

CLÁUDIA RAQUEL CANTARELLI COSTA

**DETECÇÃO DA CARGA VIRAL DOS HERPESVIRUS HHV-5
(*CITOMEGALOVIRUS*) E HHV-6 PELA REACÇÃO EM CADEIA
DA POLIMERASE EM TEMPO REAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA
ACOPLADA A NESTED-PCR EM PACIENTES RECEPTORES
DE TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**

CAMPINAS

Unicamp

2009

CLÁUDIA RAQUEL CANTARELLI COSTA

**DETECÇÃO DA CARGA VIRAL DOS HERPESVIRUS HHV-5
(*CITOMEGALOVIRUS*) E HHV-6 PELA REACÇÃO EM CADEIA
DA POLIMERASE EM TEMPO REAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA
ACOPLADA A NESTED-PCR EM PACIENTES RECEPTORES
DE TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Clínica Médica, área de concentração em
Ciências Básicas.

ORIENTADORA: DRA. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

Campinas

Unicamp

2009

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

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

C823d Costa, Cláudia Raquel Cantarelli
Detecção da carga viral dos herpesvirus HHV-5 (citomegalovirus) e HHV-6 pelas técnicas de reação em cadeia da polimerase em tempo real e transcrição reversa acoplada a nested-PCR em pacientes receptores de transplante de células tronco hematopoiéticas / Cláudia Raquel Cantarelli Costa. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

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

1. Citomegalovirus. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Transplante de células-tronco hematopoiéticas. I. Costa, Sandra Cecília Botelho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Detection of herpesvirus HHV-5 (cytomegalovirus) and HHV-6 viral load by real time polymerase chain reaction and reverse transcription nested polymerase chain reaction in hematopoietic stem cell transplantation recipients

Keywords: • Cytomegalovirus
• PCR
• Hematopoietic stem cell transplantation

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Sandra Cecília Botelho Costa
Prof^º. Dr^º. Maria Patelli Juliani Souza
Prof. Dr. Jörg Kobarg
Prof. Dr. Fernando Lopes Gonçales Júnior
Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos

Data da defesa: 31-08-2009

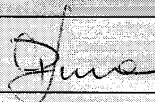
Banca examinadora da tese de Doutorado

Cláudia Raquel Cantarelli Costa

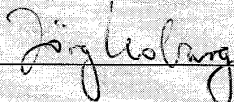
Orientador: Prof^a. Dr^a. Sandra Cecilia Botelho Costa

Membros:

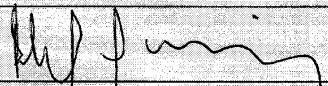
1. Prof^a. Dr^a. Maria Patelli Juliani Souza



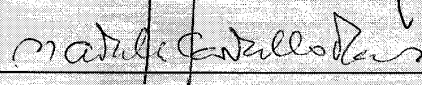
2. Prof. Dr. Jörg Kobarg



3. Prof. Dr. Fernando Lopes Gonçalves Junior



4. Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos



5. Prof^a. Dr^a. Sandra Cecilia Botelho Costa



Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/08/2009

DEDICATÓRIA

*“Dedico este trabalho ao grande amor da minha vida,
Ana Clara, que ainda não existia quando eu o iniciei,
mas tornou-se a principal razão para que eu o concluísse”*

*“Aos meus pais, José e Cleonice, pelo apoio, compreensão,
incentivo e por cuidarem de minha mais rara jóia.
Sem sua ajuda jamais concretizaria este sonho”*

*“Ao meu marido Luciano,
pelo apoio incondicional e paciência”*

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade.”

Carlos Drummond de Andrade

“Eterno, é tudo aquilo que dura uma fração de segundo, mas com tamanha intensidade, que se petrifica, e nenhuma força jamais o resgata....”

Carlos Drummond de Andrade

“O homem não é o único animal que pensa. Entretanto é o único que pensa que não é animal.”

Pascal

O *cytomegalovirus* humano (HCMV) e o herpesvirus humano 6 (HHV-6) são β -herpesvirus com homologia superior a 67% e alta soroprevalência na população adulta. A infecção primária por estes herpesvirus ocorre comumente na infância e é normalmente subclínica, ou pode causar mononucleose (HCMV) ou exantema súbito (HHV-6) sendo resolvidos na maioria dos casos sem complicações. Após a infecção primária os vírus permanecem no hospedeiro por toda vida podendo ser reativado de seu estado de latência em indivíduos adultos imunocomprometidos como os receptores de células tronco hematopoiéticas (TCTH). A reativação ou reinfeção por estes vírus causam serias complicações em pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas como pneumonia intersticial, febre, gastroenterite, mielossupressão, encefalite e doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD). A reativação do HHV-6 após o transplante é associada com o desenvolvimento de infecções oportunistas, doença causada pelo citomegalovírus humano e possíveis episódios de rejeição aguda. Com efetivos tratamentos antivirais disponíveis, um monitoramento adequado destes vírus distinguindo entre latência e reativação é crítico para estes pacientes.

Monitoramos 30 pacientes submetidos à TCTH quanto a infecção ativa por HCMV e HHV-6 pelas técnicas de nested-PCR em soro e células, PCR- em tempo real em soro e células e transcrição reversa acoplada a nestedPCR (RT-*n*PCR). 29 pacientes (96,66%) apresentaram infecção ativa por HCMV sendo 21 pacientes (70%) pela nested-PCR em células, 17 pacientes(56,66%) pela neste-PCR em soro ,23 pacientes(76,67%) pela PCR em tempo real em células,19 pacientes (63,33%) pela PCR em tempo real em soro e 15 pacientes (53,3%) pela RT-*n*PCR. 25pacientes (83,33%) apresentaram infecção ativa por HHV-6, sendo 14 pacientes (46,7%) pela nested-PCR em células, 2 pacientes(6,6%) pela PCR em tempo real em células,23 pacientes (76,67%) %) pela PCR em tempo real em soro e 9 pacientes (30%) pela RT-*n*PCR.

Todos os pacientes que apresentaram infecção ativa por HCMV apresentaram também presença do HHV-6, e 25 pacientes (83,33%) apresentaram co-infecção HCMV/HHV-6, sendo a infecção por HHV-6 precoce em relação ao HCMV. O presente estudo encontrou também associação entre infecção ativa por HCMV e doença do enxerto contra o hospedeiro.

Human cytomegalovirus (HCMV) and human herpesvirus type 6 (HHV-6) are β -herpesvirinae extremely closely related with a homology > 67% with a high seroprevalence in the adult population. Primary infection commonly appears in early childhood and is usually subclinical, or may cause mononucleosis (HCMV) or febrile illness, including exanthema subitum (HHV-6), solving, in the majority of cases, without complications. After primary infection, the viruses persist in the infected individual through life and can be reactivated from their state of latency in immunocompromised hosts. Reactivation or reinfection causes severe clinical diseases in patients who underwent hematopoietic stem cell transplantation, like interstitial pneumonia, fever, gastroenteritis, myelosuppression, encephalitis and graft-versus-host-disease (GVHD). A potential increase in virulence of HHV-6 in the course of a simultaneous CMV reactivation, leading to a great risk of CMV-associated disease.

In this present study, 30 patients who received HSCT were monitoring for active HCMV and HHV-6 infection by Nested PCR in serum and peripheral blood leukocytes (PBL) samples, real time PCR in serum and PBL and RT-*n*PCR. In 29 patients (96,66%) active HCMV infection was detected: 21 patients (70%) by PBL nested-PCR, 17 patients (56,66%) by serum neste-PCR, 23 patients(76,67%) by PBL real-time-PCR,19 patients (63,33%) by serum real-time-PCR and 15 patients (53,3%) by RT-*n*PCR. In 25 patients (83,33%) active HHV-6 infection was detected : 14 patients (46,7%) by PBL nested-PCR, 2 patients(6,6%) by PBL real time -PCR,23 patients (76,67%) by serum real time-PCR and 9 patients (30%) by RT-*n*PCR. In all patients who had active HCMV infection, HHV-6 DNA was detected.

25 patients (83,33) had HCMV/HHV-6 co-infection, and the active HHV-6 infection was detected earlier in the majority of the cases.

Our results showed a correlation between GVHD and active HCMV infection and detection of active HCMV infection by serum nested-PCR and PBL and serum real time-PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS

β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
μl	microlitro
μM	Micromol
$5' \rightarrow 3'$	Sentido da transcrição
A	Base nucleotídica adenina
AA	Anemia Aplástica
AD169	Linhagem de cepa de HCMV isolada em laboratório
AGM	Antigenemia
AIDS ou SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
C	Base nucleotídica citosina
CMV	Citomegalovírus
CPP	Célula Progenitoras periféricas
dATP	Desoxirribonucleotídeo adenina trifosfato
dCTP	Desoxirribonucleotídeo citosina trifosfato
DECH ou GVHD	Doença do enxerto contra hospedeiro ou graft <i>versus</i> host disease
dGTP	Desoxirribonucleotídeo guanina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico ou ADN
DO	Densidade Óptica
dTTP	Desoxirribonucleotídeo timina trifosfato
E	<i>Early</i> (Fase precoce do ciclo de replicação do HCMV)
EA	Antígenos precoces (“Early antigens”)
EBV	Epstein-Barr Virus
EDA	Endoscopia Digestiva Alta

EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay ou Ensaio Imunoenzimático
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
G	Base nucleotídica guanina
g	Gramas
g/l	Gramas por litro
G-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos
GVHD ou DECH	Graft <i>versus</i> host disease ou doença do enxerto contra o hospedeiro
Gy	Gray, unidade de absorção de radiação, equivalente a 100 rads
h	horas
HCMV	Citomegalovírus Humano
HEMOCENTRO	Centro de Hematologia e Hemoterapia
HHV-5	Herpesvírus Humano tipo 5
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HPMPC	([S]-1-[3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl] cytosine) - Cidofovir
IE	<i>Immediately Early</i> (Fase imediatamente precoce do ciclo de replicação do HCMV)
IE	<i>Immediate-Early Antigen</i> (Antígeno Imediatamente Precoce)
IEA	<i>Immediately early antigens</i> (Antígenos imediatamente precoces)
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M

IRL/IRS	Seqüências invertidas repetidas do genoma do HCMV (“Inverted Repeats”)
Kb	Quilobases
kDa	Quilodaltons
Kg	Quilogramas
L	Fase tardia do ciclo de replicação do HCMV
LA	<i>Late antigens</i> (Antígenos Tardios)
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
M	Molar
mg	Miligramas
MIE	<i>Major Immediate-Early Antigen</i> (Principal Antígeno Imediatamente precoce)
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mm³	Milímetro cúbico
MO	Medula Óssea
Nested-PCR ou nPCR	Reação em Cadeia da Polimerase tipo “nested”
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pH	Logaritmo da recíproca da concentração de íons Hidrogênio presentes em uma dada solução
pp65	Proteína matricial de peso molecular 65 Kd do HCMV

RNA	Ácido ribonucléico ou ARN
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro ou ARN mensageiro
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa acoplada a PCR
RT-<i>n</i>PCR	Transcrição reversa acoplada a nested-PCR
RX	Raio-X
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SMD	Síndrome Mielodisplásica
STMO	Serviço de Transplantes de Medula Óssea
T	Base nucleotídica timina
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCTH	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
TGI	Trato Gastrointestinal
TKM1/TKM2	Tampões de lise celular
TMO	Transplante de Medula Óssea
TRL/TRS	Seqüências de terminações repetidas do genoma do HCMV(“Terminal Repeats”)
UI	Unidade Internacional
UL	Seqüência única longa (“Unique Long”) do genoma do HCMV
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
US	Seqüência única curta (“Unique Short”) do genoma do HCMV
VO	Via Oral
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Primers para detecção do HCMV.....	81
Tabela 2- Primers para detecção do HHV-6.....	82
Tabela 3- Primers para detecção Da β -globina humana.....	83
Tabela 4- Primers e sonda para detecção do HCMV.....	88
Tabela 5- Primers e sonda para detecção do HHV-6.....	88
Tabela 6- Primer e sonda para detecção da β -actina humana.....	89
Tabela 7- Primers para detecção do cDNA do HCMV.....	92
Tabela 8- Primers para detecção do cDNA do HHV-6.....	93
Tabela 9- Primers para detecção do cDNA da β actina humana.....	94
Tabela 10- Características dos pacientes que receberam transplante de células tronco hematopoiéticas do tipo alogênico, envolvidos no estudo.....	99
Tabela 11- Comparação entre os testes diagnósticos.....	111
Tabela 12- Tempo para detecção da infecção ativa por HCMV pelos testes diagnósticos.....	111
Tabela 13- Número de pacientes positivos para detecção da infecção ativa por HCMV por teste diagnóstico isolado.....	111
Tabela 14- Comparação entre os testes diagnósticos.....	112
Tabela 15- Tempo para detecção da infecção ativa por HHV-6 pelos testes diagnósticos.....	112

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Ciclo de replicação do HCMV.....	54
Figura 2- Representação do ciclo de replicação do HHV-6.....	57
Figura 3- Sequência de nucleotídeos da região US 17 do HCMV com primers e sonda utilizados para a PCR em tempo real.....	89
Figura 4- Sequência de nucleotídeos da região U 67 do HHV-6 com primers e sonda utilizados para a PCR em tempo real.....	90
Figura 5- Produto da Nested-PCR para detecção do HCMV em amostras de DNA de sangue de pacientes receptores de transplante de medula óssea.....	100
Figura 6- Produto da Nested-PCR para detecção do HCMV em amostras de DNA de soro de pacientes receptores de transplante de medula óssea.....	100
Figura 7- Produto da Nested-PCR para detecção do HHV-6 em amostras de DNA de sangue de pacientes receptores de transplante de medula óssea.....	101
Figura 8- Eletroforese em gel de agarose 2% de produto de transcrição reversa acoplada a PCR para detecção do HHV-6.....	102
Figura 9- Produto da RT-PCR para detecção do HCMV em amostras de cDNA de sangue de pacientes receptores de transplante de células tronco hematopoéticas.....	102
Figura 10- Curva ROC demonstrando o ponto de corte para detecção do HCMV.....	104
Figura 11- Curva de amplificação das amostras de DNA provenientes de sangue e soro para detecção do gene da β actina humana.....	105

Figura 12-	Curva de amplificação das amostras de DNA provenientes de sangue para detecção do gene da β actina humana.....	106
Figura 13-	Curva de amplificação das amostras de DNA provenientes de sangue e soro para detecção HCMV.....	107
Figura 14-	Curva de eficiência gerada da reação para detecção do HCMV, mostrando as amostras plotadas na curva padrão.....	108
Figura 15-	Curva de amplificação das amostras de DNA provenientes de sangue e soro para detecção HHV-6.....	110
Figura 16-	Cinética da carga viral do HCMV em amostras de DNA de leucócitos durante monitoramento do paciente 9, que apresentou doença causada por HCMV no TGI. TTO GCV= tratamento com ganciclovir.....	140
Figura 17-	Cinética da carga viral do HCMV em amostras de DNA de soro durante monitoramento do paciente 9, que apresentou doença causada por HCMV no TGI. TTO GCV= tratamento com ganciclovir.....	141
Figura 18-	Cinética da carga viral do HCMV e do HHV-6 durante monitoramento do paciente 9.....	141
Figura 19-	Cinética da carga viral do HCMV em amostras de DNA de leucócitos durante monitoramento do paciente 27, que apresentou doença causada por HCMV no TGI. TTO GCV= tratamento com ganciclovir.....	142
Figura 20-	Cinética da carga viral do HCMV em amostras de DNA de soro durante monitoramento do paciente 27, que apresentou doença causada por HCMV no TGI. TTO GCV= tratamento com ganciclovir, IO= infecção oportunista.....	142
Figura 21-	Cinética da carga viral do HCMV e do HHV-6 durante monitoramento do paciente 27.....	143

LISTA DE GRÁFICOS

	PÁG.
Gráfico 1- Incidência da infecção ativa viral e co-infecção HCMV/HHV-6 e presença de DNA viral do HHV-6 nos pacientes receptores de TCTH.....	113
Gráfico 2- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 4.....	115
Gráfico 3- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 4.....	115
Gráfico 4- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 5.....	116
Gráfico 5- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 5.....	116
Gráfico 6- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 6.....	117
Gráfico 7- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 7.....	118
Gráfico 8- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 7.....	118
Gráfico 9- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 8.....	119
Gráfico 10- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 8.....	119
Gráfico 11- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 9.....	120

Gráfico 12-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 9.....	120
Gráfico 13-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 10.....	121
Gráfico 14-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 11.....	122
Gráfico 15-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 11.....	122
Gráfico 16-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 12.....	123
Gráfico 17-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 12.....	123
Gráfico 18-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 13.....	124
Gráfico 19-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 14.....	125
Gráfico 20-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 14.....	125
Gráfico 21-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 15.....	126
Gráfico 22-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 16.....	127
Gráfico 23-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 16.....	127
Gráfico 24-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 17.....	128

Gráfico 25-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 17.....	128
Gráfico 26-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 18.....	129
Gráfico 27-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 19.....	130
Gráfico 28-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 19.....	130
Gráfico 29-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 20.....	131
Gráfico 30-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 20.....	131
Gráfico 31-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 22.....	132
Gráfico 32-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 22.....	132
Gráfico 33-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 23.....	133
Gráfico 34-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 23.....	133
Gráfico 35-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 24.....	134
Gráfico 36-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 24.....	134
Gráfico 37-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 25.....	135

Gráfico 38-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 26.....	136
Gráfico 39-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 27.....	137
Gráfico 40-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 27.....	137
Gráfico 41-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 29.....	138
Gráfico 42-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 29.....	138
Gráfico 43-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de sangue do paciente 30.....	139
Gráfico 44-	Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 30.....	139
Gráfico 45-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 1.....	144
Gráfico 46-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 2.....	145
Gráfico 47-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 3.....	145
Gráfico 48-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 5.....	146
Gráfico 49-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 7.....	146
Gráfico 50-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 8.....	147

Gráfico 51-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 9.....	147
Gráfico 52-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 10.....	148
Gráfico 53-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 11.....	148
Gráfico 54-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 12.....	149
Gráfico 55-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 13.....	149
Gráfico 56-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 14.....	150
Gráfico 57-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 15.....	150
Gráfico 58-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 18.....	151
Gráfico 59-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 19.....	151
Gráfico 60-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 20.....	152
Gráfico 61-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 23.....	152
Gráfico 62-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 24.....	153
Gráfico 63-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 25.....	153

Gráfico 64-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 27.....	154
Gráfico 65-	Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 29.....	154

LISTA DE QUADROS

	PÁG.
Quadro 1- Posologia do ganciclovir – Dose padrão para o tratamento de doença por HCMV.....	65
Quadro 2- Posologia do ganciclovir – Dose padrão para o tratamento de infecção ativa pelo HCMV.....	66

	PÁG.
RESUMO	<i>xi</i>
ABSTRACT	<i>xiii</i>
1- INTRODUÇÃO	51
1.1- Citomegalovirus humano	53
1.1.1- Replicação do HCMV.....	53
1.1.2- Epidemiologia e infecção.....	54
1.1.3- HCMV e transplante de células tronco hematopoiéticas.....	55
1.2- HHV-6	56
1.2.1- Replicação do HHV-6.....	57
1.2.2- Epidemiologia e transmissão.....	58
1.2.3- Manifestações clínicas.....	58
1.2.4- HHV-6 e transplante de células tronco hematopoiéticas.....	58
1.3- Diagnóstico laboratorial	59
1.3.1- Sorologia.....	59
1.3.2- Cultura celular <i>in vitro</i>	59
1.3.3- Cultura <i>Shell-vial</i>	60
1.3.4- Antigenemia.....	60
1.3.5- PCR- reação em cadeia da polimerase.....	60
1.3.6- PCR em tempo real.....	61
1.3.7- Transcrição reversa acoplada a nested-PCR.....	62
1.4- Estratégia utilizada na prevenção da infecção ativa por HCMV e HHV-6	63
1.4.1- Profilaxia universal.....	63
1.4.2- Terapia precoce.....	64
1.4.3- Medicamento utilizado no tratamento antiviral.....	64
1.5- Transplante de células tronco hematopoiéticas	66
2- OBJETIVOS	69

