecção por HHV-5 e rejeição (**Pouteil-Noble et al., 1993**).

Recentemente, alguns estudos tem investigado co-fatores que podem afetar a gravidade da infecção por HHV-5 em pacientes submetidos à transplantes. Dentre os principais co-fatores está a infecção múltipla por outros herpesvírus que podem favorecer o progresso da doença por HHV-5 (**Pasca et al., 2003; Lautenschlager et al., 2002**).

Alguns estudos sugerem que o HHV-5 juntamente com o HHV-6 e o HHV-7 podem estar associados, e juntos causar grande impacto clínico em pacientes transplantados de órgãos (**Lautenschlager et al., 2002**), embora o significado clínico para HHV-7 esteja ainda pouco esclarecido.

A infecção ativa por HHV-5 foi diagnosticada em 33/53 pacientes (62,3%), pelo HHV-6 foi diagnosticada em 21/53 pacientes (39,6%) e pelo HHV-7 foi diagnosticada em 23/53 pacientes (43,39%).

Estes resultados corroboram com dados da literatura que mostram uma alta prevalência em pacientes transplantados hepáticos (**Okada et al., 1993; Freitas 1997; Knoles e Gardner, 1988**).

O HHV-5, HHV-6 e HHV-7 são vírus universais que podem causar infecções primárias e secundárias (**Mendelson et al., 2006**). São amplamente disseminados, sendo que a soroprevalência do HHV-5 varia entre 40% e 60% em populações de alto nível sócio-econômico, enquanto em populações de nível sócio-econômico mais baixo a soroprevalência é maior, variando de 80% a 100%. Para o HHV-6 e HHV-7 a soroprevalência também é alta variando de 45 a 97% e 90 a 100%, respectivamente (**Ablashi et al., 1988; Cuende et al., 1994; Freitas, 1997; Okada et al., 1993**).

O HHV-7 em pacientes imunossuprimidos pode se reativar e, em associação com outros herpesvírus causar danos tanto ao órgão transplantados, como ao estado geral do paciente (**Ward et al., 2005; Thomasini et al, 2007**). Vários estudos têm relatado a possível interação direta ou indireta pela ação imunomodulatória desses vírus (**Mendez et al., 2001; Humar et al., 2002; Clarck, 2003; Razonable e Paya, 2002; Lautenschlager et al., 2002**).

A infecção concomitante pelo HHV-5 e HHV-6 está geralmente associada com manifestações clínicas e tem sido descrito que a infecção por HHV-6 pode levar à reativação do HHV-5 ou alteração da história natural da doença (**Abdel e Asmar, 2004; Pasca et al., 2003**).

No presente estudo foram monitorizados prospectivamente em relação à infecção ativa por HHV-5, HHV-6 e HHV-7 53 pacientes transplantados hepáticos. Dos 53 pacientes estudados, 8 apresentaram co-infecção ativa por HHV-5/HHV-6 (15,1%), para o HHV-5/HHV-7 a co-infecção acometeu 5 pacientes dos 53 (9,4%), para o HHV-6/HHV-7 a co-infecção ocorreu em 2 dos 53 pacientes (3,8%), e em 1 dos 53 pacientes foi detectado a co-infecção ativa por HHV-5/HHV-6/HHV-7.

Dos 8 pacientes que apresentaram a co-infecção por HHV-5 e HHV-6, 7 deles apresentaram provável doença por HHV-5, e 3 deles apresentaram rejeição do enxerto. Desses 3 pacientes 1 (paciente 23) além da co-infecção por HHV-5/HHV-6 também foi detectado o HHV-7 no pós-operatório dia 61º, evoluindo à óbito no dia 84º.

Estudos indicam que a detecção do HHV-6 e HHV-7 aparecem juntas, e precocemente em relação ao HHV-5 nos pacientes transplantados hepáticos (**Lautenschlager et al., 2006; Humar et al., 2000**), o que foi demonstrado no presente estudo onde a infecção ativa pelo HHV-6 ocorreu com uma mediana de 34 dias, para o HHV-7 com uma mediana 33 dias pós transplante, e para o HHV-5 a aparecimento da infecção ativa ocorreu com mediana de 36 dias pós transplante.

Em comparação com outros estudos, a incidência dos três vírus foi considerada, relativamente similar ao encontrado neste trabalho (**Ihira et al., 2001, Griffiths et al., 1999; Okada et al., 1993; Freitas 1997; Knoles e Gardner, 1988**).

O impacto clínico da infecção por HHV-5 em pacientes imunossuprimidos não se restringe apenas à lesões diretas celulares em vários tecidos do corpo, mas também a lesões celulares induzidas pelo sistema imunológico, associação do vírus a estados febris resultado de invasão e disseminação viral, redução da sobrevida do paciente, disfunções agudas e crônicas no enxerto e conseqüente rejeição e aumento da pré-disposição a infecções bacterianas e fúngicas, podendo levar o transplantado à óbito (**Paya, 2002**). Neste estudo dos 22 pacientes que tiveram provável doença por HHV-5, 16 destes pacientes apresentaram infecções oportunistas.

Ainda que a profilaxia antiviral tenha reduzido a morbidade e a mortalidade da doença por HHV-5 nos últimos anos, a toxidade associada com os atuais agentes antivirais disponíveis continua a ser um problema significativo; assim, os esforços têm sido direcionados ao desenvolvimento de métodos de detecção, altamente sensíveis e quantitativos, para identificar pacientes com risco para a doença antes do início dos sintomas, com isso direcionando o tratamento antiviral apenas aos pacientes seguramente com risco para a doença (**Boeckh e Boivin, 1998**). Para evitar a ocorrência da doença uma das estratégias é a utilização de diagnósticos laboratoriais rápidos e sensíveis, que permitam

a detecção precoce de replicação viral ativa, evitando custos e toxidades desnecessários de terapêutica (**Goodrich et al., 1991**).

Neste estudo foram utilizadas as técnicas de antigenemia e Nested-PCR para detecção do HHV-5 e HHV-6 no sangue periférico e Nested PCR para o HHV-7 no soro. Foi considerado infecção ativa para HHV-5 antigenemia com 1 célula positiva ou mais antígenos positivos. Para a Nested-PCR do HHV-5 e HHV-6 foi considerado infecção ativa 2 PCR's positivos consecutivos com intervalo menor ou igual à 30 dias, e para a Nested-PCR do HHV-7 em soro consideramos infecção ativa 1 resultado positivo.

Quando a antigenemia detectava uma célula positiva era iniciado o tratamento com ganciclovir, mesmo na ausência de manifestações clínicas (tratamento precoce).

A antigenemia é um método sensível para estimativa da carga viral sistêmica e tem bom valor preditivo positivo para a doença e pode ser detectado vários dias a uma semana antes do aparecimento dos sintomas (**The et al., 1992; Boeckh 1996ab**).

O N-PCR tem uma alta sensibilidade para detecção de infecção ativa, porém apresenta valor preditivo positivo para Doença ainda não muito satisfatório.

Os resultados laboratoriais juntamente com o levantamento clínico dos transplantados acompanhados até o presente momento têm demonstrado que a infecção ativa pelo HHV-6 é um possível fator de risco para rejeições de enxerto, principalmente quando associado à infecção ativa pelo HHV-5. Dentre os 53 pacientes estudados 16 apresentaram rejeição ao enxerto, sendo que 11 destes pacientes apresentaram infecção ativa por HHV-5 e 4 deles apresentaram a co-infecção por HHV-5 e HHV-6.

Infecções oportunistas foram diagnosticado em 31/53 pacientes estudados, sendo que destes 21/31 apresentaram infecção oportunista por HHV-5 e 11/21 tiveram episódio de rejeição do enxerto, destes 5/11 (45,45%) evoluindo à óbito. Dos 5 pacientes que evoluíram à óbito 2 (40%) deles tiveram co-infecção por HHV-5/HHV-6.