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	73
3.1- Critérios utilizados para inclusão dos pacientes no estudo.....	75
3.1.1- Protocolo de acompanhamento para realização das coletas.....	75
3.1.2- Critérios utilizados para definição da infecção ativa por HCMV e POR HHV-6.....	76
3.1.3- Critérios utilizados para definição de doença por HCMV.....	76
3.1.4- Critérios utilizados para caracterizar provável doença por HHV-6...	77
3.1.5- Recorrência da infecção ativa por HCMV ou HHV-6.....	78
3.2- Coletas de sangue.....	78
3.2.1- Extração de DNA de leucócitos para detecção do HHV-6 e do HCMV.....	78
3.2.2- Extração de DNA de soro para detecção do HHV-6 e do HCMV....	79
3.3- Amplificação gênica pela Nested-PCR para detecção do HCMV.....	80
3.4- Amplificação gênica pela Nested-PCR, para detecção do HHV-6.....	81
3.5- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção do gene da β-globina humana.....	82
3.6- PCR em tempo real.....	83
3.6.1- Nested PCR para obtenção da amostra padrão para a PCR em tempo real.....	83
3.6.2- Reação de ligação e clonagem.....	84
3.6.3- Sequenciamento automatizado.....	85
3.6.4- Extração do DNA do fragmento clonado e linearização do plasmideo.....	86
3.6.5- Padronização da concentração dos primers.....	86
3.6.6- Eficiência da reação-curva padrão.....	87
3.6.7- Determinação da concentração do DNA.....	87
3.6.8- Reação de amplificação em tempo real para detecção do HCMV..	87
3.6.9- Reação de amplificação em tempo real para detecção do HHV-6..	88
3.6.10- Reação de amplificação em tempo real para detecção da β -actina.....	88

3.7- Transcrição reversa acoplada a nested-PCR.....	90
3.7.1- Separação de células para extração de RNA.....	90
3.7.2- Extração de RNA para detecção dos <i>Herpesvírus</i> HCMV e HHV6.....	91
3.7.3- Determinação da concentração de RNA.....	91
3.7.4- Transcrição reversa.....	91
3.7.5- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase para detecção do cDNA do HCMV.....	92
3.7.6- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase para detecção do cDNA do HHV-6.....	92
3.7.7- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase para detecção do gene da beta actina humana.....	93
3.8- Seqüenciamento do cDNA.....	94
3.9- Análise estatística.....	95
4- RESULTADOS.....	97
4.1- Características dos pacientes envolvidos no estudo.....	99
4.2- Nested-PCR para detecção do HCMV.....	100
4.3- Nested-PCR para detecção do HHV-6.....	101
4.4- Transcrição reversa acoplada a Nested-PCR (RT-nPCR) para detecção do HCMV e do HHV-6.....	101
4.5- Detecção da carga viral do HCMV pela PCR em tempo real.....	103
4.6- Determinação do ponto de corte (CUT-OFF) da PCR em tempo real para detecção do HCMV- análise da curva ROC.....	103
4.6.1- Amplificação em tempo real.....	104
4.7- Detecção da carga viral do HHV-6 pela PCR em tempo real.....	108
4.8- Determinação do ponto de corte (CUT-OFF) da PCR em tempo real para detecção do HHV-6.....	109
4.8.1- Amplificação em tempo real para detecção do HHV-6.....	109
4.9- Comparação entre as técnicas para detecção da infecção ativa por HCMV.....	110

4.10- Comparação entre as técnicas para detecção da infecção ativa por HHV-6.....	112
4.11- Co-infecção HCMV/HHV-6.....	112
4.12- Monitoramento da carga viral do HHV-6 e correlação com a infecção por HCMV.....	113
4.13- Incidência de doença por HCMV e provável doença por HCMV.....	140
4.14- Principais complicações associadas a infecção ativa viral (HHV-6 e HCMV) e transplante de células tronco hematopoiéticas.....	143
4.15- Monitoramento da terapia antiviral.....	143
4.16- Incidência de doença/provável doença por HHV-6.....	155
4.17- Causas dos óbitos.....	155
5- DISCUSSÃO.....	157
6- CONCLUSÃO.....	165
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	169
8- ANEXO.....	187

1- INTRODUÇÃO



1.1- Citomegalovírus humano

O HCMV pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae* e gênero *Cytomegalovirus*. Ele possui ultra-estrutura semelhante à de outros Herpes vírus, sendo considerado o maior membro desta família com diâmetro final de 200nm(MUSTAFA, 1994; COSTA, 1999). É também conhecido como Herpes Vírus Humano tipo 5 (HHV-5) (MOCARSKI *et al.*, 1990; BROWN & ABERNATHY, 1998). A partícula viral consiste de um capsídeo icosaédrico de 110 nm de diâmetro composto por 162 capsômeros, no interior do qual se encontra o núcleo de 64 nm de diâmetro contendo o material genético (DNA). O genoma do HCMV é constituído por uma cadeia dupla de DNA linear, com aproximadamente 240 Kpb (COSTA, 1999), possuindo mais de 200 ORFs. Quando desnaturadas, as fitas de DNA do HCMV tendem a se anelar e formar alça indicativo de que as moléculas possuem dois pares de repetições invertidas que subdividem o genoma em um segmento grande, correspondente a uma única região (U_L , 174 Kpb) que está inserida entre repetições invertidas (IR_L / TR_L) e um segmento pequeno (U_S), que é uma sequência única de 35,6 Kpb flanqueada por repetições curtas invertidas (IR_S / TR_S) (RÜGER, BORNKAMM & FLECKENSTEIN, 1984; SPECTOR *et al.*, 1990).

1.1.1- Replicação do HCMV

O HCMV apresenta replicação lenta no hospedeiro infectado, que pode se dar por períodos prolongados e, após, permanecer em estado latente. O vírus, através de receptores específicos na membrana celular, é adsorvido e penetra no interior da célula por fusão de seu envelope com a membrana celular. Desnuda o capsídeo no citoplasma e o genoma viral inicia sua replicação no núcleo da célula.

A replicação viral começa, aproximadamente, 12 horas após a infecção e ocorre em três etapas interdependentes, denominadas precoce imediata, precoce e tardia.

O período imediato ocorre entre 2 a 4 horas após a infecção sendo caracterizado pela transcrição de segmentos específicos do genoma e pela produção de proteínas virais, denominadas “immediate-early” (IE ou α), que são regulatórias e essenciais na transcrição

do DNA do vírus para a fase seguinte da replicação. O período precoce tem duração de 24 horas e são produzidas as proteínas “early” (E ou β) que também são regulatórias e com função enzimática essencial na replicação viral, a exemplo da DNA polimerase. Este período é caracterizado pela transcrição e replicação contínua de grande parte do DNA viral. O período tardio ocorre de 36 a 48 horas após a infecção e nele são sintetizadas as proteínas “late” (L ou γ) que são relacionadas à elementos estruturais do vírus e nesta fase ocorre a montagem e liberação de novos vírions (RASMUSSEN, 1990).

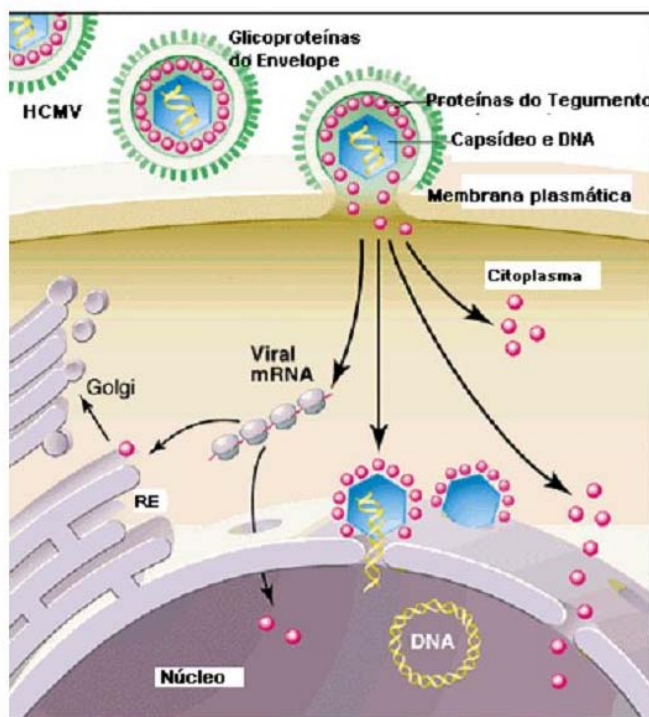


Figura 1- Ciclo de replicação do HCMV (<http://utsouthwestern.edu/bresnahan.com>)

1.1.2- Epidemiologia e infecção

A infecção primária pelo HCMV é frequentemente seguida por infecção persistente e/ou recorrente. Na maioria dos casos, a infecção é subclínica, porém, pacientes imunossuprimidos como os submetidos a transplante de rins, fígado, medula, coração, portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), aqueles submetidos a

quimioterapia antineoplásica e crianças com infecções congênitas, a apresentação clínica pode ser grave e muitas vezes letal (Ho, 1990).

A infecção por HCMV ocorre em praticamente todo mundo, com prevalência de 80-100% em populações de nível socioeconômico baixo e variando de 40-60% em populações de melhor nível socioeconômico.

As principais fontes de infecção podem ser no período perinatal através do canal do parto, leite materno, banco de leite e outra criança contaminada (ex; berçários, creches, etc.), ou no período de maturidade sexual através de contato sexual. O HCMV pode ser transmitido iatrogenicamente através de transfusão sanguínea (SAYERS, 1992;), ou do transplante de órgãos (RUBIN, 1990). O HCMV é o agente infeccioso mais freqüente em transplantados, afetando pelo menos dois terços desses indivíduos, não importando se o órgão transplantado é rim, medula óssea, fígado, coração, coração-pulmão ou pâncreas-rim. Esta alta prevalência de infecção deve-se à capacidade do HCMV permanecer em latência por longo período de tempo e de reativar-se em condições especiais, como o uso de terapia imunossupressora (RUBIN, 1990).

Há três padrões epidemiológicos da infecção por HCMV em receptores de órgãos: infecção primária, reativação da infecção pré-existente e reinfecção. A infecção primária ocorre quando um indivíduo soronegativo para o HCMV se infecta com o vírus presente, na forma latente, em células de um doador soropositivo. A reativação viral ocorre quando o receptor de transplante, previamente infectado pelo HCMV (soropositivo antes do transplante), sofre reativação do vírus latente após o transplante. A reinfecção ocorre quando um indivíduo soropositivo recebe um órgão de um doador soropositivo apresentando uma cepa do vírus diferente daquela do doador e o vírus ativado é o procedente do doador (GRUNDY, 1988).

1.1.3- HCMV e transplante de células tronco hematopoiéticas

Além das manifestações próprias da doença viral, o HCMV parece ser imunossupressor, e a infecção por este agente foi considerada um fator de risco independente para o desenvolvimento de superinfecções com patógenos oportunistas

(bactérias e outros vírus), além da relevância na participação do processo de rejeição aos órgãos transplantados (HIBBERD & SNYDMAN, 1995; ROSEN, *et al.* 1998; MAYA & AZULAY, 2000). Dentre as complicações clínicas associadas à infecção pelo HCMV estão: pneumonia intersticial, doença gastrointestinal, retinite, pancitopenia, febre, demora na pega do enxerto e rejeição do enxerto entre os receptores de órgão sólido (WALTER & BOWDEN, 1995; LJUNGMAN, 1996).

1.2- HHV-6

O herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6) foi isolado pela primeira vez em 1986, por SALAHUDDIN *et al* 2002, de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com desordens proliferativas (LEACH *et al.*, 2002, SASHIHARA *et al.*, 2002, TANIGUCHI *et al*) e de pessoas com síndrome da imunodeficiência adquirida (BRAUN *et al.*, 1997).

O HHV-6 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirine* e gênero *Roseolovirus*. A partícula viral é formada por um capsídeo icosaédrico com 162 capsômeros, com diâmetro de aproximadamente 106nm, que é envolto por um envelope lipoprotéico. A partícula viral envelopada mede cerca de 180-200nm de diâmetro (SANTOS, 2000). O genoma do HHV-6 é formado por uma dupla fita de DNA linear com aproximadamente 160 kpb (LEVY, 1997). Seu genoma é composto por uma região central U com cerca de 144 kpb e uma região terminal DR com cerca de 9 kpb. As “open reading frames” (ORFs) estão localizadas na região central. Por suas propriedades de conteúdo genético a antigenicidade, o HHV-6, possui duas variantes diferentes HHV-6A e HHV-6B, que possuem 90% de similaridade da sequência nucleotídica. O HHV-6 A e o HHV-6B possuem, respectivamente, 110 e 119 ORFs. As duas variantes diferem também nas manifestações clínicas produzidas e epidemiológica. A variante B implica na maioria dos sintomas associados com o HHV-6, e a variante A tem sido associada com vários sintomas neurológicos (RAZONABLE, 2002). A variante A tem mostrado grande virulência com respeito a supressão, induzindo maturação de células precursoras da medula e formação de colônias (SINGH & CARRIGAN, 1996).

1.2.1- Replicação do HHV-6

Ambas as variantes penetram na célula através de interação com o CD46 (Santoro et al, 1999), que esta presente na membrana de todas as células nucleadas e está fisiologicamente envolvido na regulação do complemento (Liszewski et al, 1991). Um complexo de glicoproteínas (gH, gL e gQ) codificadas pelo HHV-6 servem como ligantes ao CD46(Mori et al, 2003). Após a ligação ao receptor o complexo de glicoproteínas media a fusão do envelope viral com a membrana celular e o nucleocapsídeo é transportado pelo citoplasma (através de rede de microtúbulos) para o complexo de poros nucleares onde o DNA genômico viral é liberado para dentro do nucleoplasma.

O vírus então utiliza o maquinário de transcrição e tradução celular para produzir 3 classes de proteínas virais: IE (immediatly early ou imediatamente precoces) (early ou precoce) e L (late ou tardia). As proteínas imediatamente precoces são sintetizadas poucas horas após a infecção e regulam a expressão de outros genes como os genes precoces. As proteínas precoces estão envolvidas no metabolismo do DNA e replicação. As proteínas tardias são freqüentemente glicosiladas e servem como componentes de partículas virais maduras.

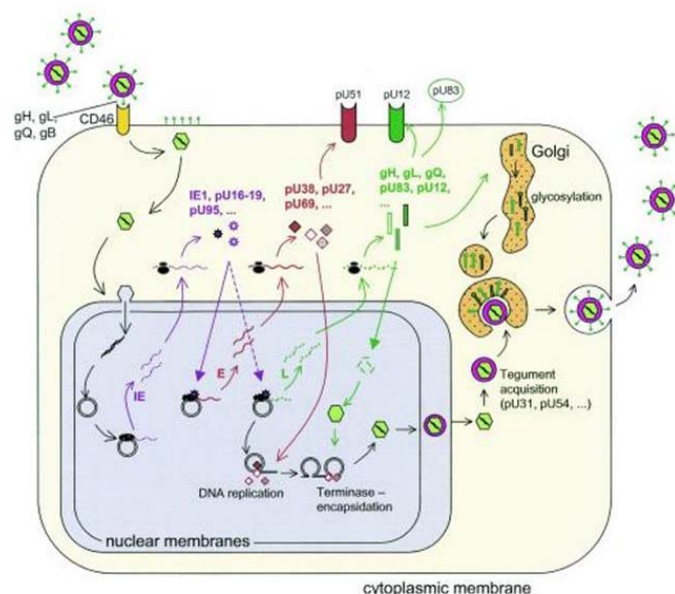


Figura 2- Representação do ciclo de replicação do HHV-6. De BOLLE, Clin Microbiol Rev. 2005

1.2.2- Epidemiologia e transmissão

O HHV-6 é disseminado pelo mundo com diferenças geográficas em que a prevalência varia de 70% a 100% (DesJardin et al, 2001). É geralmente adquirido entre os 6 e 15 meses de idade, com um período de incubação de uma a duas semanas. A infecção primária por HHV-6 é responsável por 20% de todos os casos de febre aguda em crianças entre 6 e 12 meses de idade, exclusivamente causada pela variante B. A maioria das infecções clínicas em indivíduos imunocompetentes são ,também,causadas pela variante B e a variante A causa infecções em indivíduos imunossuprimidos e manifestações neurológicas (Hall et al.,1998).

A freqüente detecção do DNA do HHV-6 em saliva e tecido de glândulas salivares (Di Luca et al, 1995) sugere que a saliva é um veículo de transmissão tanto de mãe para filho quanto de criança para criança. A detecção do DNA viral em cordão umbilical de recém-nascidos saudáveis e em ausência de imunoglobulinas M (IgM) no soro corroboram com a hipótese de transmissão intra-uterina (Adams et al, 1998)

1.2.3- Manifestações clínicas

Em pacientes imunocompetentes está associado às seguintes síndromes clínicas: exantema súbito (Roseola Infantum), síndrome febril, convulsão febril, encefalite, meningite, doenças desmielinizantes, síndrome da mononucleose, hepatite fulminante e síndrome da fadiga crônica. Em pacientes imunossuprimidos, as manifestações clínicas podem ser: febre , erupções cutâneas , mielossupressão, pneumonite intersticial, encefalite, exacerbação da infecção e doença causada pelo HCMV e na ocorrência de outras infecções oportunistas, como a doença fúngica invasiva, disfunção alográfica e rejeição alográfica , rejeição celular aguda (RAZONABLE & PAYA, 2002).

1.2.4- HHV-6 e transplante de células tronco hematopoiéticas

As manifestações clínicas mais freqüentes são: encefalite (MACLEAN, 2002; BETHGE, 1999), seguida pela pneumonia (BUCHBINDER, 2000) e atraso na pega do enxerto (ROSENFELD,1995). Ainda como um grande problema para os receptores de

transplante de medula óssea, está o fato de que o HHV-6 é suspeito de causar danos no endotélio vascular desses pacientes e esse processo pode levar à microangiopatia trombótica, que é a maior complicação no transplante de medula óssea (TAKATSUKA, 2003; MATSUDA, 1999). A infecção pelo HHV-6 também tem sido associada à supressão da medula óssea. Estudos sugerem que pacientes com infecção por HHV-6 apresentam mielossupressão com maior frequência que aqueles sem infecção (57% versus 6% respectivamente).

1.3- Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de infecção por HHV-6 e HCMV pode ser feito através de sorologia, reação em cadeia da polimerase (PCR), cultura viral e pesquisa de antigenemia.

1.3.1- Sorologia

O diagnóstico sorológico é confirmado pela presença de anticorpos IgM específicos no sangue ou aumento do título de IgG em 4 vezes ou mais ou pela soroconversão, porém em indivíduos imunocomprometidos este diagnóstico tem valor limitado, pois, a resposta IgM pode estar ausente ou resultar de reação sorológica cruzada entre os betaherpesvirus (HCMV ,HHV-6 e HHV-7). A detecção dos anticorpos pode ser feita por imunofluorescência indireta (IFI), ensaio de imunofluorescência anticomplemento (EIAC) ou ensaio imunoenzimático (Elisa), sendo este o método mais sensível.

1.3.2- Cultura celular *in vitro*

É um método que realiza cultura viral em células de linhagem de linfócitos originais para o HHV-6 e para demonstrar infecção ativa por HCMV é necessária a inoculação do material suspeito em cultura de fibroblastos humanos, única linhagem celular que permite sua replicação “*in vitro*”.. O método é demorado, pois o crescimento viral é lento, levando cerca de onze dias.

1.3.3- Cultura “*Shell-vial*”

É um método mais rápido e específico que a cultura celular “*in vitro*”, baseado na ligação de anticorpos monoclonais contra proteínas IE do HCMV e do HHV-6. A sensibilidade deste método varia de acordo com a técnica utilizada, que pode ser ELISA ou Imunofluorescência.

1.3.4- Antigenemia

A pesquisa da antigenemia em leucócitos do sangue periférico proporciona um marcador precoce de infecção ativa pelo HCMV e por HHV-6 e é um teste rápido. No caso do HCMV, esse método depende do uso de anticorpos monoclonais que detectam o antígeno viral *pp65*, uma proteína estrutural expressa nos leucócitos do sangue durante a fase precoce do ciclo de replicação do HCMV, e detecta antígeno específico do HHV-6. Este teste é limitado à detecção de antígenos virais nos leucócitos. O resultado é também quantitativo, correlacionando a viremia com a gravidade da doença clínica (LO *et al*, 1997; NIUBÓ *et al*, 1996; THE *et al*, 1992). Porém, é um método que apresenta como desvantagens o curto espaço de tempo em que a amostra deve ser processada (até 8 horas após a coleta) e a impossibilidade da realização do exame em pacientes com grave neutropenia em razão da baixa contagem de granulócitos (BOECKH & BOIVIN, 1998).

1.3.5- PCR- reação em cadeia da polimerase

A PCR é um método rápido (4-6 h), específico e extremamente sensível. Seu principal problema são os resultados falso-positivos resultantes da contaminação na execução do teste. O aumento da especificidade e sensibilidade da PCR foram alcançados pela “Nested-PCR”, em que o produto da primeira PCR, amplificada com um par de “primers”, é submetido à nova reação de amplificação utilizando-se um par de “primers” internos ao primeiro, sendo o produto então detectado por eletroforese em gel de agarose. (BRYTTING, *et al*, 1991)

1.3.6- PCR em tempo real (REAL-TIME PCR)

É provável a associação entre a carga viral como marcador ou preditor para o desenvolvimento de doença órgão-específica pelo Citomegalovírus Humano (HCMV) (LIPSON *et al.*, 1998; FERREIRA-GONZALEZ *et al.*, 1999; SAI *et al.*, 2000) e pelo HHV-6, podendo ser este dado um fator importante para estabelecer o diagnóstico da infecção produtiva e assim instituir o tratamento adequado.

A metodologia de PCR em tempo real de amplificação (Real-Time PCR), de alta sensibilidade e precisão, tem sido utilizada para a detecção e monitoramento da carga viral. A sua sensibilidade e especificidade estão diretamente relacionadas à escolha dos “primers” e sondas, e a precisão é determinada pela C_t (threshold cycle), que é calculada durante a fase exponencial da reação (CLEMENTI, 2000; NITSCHKE *et al.*, 1999; NITSCHKE *et al.*, 2000).

O método é baseado na detecção, ciclo após ciclo, de produto de PCR acumulado, sendo possível pelas condições de ciclagem, detecção fluorescente e aplicação de um software específico em um único instrumento. Os resultados quantitativos são obtidos logo após o término da reação de amplificação. Os sistemas de detecção da sequência mais usados incluem 2 tipos de reações químicas SYBR® Green - o produto da PCR pode ser quantificado em tempo real pelo uso de um marcador (“dye”) que se liga somente ao DNA dupla fita. Desta maneira, o produto da PCR dupla fita é marcado conforme vai sendo sintetizado e pode ser quantificado através de um fluorímetro; a vantagem desta metodologia está na não necessidade de uma sonda, e uma desvantagem potencial é a possibilidade de geração de produtos inespecíficos que podem gerar sinal fluorescente.

Outro método, o TaqMan® - utiliza um método de PCR com atividade nuclease 5' para gerar o sinal fluorescente durante a PCR. Neste sistema, uma sonda é usada com um “reporter dye” e um “quencher dye” ligados. Durante a PCR, a sonda é clivada pela atividade nuclease 5' da Taq DNA polimerase, separando o “reporter dye” do “quencher dye”, gerando o sinal fluorescente sequência específica, que é aumentado a cada ciclo. A especificidade deste método é maior, mas requer o uso de sondas especialmente feitas e caras.

Principalmente em pacientes imunocomprometidos, a PCR quantitativa tem sido demonstrada auxiliar na determinação da gravidade de uma infecção e predição do risco de um paciente desenvolver doença por HCMV. A PCR Real-Time é uma técnica simples e produz resultados rápidos (não requer manuseio pós-PCR), permite a quantificação direta e precisa do produto da PCR (DNA e RNA), e é potencialmente apropriada para aplicação em rotina (NITSCHKE A., *et al.*, 1999; CLEMENTI, 2000).

1.3.7- Transcrição reversa acoplada a nested-PCR (RT- NESTED PCR)

A transcrição reversa acoplada a PCR é outra técnica de biologia molecular que vem sendo utilizada para a detecção da reativação e monitorização do HHV-6 (Bosch 2001, Norton 1999) e do HCMV (Gozlan J., 1996, 1993). É uma metodologia aceita como padrão ouro para diferenciação da infecção ativa e latência, muito utilizada em laboratórios de pesquisa, porém ainda não utilizado em laboratórios de diagnóstico comerciais, devido a fácil degradação do RNA. Durante a replicação viral um pequeno número de genes é transcrito, codificando proteínas que regulam sua expressão. Estes genes podem ser expressos na fase imediatamente precoce (IE), precoce (E) e tardia (L). Na fase imediatamente precoce os genes são transcritos através de enzimas nucleares, os RNAs são transportados para o citoplasma e são traduzidos; ocorre a produção de proteínas regulatórias que são transportadas para o núcleo e que permitem ao vírus ter controle da síntese macromolecular da célula hospedeira. Os genes transcritos nessa fase podem ter influência na expressão de outros genes virais, seus próprios genes e, possivelmente, genes celulares. Após esta fase inicia-se o período precoce que é caracterizado pela replicação do DNA viral, produção de proteínas nas células infectadas e produção da progênie. Segue-se então a fase tardia em que componentes estruturais ou de maturação dos vírus produzidos e o vírus infectante é eliminado da célula (MUSTAFA, 1994). A transcrição de genes tardios requerer ciclo lítico completo indicando desta forma a replicação viral. A metodologia de transcrição reversa acoplada a PCR permite identificar genes tardios transcritos pelo HCMV e pelo HHV-6 utilizados para suas replicações nas células do hospedeiro (PRADEAU, 2006;) permitindo assim a identificação da infecção ativa. Estudos têm indicado esta técnica como muito específica e uma ferramenta clínica mais útil que outras

técnicas utilizadas, como o isolamento de vírus e técnicas envolvendo o DNA, através da PCR (Norton, 1999; Gozlan, 1992).

1.4- Estratégia utilizada na prevenção da infecção ativa por HCMV E HHV-6

Medicamentos antivirais são utilizados na profilaxia e tratamento da infecção ativa e doença por HCMV em pacientes imunossuprimidos. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção normalmente é controlada sem intervenção medicamentosa. Os agentes utilizados para profilaxia ou terapia contra a infecção por HCMV e/ou HHV-6 são: Imunoglobulina humana anti-HCMV, Aciclovir, Valaciclovir, Ganciclovir, Valganciclovir, Foscarnet e Cidofovir. Duas diferentes estratégias terapêuticas podem ser empregadas para combater a infecção ativa pelo HCMV: profilaxia universal e a terapia precoce (preemptive therapy) (Landolf, et al,2003) quando o risco de doença por HCMV é alto (ex. pacientes transplantados).

1.4.1- Profilaxia universal

Na profilaxia universal, administram-se drogas antivirais a todos os pacientes transplantados, independente dos resultados dos testes de investigação de viremia (excluindo somente os doadores soronegativos com receptores negativos para o HCMV) .A profilaxia com uso de ganciclovir pós-TCTH do tipo alogênico em receptores soropositivos foi significativamente eficaz em dois estudos realizados por Goodrich et al. e Broeck e Bowden , mas falhou em um terceiro, de responsabilidade de Winston et al.,1993, em que a redução da mortalidade não foi atingida, provavelmente porque a neutropenia induzida pelo ganciclovir acarretou infecções bacterianas e fúngicas fatais.

Em conclusão, a profilaxia antiviral pode ser útil em alguns casos, mas é uma estratégia em que os pacientes são expostos à toxicidade da droga (mielossupressão e toxicidade renal), possível resistência antiviral e, ainda, há risco de infecções tardias pelo HCMV (EMERY,2001).

1.4.2- Terapia precoce (PREEMPTIVE THERAPY)

O tratamento precoce foi descrito no início da década de 1990 (RUBIN, 1991), como forma de reduzir o aparecimento da doença provocada pelo HCMV. O tratamento antiviral é iniciado quando o HCMV é detectado no sangue, qualquer outro líquido corporal e lavado broncoalveolar em pacientes assintomáticos ou oligossintomáticos, usando métodos sensíveis, como a PCR e a antigenemia (BONON,2004).

Geralmente, o uso precoce do ganciclovir exige que os pacientes sejam monitorizados pelo menos uma vez por semana durante o período de risco máximo (até o 100º dia pós-TCTH). A monitorização mais longa é recomendada a pacientes com DECH, pacientes submetidos a transplantes não relacionados e pacientes que tiveram reativação prévia pelo HCMV.

Dentre as vantagens da monitorização da infecção ativa pelo HCMV e consequente tratamento precoce, está a redução do número de pacientes expostos à toxicidade dos medicamentos antivirais e diminuição do risco de resistência à drogas antivirais, melhorando, assim, a relação custo-benefício (EINSELE,1995).

Na Unidade de Transplante de Medula Óssea da UNICAMP a estratégia de tratamento utilizada é a terapia precoce, sendo iniciada a partir dos resultados ≥ 1 célula positiva pela antigenemia/ 3×10^5 leucócitos e/ou duas ou mais Nested-PCR positivas consecutivas.

1.4.3- Medicamento utilizado no tratamento antiviral

O ganciclovir é um nucleosídeo sintético análogo da 2'-desoxiguanina, que inibe a replicação dos herpes vírus, tanto *in vitro* como *in vivo*. Seu nome químico é 9-[2-hidroxi-1-(hidroximetil)-etoximetil] guanina, embora seja mais comumente conhecido como dihidroxipropoximetil guanina (DHPG).

Nas células infectadas pelo HCMV, o ganciclovir é inicialmente fosforilado a ganciclovir monofosfato pela quinase protéica viral UL97. Depois de ocorrer a fosforilação, diversas quinases celulares produzem o ganciclovir trifosfato, o qual é lentamente

metabolizado no interior da célula. A atividade virustática do ganciclovir é devido à inibição da síntese do DNA viral por dois mecanismos: (a) inibição competitiva da incorporação da desoxiguanosina trifosfato (DGTP) ao DNA pela DNA polimerase e (b) a incorporação do trifosfato de ganciclovir ao DNA viral causa um subsequente término ou alongamento muito limitado do DNA viral.

O principal efeito adverso do ganciclovir é a neutropenia, que ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes em tratamento. Outros efeitos associados à droga são mielossupressão e plaquetopenia (Conceição, OJG, 2005; Pannutti CS, 2001).

A resistência do HCMV ao ganciclovir é rara (aproximadamente 1%), mas deve ser considerada em pacientes com resposta clínica repetidamente pobre ou com excreção viral persistente durante o tratamento. O principal mecanismo de resistência ao ganciclovir é a diminuição da capacidade de formar moléculas ativas de trifosfato. Resistência viral tem sido descrita devido à mutação no gene UL97 do HCMV que controla a fosforilação do ganciclovir e mutações na polimerase do DNA viral.

O Ganciclovir não é o tratamento de escolha para o HHV-6, pois, sua eficiência contra este patógeno não ser satisfatória, porém, o acompanhamento e tratamento dos pacientes receptores de transplante de células tronco hematopoiéticas na Unidade de Transplante de Medula Óssea da UNICAMP, é feito em relação ao HCMV, o HHV-6 não é monitorado na rotina deste serviço.

Quadro 1- Posologia do ganciclovir – Dose padrão para o tratamento de doença por HCMV

Dose padrão para tratamento de doença por HCMV
<i>Terapia de indução:</i> 5 mg/kg administrada por infusão intravenosa a cada 12 horas por 21 dias.
<i>Tratamento de manutenção:</i> 5 mg/kg administrada por infusão intravenosa 3 vezes/semana até 12 doses.

Quadro 2- Posologia do ganciclovir – Dose padrão para o tratamento de infecção ativa pelo HCMV

Dose padrão para tratamento de infecção ativa pelo HCMV
<i>Tratamento de indução:</i> 5 mg/kg administrada por infusão intravenosa a cada 12 horas por 7 dias.
<i>Tratamento de manutenção:</i> 5 mg/kg administrada por infusão intravenosa 3 vezes/semana até 12 doses.

1.5- Transplante de células tronco hematopoiéticas

O transplante de células tronco hematopoiéticas é um procedimento terapêutico muito útil no tratamento de diversas doenças malignas e não-malignas, e que tem sido praticado intensamente ao longo dos últimos 10 ou 15 anos.

Há três tipos de transplante de células tronco-hematopoiéticas: o alogênico, o autólogo e o singênico. No transplante alogênico as células tronco são retiradas de um doador vivo, compatível, selecionado por testes de histocompatibilidade (antígeno leucocitário humano-HLA), podendo ser identificado entre os familiares ou em bancos de medula óssea. No transplante autólogo, as células, que provem do próprio paciente, são retiradas, armazenadas e reinfundidas após o regime de condicionamento. O transplante singênico é o que ocorre entre gêmeos univitelinos.

As atuais indicações para o transplante de células tronco hematopoiéticas autólogo e alogênico são:

Dentre as doenças linfoproliferativas: leucemia linfóide aguda, leucemia linfóide crônica, mieloma múltiplo, linfoma Não-Hodgkin, linfoma folicular, linfoma difuso de grandes células B, linfoma de células do manto e linfoma de Hodgkin. Entre as malignidades mieloproliferativas estão a leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica e síndrome mielodisplásica. As condições não-malignas em que o TCTH pode ser empregado são a anemia aplástica, distúrbios genéticos como a anemia falciforme e a

talassemia, distúrbios de imunodeficiência como a síndrome de Wiskott-Aldrich e imunodeficiência combinada e doenças autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico.

O transplante envolve três fases:

Fase pré-transplante: inicia-se no momento da indicação do tratamento e inclui a seleção do doador, avaliações do receptor e doador, mobilização, coleta, processamento e armazenamento das células tronco hematopoiéticas, implante do cateter venoso central e regime de condicionamento.

Transplante: é o momento de infusão das células tronco hematopoiéticas. O dia de sua realização é considerado o dia zero (DØ).

Fase pós-transplante: que se subdivide em imediato que inclui a fase de aplasia medular, enxertia e vai até o dia +30; período mediato, que vai do dia +30 ao dia +100 e o período tardio, após o dia +100, quando podem ocorrer as complicações tardias ou crônicas.

A agressividade do processo de TCTH decorrente dos efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia acarreta comprometimento múltiplo de órgãos e tecidos e depressão imunológica.

2- OBJETIVOS



- Identificar a infecção ativa pelo HCMV e pelo HHV-6 em pacientes que receberam transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) através da técnica de PCR em tempo real.
- Identificar a infecção ativa pelo HCMV e pelo HHV-6 em pacientes que receberam transplante células tronco hematopoéticas (TCTH) através da técnica de transcrição reversa acoplada a PCR
- Monitorar a carga viral dos herpesvírus HCMV e HHV-6 pós-transplate.
- Monitorar a terapia antiviral instituída através da determinação da carga viral.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS



Foram estudados, prospectivamente, 30 pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) do tipo alogênico em seguimento no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da UNICAMP. As coletas iniciaram-se no dia do transplante (D0), seguindo, semanalmente, até 150 dias pós-transplante.

3.1- Critérios utilizados para inclusão dos pacientes no estudo

Foram utilizados os seguintes critérios para inclusão dos pacientes no estudo:

- Pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoéticas do tipo alogênico.
- Disponibilidade de amostras semanais de sangue dos receptores, no pré e pós-transplante, adequadas para a realização dos testes laboratoriais (nested-PCR, PCR em tempo real e transcrição reversa);
- Sobrevida de, pelo menos, 4 semanas pós transplante de células tronco hematopoéticas.

3.1.1- Protocolo de acompanhamento para a realização das coletas

Durante o período do estudo, o protocolo de acompanhamento para a realização das coletas de sangue periférico foi o seguinte:

- No dia do transplante: foram coletadas amostras de sangue total e de soro do receptor
- Coletas semanais subsequentes foram realizadas no receptor a partir do dia +7 até o dia +150 após o transplante, até o óbito ou até a perda do enxerto;
- As amostras foram coletadas durante o período de internação na Enfermaria de Transplante de Medula Óssea do HC/UNICAMP e durante os retornos dos pacientes ao Ambulatório de Transfusão e Quimioterapia do HEMOCENTRO/UNICAMP, pela equipe de enfermagem especializada;

- As amostras foram enviadas ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular/FCM/UNICAMP, imediatamente após a coleta, onde foram realizados os testes de nested PCR, PCR em tempo real e transcrição reversa acoplada a PCR.

3.1.2- Critérios utilizados para definição da infecção ativa por HCMV e POR HHV-6

A presença de pelo menos um dos resultados abaixo foi considerada indicativa de infecção ativa por HCMV e/ou HHV-6:

- **Nested PCR em sangue para HCMV** - duas ou mais reações positivas, consecutivas (EINSELE *et al*, 1995).
- **Nested PCR em soro**- uma amplificação positiva
- **Transcrição reversa acoplada a PCR**- uma amplificação positiva por RT-PCR (Gozlan et al, 1992)
- **PCR em tempo real em sangue** – carga viral maior ou igual ao ponto de corte. Para o HCMV o ponto de corte foi estabelecido neste estudo, para o HHV-6 foi utilizado valor da literatura (ARITAKI, et al, 2001)
- **PCR em tempo real em soro**- detecção da carga viral do HCMV (TANAKA, 2002) e/ou do HHV-6 (YAMANE, 2006) em pelo menos uma amostra.

3.1.3- Critérios utilizados para definição de doença por HCMV

Para caracterização de doença por HCMV, além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas acima, fez-se necessária a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo HCMV (LJUNGMAN & PLOTKIN, 1995; LJUNGMAN *et al*, 2002):

- **Pneumonia (HCMV-IP)** - a presença de sinais e/ou sintomas de doença pulmonar combinado com a detecção do HCMV em lavado brônquio-alveolar ou biópsia de pulmão. A detecção deverá ser realizada por cultura celular, testes histopatológicos, análise imunohistoquímica ou hibridização *in situ*.
- **Doença Gastrointestinal (HCMV-TGI)** - sintomas gastrointestinais (colite, gastrite ou esofagite) associados com histologia ou imunohistoquímica positiva para HCMV de biópsias de lesões macroscópicas do tracto gastrointestinal;
- **Hepatite** - O vírus deverá ser demonstrado em biópsias hepáticas (por cultura, imunohistoquímica, hibridização “*in situ*” ou PCR) em combinação com:
 - Aumento de pelo menos duas vezes o valor máximo normal de alanina-amino-transferase (ALT);
 - Achados histopatológicos consistentes com hepatite ou colangite;
- **Doenças Neurológicas** - Sintomas como encefalite, mielite transversa ou outros sinais de doença difusa do sistema nervoso central juntamente com a detecção de HCMV em fluido cerebroespinal por PCR, por cultura ou detecção do antígeno;
- **Retinite** - lesões oftalmológicas típicas, com ou sem provas virológicas, diagnosticadas pelo exame de fundo de olho, realizado pelo oftalmologista, com presença de retinite necrotizante com infiltrado branco algodinoso, áreas de hemorragia e irite e vitrite mínima (PANUTTI *et al*, 1996).

3.1.4- Critérios utilizados para caracterizar provável doença por HHV-6

A exata caracterização de doença por HHV-6 é difícil de ser determinada pela dificuldade de isolar o HHV-6 como o agente causador das manifestações. Alguns tópicos foram avaliados para possível identificação da doença segundo estudo feito por SASHIHARA *et al* (2002), já que também a investigação deste patógeno não é feita

rotineiramente no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

- viremia por HHV-6 pós transplante associado a febre alta ($> 38^{\circ}\text{C}$), rash cutâneo não específico, supressão medular, pneumonite intestinal e sintomas como encefalite, mielite transversa ou outros sinais de doença difusa do sistema nervoso central, excluindo manifestações associadas a outros vírus.

3.1.5- Recorrência da infecção ativa por HCMV ou HHV-6

Recorrência da infecção ativa é definida como um novo diagnóstico da infecção pelos testes de RT-PCR e/ou PCR em um paciente que já teve infecção ativa e a negatificação da mesma previamente documentada. A recorrência pode ser resultado de uma reativação de vírus latente ou de uma reinfecção.

3.2- Coletas de sangue

Foram coletados de cada paciente, 15 ml de sangue em tubos com EDTA (ácido etileno-diaminotetracético) e 5 ml em tubo seco no período citado anteriormente. Foram efetuadas para a PCR em tempo real análise de sangue e soro para uma análise comparativa de eficiência e sensibilidade. As amostras foram coletadas durante o período de internação na Enfermaria de Transplante de Medula Óssea do HC/Unicamp e durante os retornos dos pacientes ao Ambulatório de Transfusão e Quimioterapia do Hemocentro/Unicamp, pela equipe de enfermagem especializada. As amostras foram mantidas em gelo e levadas imediatamente para o laboratório de Diagnóstico de Moléstias Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular para a realização dos exames.