O HHV-6 é o vírus da família Herpesvirinae com maior tropismo por células do SNC (Clarck e Griffiths, 2003). Há relatos de casos de encefalite associadas ao HHV-6 em pacientes transplantados hepáticos. O HHV-6 pode ocasionar alterações neurológicas,

as complicações no Sistema Nervoso Central (SNC) pode ser resultado de uma ação direta viral ou indireta porque o vírus pode induzir a produção de citocinas, incluindo o interferon-alfa, uma citocina conhecida pela toxicidade neurológica causando a mudança no estado mental pôr efeitos indiretos no SNC (**Rogers et al., 2000**).

Neste estudo houve 1 caso de encefalite associado á febre (paciente 40), com detecção do HHV-6 no 12º dia pós transplante, com sintomas iniciais no 24º dia pós transplante. O DNA do HHV-5 não foi detectado neste paciente. A amostra de liquor não foi disponibilizada para a detecção do DNA para HHV-6 para que se pudesse confirmar a suspeita de encefalite por HHV-6, ficando assim a hipótese sustentada pela presença de detecção do DNA para HHV-6 no sangue periférico.

O paciente 23 apresentou alterações neurológicas, febre e plaquetopenia, e a detecção do HHV-5 ocorreu no 61º dia pós transplante pela antigenemia e Nested PCR no sangue periférico. A detecção do HHV-7 também ocorreu no 61º dia, e o HHV-6 foi detectado no 12º dia pós-transplante. O paciente foi à óbito no 84º dia pós transplante, tendo como causa a falência do enxerto.

Desde 1990 quando o HHV-7 foi isolado, ele tem sido relacionado à processos de exantema súbito em crianças, encefalopatia e encefalite quando acomete pacientes transplantados hepáticos (**Ward et al., 2005**). No caso de pacientes imunossuprimidos o HHV-7 pode se reativar e, em associação com outros herpesvírus causar danos tanto no órgão transplantado, como ao estado geral do paciente (**Ward et al., 2005**). O HHV-5 raramente causa encefalite (**Singh et al., 2000**).

Este estudo demonstrou que poucos pacientes permanecem livres de infecção ativa pelos betaherpesvírus após o transplante, indicando que muitos pacientes são infectados de forma sequencial e não concomitante (**Griffths et al., 1999**). No estudo detectou-se a infecção ativa para HHV-5 em (62,26%) pacientes acompanhados, sendo que destes 22/33 (66,66%) tiveram provável doença por HHV-5, demonstrando a importância dessa doença no pós-operatório do transplante. Foi demonstrado que mesmo mediante à estratégias utilizadas para a prevenção da doença, os dados obtidos indicam a elevada incidência de provável doença causada por HHV-5 com impacto clínico nesse grupo de transplantados.

Nesse grupo de pacientes que fizeram parte do estudo não ocorreu nenhum caso de HHV-5 disseminado.

Os dados obtidos e os inúmeros estudos sobre a detecção e tratamento destes Betaherpesvírus em pacientes submetidos ao transplante, demonstram a importância do monitoramento e acompanhamento, com avaliação do impacto clínico em nosso meio.

Em relação ao HHV-6 investigações futuras devem ser realizadas em diferentes grupos de transplantados de órgãos, à fim de se verificar a importância do impacto clínico decorrente da infecção ativa por HHV-6 e HHV-7.

Além da antigenemia, seria interessante também a realização da PCR em Tempo Real que é uma técnica quantitativa e qualitativa que detecta a carga viral **(Sashihara et al., 2002)**

Vale ressaltar, portanto, que o impacto clínico observado, é de extrema importância e esses dados não devem ser ignorados pela equipe médica que acompanha o paciente, já que irão influenciar significativamente no prognóstico dos mesmos. Quanto ao HHV-7 ainda está pouco esclarecido neste estudo, mas dados obtidos da literatura sugerem que ele possa estar correlacionado com grande impacto juntamente com os dois outros herpesvirus estudados **(Lautenschlager, 2002; Lautenschlager, 2006)**.

7- CONCLUSÃO

Monitorizou-se prospectivamente pacientes submetidos à transplante de fígado em relação a infecção ativa por HHV-5, HHV-6 e HHV-7, utilizando as técnicas de Antigenemia e Nested-PCR

Padronizou-se as duas partes da técnica de antigenemia para HHV-6 e a primeira parte da antigenemia para HHV-7.

Verificou-se a importância do acompanhamento dos receptores de fígado em relação à infecção ativa pós transplante

Verificou-se um número elevado de pacientes com infecção ativa para HHV-5, seguido do HHV-6 e HHV-7, esta co-infecção pode estar provavelmente associada à um maior risco de rejeição do implante.

Deve-se ter atenção à estes vírus no acompanhamento pós transplante para o melhor entendimento dos aspectos da co-infecção e impacto clínico.

Embora o HHV-7 esteja ainda pouco esclarecido neste estudo, porém há hipóteses de que possa estar correlacionado com HHV-5 e HHV-6 causando impacto clínico indireto, inclusive manifestações clínicas neurológicas e encefalites nos transplantados hepáticos.

É necessário a implantação de novas metodologias para detecção e monitorização da infecção ativa para HHV-6 e HHV-7 em pacientes transplantados hepáticos, para confirmar com dados estatisticamente significantes sobre o impacto clínico epidemiológico da infecção nesse grupo de pacientes.

A utilização da Antigenemia para a detecção do HHV-6 e HHV-7 deve contribuir para uma melhora do entendimento da inter-relação destes pacientes entre os vírus.

Vale ressaltar, portanto que, os dados obtidos nesse estudo, são de extrema importância, a detecção precoce da infecção ativa por HHV-5 previne a equipe médica do Hospital das Clínicas da Unicamp, à uma intervenção terapêutica precoce, evitando em muitos casos a progressão para as doenças associadas à esse agente, contribuindo para aumentar as chances do sucesso do transplante.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Haq NM, Asmar BI. Human herpesvirus 6 (HHV6) infection. Indian Pediatr 2004; 71(1): 89-96.

Ablashi DV, Balachandran N, Josephs SF, Hung CL, Krueger GR, Kramarsky B, Salahuddin SZ, Gallo RC. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. Virology 1991; 184(2):545-52.

Ablashi DV, Handy M, Bernbaum J, Chatlynne LG, Lapps W, Kramarsky B, Berneman ZN, Komaroff AL, Whitman JE. Propagation and characterization of human herpesvirus-7 (HHV-7) isolates in a continuous T-lymphoblastoid cell line (SupT1). J Virol Methods 1998; 73(2):123-40.

Ablashi DV, Josephs SF, Buchbinder K, et al. Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). J virol Meth 1988; 21:29-48.

Alford CA, Britt WJ. Cytomegalovirus In: Fields BN, Knipe DM, Virology 2ed. New York. Raven Press: 1990. 1981-2010.

Aquino VH, Figueiredo LTM. Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients diagnosed by nested-PCR. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2001; 34:193-101.

Balfour HH Jr. Management of cytomegalovirus disease with antiviral drugs. Rev Infect Dis 1990; 12 Suppl 7:S849-60.

Black JB, Schwarz TF, Patton JL, Kite-Powell K, Pellett PE, Wiersbitzky S, Bruns R, Muller C, Jager G, Stewart JA. Evaluation of immunoassays for detection of antibodies to human herpesvirus 7. Clin Diagn Lab Immunol 1996; 3(1):79-83.

Boeckh M, Bowden RA, Goodrich JM, Pettinger M, Meyers JD. Cytomegalovirus Antigen Detection in Peripheral Blood Leukocytes After allogeneic marrow Transplantation. Blood 1992; 80(5): 1358-1364.

Boeckh M, Woogerd PM, Stevens-Ayers T, Ray CG, Bowden RA. Factors influencing detection of quantitative cytomegalovirus antigenemia. J Clin Microbiol 1994; 32(3): 832-834.

Boeckh WM, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clinical Microbiology Review* 1998; 11(3): 533-554.

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

Boeckh M, Riddell SR, Cunningham T, 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* 88 (suppl. 1): 302a 1996b.

Braun DK, Dominguez G, and PELLETT PE. Human Herpesvirus 6. *Clin Microbiol Reviews* 1997; 10:521-567.

Bresnahan WA, Shenk T. A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science* 2000; 288(5475):2373-2376.

Brown HL, Abernathy MP. Cytomegalovirus Infections. *Seminars in Perinatology* 1998; 22(4):260-266.