3.2.1- Extração de DNA de leucócitos para detecção do HHV-6 e do HCMV

Foram centrifugados a 3500rpm por 10 minutos para separação do plasma, o qual será descartado, 5ml de sangue total em tubo com anticoagulante EDTA. Seguiu-se a lise dos eritrócitos através da adição das soluções de cloreto de amônio (NH_4Cl), a

0,0114 M e bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3), 0,01M e subsequente centrifugação a 3500rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi removido, e o precipitado de leucócitos lisado em solução TKM1 (Tris-HCL 10mM (pH 7,6), KCL 10mM; MgCl_2 10 mM e EDTA 20 mM) e 2 gotas de Triton X-100 (Nuclear) seguido de centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos. Seguiu-se uma segunda lavagem com somente a solução de TKM1 seguindo o mesmo procedimento de centrifugação. O sobrenadante foi descartado, e o pellet ressuspendido com a solução TKM2 (0,8ml da solução contendo Tris-HCL 10mM (pH=7,6); KCL 10mM; NaCl 0,4 M; MgCl_2 10mM; EDTA 2mM; 0,025ml de duodecil sulfato de sódio (SDS) 20%). Em seguida o material foi incubado durante por 15 minutos a temperatura de 56°C. Após este período foi adicionado 0,3 ml de NaCl 5M, e realizada centrifugação a 3500rpm por 10 minutos. Nesta etapa, o precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para um tubo estéril. Ao sobrenadante foram adicionados 6 ml de etanol absoluto gelado (EtOH), para ocorrer a precipitação do DNA. O DNA precipitado foi transferido para um tubo estéril e incubado a 37°C em banho-maria para secagem.

3.2.2- Extração de DNA de soro para detecção do HHV-6 e do HCMV

O tubo seco com 5ml de sangue foi centrifugado a 3200 rpm por 15 minutos para separação do soro.

A 20µl do soro dos pacientes foi adicionado 180 µl de uma solução contendo Tampão TNE (10 mM Tris-HCl 1M pH= 8, 10 mM NaCl 5M, 10 mM EDTA 0,5 M), Proteinase K (10mg/ml) e SDS 10% seguindo-se incubação em banho maria à 56°C por 30 minuto. Em seguida foram adicionados 200 µl de fenol e as amostras foram homogeneizadas em vortex por 15 segundos aproximadamente, e centrifugadas por 3 minutos a 12000 g. Cerca de 150 µl do sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 150 ul de fenol: clorofórmio: isoamílico na proporção (25:24:1). Seguiu-se nova homogeneização em vortex por 15 segundos e centrifugação por 3 minutos a 12.000 g. Foram transferidos 100 µl do sobrenadante para um tubo contendo 100 µl de clorofórmio, e ocorreu posterior homogeneização em vortex e centrifugação por 3 minutos a 12.000 g. Foram retirados 40 µl do sobrenadante para serem armazenado à 20°C.

3.3- Amplificação gênica pela Nested-PCR para detecção do HCMV

A reação em cadeia da polimerase seguiu o método descrito por Saiki *et al* (1985 e 1988) com algumas modificações. Para cada reação de amplificação Foram utilizados 0,4 a 0,5 µl do DNA em estudo para um volume total de 20,0 µl de reação. Foram adicionados 50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 2 pmol de cada “primer” MIE4 e MIE 5 (*Tabela 01*), 200 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase.

Os ciclos de amplificação empregados para cada amostra compreenderam:

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

Trinta ciclos foram realizados automaticamente em termociclador Robocycler 40 (Stratagene). Os ciclos foram precedidos por um período de denaturação inicial a 94°C durante 5 minutos e no final, 7 minutos a 72°C para a extensão final. As condições de reação para a *n*PCR foram as mesmas utilizadas na 1ª PCR. Nesse caso, uma alíquota do produto da 1ª reação foi usada como molde para amplificação com o par de “primers” interno ao fragmento anterior (IE – “immediate early”) (*Tabela1*).

Para a nested os ciclos empregados foram:

- Denaturação: 94°C - 40 segundos;
- Anelamento: 55°C – 40 segundos;
- Extensão: 72°C - 1 minuto

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

Tabela 1- Primers para detecção do HCMV, Sequência descrita por BRYTTING *et al.*, 1991.

Nome	Sequência	Sentido
MIE 4	5' CCAAGCGGCTCTGATAACCAAGCC 3'	“sense”
MIE 5	5' CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG 3'	“antisense”
IE 1	5' CCACCGCTGGTGTGAGCTCC 3'	“antisense”
IE 2	5' CCCGCTCCTCCTGAGCACCC 3'	“sense”

3.4- Amplificação gênica pela Nested-PCR, para detecção do HHV-6

A amplificação para o HHV-6 seguiu o seguinte protocolo: A reação continha 5µl da amostra do DNA em estudo (obtida da extração anteriormente descrita) em um volume total da mistura de 50 µl, contendo 10 mM Tris HCl (*pH* 8,3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 10 pmol de cada primer (*Tabela 2*) e 1,25 unidade de *Taq* DNA polimerase. Os ciclos de amplificação empregados para cada amostra compreenderam:

- Denaturação: 94°C - 1 minuto;
- Anelamento: 56°C - 1 minuto;
- Extensão: 72°C - 1 minuto e 30 segundos.

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

Para a *n*PCR as condições foram as mesmas utilizadas na primeira PCR, nesse caso, uma alíquota do produto da 1ª reação foi usada como molde para amplificação com o par de “primers” interno ao fragmento anterior (IN3 e IN4)(*Tabela2*).

Quarenta e cinco ciclos foram realizados automaticamente em termociclador Robocycler 40 (Stratagene). Os ciclos foram precedidos por um período de denaturação inicial a 96°C durante 10 minutos e no final, 10 minutos a 72°C para a extensão final.

Tabela 2- Primers para detecção do HHV-6 Sequência descrita por SECCHIERO *et al.*, 1995

Nome	Sequência	Sentido
HHV6(A/B) 1+(EX-1)	5' GCGTTTTTCAGTGTGTAGTTCGGCAG 3'	“sense”
HHV6(A/B)1- (EX-2)	5' CGCTAGGTTGAGGATGATCGA 3'	“antisense”
HHV6(A/B)2+ (IN-3)	5' GCTAGAACGTATTTGCTGCAGAAC 3'	“sense”
HHV6(A/B)2- (IN-4)	5' ATCCGAAACAACGTCTGACTGGC 3'	“antisense”

3.5- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção do gene da β -globina humana

A validação das amostras de DNA amplificadas para o HHV-6 e HCMV foi feita pela amplificação do gene da β -globina humana.

A reação em cadeia da polimerase seguiu o método descrito por Saiki *et al* (1985) com algumas modificações. Para cada reação de amplificação Foram utilizados 0,8 μ l do DNA em estudo para um volume total de 20,0 μ l de reação. Foram adicionados 50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 0,1 μ M de cada “primer” PCO3 e PCO4 (Tabela 3), 0,5 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase.

Trinta ciclos foram realizados automaticamente em termociclador Robocycler 40 (Stratagene). Os ciclos foram precedidos por um período de denaturação inicial a 94°C durante 5 minutos e no final, 7 minutos a 72°C para a extensão final. Os 30 ciclos compreenderam:

- Denaturação: 94°C - 45 segundos;
- Anelamento: 55°C – 45 segundos;
- Extensão: 72°C - 1 minuto

Tabela 3- Primers para detecção Da β -globina humana Sequência descrita por SAIKI *et al.*, 1988

Primer	seqüência	sentido
PCO3	5'CCTCTGACACAACGTGTGTTCACTAGC3'	“sense”
PCO4	5'TCACCACCAACTTCATCCACGTTTCACC3'	“antisense”

3.6- PCR em tempo real

3.6.1- Nested PCR para obtenção da amostra padrão para a PCR em tempo real

Para estas amplificações foram utilizadas como amostras a cepa do HCMV e o controle positivo do HHV-6, e os primers sintetizados especificamente para a PCR em Tempo Real (Tabelas 4 e 5) (figuras 3 e 4). A primeira reação foi realizada nas seguintes condições: 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 10mM de cada “primer” US 17 F ext e US 17 R, para detecção do HCMV (*Tabela 4*), e, os primers U67 F e U67 R ext para detecção do HHV-6 (*Tabela 5*), 10mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase e água estéril para completar um volume final de 20 μ l. Os ciclos foram precedidos por um período de denaturação inicial a 95°C durante 2 minutos e no final, 5minutos a 72°C para a extensão final.

Os 30 ciclos de amplificação utilizados compreenderam:

- 95°C - 15 segundos
- 60°C - 30 segundos
- 72 °C - 40 segundos

A nested PCR foi realizada utilizando-se 1µl do produto da reação anterior nas mesmas condições, alterando-se apenas os primers específicos que para esta amplificação foram: primers US17 R e US17 F para detecção do HCMV (Tabela 4) e primers U67 F e U67 R para detecção do HHV-6 (tabela 05) num volume final de 50µl. Os ciclos foram precedidos por um período de denaturação inicial a 95°C durante 3 minutos.

Os 50 ciclos de amplificação utilizados compreenderam:

95°C - 15 segundos

60°C - 1 minuto

Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. O tamanho final dos produtos foi de 81pb para o HCMV e 164pb para o HHV-6.

3.6.2- Reação de ligação e clonagem

Para esta etapa, foi utilizado o *Kit PROMEGA P GEM – T Easy Vector System I*, onde ao volume de reação de 10 µl, misturou-se 1ul do plasmídeo (50ng/µl), 3µl do produto da Nested PCR realizada acima, 5 µl da solução tampão e 1µl da T4 DNA ligase, completando-se com água para 10 µl. A mistura foi homogeneizada e deixada a 4°C de um dia para outro. Adicionou-se, então, cerca de 5µl dessa reação a 200 µl da cultura de células competentes (*E. coli*). Esta mistura foi deixada por 20 minutos no gelo e 1h e 30min a 42°C, e após, por 2 minutos no gelo. Inseriu esta reação em cerca de 800 µl de meio SOC, deixando-se incubar por 1 hora a 37°C, agitando-se em termomix (Thermomixer Comfort – Eppendorf). A seguir, a cultura foi centrifugada a 8.000 RPM por 1 minuto e mais da metade da solução foi descartada. O *pellet* foi homogeneizado e, com alça de vidro, aplicado em meio de cultura na Placa de Petri (cerca de 200 µl). Deixou-se a placa em estufa a 37°C de um dia para outro.

Após o crescimento das colônias, as colônias brancas são pescadas com palitos descartáveis, ou seja, aquelas que não expressaram o gene *lacZ*. Cada colônia foi inserida em um poço da placa em meio *Circle Grow*, deixando crescer a 37°C, de um dia para outro. Realizou-se, então, a partir da cultura turva, a PCR para amplificação do inserto para posterior purificação e seqüenciamento. A PCR seguiu o seguinte protocolo para uma reação de 15 µl: 2µl da cultura do plasmídeo, 1,5 µl de solução tampão, 1,5 µl de dNTP (1,25 mM), 0,5 µl de MgCl₂ (50mM), 0,35 µl do iniciador *sense* e 0,35 µl do iniciador *antisense* (do plasmídeo), 0,35 µl de *Taq* DNA polimerase, 8,6 µl de água estéril, submetidos ao seguinte ciclo de amplificação: desnaturação inicial: 2 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos:

- 94 °C por 20 segundos
- 58 °C por 15 segundos
- 72°C por 1 minuto

O produto da PCR foi então submetido à eletroforese e visualizado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, para a confirmação do inserto.

3.6.3- Seqüenciamento automatizado

A reação foi submetida à purificação e seqüenciamento automatizado em aparelho *ABI PRISM 377*. Para realizar o seqüenciamento, utilizamos 1,2µl da amostra de cada produto da PCR anterior, 1 µl de primer antisense do vetor, 4 µl do pré mix que é um regente pronto contendo o corante para o seqüenciamento e 9 µl de água estéril. A reação foi submetida ao seguinte ciclo de amplificação: desnaturação inicial de 1 minuto a 96°C, seguidos de 30 ciclos:

- 96 °C por 10 segundos
- 57°C por 5 segundo
- 60°C por 4 minutos

O produto da PCR foi submetido a uma reação de precipitação utilizando o seguinte protocolo: foram adicionados 2µl de acetato de amônio 7,5M e 50 µl de etanol 100%. Após permanecer 15 minutos no escuro, a reação foi centrifugada por 30 minutos a 4000 rpm, e o sobrenadante descartado. Foram acrescentados 100 µl de etanol 70% e seguiu-se centrifugação por 15 minutos a 4000rpm. As amostras foram então aquecidas a 65°C por 5 minutos e seqüenciadas no *ABI PRISM 377*.

As seqüências obtidas foram comparadas às seqüências com a literatura e *Gen Bank* para confirmar os insertos de 81 pb do HHV-6 e 164 pb do HCMV.

3.6.4- Extração do DNA do fragmento clonado e linearização do plasmídeo

Após confirmação do inserto pelo seqüenciamento, realizou-se a cultura da amostra desejada em meio SOC a 37°C por cerca de 12 horas, em seguida extraiu-se o DNA do plasmídeo com um kit SV Wizard Purification System (*Promega*), conforme o protocolo do fabricante.

A partir da leitura em espectrofotômetro do DNA referente ao plasmídeo, fez-se a digestão com enzima de restrição, no caso, *ECO RI*, para linearização do DNA circular. A digestão foi realizada com 1µg da DNA, 1µl de Tampão 10x, 1µl da enzima *ECO RI* e água num volume final de 10 µl. Esta reação permaneceu 12 horas a 37°C. A partir do produto desta reação foi feita a PCR em Tempo Real com SYBR® Green.

3.6.5- Padronização da concentração dos primers

Para a padronização da concentração dos primers foi escolhida uma concentração fixa de amostra e variadas as concentrações de primers nas seguintes condições: 6 µl de SYBR® Green, 3 µl do mix de primers e 3 µl do mix de amostra. As amplificações foram feitas no GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Perkin Elmer/Applied Biosystems Division)

3.6.6- Eficiência da reação – curva padrão

Após a determinação da concentração ideal de cada primer, foram realizadas as reações para PCR em tempo Real variando as concentrações das amostras nas seguintes condições: 6 µl de SYBR® Green, 3 µl do mix de primers e 3 µl do mix de amostra. As amplificações foram feitas no GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Perkin Elmer/Applied Biosystems Division)

3.6.7- Determinação da concentração de DNA

A concentração das amostras de DNA provenientes de sangue e soro foi determinada por espectrofotometria no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 em comprimento de onda 260nm e com avaliação da pureza das amostras.

3.6.8- Reação de amplificação em tempo real para detecção do HCMV

As amostras foram ajustadas para uma concentração final de 5ng para preparo do mix, que consiste de DNA e água para um volume final de 3µl por well. Os primers também são ajustados com água para um volume final de 3µl por well. A reação de amplificação em tempo real foi feita da seguinte maneira: 5 ng de DNA, 300nM de cada primer *US17F* e *US17R*, (Tabela 4) e 6,0µl de Mix de reagentes contendo : tampão 10X; 3mM de MgCl₂ ; 10 µM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 2 µM da sonda HCMV (tabela 04) (PE Applied Biosystems) e 5 U/ µl da enzima *Platinum Taq*. Os ciclos foram precedidos por um período inicial de 50°C durante 2 minutos para inativação do anticorpo seguido de denaturação inicial a 95 °C por 10 minutos.

Os 40 ciclos de amplificação utilizados compreenderam:

95°C - 15 segundos

60°C - 1 minuto

Os resultados foram então analisados através do GeneAmp 5700 SDS Software.

Tabela 4- Primers e sonda para detecção do HCMV

Nome	Seqüência	Sentido
US 17 F	5' GAAGGTGCAGGTGCCCTG 3'	“sense”
US 17 R	5' GTGTCGACGAACGACGTACG 3'	“antisense”
US 17F ext	5' AGCAGGGCCAAACAGATG3'	“sense”
Sonda HCMV	5' FAm ACGGTGCTGTAGACCCGCATACAAA TAMRA3'	

3.6.9- Reação de amplificação em tempo real para detecção do HHV-6

O DNA das mesmas amostras de sangue e soro que foram testadas para detecção do HCMV foi submetido a reação de amplificação do HHV-6, através do mesmo procedimento utilizando também 5 ng de DNA, 150nM de cada primer *U67F* e *U67R*, (Tabela 5) e 6,0µl de Mix de reagentes contendo : tampão 10X; 3mM de MgCl₂ ; 10 µM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 2 µM da sonda HHV-6 (Tabela 5) (PE Applied Biosystems) e 5 U/ µl da enzima *Platinum Taq.* (PE Applied Biosystems), e submetido às mesmas condições de ciclagem.

Tabela 5- Primers e sonda para detecção do HHV-6. Seqüência de primers modificada de (LOCATELLI, et al 2000). Sonda: seqüência desenhada especificamente para este estudo.

Nome	Seqüência	Sentido
U67 F	5' GCGTTTTCACTGTGTAGTTCGG 3'	“sense”
U67 R	5' AAAGCCAAATTATCCAGAGCG 3'	“antisense”
U67 R ext	5'GCAAATACGTTCTAGCCATCTTCT3'	“sense”
Sonda HHV-6N	6FAM 5' AAGGAATAACGCTCGTCACAAACATAAAAT3'TAMRA	

3.6.10- Reação de amplificação em tempo real para detecção da β actina

A reação de amplificação em tempo real para detecção do gene da β actina foi realizada pelo sistema TaqMan. As condições da reação foram: 3mM de MgCl₂, 10mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 3µM de cada primer (seqüências não fornecida pelo fabricante, (Tabela 6) , 2µM da sonda (seqüência não

fornecida pelo fabricante, (Tabela 6), 5U/μl da enzima *Platinum taq*, tampão 10x, 10ng de amostra e água para um volume final de 12 μl. Os ciclos foram precedidos por um período inicial de 50°C durante 2 minutos para inativação do anticorpo seguida de denaturação inicial a 95 °C por 10 minutos.

O produto foi então submetido 40 ciclos que compreenderam:

95°C - 15 segundos

60°C - 1 minuto

Os resultados foram então analisados através do GeneAmp 5700 SDS Software.

Tabela 6- Primer e sonda para detecção da β-actina humana.

TaqMan® B-actin	Human Control DNA, B-actin Probe (FAM™ Probe) 2uM, B-	Part Number
Detection Reagents	actin Forward Primer 3uM, and B-actin Reverse Primer 3uM.	401846

```

TTACGCCATG GTTCGCGTGA GGTTCCTCTG TACCTCCCGC AAAAGGTCAC AGCCCGAAATGAGGCGCGCT
TGGTGCCCCCGGTGGCGCGTGACGATAACCAGGTCATCCAAGCGATGAGTTTGTCTAATGAGTCCTCGGTGGT
GAAGAGGATGAGAATGAGCAGGTACAGGTACACCAGGTTCTCATAGAGACACAAGGTGAGCAGGTCAGCCTC
GGACCACGCGATCTCAAACAGGCGCGTGGTGTCAAAGACCGTGACGACCAGCATGAAGCTGAGCGCCATGGC
GTAATAGCCCCAAAAAGTTTGTGCCCCAACGGTACGGGCTGCAGGTAAAGTGCGATCAAGAACGCGATAAC
GCCGATCACAAACAGCGTGACGATGACCTGCCATCGACGGTGATTATGGCCGGCTAGACCCGTGACGCAGCT
GCAGAGGCTAAAAAGCACGCAAGCCAAGAGGCCCGAGAAGGTCACTAGCGTAGAGGAGGAGCAGGCGCTGG
CCACGATCACCGAAAGCGTCGTGAGCACGCTATAAATGGTGAGCAGGCCAGGGCTCGGTGGCGACGTGAACG
ATCCTTCATCGCGTTTGCCGTGCAGCAGGGCCAAACAGATGGTGGGCACCATCAAACCTTAAGGGCGGCATAAA
GCCGGTGCAACAGAGAAAGACGGTGCCCTTTAAGATGCGGAAAAGCCAGCACCAGGCCAGACAGAGCAAPrimer senseGAA
GGTGCAAGGTGCCCTGCACGGCCACGGTGCTGTAGACCCGCATACAAAGTAAAAAGCGACGTACGTCGTTCTGTC
GACACGGAGGAAATCATAATGACTCCGCGCAGGGTCGCGGGGTGGGGCGCCCAGGCCGTCCCGGTGGCCT
CTGAGTTTCGGAGACAT

```

Figura 3- Sequência de nucleotídeos da região US 17 do HCMV com primers e sonda utilizados para a PCR em tempo real.