Brugeman CA. Cytomegalovirus and latency: an overview. *Archiv B Cell Pathology* 1993; 64:325-333.

Bruggeman CA, Marjorie HJ, Nelissen-Vrancken G. Cytomegalovirus and atherogenesis. *Antiviral Res* 1999; 43(3): 135-144.

Brytting M, Sundqvist VA, Stalhandske P, Linde A, Wahren B. Cytomegalovirus DNA detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. *J Virol Methods* 1991; 32(2-3):127-38.

Camargo LFA, Granato C, Fiança SVH, Tomyana HT, Cobo, E, Ajzen H, Pestana JOM. Infecção pelo citomegalovirus em pacientes submetidos a transplante renal: Estudo de 20 casos. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 1996; 18(2):130-136.

Campadelli-Fiume G, Mirandola P, Menotti L. Human herpesvirus 6: An emerging pathogen. *Emerg Infect Dis* 1999; 5(3):353-66.

Capulong MG, Mendoza M, Chavez J. Cytomegalovirus pneumonia in renal transplant patients. *Transplant Proc* 1998; 30(7):3151-3

Chatlynne LG, Ablashi DV. Seroepidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV). *Semin Cancer Biol* 1999; 9(3):175-85.

Chou S. Newer Methods for Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. *Rev Infect Dis* 1990; 12(7): 727-735.

Clark DA, Griffiths PD. Review Human Herpesvírus 6: relevance of infection in the immunocompromised host. *British Journal of Hematology*, 2003; 3:384-120.

Colimon R, Michelson S. Human Cytomegalovirus: pathology, diagnosis, treatment. *Adv Nephrol* 1990; 19:333-356.

Cope AV, Sabin C, Burroughs A, Rolles K, Griffiths PD, Emery VC. Interrelationships among quantity of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in blood, donor-recipient serostatus, and administration of methylprednisolone as risk factors for HCMV disease following liver transplantation. *J Infect Dis* 1997; 176(6):1484-90.

Costa FF, Costa SCB. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): princípios e aplicações clínicas. *Rev Brás Reumatol* 1992; 32:142-146.

Costa SBC. Infecção por citomegalovírus (HCMV); Epidemiologias, diagnóstico e tratamento. *Rev Bras Clín Terap* 1999; 25(1):18-28.

Crumpacker CS. Ganciclovir. *N Engl J Med* 1996; 335(10):721-9.

Cuende JI, Ruiz J, Civeira MP, Prieto J. High prevalence of HHV-6 DNA in peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals detected by nested-PCR. *J Med Virol* 1994; 43(2):115-118.

Dankner WM, McCutchan JA, Richman DD, Hirata K, Spector SA. Localization of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by in situ hybridization. *J Infect Dis* 1990; 161(1):31-6.

Deborska D, Durlik M, Sadowska A, Nowacka-Cieciura E, Pazik J, Lewandowski Z, Chmura A, Galazka Z, Paczek L, Lao M. Human herpesvirus-6 in renal transplant recipients: potential risk factors for the development of human herpesvirus-6 seroconversion. *Transplant Proc* 2003; 35(6): 2199-201.

Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, et al. 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, Francois B, Venot C, Tracard I, Gastinne H, Denis F, Vignon P. Reactivation of human herpesvirus type 6 in multiple organ failure syndrome. *Clin Infect Dis* 2001; 32(2): 197-203.

Dewhurst S, Skrinicosky D, van Loon N. Human herpesvirus 7. *Expert Rev Mol Med* 1997; 18:1997.

Dockrell DH, Mendez JC, Jones M, Harmsen WS, Ilstrup DM, Smith TF, Wiesner RH, Krom RA, Paya CV. Human herpesvirus 6 seronegativity before transplantation predicts the occurrence of fungal infection in liver transplant recipients. *Transplantation* 1999; 67(3): 399-403.

Drago F, Aragone MG, Lugani C, Rebora A. Cytomegalovirus infection in normal and immunocompromised humans. *Dermatology* 2000; 200:189-195.

Drew WL. Diagnosis of cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 1988; 10 Suppl 3:S468-476.

Ehrnst A. The clinical relevance of different laboratory tests in CMV diagnosis. *Scand J Infect Dis Suppl* 1996; 100:64-71.

Evans MJ, Edwards-Spring Y, Myers J, Wendt A, Povinelli D, Amsterdam D, Rittenhouse-Diakun K, Armstrong D, Murray BM, Greenberg SJ, Riepenhoff-Talty M. Polymerase chain reaction assays for the detection of cytomegalovirus in organ and bone marrow transplant recipients. *Immunol Invest* 1997; 26(1-2):209-29.

Feldstein AE, Razonable RR, Boyce TG, Freese DK, El-Youssef M, Perrault J, Paya CV, Ishitani MB. Prevalence and clinical significance of human herpesviruses 6 and 7 active infection in pediatric liver transplant patients. *Pediatr Transplant* 2003; 7(2):125-9.

Flamand L, Gosselin J, Stefanescu J, 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.

Fox JD, Brink NS, Zuckerman MA, Neild P, Gazzard BG, Tedder RS, Miller RF. Detection of herpesvirus DNA by nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus-infected persons with neurologic disease: a prospective evaluation. *J Infect Dis* 1995; 172(4):1087-90.

Freitas RB, Freitas MR, Oliveira CS, Linhares AC. Human herpesvirus-7 as a cause of exanthematous illnesses in Belem, Para, Brazil. *Rev Inst Med Trop* 2004; 46(3):139-43.

Freitas RB, Linhares A. Prevalence of hhv-6 antibody in the population of Belém, Pará, northern Brazil. *Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Higiene* 1997; 91: 538-540.

Gane E, Saliva f, Valdecasas GIC, O'grady J, Pescovitz MD, Lyman S, Robinson CA. Randomized trial of efficacy and safety of oral ganciclovir the prevention of cytomegalovirus diseases in liver transplantation recipients. *Lancet* 1997; 350: 1729-1733.

Gerna G, Zavattoni M, Percivalle E, Zella D, Torsellini M, Revello MG. Diagnosis of human cytomegalovirus infections in the immunocompromised host. *Clin Diagn Virol* 1996; 5(2-3):181-6.

Gerna G, Zipeto D, Percivalle E, Parea M, Revello MG, Maccario R, Peri G, Milanesi. Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients. *J Infect Dis* 1992; 166(6): 1236-1244.

Gondo H, Minematsu T, Harada M, Akashi K, Hayashi S, Taniguchi S, Yamasaki K, Shibuya T, Takamatsu Y, Teshima T, et al. Cytomegalovirus (CMV) antigenaemia for rapid diagnosis and monitoring of CMV associated disease after bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1994; 86(1):130-137.

Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA, Du Mond C, Cays M, Ebeling DF, Buhles WC, DeArmond B, Meyers JD. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1991; 5,325(23):1601-1607.

Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, Keller BSNC, Schoch BA, Myers JD. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Méd* 118: 173-178, 1993.

Griffiths PD, Ait-khaled M, Bearcroft CP, Clark DA, Guaglia A, Davies CE 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.

Griffiths PD, Clark DA, Emery VC. Betaherpesviruses in transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45 T3:29-34.

Grundy JE. Virologic and pathogenetic aspects of cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 1990; 12 Suppl 7:S711-9.

Gupteat M, Diaz-Mitoma F, Feber J, Shaw L, Forget C, Filler G. Tissue HHV6 and HHV7 determination in pediatric solid organ recipients – a pilot study. **Pediatric Transplantation**. 2003. 7: 458-463.

Hara S, Kimura H, Hoshino Y, Tanaka N, Nishikawa K, Ihira M, Yoshikawa T, Morishima T. Detection of herpesvirus DNA in serum of immunocompetent children. **Microbiol.Immunol**. 2002. 46(3): 177-180.

Härma M, Höckerstedt K, Lautenschlager L. HHV-6 and acute liver failure. *Transplantation* 2003; 76: 536-539.

Hernando S, Folgueira L, Lumberasc C, Juan San R, Maldonado S, Prieto C, Babiano MJ, Dejgado J, Andrés A, Moreno E, Aguado JM, Otero JR. Comparison of citomegalovirus viral load measure by real-time PCR with pp65 antigenemia for the diagnosis of cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients. **Transplantation Proceedings**. 2005; 37: 4094-4096.

Hibbert PL, Snyderman DR. Cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Infectious Diseases Clinics of North America* 1995; 863-877.

Ho M. Cytomegalovirus: Biology and Infection. Plen Publis Corp. 1991; 1-440.

Ho, M. Epidemiology of Citomegalovirus Infections. *Rev Infect Dis* 1990; 12 (Suppl 7): 701-710.

Hoppe L, Bressane R, Lago LS, Schiavo FL, Marroni CA, Keiserman DR, Brandão ABM, Junior AMF, Cassal AP, Zanotelli ML, Castisani GPC. Risk factors associated with cytomegalovirus-positive antigenemia in orthotopic liver transplant patients. **Transplantation Proceedings**. 2004. 36: 961-963.

Humar A, Malkan G, Moussa G, Greig P, Levy G, Mazzulli T. Human herpesvirus-6 is associated with cytomegalovirus reactivation in liver transplant recipients. *J Infect Dis*. 2000; 181(4):1450-3.

Humar A, Kumar D, Caliendo AM, Moussa G, Ashi-Sulaiman A, Levy G, Mazzulli T. *Transplantation* 2002; 599:604-73

Hunter K, Stagno S, Capps E, Smith RJ. Prenatal screening of pregnant women for infections caused by cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, herpesvirus, rubella, and *Toxoplasma gondii*. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 145(3):269-73.

Ihira M, Yoshikawa T, Suzuki K, et al. – Correlation between human herpesvirus 6 and 7 infections after living related liver transplantation. **Microbiol. Immunol.**, 45(3):225-232, 2001.

Jacobs F, Knoop C, Brancart F, Gilot P, Melot C, Byl B, Delforge ML, Estenne M, Liesnard C; Brussels Heart and Lung Transplantation Group. Human herpesvirus-6 infection after lung and heart-lung transplantation: a prospective longitudinal study. *Transplantation* 2003; 75(12):1996-2001.

Knowles WA, Gardner SD. High prevalence of antibody to human herpesvirus 6 and seroconversion associated with rash in two infants. *Lancet* 1988; 2:912-913.

Koch S, Solana R, Dela Rosa O, Pawelec G. Human cytomegalovirus infection and T cell immunosuppression: a mini review. *Mech Ageing Dev* 2006; 127(6):538-43.

Krom RAF, Gish CH, Houthoff HJ et al. Orthotopic liver transplantation in Groningen, the Netherlands (1979-1983). *Hepatology* 1984; 4(suppl):61-5.

Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 2003; 98(3):269-97.

Lautenschlager I, Halme L, Hockerstedt K, Krogerus L, Taskinen E. Cytomegalovirus infection of the liver transplant: virological, histological, immunological, and clinical observations. *Transpl Infect Dis* 2006; 8(1):21-30.

Lautenschlager I, Linnavuori K, Lappalainen M, Suni J, Hockerstedt K. HHV-6 reactivation is often associated with HCMV infection in liver transplant patients. *Transpl Int* 2000; 13 Suppl 1:351-3.

Lautenschlager J, Lappalainen M, Linnavuori K, Suni J, Hockerstedt K. CMV infection is usually associated with concurrent HHV-6 and HHV-7 antigenemia in liver transplant patients. *J Clin Virol* 2002; 25:57-61.

Lautenschlager J, Linnavuori K, Hockerstedt K. human Herpesvirus-6 Antigenemia after Liver Transplantation. *Transplantation* 2000; 69:2561-2566.

Leach CT, Pollock BH, McClain KL, Parmley RT, Murphy SB, Jenson HB. HHV-6 and CMV infections in children with human immunodeficiency virus infection and cancer. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:125-132.

- Leen DB, Lieve N, Erick DC. Clinical Microbiology. Reviews 2005; 217:245-18
- Levy J. A Tree new human herpesviruses (HHV-6, HHV-7 and HHV-8). The Lancet 1997; 349: 558-562.
- Lassener D, Geiessler F, Bosse S, Hofmann J, Witzigmann H, Remke H, Hauss J, Wagner O. Diagnosis and monitoring of acute cytomegalovirus infection in peripheral blood of transplant recipients by nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (PT-PCR). Transpl.Int. 2000. 13 [Suppl1]: S366-S371
- Ljungman P & Einsele H. Cytomegalovirus infection. Curr Opin Hematol 1994; 1(6):418-22.
- Ljungman P & Plotkin SA. Workshop on CMV Disease Clinical severity Scores, and syndromes Scand. J Infect Dis 1995; (Suppl.)99: 87-89.
- Lo CY, Ho KN, Yuen KY, Lui SL, Li FK, Chan TM, Lo WK, Cheng IK. 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(4):286-93.
- Maya TC, Azulay DR. Infecção pelo Citomegalovírus. In: Lupi O, Silva AS, Pereira JR, AC. – Herpes - Clínica, Diagnóstico e Tratamento. Medsi Editora Médica e Científica Ltda; 2000.Cap. 8. P.135-156,
- Mendelson E, Aboudy Y, Smetana Z, Tepperberg M, Grossman Z. Laboratory assessment and diagnosis of congenital viral infections: Rubella, cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), herpes simplex virus (HSV), parvovirus B19 and human immunodeficiency virus (HIV). Reproductive Toxicology 2006. 21: 350-382.
- Mendez JC, Dockrell MJ, Espy MJ, Smith TF, Wilson JÁ, Harmsen WS, et al. Human - Herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients. The J Infect Dis 2001; 183:179-84.

Miller CS, Avdiushko SA, Kryscio RJ, Danaher RJ, Jacob RJ. Effect of prophylactic valacyclovir on the presence of Human Herpesvirus DNA in saliva of healthy individuals after dental treatment. **Journal of Clinical Microbiology**. 2005. 5: 2173-2180.

Mocarski ES Jr, Abenes GB, Manning WC, Sambucetti LC, Cherrington JM. Molecular genetic analysis of cytomegalovirus gene regulation in growth, persistence and latency. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 154:47-74.

Murray BM. Management of Cytomegalovirus infection in Solid Organ Transplant Recipients. *Imm Invest* 1997; 26:243-255.

Myers JB, Amsterdam D. The laboratory diagnosis of Cytomegalovirus infections. *Immunol Invest* 1997; 26 (3):383-394.

Niubo J, Perez JL, Martinez-Lacasa JT, Garcia A, Roca J, Fabregat J, Gil-Vernet S, Martin R. Association of quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 24(1):19-24.

Olive DM, al Mufti S, Simsek M, Fayez H, al Nakib W. Direct detection of human cytomegalovirus in urine specimens from renal transplant patients following polymerase chain reaction amplification. *J Med Virol* 1989; 29(4):232-7.

Okada K, Ueda K, Kusuhara K, et al. Exanthema subitum and human herpesvirus 6 infection: clinical observations in fifty-seven cases. *Pediat. infect Dis J* 1993; 12:204-208.

Paya CV. Prevention of fungal infection in transplantation.

Revista: *Transpl Infect Dis* .Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society 2002; 46:51-4

Pannuti CS, Citoegalia. In: Ferreira AW, Ávila SLM. Eds. Diagnóstico Laboratorial das principais doenças Infeciosas e Auto-imunes. 2ªed, Guanabara Koogan; 2001.cap 5, p.68-73.

Pannuti CS, Vilas B, Neto LSVA, Ângelo MJO, Sabbada E, Detecção de anticorpos IgM nas interações primárias e secundárias pelo citomegalovirus em pacientes submetidos a transplante renal. Ver Inst Méd Trop 1987; 29:317-322.

Pannutti CS infecção por cmv. Revisão e ensaios pediat 1984; 6: 144-153.

Pasca A S, Essa S, Voevodin A, El-Shazly A, Kazak H, Nampoory M.R.N Correlation between CMV genotypes, multiple infections with herpesvíruses (HHV-6,7) and development of CMV disease in kidney recipients in Kuwait. FEMS – Immunol and Méd Microbiol, 35: 125-130, 2003.

Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. Clin Microbiol Rev 1997; 10(1): 86-124.