ATGTGGGTTATGTCGCAGGTACGTAGCATGGAGCCCGACCTTACGTTGGCGGCGGTCTATCAGGCGGCGG
 CGAACCTCACAGAGCAAGATAAGGAGATTTTGGCGAAGCGGTAAAACTCGTTCCTCAGTGTAGTTCGG
 CAGCCCCGAGCGCTAGGTTGAGGATGATCGAAACGCCTACACAGAAATTTATGTTTGACGAGCGTTATTC
 CTTGGGTTGACGCTCTGGTGAAAAAAACAAAGTTAAATATCGATGCCGCTCTGGATAATTGGCTTTGTC
 GTTTGCGAACAAAAATCAAGAAGATGGCTAGAACGTATTGCTGCAGAACGTTTTCGGACTCAAGATCA
 ACAAGTTGCCATTTTCGGGGAAGTACATTTTGTATACAAAAACACATTGAAACGCTTTTGTATCGATAAGA
 CGAAGTTAGTTAAAAAATTCTCGAGTATGCCGAGACCCCTAATCTGTTAGGATATACCGATGTGCGTGATCTT
 GAATGTTTACTTTGGTTAGTGTGTTTGTGGTCCTAAAGTTTTCGCCAGTCAGACAGTTGTTTCGGATACAGTAAG
 ACGGGATATAATGCCGCGTTTCCAAATCTATTGCCTCCGTATCTGTACGAATGCGGCCAAAATAATGGACTGTT
 TTTTGGCATTGTGCAAGCTTACGTGTTTTCTTGGTACTCAGATTTTGATTTTTCGGCGCTTGAGATTTTCAGAACG
 CGCTCGTCGTCGAATCAGGTCACTCCTGTACGACTTAAACAGAAAGTTTTCGGGAGCAAGAAGTTTCTGTTTTAT
 CGGTAGCGTCACAGATGTGTATCTTTTGTGCATTATATAAACAAAAACAACTTAGTCTAGAATACGTTTCTGGTG
 ACTTAAAGACTTCTGTTTTAGTCCAATTATAATAAAGGATTGTTTATGCGCGCAGACGACAATTTCTACAACCTCA
 GATGCTGCCAGGTACAAAGAGCTCAGCCATATTCCGGTATATGACCTTCGTAAGCTGCTCGGTGCGCTTGTCAT
 TTTTCGGAAGGTAGTGTCAAGTTTCGACATATAA

Figura 4- Sequência de nucleotídeos da região U 67 do HHV-6 com primers e sonda utilizados para a PCR em tempo real.

3.7- Transcrição reversa acoplada a nested-PCR

3.7.1- Separação de células para extração de RNA

O primeiro passo para a extração de RNA foi separar as células aonde os vírus em estudo se encontram. Foram separados os neutrófilos, onde podem detectar-se o HCMV e os linfócitos onde pode detectar-se o HHV-6. O processo de separação ocorreu da seguinte forma: Em um tubo de centrífuga foi colocado 3ml de histopaque®1119 (Sigma) sobre ele foram adicionados 3ml de histopaque® 1077 e cuidadosamente sobre eles foram adicionados 5ml de sangue total com EDTA. As amostras foram centrifugadas a 700g por 30 minutos. Este procedimento permitiu a separação dos dois diferentes tipos celulares em fases distintas devido a diferença de densidade. A camada contendo as células mononucleares foi transferida para outro tubo, e então lavada com PBS em centrifugação a 1600 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet foi submetido a extração de RNA. A camada contendo os neutrófilos foi transferida para outro tubo e também lavada com PBS

em centrifugação a 1600 rpm por 10 minutos. Realizou-se então lise de hemácias com solução em centrifugação a 1600rpm por 10 minutos. Seguiu-se então uma nova lavagem com solução de PBS em centrifugação a 1600rpm por 10 minutos. O pellet de neutrófilos foi submetido a extração de RNA.

3.7.2- Extração de RNA para detecção dos *Herpesvírus* HCMV e HHV6

O RNA total das células foi extraído com a adição de 1ml do reagente comercial TRIZOL® às células separadas das amostras de sangue total e homogeneizou-se consistentemente. Após um repouso de 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir a dissociação completa dos complexos de nucleoproteínas, adicionou-se 200 µl de clorofórmio a cada amostra e agitou-se vigorosamente por 15 segundos. Após permanecer em repouso em temperatura ambiente por 5 minutos, as amostras foram centrifugadas a 13500 rpm por 15 minutos a 4°C para separação da fase orgânica, onde o DNA está contido, e da fase aquosa, onde encontra-se o RNA. Transferiu-se a fase aquosa para outro tubo e precipitou-se o RNA com a adição de 500 µl de álcool isopropílico. Após permanecerem em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos as amostras foram centrifugadas a 13500 rpm por 10 minutos a 4°C, o pellet de RNA foi ressuspense em 1000 µl de álcool etílico 75% gelado e a amostra foi centrifugada a 11800 rpm por 5 minutos a 4°C. O RNA foi então eluído em 20 µl de água livre de RNase.

3.7.3- Determinação da concentração de RNA

A concentração das amostras de RNA foi determinada por espectrofotometria no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 em comprimento de onda 260nm e com avaliação da pureza das amostras.

3.7.4- Transcrição reversa

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando-se o Transcriptor high fidelity cDNA synthesis Kit (Roche) segundo instruções do fabricante, posteriormente foram realizadas as amplificações gênicas para o HCMV, HHV-6 e β -actina.

3.7.5- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase para detecção do cDNA do HCMV

A reação de amplificação para detecção do cDNA do HCMV foi realizada utilizando-se 2µl do cDNA obtido da reação de transcrição reversa na presença de tampão 10X, 2mM de MgCl₂, 10mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 10µM de cada primer específico SLG1 e SLG2 (*Tabela 7*) e 5U/µl de *Taq polymerase*. Os 30 ciclos foram precedidos por um período de denaturação inicial a 94°C durante 1 minuto e no final, 7 minutos a 72°C para a extensão final.

A reação foi submetida as seguintes condições:

94°C - 1 minuto

55°C - 2 minutos

72°C - 3 minutos

Foram realizadas nested PCR com 1µl dos produtos da reação anterior nas seguintes condições: tampão 10X, 2mM de MgCl₂, 10mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 10µM de cada primer específico SLG 3 e SLG4 (*Tabela 7*) e 5U/µl de *Taq polymerase*, nas mesmas condições de ciclagem da primeira amplificação.

Tabela 7- Primers para detecção do cDNA do HCMV.

Nome	Seqüência	Sentido
SLG1	5'CTATGGATCTTGAGCTTACT 3	“sense”
SLG2	5'TCGCTGCCATCTCCGTCTGT 3'	“antisense”
SLG3	5'GTGACCTTGACGGTGGCTTT 3'	“sense”
SLG4	5'CGTCATACTCCCCGAGTAA 3'	“antisense”

3.7.6- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase para detecção do cDNA do HHV-6

As amostras de cDNA obtidas da transcrição reversa foram amplificadas seguindo o seguinte protocolo: 2µl do cDNA obtido da reação de transcrição reversa na presença de tampão 10X, 2mM de MgCl₂, 10mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 10µM de cada primer específico GP 6 1 e GP 6 2 (*Tabela 8*) e

5U/μl de *Taq polymerase* . Os 30 ciclos foram precedidos por um período de denaturação inicial a 94°C durante 5 minutos e no final, 57 °C por 2 minutos e 7 minutos a 72°C para a extensão final e foram submetidas as seguintes condições de ciclagem:

57°C - 45 segundos

72°C - 45 segundos

94 °C - 1 minuto

Foi realizada Nested PCR utilizando 1μl do produto da reação anterior, tampão 10X, 2mM de MgCl₂, 10mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 10μM de cada primer específico GP 6 3 e GP 6 4 (*Tabela 8*) e 5U/μl de *Taq polymerase*, e submetidas as mesmas condições de ciclagem utilizadas para a primeira amplificação. Os resultados obtidos foram avaliados em gel de agarose 2%.

Tabela 8- Primers para detecção do cDNA do HHV-6.

Nome	Seqüência	Sentido
GP6 1	5` CTAAATTTTCTACCTCCGAAATGT 3`	“sense”
GP6 2	5` GAGTCCATGAGTTAGAAGATT 3`	“antisense”
GP 6 3	5` ACTACTACCTTAGAAGATATAG 3`	“sense”
GP6 4	5` AAGCGCGTGCAGGTTTCCCAA 3`	“antisense”

3.7.7- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase para detecção do gene da beta actina humana

A detecção do gene da beta actina humana foi realizada utilizando-se 1μl do cDNA na presença de tampão 10X, 2mM de MgCl₂, 10mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 10μM de cada primer específico βactina1 e βactina2 (*Tabela 9*) e 5U/μl de *Taq polymerase*. Os 30 ciclos foram precedidos por um período de denaturação inicial a 96°C durante 2 minutos e no final, 5 minutos a 72°C para a extensão final e foram submetidas as seguintes condições de ciclagem:

96°C - 30 segundos

55°C - 30 segundos

72 °C - 1 minuto

Tabela 9- Primers para detecção do cDNA da β actina humana.

Nome	Seqüência	Sentido
β actina 1	5'AAGAGATGGCCCGGCTGCT3'	“sense”
β actina 2	5'TCGCTCCAACCGACTGCTGT3'	“antisense”

3.8- Seqüenciamento do cDNA

Para confirmação da detecção do mRNA do HHV-6 e do HCMV alguns dos produtos da RT-*n*PCR, foram selecionados e seqüenciados separadamente. A amplificação para seqüenciamento automatizado foi realizada com o DYEnamicTM Terminator Cycle Sequencing Kit (MegaBACETM) (Amersham Pharmacia Biotech, Inc Cleveland, Ohio, USA). Para esta reação foi utilizado cerca de 30 ng do produto de PCR purificado, quantificado através de gel de agarose 1,5%, 3 μ M de iniciador sense e anti-sense (em reações separadas), 4 μ l da solução DYEnamic ET Reagent Premix e água deionizada estéril (volume final 15,0 μ l). A reação, distribuída em placa própria para seqüenciamento, foi protegida da luz com papel de alumínio. Em termociclador (GeneAmp® PCR System 9600 – Applied Biosystems), as amostras foram submetidas a desnaturação inicial de 96°C por 2 minutos seguido de 30 ciclos que consistiram em:

96°C - 20 segundos

57°C - 15 segundos

60 °C - 1 minuto

O produto da reação de seqüenciamento foi precipitado adicionando-se 2,0 μ l de acetato de amônio 7,5M e 50,0 μ l de etanol absoluto aos 15,0 μ l de reação, com posterior homogeneização. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente protegido da luz, a placa foi centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi removido por

inversão e a seguir foram adicionados 100,0 µl de etanol 70%. Posteriormente o material foi centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos. Novamente o sobrenadante foi desprezado por inversão tomando-se o cuidado de não remover o *pellet*. Para completa remoção do etanol, a placa foi submetida à centrifugação invertida a 200 rpm por 6 segundos e finalmente aquecida em termobloco a 65°C por 5 minutos para a secagem das “wells”. Para a eletroforese, foi adicionado 10,0 µl de loading buffer, uma mistura de formamida deionizada, 25mM EDTA (pH 8,0) em cada “well”. As amostras foram homogeneizadas, aquecidas a 65°C por 3 minutos e colocadas em gelo para, a seguir, serem submetidas à eletroforese em seqüenciador automatizado.

Após eletroforese, o Software MegaBACE analisou as seqüências e as amostras foram alinhadas e comparadas ao HHV-6 e ao HCMV através do programa BLAST 2 SEQUENCES (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>).

3.9- Análise estatística

Os resultados foram comparados utilizando o teste de Fisher (“Fisher’s exact test”). Os pacientes foram monitorizados até o dia 150 após o transplante. Todos os dados foram analisados utilizando estatística descritiva (mediana para variáveis contínuas e porcentagens para variáveis categóricas). A probabilidade de eventos (ex: RT-*n*PCR e nested-PCR sangue positivo) foram analisadas utilizando o método de Kaplan-Meier (“estimate of a survival curve using the Kaplan-Meier method”). Os fatores de risco incluídos foram infecção oportunista, rejeição ao transplante, distúrbio neurológico e DECH. Sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos utilizados foram calculados através de contingência.

O valor de $P < 0.05$ foi considerado como estatisticamente significante.

4- RESULTADOS

4.1- Características dos pacientes envolvidos no estudo

Participaram do estudo 30 pacientes receptores de transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas atendidos e acompanhados pelo Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da UNICAMP, cujas características são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10- Características dos pacientes que receberam transplante de células tronco hematopoiéticas do tipo alogênico, envolvidos no estudo.

Característica	
<i>Idade – média em anos</i>	40.5 (16-56)
<i>Sexo – masculino/feminino</i>	17/13
<i>Doença de base – n (%)</i>	
Doenças hematológicas Malignas	
Leucemia Linfóide Aguda (LLA)	4 (13.33)
Leucemia Mieloide Aguda (LMA)	10 (33.33)
Leucemia Linfóide Crônica (CLL)	1 (3.33)
Leucemia mieloide Crônica (LMC)	4 (13.33)
Linfoma Não-Hodgkin(NHD)	2 (6.67)
Doença de Hodgkin (HD)	3 (10)
Mieloma Múltiplo (MM)	1 (3.33)
Mielofibrose	2 (6.67)
Doenças hematológicas não Malignas	
Anemia Aplástica Grave (AAG)	3 (10)
<i>GVHD – (n%)</i>	13 (43.33)
<i>Status sorológico Pre-transplante HCMV – (n%)</i>	
D+/R+	30(100)
<i>Regime de condicionamento – (n%)</i>	
transplante Mieloablativo	
BU + FLU	7 (23.33)
BU + Cy	6 (20)
BU+ Cy + VP-16	3 (10)
Cy + VP-16 + TBI	2 (6.67)
Cy + TBI	1 (3.33)
transplante Não myeloablativo	
FLU + TBI	9 (30)
FLU + TBI + ARA-C	1 (3.33)
<i>profilaxia – (n%)</i>	
CsP	2 (6.67)
CsP + MMF	7 (23.33)
CsP + MTX	20 (66.66)
CsP + MTX + Mitoxantrone + Cy	1 (3.33)
<i>Fonte de células tronco</i>	
Medula óssea	14 (46.67)
Sangue periférico	16 (53.33)
<i>Óbitos</i>	13 (43.33)

GVHD (Graft-versus-host disease, doença do enxerto contra o hospedeiro); BU (Bussulfan); FLU (Fludarabina); Cy (Ciclofosfamida); VP-16 (Etoposide); TBI (Total body irradiation); ARA-C (Citarabina); CsP (Ciclosporina); MMF (Mycophenolate mofetil); MTX (Methotrexate).

4.2- Nested-PCR para detecção do HCMV

Foram realizadas 557 amplificações de amostras de DNA de sangue e 557 de soro de 30 pacientes para detecção do HCMV (figuras 5 e 6). Vinte e cinco pacientes apresentaram amplificação positiva, e 21 pacientes (70%) apresentaram infecção ativa em amostras de DNA de leucócitos. Das amostras de DNA de soro, 17 pacientes (56,66%) apresentaram infecção ativa para o HCMV. A nested-PCR de DNA de soro apresentou sensibilidade e especificidade de 83% e 82%, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) de 77% e 87% respectivamente. A nested-PCR de DNA de leucócitos apresentou sensibilidade e especificidade de 85% e 44% e a VPP e VPN de 55% e 77% respectivamente. Encontramos correlação entre a detecção da infecção ativa por HCMV pela nested-PCR em soro e DECH (GVHD) ($p=0,003$).

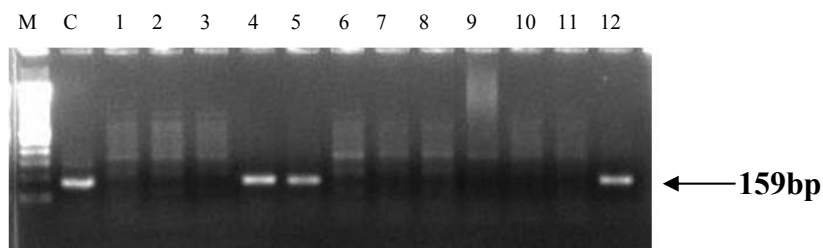


Figura 5- Produto da Nested-PCR para detecção do HCMV em amostras de DNA de sangue de pacientes receptores de transplante de medula óssea. M=marcador de peso molecular; C=controle positivo; 1,2,3,6, 7, 8,9,10 e 11=PCR negativo; 4,5 e 12=produto de PCR positivo.

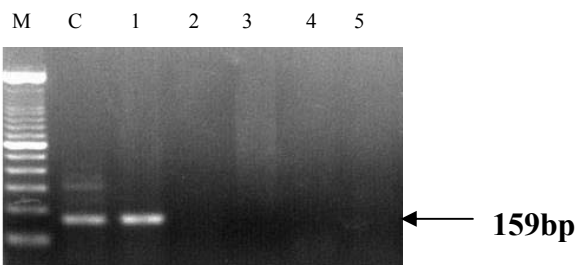


Figura 6- Produto da Nested-PCR para detecção do HCMV em amostras de DNA de soro de pacientes receptores de transplante de medula óssea. M=marcador de peso molecular; C=controle positivo; 1 = produto de PCR positivo; 2,3,4 e 5 = PCR negativo.

4.3- Nested-PCR para detecção do HHV-6

Foram realizadas amplificações de DNA de sangue e soro para detecção do HHV-6 (figura 7). Vinte e três pacientes apresentaram amplificação positiva e 14 apresentaram infecção ativa (46,7%). Porém, segundo dados da literatura a detecção do DNA do HHV-6 em células não é um bom indicativo da infecção ativa por HHV-6, devido a sua alta prevalência e persistência em monócitos/macrófagos podendo sua detecção refletir infecção ativa e latência. A nested-PCR em leucócitos apresentou sensibilidade de 72%, especificidade de 75% e valor preditivo positivo e valor preditivo negativo respectivamente de 64% e 81% quando comparado com a RT-nPCR como padrão. A nested-PCR em soro detectou infecção ativa por HHV-6 em 1 paciente.

A detecção da infecção ativa pela nested-PCR em sangue ocorreu com mediana de 34 dias.

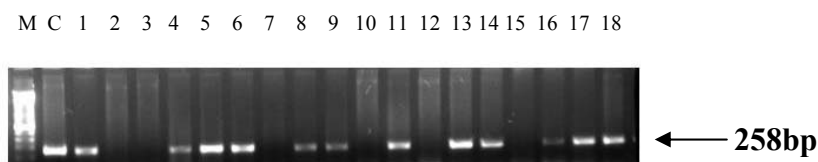


Figura 7- Produto da Nested-PCR para detecção do HHV-6 em amostras de DNA de sangue de pacientes receptores de transplante de medula óssea. M=marcador de peso molecular; C=controle positivo; 1,4,5,6,8,9,11,13,14,16,17,18 = produto de PCR positivo; 2,3,7,10,12 e 15 = amostras de pacientes com PCR negativo.

4.4- Transcrição reversa acoplada a Nested-PCR (RT-nPCR) para detecção do HCMV e do HHV-6

Das 557 amostras de sangue total foram separadas as frações de células polimorfonucleares e mononucleares para detecção do RNA viral do HCMV e HHV-6 respectivamente. Estas amostras celulares foram transcritas e amplificadas para detecção do HCMV (figura 9) e do HHV-6 (figura 8) e do gene da β actina humana para controle

interno da reação. As amplificações foram efetuadas utilizando-se primers exon-exon (região de splicing) o que permitiu uma diferenciação precisa da presença de DNA viral e do RNA. Seguiu-se eletroforese em gel de agarose 2% para visualização dos resultados.

A RT-PCR para detecção da infecção ativa por HCMV foi positiva em 15 pacientes (53,3%) e apresentou sensibilidade e especificidade de 56% e 71%, VPP e VPN de 86,7% e 34% respectivamente.

A detecção da infecção ativa por HHV-6 pela RT-PCR foi identificada em 9 pacientes (30%). Esta metodologia apresentou sensibilidade de 67% e especificidade de 100%. Os valores preditivos positivos e negativos encontrados foram de 25% e 100% respectivamente. Encontramos correlação entre a RT-nPCR e a nested-PCR em sangue ($p=0,024$)

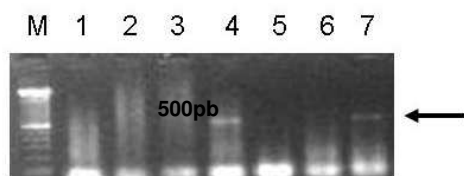


Figura 8- Eletroforese em gel de agarose 2% de produto de transcrição reversa acoplada a PCR para detecção do HHV-6. M=marcador de peso molecular; 1,2,3,5 e 6 resultado negativo; 4 e 7 resultado positivo indicando um cDNA com 500pb.

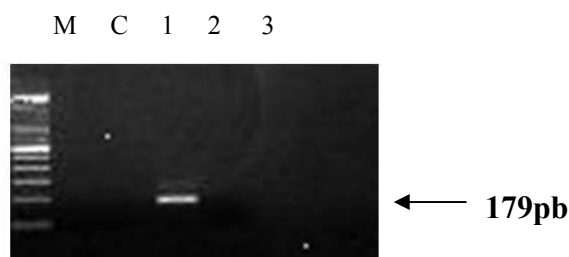


Figura 9- Produto da RT-PCR para detecção do HCMV em amostras de cDNA de sangue de pacientes receptores de transplante de células tronco hematopoéticas. M=marcador de peso molecular; C=controle negativo; 1 e 3= produto de RT-PCR negativo; 2 produto de RT-PCR positivo.