Pichlmayr R, Brölsch CH, Wonigeit K. Experiences with liver transplantation in Hannover. Hepatology 1984; 4(suppl): 56-60.

Pouteil-Noble C, Ecochard R, Landrison G, Donia-Maged A, Tardy JC, Bosshard S, Colon S, Betuel H, Aymard M, Touraine JL. Cytomegalovirus infection an etiological factor for rejection? A prospective study in 242 renal transplant patients. Transplantation 1993; 55(4):851-7.

Pozo F, Tenorio A. Detecção and typing of lymphotropic herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. J of Virol Methods 1999; 79:9-19.

Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from living donors. Lancet 1989; 2: 497.

Raia S, Pinto I, Lopes JD, et al. Transplante de fígado. (Monografia apresentada à Academia Nacional de Medicina.) Rio de Janeiro, 1969.

Ratnamohan VM, Chapman J, Howse H, Bovington K, Robertson P, Byth K, et al. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6 both cause disease renal transplantation. Transplantation 1998; 66(7): 877-882.

Razonable RR, Brown RA, Wilson J, et al. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation* 2002; 73: 968-73.

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

Reynolds DW, Stagno S, Alford CA. Laboratory Diagnosis of Cytomegalovirus Infections. In: Lennette EH, Schmidt NJ. (eds). *Diagnosis Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*, 5^aed, New York: American Public Health Association Inc; 1979. p.399-439.

Ringe B. *Am J Gastroenterol* (The american journal of gastroenterology. 1994; 18:26-89.

Roberts TC, Buller RS, Gaudreault-Keener M, Sternhell KE, Garlock K, Singer GG, Brennan DC, Storch GA. 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): 2224-2228.

Rogers J, Rohal S, Carrigan DR, Kusne S, Knox KK, Gayowski T. et al.,. Human herpesvirus-6 in liver transplant recipients: role in pathogenesis of fungal infections, neurologic complications, and outcome. *Transplantation* 2000; 2566:2573-69(12)

Roitt I, Brostoff J, Male D. "Técnicas Imunológicas" *Imunologia*: 1^aed. Bras., editora Manole LTDA; 1999; Cap: 29. 381-387.

Rolles K, Williams R, Neuberger J, Calne R. The Cambridge and King's College Hospital experience of liver transplantation. *Hepatology* 1984; 1968-1983. 4(1 Suppl):50S-55S.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HÁ, & Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354.

Santos RLB. Propriedades Gerais dos Herpesvírus.In: Lupi A, Silva AS, Pereira JR, AC. - Herpes Clínica, Diagnóstico e Tratamento, 1ª edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda; 2000. cap10, p.79-189.

Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, Taniguchi T, Fukui T, Kasuga N, Aono T, Sako M, Hara J, Yamanishi K, Okada S. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. Blood 2002; 100(6):2005-11

Schmidt GM, Horak DA, Niland JC, Duncan SR, Forman SJ, Zaia JA. A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplants; The City of Hope-Stanford-Syntex CMV Study Group. N Engl J Med 1991; 324(15):1005-11.

Shen CY, Chang BL, Chang SF, Yang SL, Tseng SL, Chen CY, Wu CW. Molecular epidemiology of cytomegalovirus infection in kindergarten children. J Med Virol 1996; 48(1): 33-37.

Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, et al. Detection of Cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with Human Immunodeficiency Virus. J Infect Dis 1988; 158:1185-1192.

Silva AG. Propriedades Gerais dos Herpesvírus.In: Lupi A, Silva AS, Pereira JR, AC. Herpes Clínica, Diagnóstico e Tratamento: 1ª edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda; 2000. cap1, p.1-13.

Singh N, Paterson D. ENCEPHALITIS CAUSED BY HUMAN HERPESVIRUS-6 IN TRANSPLANT RECIPIENTS: Relevance of a Novel Neurotropic Virus. Transplantation 2000; 69(12): 2474-79.

Singh N, Carrigan DR. Human Herpesvirus-6 in transplantation: Emerging Pathogen. Annals of Internal Medicine 1996; 124:1065-1071.

Smith IL, Cherrington JM, Jiles RE, Fuller MD, Freeman WR, Spector SA. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis*. 1997; 176(1):69-77.

Spector D, Purves F, Roizman B. Mutational analysis of the promoter region of the alpha 27 gene of herpes simplex virus 1 within the context of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(14):5268-72.

Starzl TE, Klintmalm GBG, Porter KA, Iwatsuki S, Schroter GP. Liver transplantation with use of cyclosporin-A and prednisone. *N Engl J Med* 1981; 305: 266-9.

Stinski MF. Cytomegalovirus and Its Replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. *Virology*: 2º ed. New York, Raven Press, Ltda; 1990. 1959-1980.

Straus SE. Introduction to Herpesviridae. In: Mandell GL, Douglas JRRG, Benett JE. *Principles and practice of infections diseases*. Churchill Livinstone: 1990; 3ª ed. New York, 1139-44.

Szczepura A, Westmoreland A, Westmoreland D, Vinogradova Y, Fox J, Clarck M. Evaluation of techniques in prediction and diagnosis of cytomegalovirus disease in immunocompromised patients. **Health Technology Assessment**. 2006. Vol 10: N° 10.

Suassuna JHR, Machado RD. Diagnóstico das infecções por citomegalovirus (CMV) em pacientes com deficiência imunológica. *Rev Assoc Med Brasil* 1992; 38: 33-47.

Suassuna JHR, Leite LL, Vilela LH. Prevalence of cytomegalovirus infection in different patient groups of an urban university in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1995; 28:105-108.

Sutherland S, Bracken P, Wreghitt TG, O'Grady J, Calne RY, Williams R. Donated organ as a source of cytomegalovirus in orthotopic liver transplantation. *J Med Virol* 1992; 37(3):170-3.

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):1-5.

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.

Taya K, Terao T, Tanaka T, Sawauchi S, Numoto RT, Murakami S, Nishiwaki K, Hashimoto T, Abe T. Spontaneous regression of primary central nervous system lymphoma: a case report. *No Shinkei Geka* 2004; 32(6):637-42.

The TH, Van Der Bij W, Van Der Berg AP, Van Der Gienssen M, Weits J, Sprenger HG, Van Son WJ. Cytomegalovirus Antigenemia. *Rev Infect Dis* 1990; 12(7):737-744.

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 leucocytes. A Review of Antigenemia assay and Polymerase Chain Reaction. *Transplantation* 1992; 54: 193-198.

Thomasini RL, Sampaio AM, Bonon SH, Boin IFFS, Leonardi LS, Leonardi I, Costa SC. Detection and Monitoring of Human Herpesvirus 7 in adult Liver Transplant Patients; Impacto on Clinical Course and Association With Cytomegalovirus. *Transplantation proceedings* 2007- in press

Tong CYW, Bakran A, Williams H, Cheung CY, Peiris JSM, Association of human herpesvirus 7 with CMV disease in renal transplant recipients. *Transplant* 2000; 70(1):213-216.

Van den Berg AP, Klompaker IJ, Haagsma EB, Scholten-Sampson A, Bijleveld CM, Schirm J, Van der Giessen M, Slooff MJ, The TH. Antigenemia in the diagnosis and monitoring of active cytomegalovirus infection after liver transplantation. *J Infect Dis* 1991; 64(2):265-270.

Van der Bij W, Torensma R, Van Son WJ, Tegzess AM, The TH. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. *J Med Virol* 1988; 25:179-188.

Ward KN, Andrews NJ, Verity CM, Miller E, Ross EM. Human herpesviruses-6 and -7 each cause significant neurological morbidity in Britain and Ireland. *Arch Dis Child* 2005; 90(6): 619-23.

Weller TH, Hanshaw JB. Virologic and clinical observations on cytomegalic inclusion disease. *N Engl J Med* 1962; 14,266:1233-1244.

Weller TH. Cytomegaloviruses: the difficult years. *J Infect Dis* 1970; 122,6: 532-539.

Weller TH. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. I. *N Engl J Med* 1971; 22,285(4):203-14.

Xu W, Sundqvist VA, Brytting M, Linde A. Diagnosis of cytomegalovirus infections using polymerase chain reaction, virus isolation and serology. *Scand J Infect Dis* 1993; 25(3):311-6.

Winston DJ, Ho WG, Bartoni K, Du Mond C, Ebeling DF, Buhles WC, Champlin RE. Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. Results of a placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Intern Med* 1993; 118(3):179-84.

Yoshikawa T, Human Herpesvirus-6 and -7 in transplantation. *Pediatric Transplantation* 2003; 7:11-7

9- APÊNDICES

TERMO CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____, aceito colaborar com o estudo **VIGILÂNCIA LABORATORIAL DA INFECCÃO ATIVA POR HHV-5, HHV-6 E HHV-7 EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE FÍGADO**, que será realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Correlação clínica do HHV-5, HHV-6 e HHV-7 em pacientes transplantados hepáticos), para pesquisa de citomegalovírus, HHV-6 e HHV-7, por dois diferentes métodos de análises (antigenemia e Nested -PCR). Para isso, sei que colherão uma biópsia do fígado receptor no momento do transplante e 04 a 08 ml do meu sangue, uma vez por semana no primeiro mês, quinzenais nos três meses posteriores após cirurgia e mensais até completar um ano pós-transplante para realização dos referidos exames. Estou ciente de que poderei desistir de participar deste estudo a qualquer hora, e que isto nada irá prejudicar o meu tratamento, e a minha colaboração em muito auxiliará o tratamento de pacientes transplantados hepáticos que vierem também a serem transplantados. Estou ciente que todos os dados colhidos são sigilosos, e que meu nome não será colocado em qualquer publicação.

Campinas, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Paciente

Médico: Nome/CRM: _____

Assinatura: _____

Testemunha: Nome/RG: _____

Assinatura: _____

ESCLARECIMENTO

MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA POR HHV-5, HHV -6 e HHV -7

Após o transplante, os pacientes passam a fazer uso de vários medicamentos que têm a função de evitar a rejeição. Contudo, estes medicamentos têm um efeito imunossupressor, ou seja, eles deixam o indivíduo susceptível a uma série de doenças que anteriormente seriam inofensivas mas que agora podem tornar-se graves e trazer complicações a eles.

Entre estas doenças, estão as infecções virais oportunistas, das quais aquelas que trazem mais riscos aos receptores de transplante são as causadas pelo HHV-5, HHV -6 e HHV- 7. Assim, na realização desta pesquisa estaremos acompanhando os pacientes para o desenvolvimento destas três viroses. Para isto usaremos o sangue dos pacientes para procedimentos laboratoriais utilizando diversos métodos detecção destes vírus, na tentativa de se fazer uma detecção o mais rápido possível de qualquer problema, evitando, desta forma, que eles tragam quaisquer complicações.

Médico responsável: Ilka Maria de Fátima Boin

Pesquisadora responsável: Ana Maria Sampaio 3521.7096

Comitê de Ética: Telefone 37888936 (Marlene)

PADRONIZAÇÃO DA ANTIGENEMIA POR HHV-6

Foi realizado neste estudo a padronização de antigenemia seguindo estudos de *Lautenschlager et al., 2002* do Herpesvírus Humano Tipo 6 (HHV-6), as lâminas utilizadas para a padronização foram as que se apresentavam periodicamente Nested-PCR positiva para HHV-6, e também pacientes que não tiveram Nested-PCR positiva para HHV-6, estes sendo usados como controle negativo e positivo. No decorrer da padronização houve algumas modificações que foram necessárias devido à descontinuação de um dos reagentes.

Foram realizadas reações de antigenemia com os respectivos monoclonais e conjugados descritos na técnica para HHV-6, as quais se encontravam armazenadas em freezer à menos 80°C.

Inicialmente para a padronização utilizou-se lâminas, sendo 2 amostras de um paciente que apresentava Nested-PCR negativa para HHV-6. Para o controle positivo utilizou-se amostras de um paciente que apresentava consecutivamente PCR positivo para HHV-6 (paciente 16) . Foi realizado posteriormente outros testes de amostras de outros pacientes (6,8) que apresentavam PCR positiva para HHV-6.

Até o presente momento foi obtido êxito na padronização, pois os dados da tabela 16 (Apêndice 4) confirmam os resultados de outros testes realizados anteriormente nestes pacientes.

**FOTO DA LÂMINA DE ANTIGENEMIA PARA O HHV-6 POSITIVA
PADRONIZADA NESTE ESTUDO**

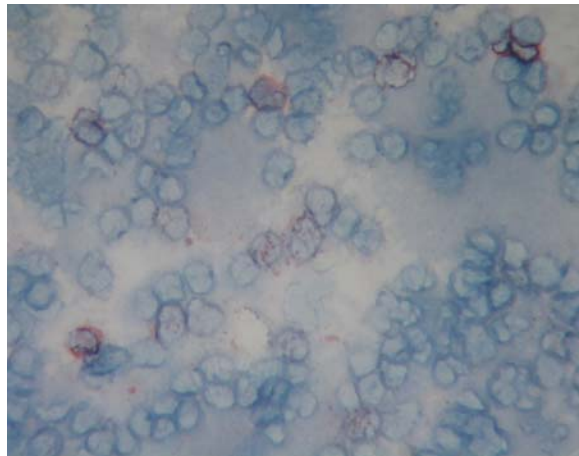


Figura 9- Ilustração da lâmina de Antigenemia para o HHV-6 padronizada neste estudo
(Linfócitos HHV-6 positivo – apresentando em coloração avermelhada)

TABELA DE RESULTADOS OBTIDOS NA PADRONIZAÇÃO DA ANTIGENEMIA PARA O HHV-6

Tabela 15- Resultados obtidos na padronização da antigenemia para HHV-6 e demais resultados para HCMV, HHV-6 e HHV-7.

Paciente	Dia pós-TX	AGM HHV-5	PCR HHV-5	AGM HHV-6	PCR HHV-6	PCR HHV-7
<u>3(SR)</u>	165	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	POSITIVO
<u>3(SR)</u>	46	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	POSITIVO
<u>6(FJC)</u>	33	SR	POSITIVO	POSITIVO +9	POSITIVO	SR
<u>6(FJC)</u>	46	Negativo	POSITIVO	POSITIVO +9	POSITIVO	Negativo
<u>6(FJC)</u>	67	Negativo	Negativo	POSITIVO +23	Negativo	Negativo
<u>6(FJC)</u>	74	Negativo	Negativo	POSITIVO +14	Negativo	POSITIVO
<u>8(LAC)</u>	0	SR	POSITIVO	POSITIVO +5	POSITIVO	Negativo
<u>8(LAC)</u>	10	SR	Negativo	POSITIVO +8	POSITIVO	SR
<u>8(LAC)</u>	24	SR	POSITIVO	POSITIVO +6	SR	Negativo
<u>8(LAC)</u>	52	SR	POSITIVO	POSITIVO +38	POSITIVO	Negativo
<u>8(LAC)</u>	61	Negativo	Negativo	POSITIVO +17	Negativo	Negativo
<u>8(LAC)</u>	79	SR	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<u>8(LAC)</u>	88	Negativo	Negativo	POSITIVO +26	Negativo	Negativo
<u>8(LAC)</u>	115	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<u>8(LAC)</u>	192	Negativo	Negativo	POSITIVO +9	SR	Negativo
<u>8(LAC)</u>	255	Negativo	SR	POSITIVO +4	SR	SR
<u>16(AC)</u>	7	Negativo	Negativo	POSITIVO +33	POSITIVO	Negativo
<u>16(AC)</u>	28	Negativo	Negativo	POSITIVO +6	POSITIVO	Negativo
<u>16(AC)</u>	36	POSITIVO +13	Negativo	POSITIVO +14	POSITIVO	Negativo
<u>16(AC)</u>	49	Negativo	POSITIVO	POSITIVO +2	POSITIVO	Negativo
<u>16(AC)</u>	63	Negativo	Negativo	POSITIVO +2	POSITIVO	Negativo
<u>16(AC)</u>	86	Negativo	Negativo	POSITIVO +38	POSITIVO	Negativo
<u>16(AC)</u>	105	Negativo	Negativo	POSITIVO +3	POSITIVO	Negativo
<u>16(AC)</u>	154	Negativo	Negativo	POSITIVO +2	POSITIVO	Negativo
<u>16(AC)</u>	182	Negativo	Negativo	POSITIVO +1	POSITIVO	Negativo

“SR” – Sem resultado

O número sublinhado indica o paciente cuja amostra foi utilizada como controle

Editorial Manager(tm) for Transplantation Proceedings
Manuscript Draft

Manuscript Number: CLIN2500

Title: DETECTION AND MONITORING OF HUMAN HERPESVIRUS 7 IN ADULT LIVER TRANSPLANT
PATIENTS: IMPACT ON CLINICAL COURSE AND ASSOCIATION WITH CYTOMEGALOVIRUS

Article Type: New Clinical Submission

Section/Category:

Keywords: HHV-7; HCMV; Nested-PCR; Liver Transplant; clinical symptoms.