Foram realizados seqüenciamentos de produtos da RT-PCR e posterior confirmação dos resultados através de análise no *Gen Bank*.

Doze pacientes (12/30) foram positivos para o HHV-6 pela RT-PCR indicando taxa de infecção de 40%. As reinfecções ou reativações (infecções secundárias) ocorreram em 8 pacientes para o HCMV e em 6 pacientes para o HHV-6.

4.5- Detecção da carga viral do HCMV pela PCR em tempo real

Otimização, estabilidade e reproducibilidade da PCR em tempo real

As condições das reações foram otimizadas variando as concentrações dos primers e das sondas do vírus alcançando um valor ótimo para acumulação do sinal fluorescente e uma precoce medida dos valores do Ct. Para o HCMV a concentração ideal de primers foi de 300nM e a de sonda de 200μM. Várias concentrações de DNA foram testadas e concentração ideal encontrada foi de 5ng DNA

A curva padrão apresentou coeficiente de correlação de 0.999458 com slope de -3.54 e eficiência de 99%.

4.6- Determinação do ponto de corte (CUT-OFF) da PCR em tempo real para detecção do HCMV- análise da curva ROC

Utilizando resultados de antigenemia (≥ 1 célula positiva/200000) para detecção do HCMV realizados para rotina nos pacientes em seguimento neste estudo, e a carga viral detectada pela PCR em tempo real, foi possível encontrar um ponto de corte para a determinação da infecção ativa por HCMV em pacientes receptores de transplante de células tronco hematopoiéticas. Este valor foi encontrado através da construção e análise da curva Roc (figura 10). O valor ótimo de Cut-off encontrado em amostras de DNA de leucócitos foi 418,39 cópias virais/60 ng de DNA, com 71,4% de sensibilidade e 89,7% de especificidade.

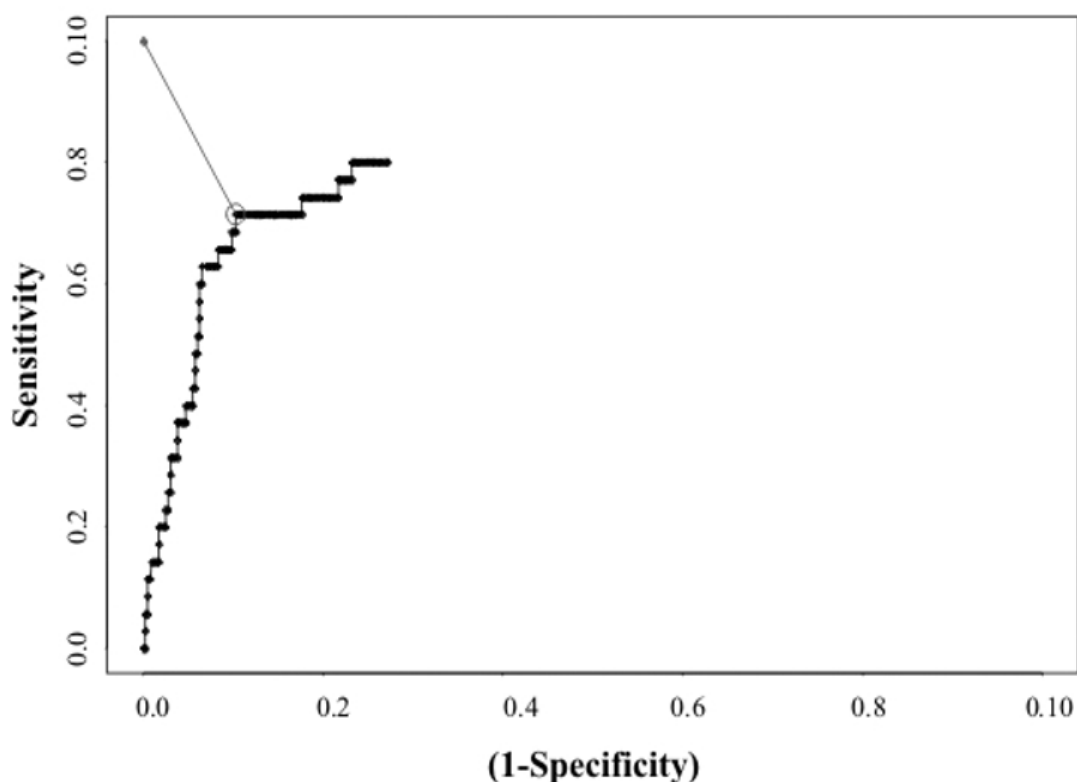


Figura 10- Curva ROC demonstrando o ponto de corte para detecção do HCMV

4.6.1- Amplificação em tempo real

Foram realizadas as reações de amplificação em tempo real para detecção do HCMV com DNA proveniente das 557 amostras de sangue e 557 amostras de soro dos pacientes em seguimento neste estudo (figuras 13 e 14). Para todas as amostras foram realizadas amplificações em tempo real para detecção da β actina humana (figuras 11 e 12) com sucesso possibilitando a validação das amostras.

A PCR em tempo real para detecção da infecção ativa por HCMV em amostras de DNA de leucócitos foi positiva em 23 pacientes (76,67%), a PCR em tempo real em soro detectou infecção ativa em 19 pacientes (63,33%). A sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real em leucócitos foram de 100% e 44% e os valores preditivo positivo e negativo foram respectivamente 59% e 100%. A PCR em tempo real em soro apresentou

sensibilidade e especificidade de 52% e 100%, e os valores preditivos positivos e negativos de 100% e 39% respectivamente.

Encontramos correlação entre a detecção da infecção ativa por HCMV pela PCR em tempo real em sangue e provável doença por HCMV ($p=0,048$).

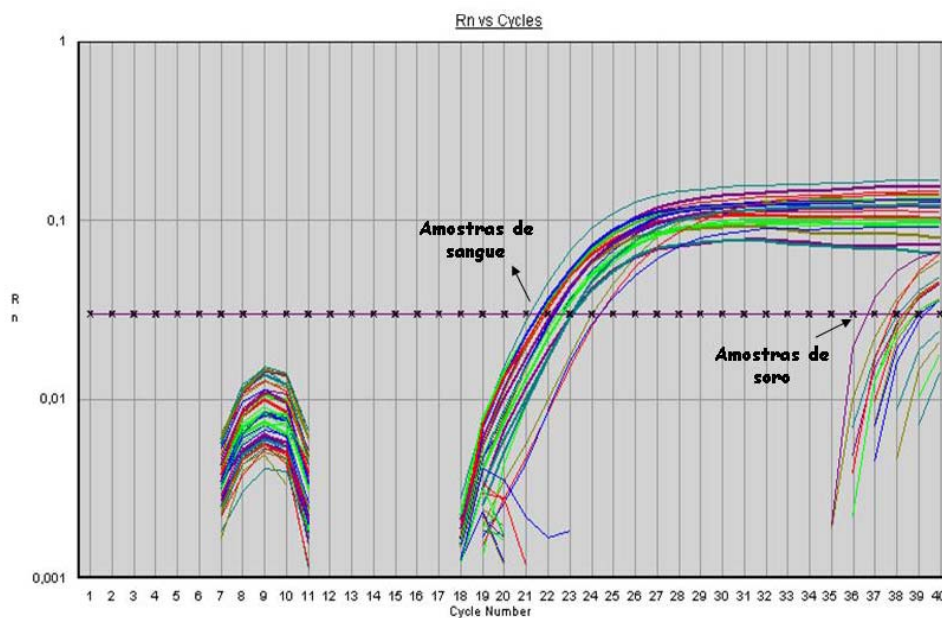


Figura 11- Curva de amplificação das amostras de DNA provenientes de sangue e soro para detecção do gene da β actina humana

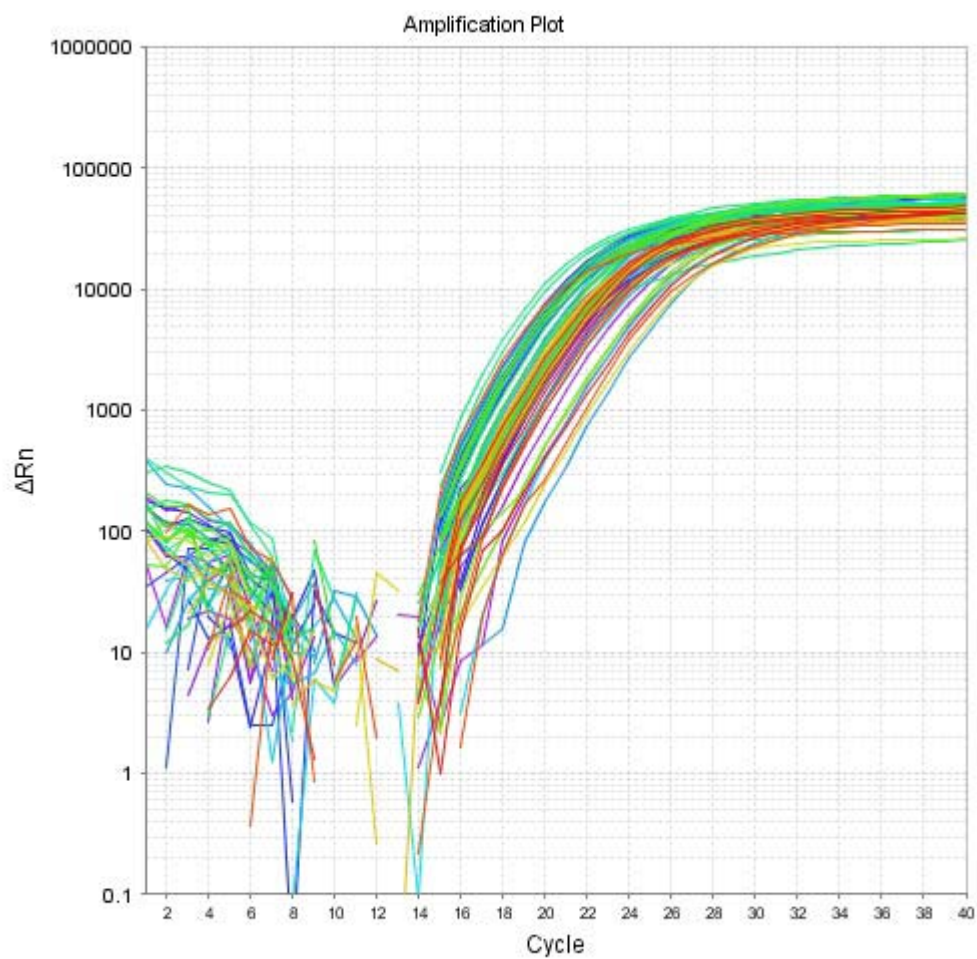


Figura 12- Curva de amplificação das amostras de DNA provenientes de sangue para detecção do gene da β actina humana

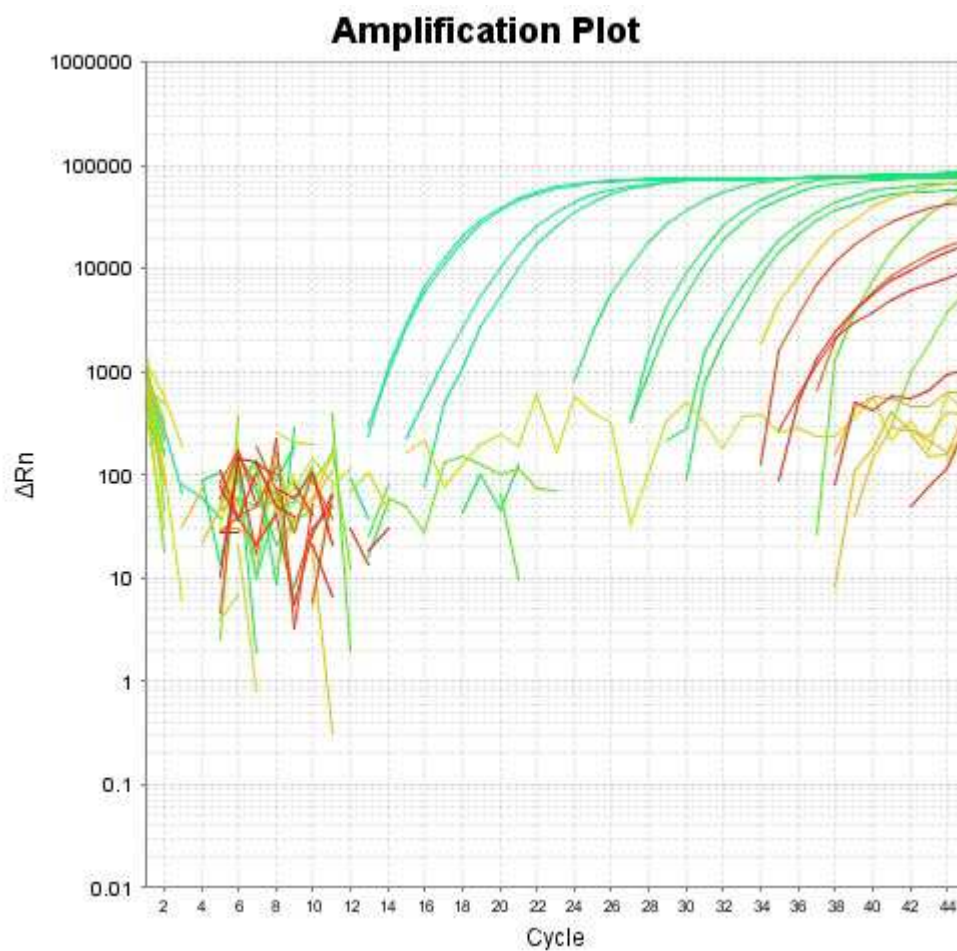


Figura 13- Curva de amplificação das amostras de DNA provenientes de sangue e soro para detecção HCMV.

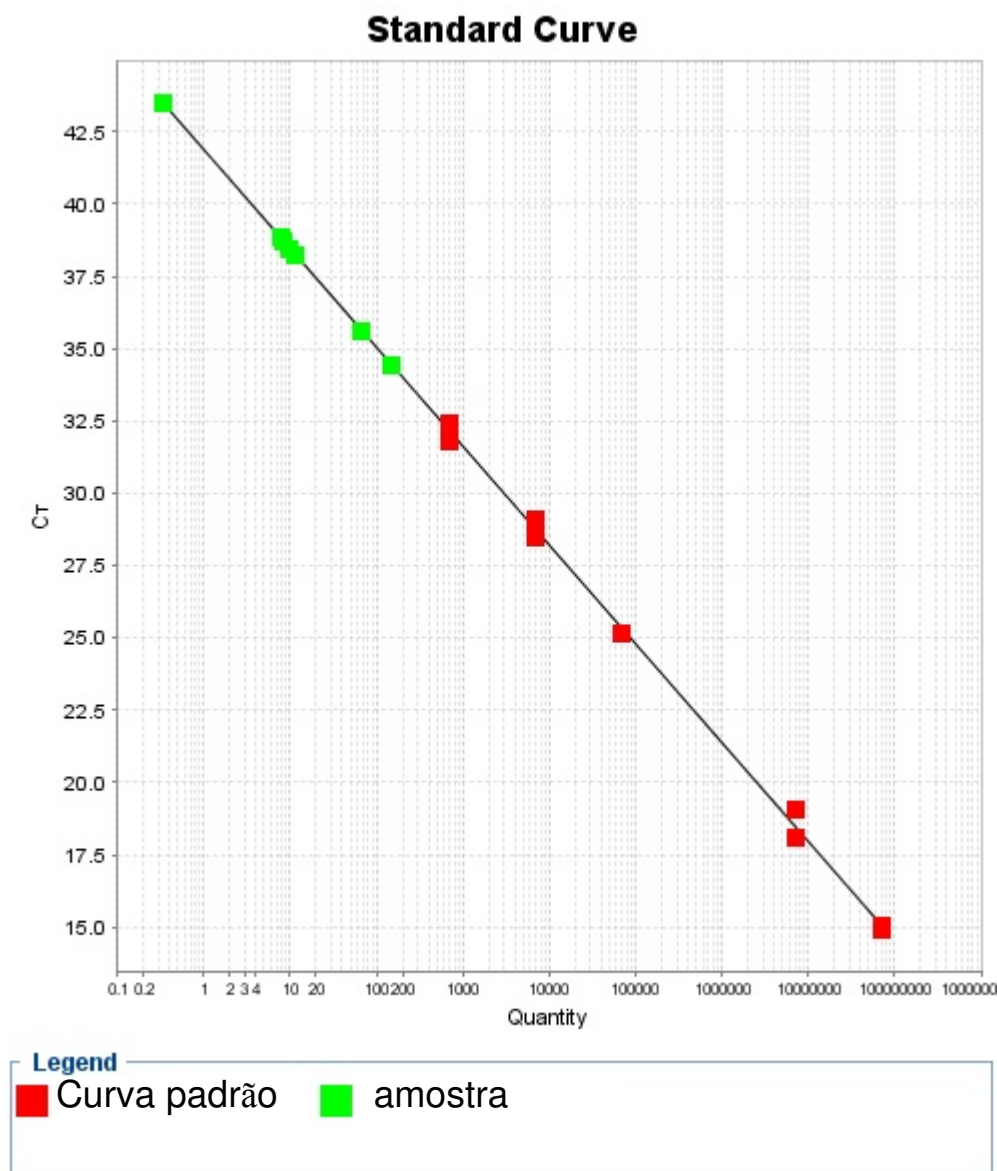


Figura 14- Curva de eficiência gerada da reação para detecção do HCMV, mostrando as amostras plotadas na curva padrão.

4.7- Detecção da carga viral do HHV-6 pela PCR em tempo real

Otimização, estabilidade e reproducibilidade da PCR em tempo real

As condições das reações foram otimizadas da mesma forma que foram realizadas para o HCMV. Para o HHV-6 o valor ótimo de primer foi de 150nM e o de sonda foi de 200 μ M.

A curva padrão apresentou coeficiente de correlação de 0.99 com slope de - 3.334 e eficiência de 99,5%

4.8- Determinação do ponto de corte (CUT-OFF) da PCR em tempo real para detecção do HHV-6

Para a detecção do HHV-6 neste grupo de estudo a antigenemia não foi realizada rotineiramente, sendo que desta forma a curva ROC não pode ser construída para este patógeno, porém, o monitoramento dos dois vírus foi realizado igualmente.

Utilizando dados da literatura (ARITAKI, et al,2001) obtidos de experimentos semelhantes em grupo de estudo submetidos ao mesmo tipo de transplante, acompanhados da mesma maneira e que estabeleceram o ponto de corte para o HHV-6 da mesma forma que efetuamos para o HCMV, utilizamos os valores encontrados nestas referências e inferimos em nossos resultados.

4.8.1- Amplificação em tempo real para detecção do HHV-6

Foram realizadas as reações de amplificação em tempo real para detecção do HHV-6 com DNA proveniente das 557 amostras de sangue e 557 amostras de soro dos pacientes em seguimento neste estudo (figura 15). Utilizando o valor de ponto de corte de 100 cópias/ng de DNA, 2 pacientes (6,66%) dos 30 avaliados neste estudo apresentaram infecção ativa por HHV-6 pela PCR em tempo real em sangue. 23 pacientes (76,66%) apresentaram infecção ativa detectada pela PCR em tempo real em soro. A PCR em tempo real em sangue apresentou sensibilidade de 8%, especificidade de 94% e VPP e VPN de 50% e 61% respectivamente. Em soro obtivemos sensibilidade e especificidade de 86% e 31% e valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de 52% e 71% respectivamente.