Corresponding Author: Professor Ronaldo Luis Thomasini, graduate

Corresponding Author's Institution: State University of Campinas

First Author: Ronaldo L Thomasini, Professor

Order of Authors: Ronaldo L Thomasini, Professor; Ana M Sampaio, Graduate; Sandra H Bonon, PhD; Ilka
F Boin, PhD; Luiz S Leonardi, PhD; Sandra C Costa, PhD

Manuscript Region of Origin:

Abstract:

* Abstract

We, here in, describe HCMV and HHV-7 detection during the follow-up of twenty-nine adult liver recipients in our transplant unit. For basic immunosuppression, the patients received cyclosporine and symptomatic HCMV infection was treated with ganciclovir. The most prevalent etiology for liver transplantation was hepatitis C and/or alcohol abuse (45% of the patients). The laboratorial monitoring follow-up (until 180 days after transplantation) was carried out by Nested-PCR to HCMV and HHV-7. HCMV DNA was detected in 19/29 of patients (65.5%) and HHV-7 DNA was detected in 14/29 of patients (48.2%). The time-related appearance of the HHV-7 and HCMV DNA differed significantly ($P=0.02$) and their detection was considered independent ($P=0.2$). The results show that few patients remain free of HHV-7 or HCMV after liver transplantation and indicate that most patients infected actively with more than one viruses were infected sequentially and not concurrently. Graft dysfunction, fever, gastrointestinal system abnormalities and interstitial pneumonitis dominated the clinical picture. Thirteen out of 29 patients (44.8%) developed symptomatic HCMV Active infection. The relationship between the detection of HCMV DNA and HCMV disease development was considered as statistically significant ($P=0.0004$). In HCMV free patients no symptoms or significant laboratorial findings could be linked with HHV-7. However, HHV-7 was frequently detected sequentially with HCMV and a interaction with HCMV and/or HHV-6 increasing their pathogenic effects do not be discarded. Further studies should be carried out including HHV-6 to evaluate the relationship for betaherpesviruses group.

DETECTION AND MONITORING OF HUMAN HERPESVIRUS 7 IN ADULT LIVER
TRANSPLANT PATIENTS: IMPACT ON CLINICAL COURSE AND ASSOCIATION
WITH CYTOMEGALOVIRUS

R.L. Thomasini ¹, A.M. Sampaio ¹, S.H.A Bonon ², I.F.S. Boin ³, L.S. Leonardi ³, S.C.B. Costa ³

¹ Department of Pharmacology - State University of Campinas – Sao Paulo -Brazil.

² Department of Clinical Medicine - State University of Campinas – Sao Paulo – Brazil.

³ Liver Transplant Unit - State University of Campinas – Sao Paulo – Brazil.

Correspondence to:

Sandra Cecília Botelho Costa, disciplina de Medicina Interna, Departamento de Clínica Médica,
FCM,Unicamp.13081-970 Campinas,SP, Brazil

Tel : +55-19-3788-7734

Fax : +55-19-3289-4107

E-mail : ronaldo@uniararas.br; costa@fcm.unicamp.br

Introduction

Human Herpesvirus 7 (HHV-7), Human Herpesvirus 6 (HHV-6) and Human Cytomegalovirus (HCMV) are members of the betaherpesvirinae subfamily. HHV-7 was recently discovered by Frenkel et al.(1). HHV-6 and HHV-7 primary infection causes common febrile infectious syndromes of early childhood, known as *exanthem subitum* and *roseola*. HHV-6 primary infection occurs before HHV-7 in majority of cases. HCMV is known as major infectious complications after solid organ transplantation (2).

HHV-6, HHV-7 and HCMV remain latent or at low level of viral replication after primary infection and can reactivate during immunosuppressed states such as following organ

transplantation (3). HHV-6, HHV-7 and HCMV share many properties, suggesting that the factors that control their reactivation or increased viral replication in immunosuppressed patients may be similar (4).

HCMV has been implicated as an important cause of morbidity and mortality in solid organ transplant patients. HHV-6 has been related to graft dysfunction, bone marrow suppression and predisposition to HCMV disease. In liver transplant recipients, HHV-6 and HCMV has been related to clinical consequences including fever, encephalitis, interstitial pneumonitis and bone marrow suppression (5) but the HHV-7 specific clinical syndrome spectrum remains unclear (3,4).

HHV-6 and HCMV detection and patient monitoring are currently carried out by Nested-PCR and/or antigenemia. Several methods and different biological materials have been proposed to detect HHV-7 infection. Nested-PCR using DNA extracted from either serum or plasma detect only HHV-7 active infection (3,5).

HCMV disease can be defined based upon laboratorial and clinical criteria. Active infection associated with clinical specific symptoms suggests HCMV disease (6). HHV-7 disease definition criteria have not yet been described and the HHV-7/HCMV association in liver transplant patients has been occasionally studied.

In Brazil, at the present moment, there are no reports regarding HHV-7 infection in liver transplant patients.

Materials and methods

Twenty-nine adult liver transplant patients (20 males and 9 females), mean age of 47.4 years old (range 18-66), transplanted at the Liver Transplant Unit (University Hospital, State University of Campinas – Sao Paulo – Brazil), between 2000 to 2004, were included in this study. The basic immunosuppression therapy consisted of cyclosporine (0.4 mg/kg/day), methylprednisone (1.0 g

first month, 20 mg 30th day decreasing to 5 mg/month until the 90th day), azathioprine (100mg/day), MMF (100 mg/day), FK (0.1 mg/kg/day).

Aciclovir (200 mg 12/12 hours; for two months) was employed as an antiviral prophylaxis to herpes simplex. HCMV active infection patients, with clinical symptoms, received ganciclovir therapy at a dose of 5 mg/kg/day for 6 weeks. Patient characteristics relating to age, sex, and underlying disease are summarized in Table 1.

The protocol was designed in accordance with the requirements for research involving human subjects in Brazil, and was approved by the Institutional Ethics Committee.

Peripheral blood was obtained from patients at the time of transplantation, weekly in the first month and once a month until the end of the study (180th day). EDTA-treated blood samples were fractionated by dextran sedimentation followed by erythrocyte lysis. The obtained granulocytes were then centrifuged and HCMV pp65-Antigenemia assay was carried out (routine HCMV monitoring in our center but was not object to present study). Serum of each blood sample was separated by centrifugation. The obtained sera were then frozen (-20°C) until the experiment.

HCMV Nested Polymerase Chain Reaction – Peripheral Blood Leukocytes (PBL) remaining from the HCMV antigenemia assay were lysed and the DNA was precipitated by cold ethanol and eluted in 50 µL of Buffer (Tris DTA Borate). This Protocol was previously described by Bonon et al. (7).

Five microliters of DNA extracted of PBL, as described before, were used for the Nested-PCR using reaction mixture containing specific primers to HCMV (HCMV primers; Invitrogen, Sao Paulo, Brazil), using a technique previously described by Shibata et al.(8) and Demmler et al.(9). The amplifications were carried out on a Peltier Thermal Cycler - MJ Research –MA.

HHV-7 Nested Polymerase Chain Reaction – DNA was extracted from 200 µL of serum using phenol-chloroform protocol after treatment with lysis buffer (containing SDS and proteinase K) at 65°C over-night followed by DNA precipitation with cold ethanol. The resulting DNA pellet were eluted in 50 µL of buffer (Tris DTA Borate).