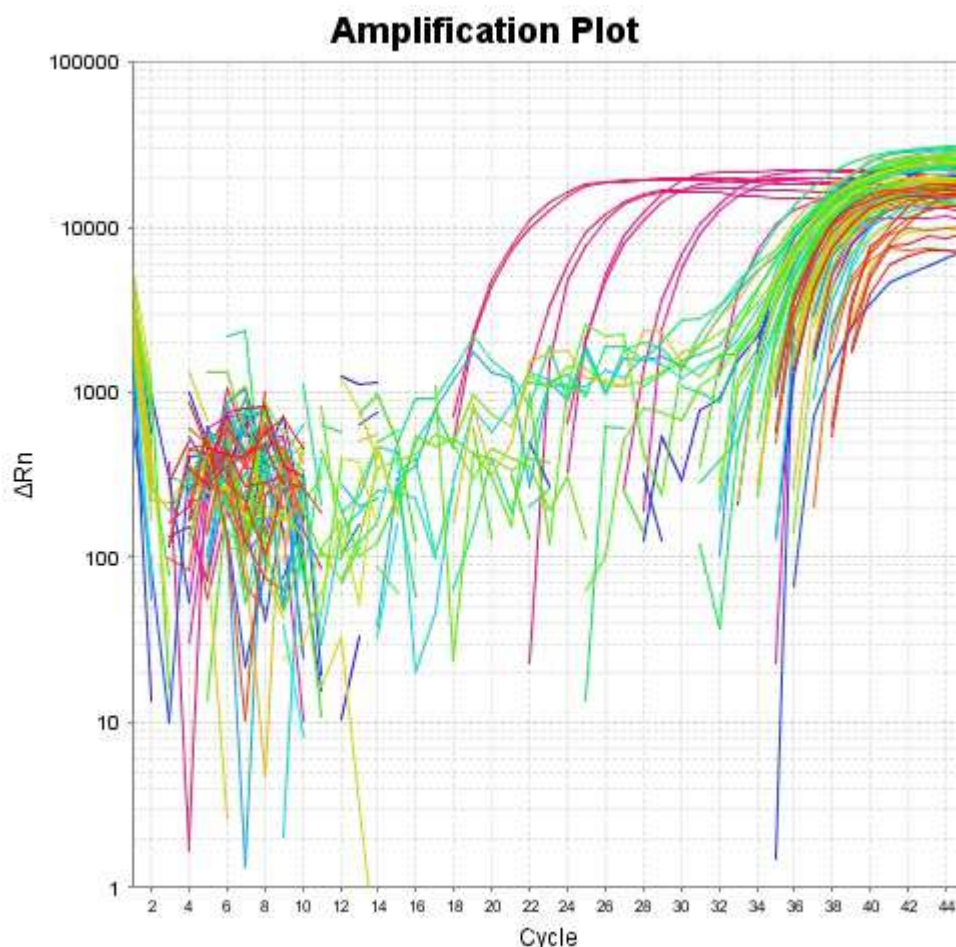


Figura 15- Curva de amplificação das amostras de DNA provenientes de sangue e soro para detecção HHV-6

4.9- Comparação entre as técnicas para detecção da infecção ativa por HCMV

Dos 30 pacientes receptores de transplante de células tronco hematopoiéticas, 29 (99,66%) apresentaram infecção ativa por HCMV detectada pelas técnicas de nested-PCR, PCR em tempo real e RT-PCR. 9 pacientes apresentaram infecção ativa detectada por todas as técnicas nas diferentes amostras (Tabela 11). As técnicas foram todas comparadas entre si e os melhores resultados estão apresentados na tabela 11. O tempo para detecção da infecção ativa foi precoce pela *n*PCR em sangue com mediana de 33 dias (Tabela 12).

Encontramos correlação entre as técnicas de PCR em tempo real em soro e nested-PCR em soro ($p=0,001$) e PCR em tempo real em sangue e nested-PCR em soro ($p=0,008$).

Tabela 11- Comparação entre os testes diagnósticos

	<i>n</i> PCR Leucócitos	<i>n</i> PCR soro	PCR em tempo real leucócitos	PCR em tempo real soro	RT-PCR
Sensibilidade	85%	83%	100%	52%	56%
Especificidade	44%	82%	44%	100%	71%
VPP	55%	77%	59%	100%	86,7%
VPN	77%	87%	100%	39%	34%

Tabela 12- Tempo para detecção da infecção ativa por HCMV pelos testes diagnósticos

	N	Mediana (dias)	variação
<i>n</i> PCR leucócitos		33	1-126
<i>n</i> PCR soro		49	7-133
PCR em tempo real leucocitos		40	0-106
PCR em tempo real soro		47	6-119
RT- <i>n</i> PCR		36,5	6-126

*n*PCR, nested PCR; RT-*n*PCR, transcrição reversa acoplada a nested PCR

Tabela 13- Número de pacientes positivos para detecção da infecção ativa por HCMV por teste diagnóstico isolado.

Teste diagnóstico	Número de pacientes
<i>n</i> PCR leucócitos	1
<i>n</i> PCR soro	0
RT- <i>n</i> PCR	1
PCR em tempo real leucócitos	3
PCR em tempo real soro	0
Todos os testes	9

4.10- Comparação entre as técnicas para detecção da infecção ativa por HHV-6

Dos 30 pacientes receptores de transplante de células tronco hematopoiéticas, 25 (83,33%) apresentaram infecção ativa por HHV-6 detectada pelas técnicas de PCR em tempo real e RT-*n*PCR. Os valores da nested-PCR em sangue foram excluídos desta avaliação por não refletirem seguramente infecção ativa, os valores e comparações entre as demais metodologias estão representadas na Tabela 14. O tempo para detecção da infecção ativa foi precoce pela PCR em tempo real em soro com mediana de 14 dias (Tabela 15).

Tabela 14- Comparação entre os testes diagnósticos

	PCR em tempo real leucócitos	PCR em tempo real soro	RT- <i>n</i> PCR
Sensibilidade	25%	85%	65%
Especificidade	100%	31%	81%
VPP	100%	52%	75%
VPN	66%	72%	72%

Tabela 15- Tempo para detecção da infecção ativa por HHV-6 pelos testes diagnósticos

	Mediana (dias)	Variação
PCR em tempo real leucócitos	99,5	0-150
PCR em tempo real soro	14	0-71
RT- <i>n</i> PCR	36,5	6-142

4.11- Co-infecção HCMV /HHV-6

Dos 30 pacientes monitorados, 25 apresentaram infecção ativa por HHV-6 pelos testes diagnósticos e 29 apresentaram infecção ativa por HCMV pelos testes diagnósticos. Os 25 pacientes que apresentaram infecção ativa por HHV-6 também foram positivos para infecção ativa por HCMV (gráfico1), destes, 14 pacientes positivaram antes para o HHV-6, 5 positivaram ao mesmo tempo para os dois vírus, e dois que positivaram antes para o HCMV, apresentaram antes presença do HHV-6. Dois pacientes positivaram ao mesmo tempo para os dois vírus, e os 4 pacientes que apresentaram infecção ativa somente por HCMV, apresentaram antes a presença do HHV-6.

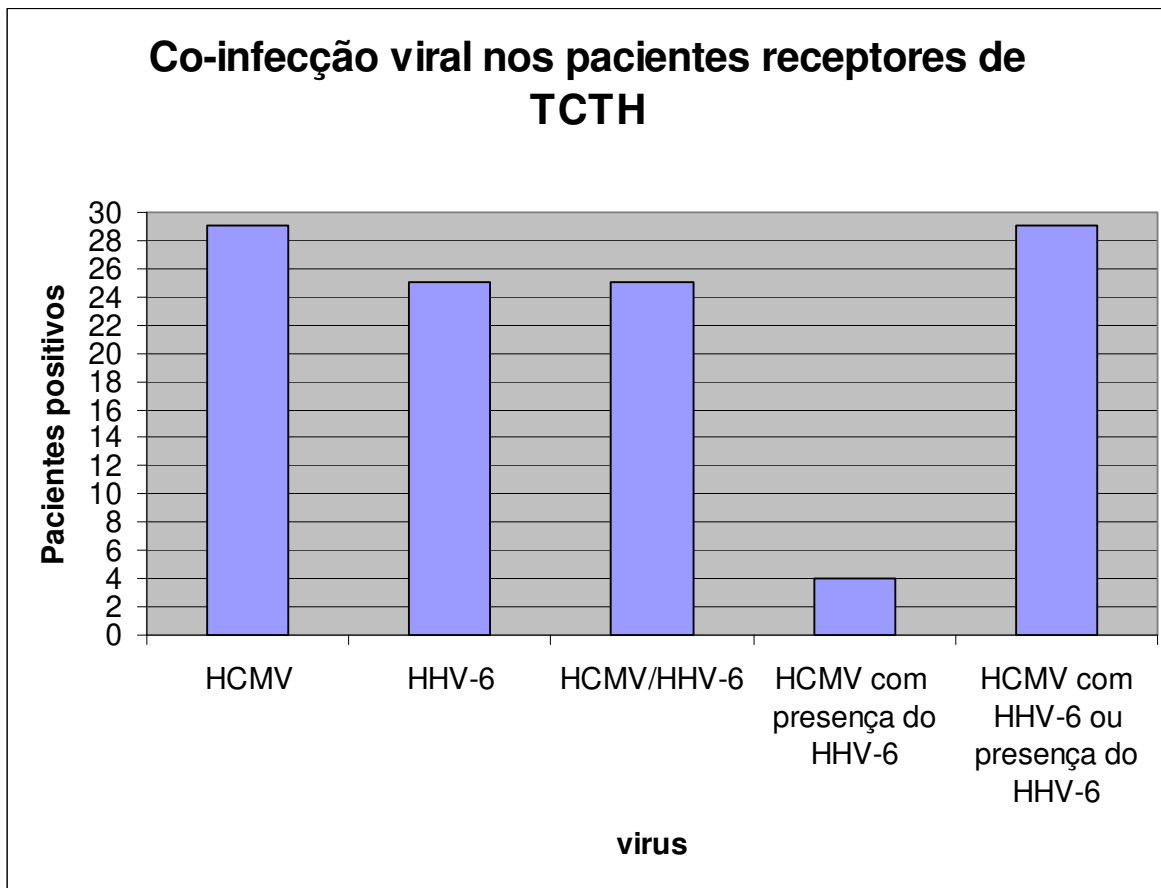


Gráfico 1- Incidência da infecção ativa viral e co-infecção HCMV/HHV-6 e presença de DNA viral do HHV-6 nos pacientes receptores de TCTH.

4.12- Monitoramento da carga viral do HHV-6 e correlação com a infecção por HCMV

Monitoramos a carga viral do HHV-6 e identificamos os pontos de pico de carga viral para relacioná-los com as complicações pós-transplantes causadas por este herpesvirus. Assim como as manifestações mais comuns como DECH ou GVHD, distúrbios neurológicos e infecções oportunistas, um importante fator relacionado ao HHV-6, esta em seu efeito imunomodulador e associação com a doença causada por HCMV. Verificamos que em vários casos a infecção ativa por HCMV ou recorrência da infecção ativa ocorreu juntamente com o pico de carga viral do HHV-6, ou após estes picos, ou mesmo, antes do pico, mas com detecção da carga viral do HHV-6. O paciente 9

desenvolveu doença por HCMV no dia 80+, entre dois picos de carga viral, e o paciente 27 desenvolveu a doença por HCMV após pico de carga viral do HHV-6 e imediatamente após GVHD agudo. O paciente 8 que desenvolveu provável doença por HCMV, apresentou infecção ativa por HCMV juntamente com pico de carga viral do HHV-6. Os resultados dos pacientes que não apresentaram picos em amostras de leucócitos ou de soro não foram representados nos gráficos, porém mesmo sem os picos eles apresentaram amplificação e detecção. Os pacientes 1,13,25e26 não apresentaram detecção de carga viral em amostras de soro, e apenas o paciente 2 não apresentou amplificação em amostras de soro e leucócitos.

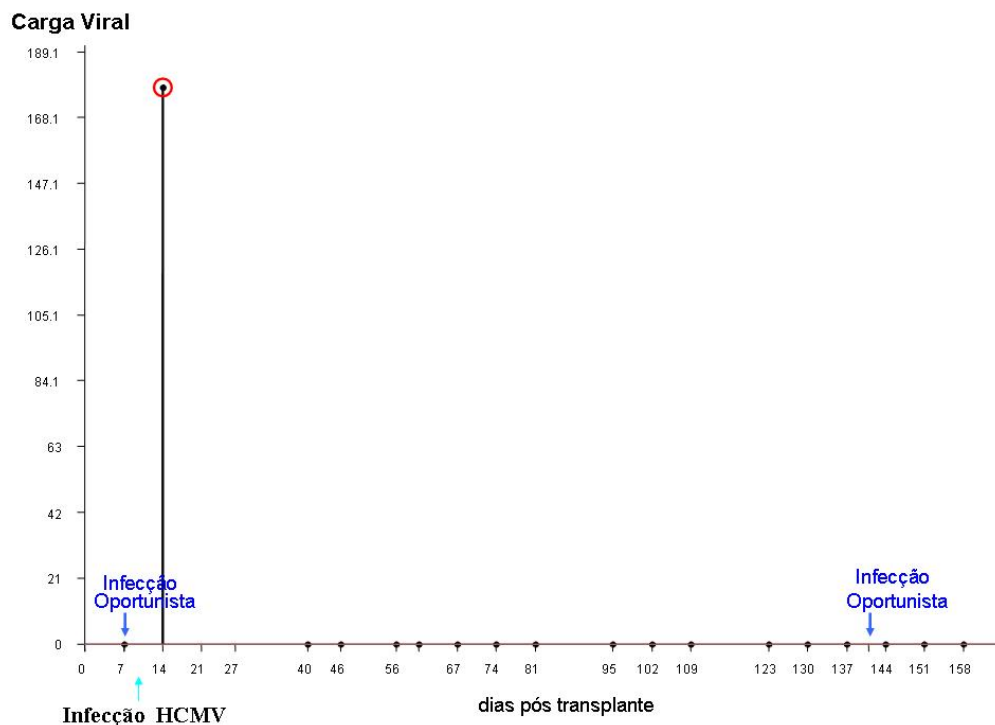


Gráfico 2- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de leucócitos do paciente 4.

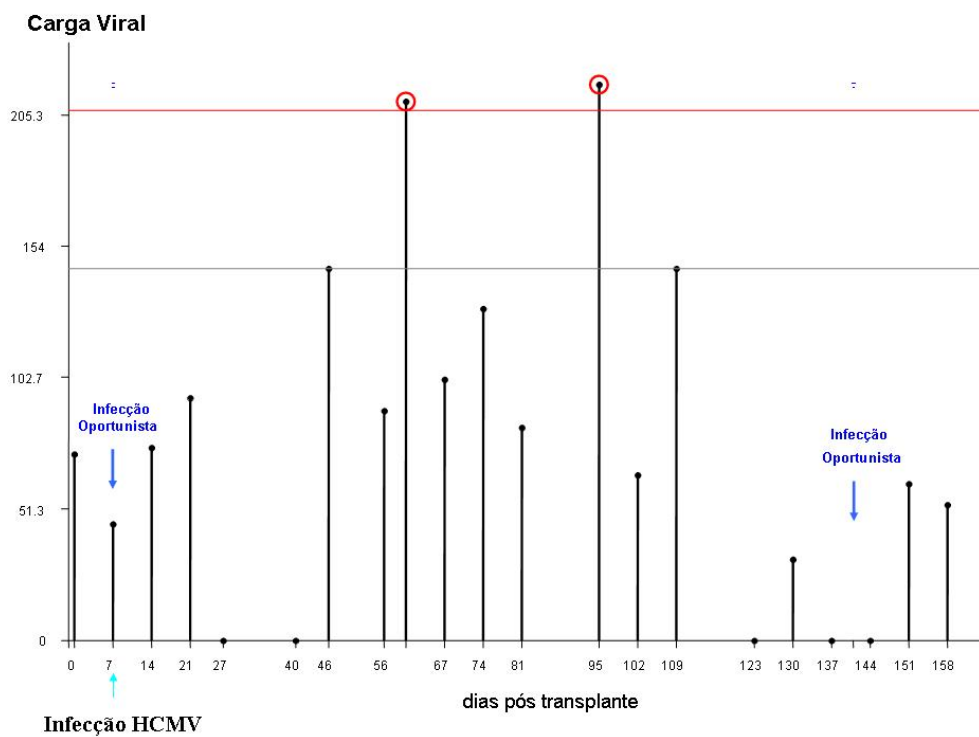


Gráfico 3- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 4

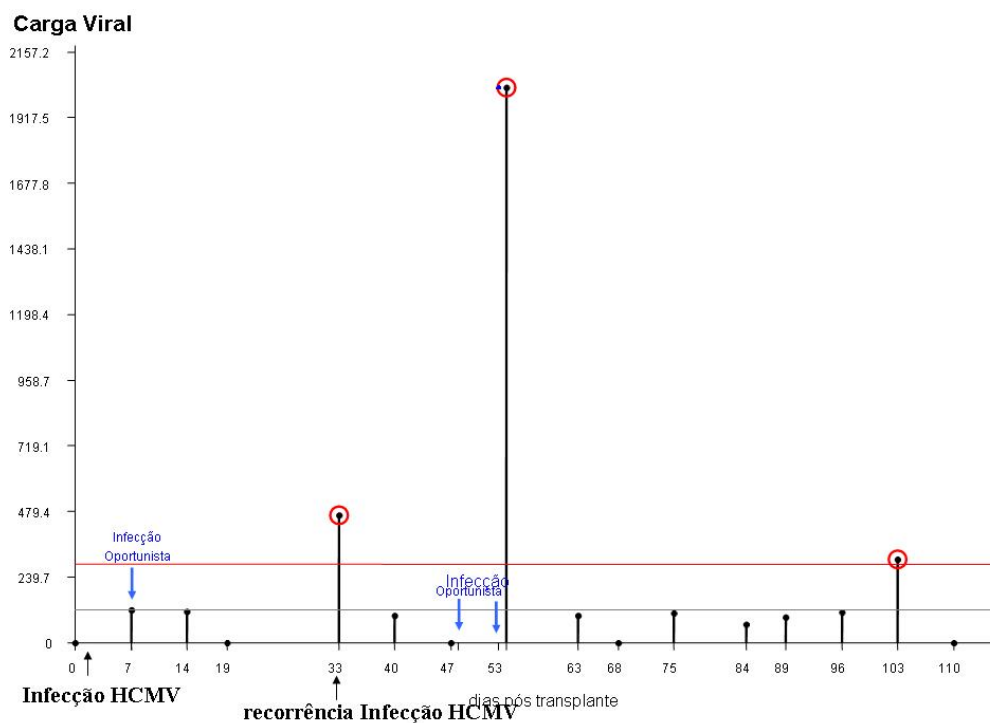


Gráfico 4- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 5

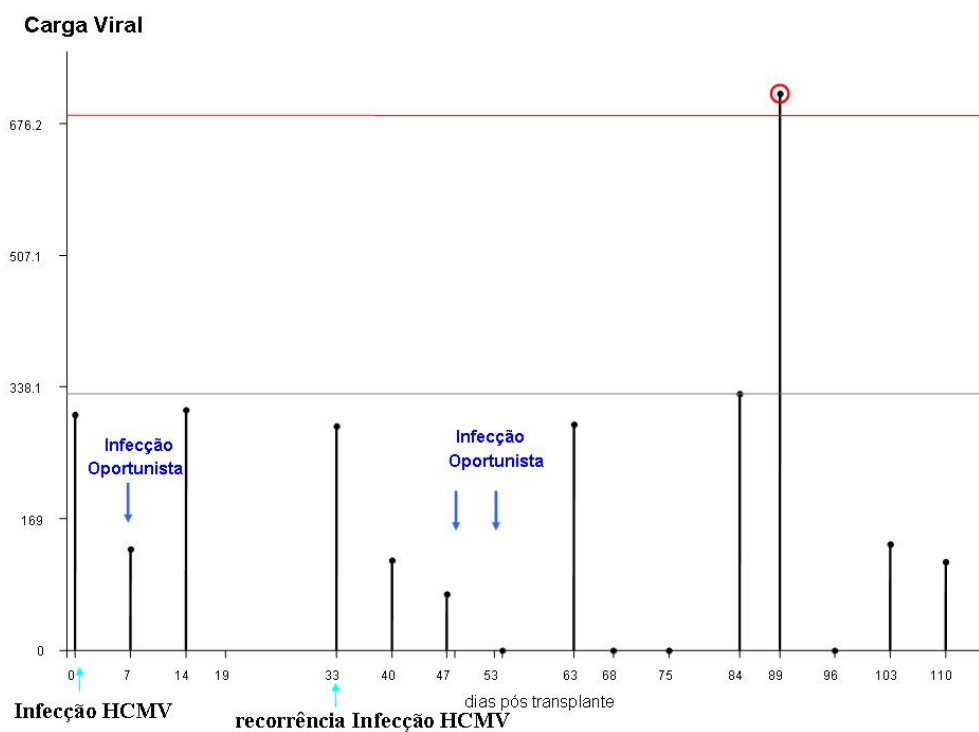


Gráfico 5- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 5.