Five microliters of DNA extracted of serum, as described before, were used for the Nested-PCR using a reaction mixture containing specific primers to HHV-7 (HHV-7 primers; Invitrogen, Sao Paulo, Brazil), previously described by Pozo et al.(10) with some modifications. The amplifications were carried out on a Peltier Thermal Cycler - MJ Research –MA.

PCR products analysis - The Nested-PCR product was analyzed after eletrophoresis in agarose gel (Gibco - BRL) in TEB-Buffer (Tris EDTA Borate) stained with ethidium bromide. The amplification of the HCMV genome using referred primers results in a DNA fragment of 159 base pairs and was selected from the MIE region of HCMV-AD169 (specific region).

The HHV-7 genome amplification using referred primers, results in a DNA fragment of 122 base pairs and amplifies only the genome of HHV-7 (U43400,52202-52009). All sequences of primers and PCR products to both viruses were sequenced and submitted to analysis using the Genbank database before initiating this study.

Definitions – HCMV disease was defined when active infection (Antigenemia and/or Nested-PCR) was accompanied by clinical symptoms and HCMV histopathological identification (6). HHV-7 active infection was defined based on Nested-PCR in DNA extracted from serum positive results (3,5). Coinfection was defined when HHV-7 and HCMV were detected at the same time as sampling.

There are not criteria in the literature to define HHV-7 disease but active infection accompanied by clinical symptoms such as fever, encephalitis, interstitial pneumonitis and laboratorial findings (leukopenia and trombocytopenia) were considered. The monitoring of graft function was based on elevation of serum alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transpeptidase and bilirrubins.

Statistical analysis- The comparison of categorical variables was performed using Fisher's exact test and Mann-Withney- U test. A P-value < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

HCMV DNA was detected in 19/29 of patients (65.5%) corresponding to 46/189 positive samples (24.3%), median time to first detection of 50 days (range 0-108). HHV-7 DNA was detected in 14/29 of patients (48.2%) during the monitoring, corresponding to 21/189 positive samples (11.3%), median time to first detection of 24 days (range 0-170). The time-related appearance of the HHV-7 and HCMV DNA differed significantly ($P=0.02$).

Both HHV-7 and HCMV viruses were found in 11/29 patients (37.9%) but only 3 out of 189 positive concurrent samples. HCMV alone was detected in 8/29 patients (27.6%) and HHV-7 alone was detected in 3/29 patients (10.3%). The statistical analysis showed that the detection of HCMV DNA and HHV-7 DNA was independent ($P=0.2$).

Considering only the patients with active infection by both viruses, HHV-7 DNA was detected before HCMV DNA in 6/11 patients and HCMV was detected in 2/11 patients before HHV-7. In three remaining patients, only one sample each was positive for both viruses during the follow-up.

Graft dysfunction, fever, gastrointestinal system abnormalities and interstitial pneumonitis dominated the clinical picture and both HCMV and HHV-7 viruses was temporally compared with of these episodes. A total of 4 deaths occurred before to complete this study (median time of 119 days; range 87-178), three related to acute rejection episode (two associated with HCMV disease and other with hepatitis B recidive) and one death occurred after sepsis.

Thirteen out of 29 patients (44.8%) developed symptomatic HCMV Active infection. Of the patients with no detectable HCMV DNA in their blood, none developed HCMV disease. The relationship between the detection of HCMV DNA and HCMV disease development was considered as statistically significant ($P=0.0004$). In HCMV free patients no symptoms or significant laboratorial findings could be linked with HHV-7.

Discussion

HHV-7 and HCMV DNA were frequently detected in patients after liver transplant (65.5% and 48.2%, respectively). Recently, Ihira et al. (3) and Feldstein et al.(5) suggested that detection of virus DNA in serum or plasma by PCR is a useful marker for HHV-7 active infection. In comparison to other studies, our incidence of the HHV-7 and HCMV active infection results are relatively similar (3,11).

The results described before show that few patients remain free of HHV-7 or HCMV after liver transplantation and indicate that most patients infected actively with more than one viruses were infected sequentially and not concurrently. Active infection by either HHV-7 or HCMV might develop independently of one another.

The results found differ from other studies based on either HHV-7 or HCMV antigenemia, in which HHV-7 and HCMV were detected concurrently (12). In comparison with studies based on PCR techniques, our results were considered in accordance (3,11).

Thirteen out of 19 patients (68.4%) who were positive HCMV Nested-PCR developed symptomatic HCMV active infection. The remaining six patients who were positive HCMV Nested-PCR without symptoms could be explained by high sensitivity of the PCR what could detect lower viral load and were not treated. Studies on sensitivity of the HCMV Nested-PCR showed that five copies of target DNA could be detected (15). However, the statistical analysis showed correlation between positive Nested-PCR and HCMV disease development.

Even considering the low number of patients studied at the present moment, the HHV-7 detection was not directly linked to any symptoms nor significant laboratorial findings. However, HHV-7 was frequently detected sequentially with HCMV and an interaction with HCMV and/or HHV-6 increasing their pathogenic effects do not be discarded. Further studies should be carried out including HHV-6 to evaluate the relationship for betaherpesviruses group in liver transplant patients.

Table**Table 1** - Characteristics of the patients studied.

Characteristic	n= 29
Mean age (years)	47.4 (18 to 66)
Sex (male/female)	20/9
Diagnosis of underlying liver disease	
Hepatitis C	15
Hepatitis B	2
Alcoholic liver disease	3
Hepatitis C and alcohol	2
Cryptogenic cirrhosis	2
Hepatitis B and alcohol	1
Primary biliary cirrhosis	1
Autoimmune hepatitis	1
Primary sclerosing cholangitis	1
Hemochromatosis and alcohol	1

Acknowledgements

This research was supported by FAPESP

References

1. FRENKEL N, SCHIRMER EC, WYATT IS, et al. Isolation of a new herpesvirus from human CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:748-752.
2. TONG CY W, BARKRAN A, WILLIAMS H, et al. Association of human herpesvirus 7 with cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. *Transplantation* 2000;70:213-116.
3. IHIRA M, YOSHIKAWA T, SUZUKI K, et al. Correlation between human herpesvirus 6 and 7 infections after living related liver transplantation. *Microbio. Immunol.* 2001;45(3):225-232.
4. MENDEZ JC, DH DOCKRELL, MJ ESPY, et al. Human β -Herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients. *The journal of Infectious Diseases* 2001;183:179-184.
5. FELDSTEIN AE, RR RAZONABLE, TG BOYCE, et al. Prevalence and clinical significance of human herpesvirus 6 and 7 active infection in pediatric liver transplant patients. *Pediatric Transplantation* 2003;7: 125-129.
6. LJUNGMAN P, GRIFFITHS P, C PAYA Definition of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases* 2002;34:1094-7
7. BONON SHA, MENONI SMF, ROSSI CL, et al. Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. *Journal of Infection*.2005;50(2):130-137
8. SHIBATA D, MARTIN WJ, APPLEMAN MD, et al. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1992;80:1358-1364.
9. DEMMLER GJ, BUFFONE CJ, SCHIMBOR CM, et al. Detection of cytomegalovirus in urine newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *Journal of Infectious Disease* 1988;158:1177-1184.
10. POZO F, TENORIO A Detection and typing of lymphotropic herpesvirus by multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Virology Methods* 1999;79:9-19

11. PD GRIFFITHS, AIT-KHALED M, CP BEARCROFT, et al. Human herpesvirus 6 and 7 as potential pathogens after liver transplant: prospective comparison with the effect of cytomegalovirus. *Journal of Medical Virology* 1999;59:496-501.
12. LAUTENSCHLAGER I, LAPPALAINEN M, LINNAVUORI K, et al. CMV infection is usually associated with concurrent HHV-6 and HHV-7 antinemia in liver transplant patients. *Journal of Clinical Virology* 2002;25: S57-S61.
13. TOKIMATSU, I; TASHIRO,T; NASU, M. – Early diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus pneumonia in patients with adult T-cell leukemia by DNA amplification in serum. *Chest* 107: 1024-1027, 1995.