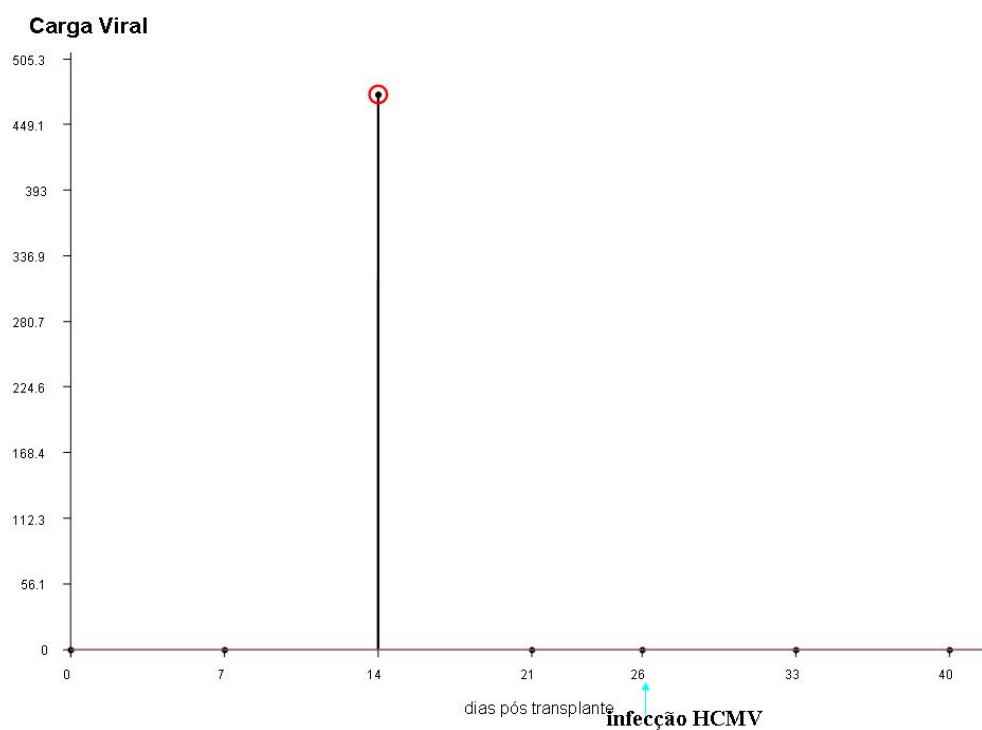


Gráfico 6- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 6. Este paciente apresentou amplificação e detecção da carga viral do HHV-6, mas não apresentou picos em amostras de leucócitos

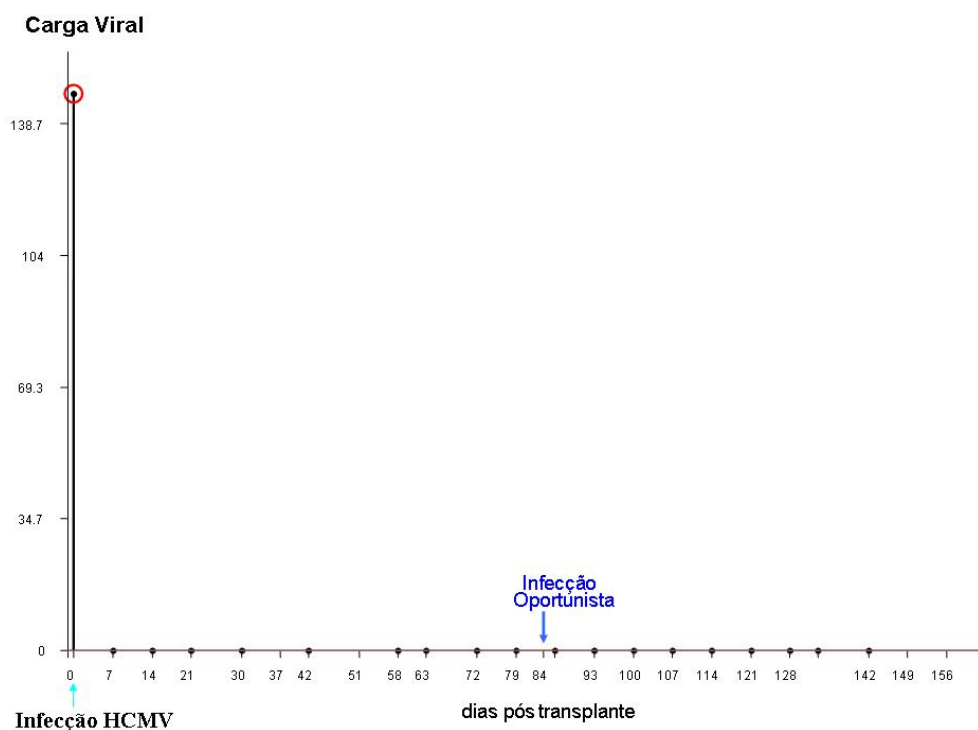


Gráfico 7- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 7

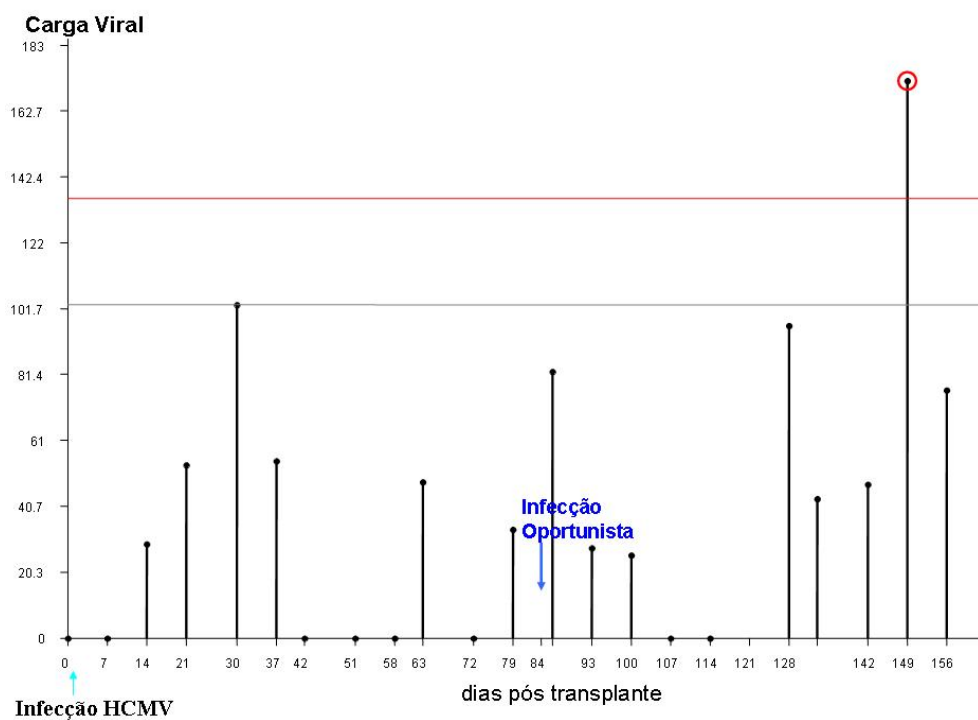


Gráfico 8- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 7.

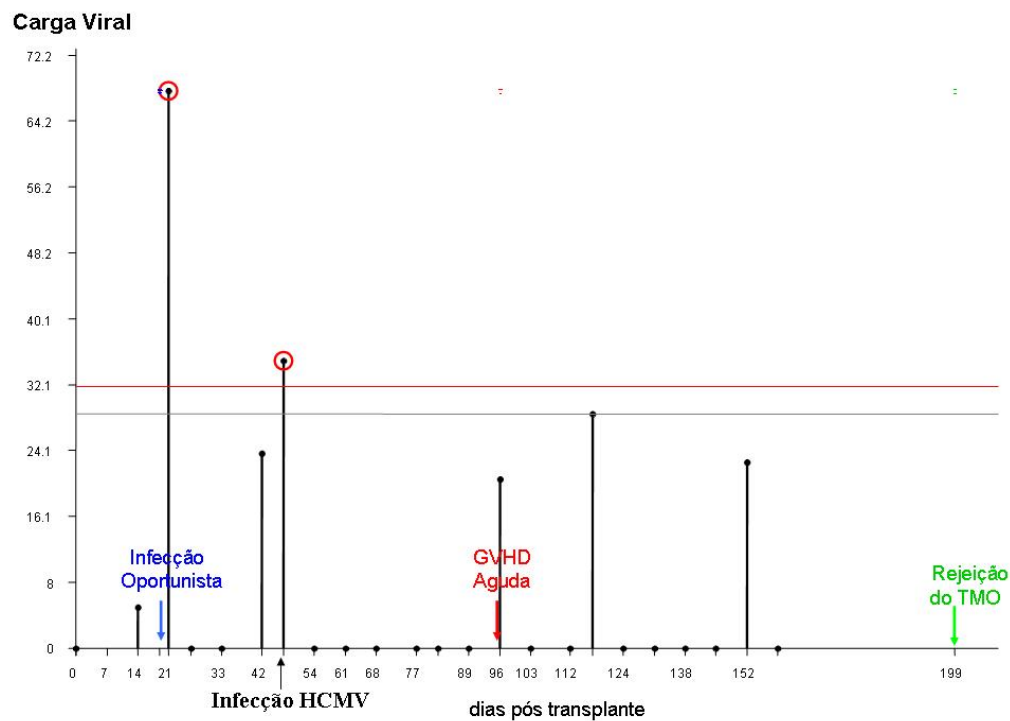


Gráfico 9- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 8.

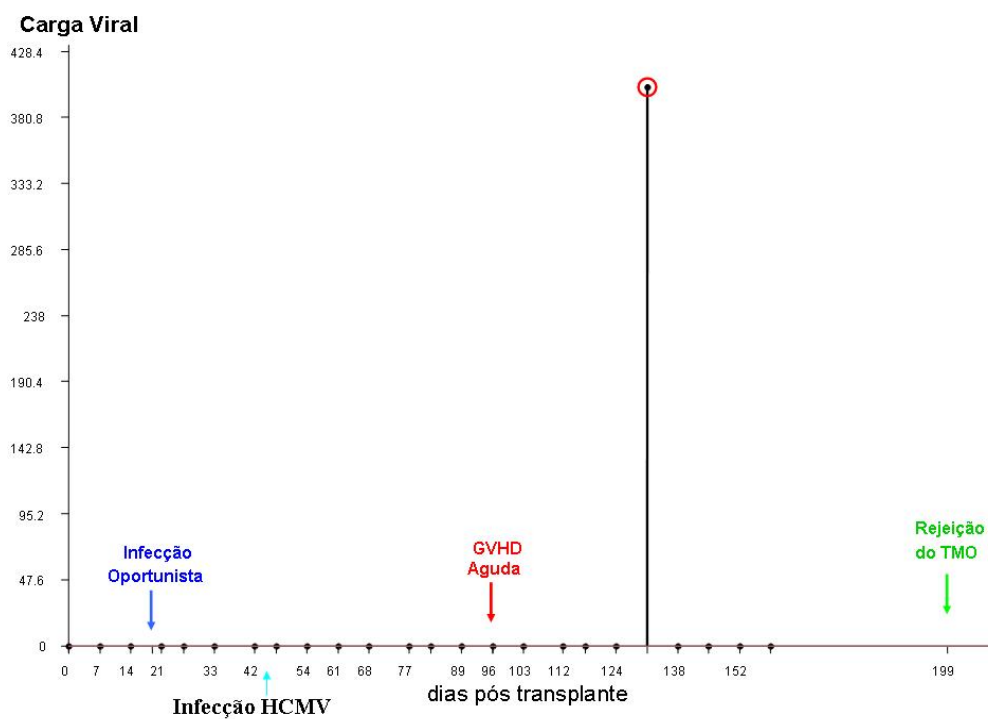


Gráfico 10- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 8.

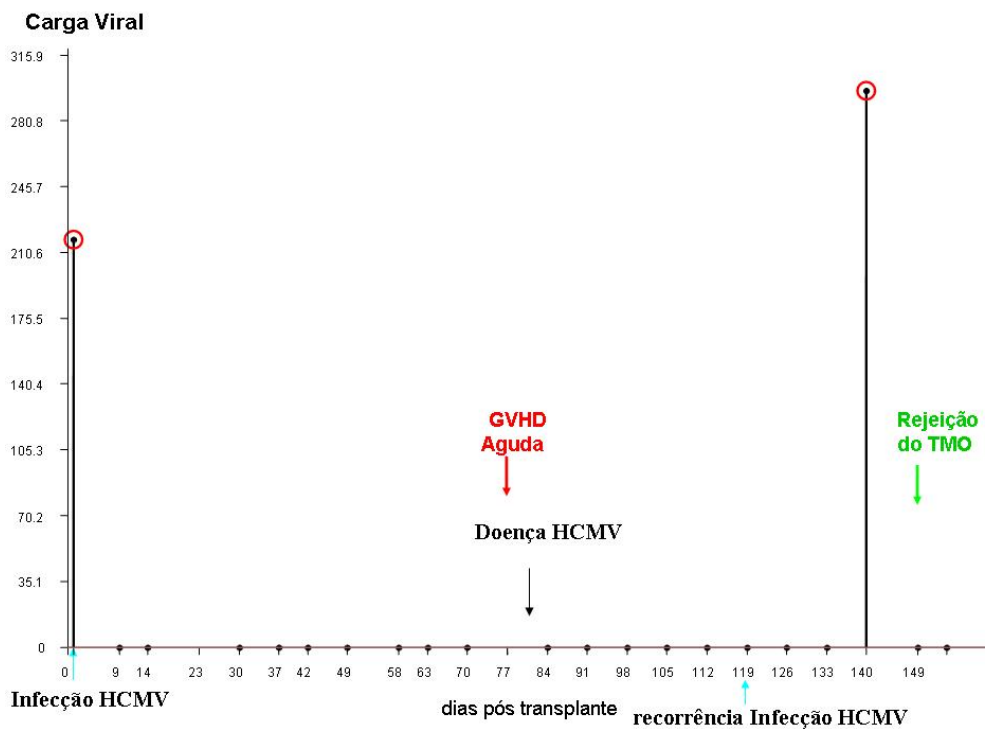


Gráfico 11- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 9.

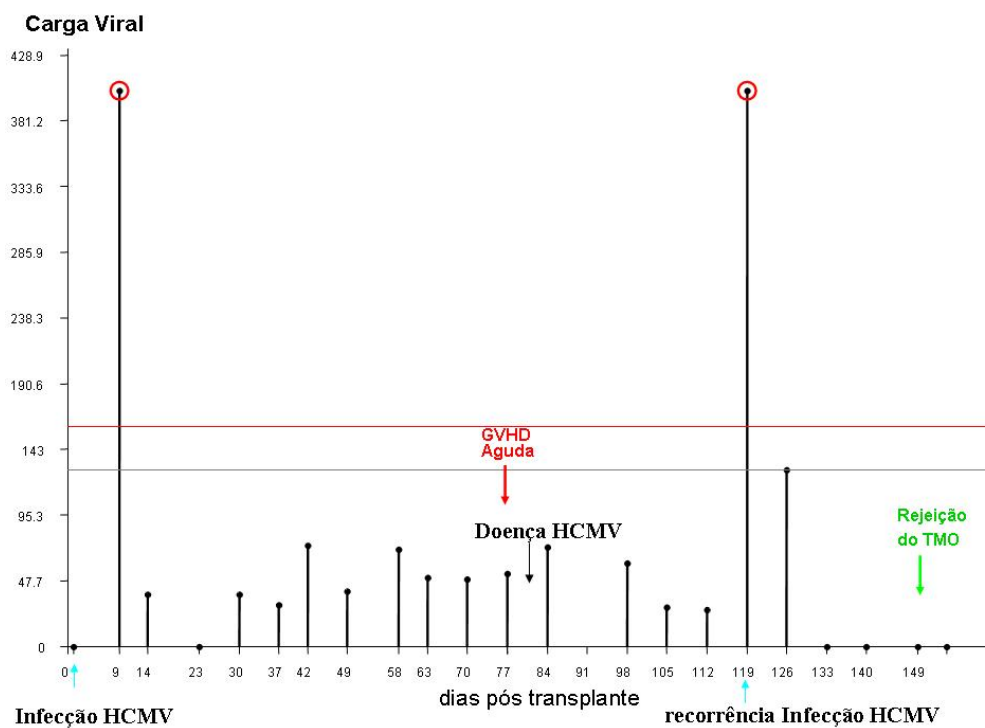


Gráfico 12- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 9.

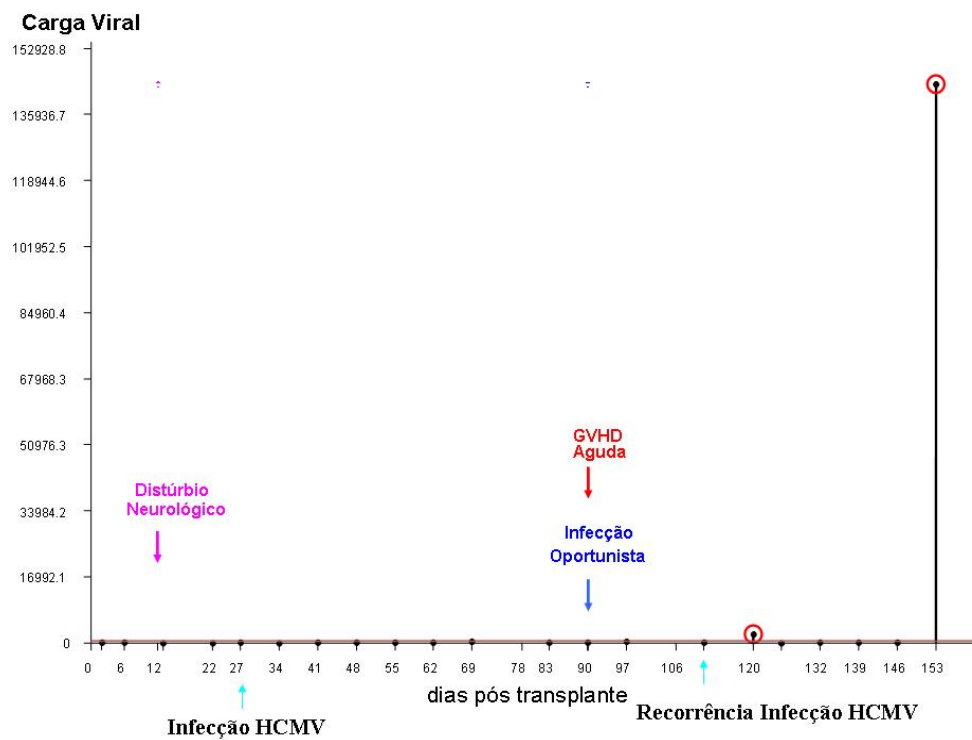


Gráfico 13- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 10

Este paciente apresentou amplificação e detecção da carga viral do HHV-6,mas não apresentou picos em amostras de leucócitos

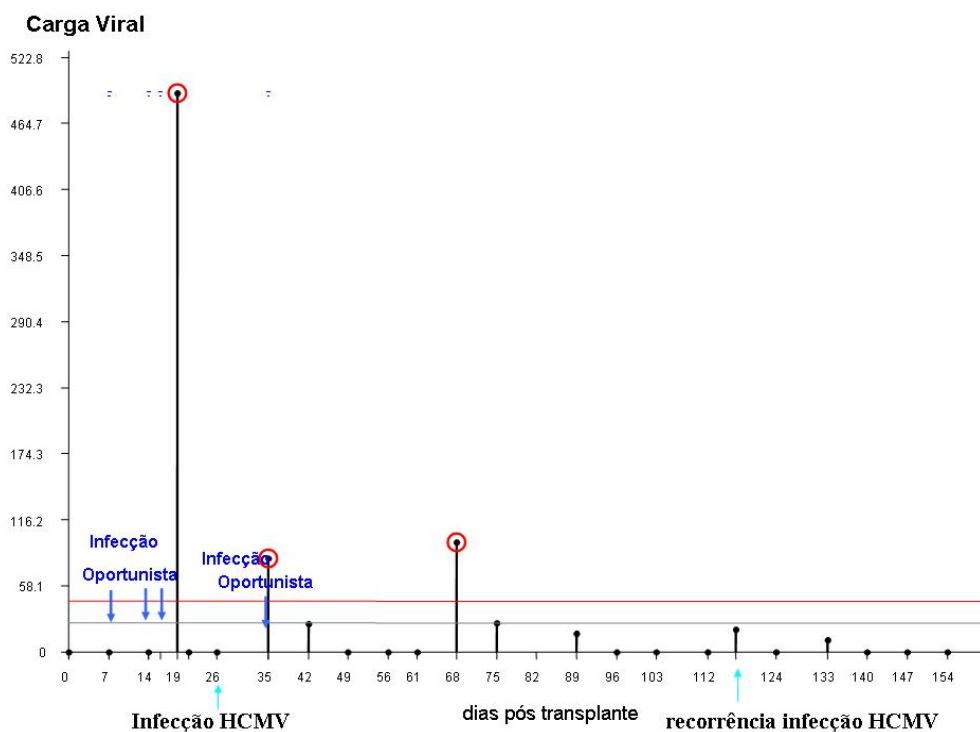


Gráfico 14- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 11.

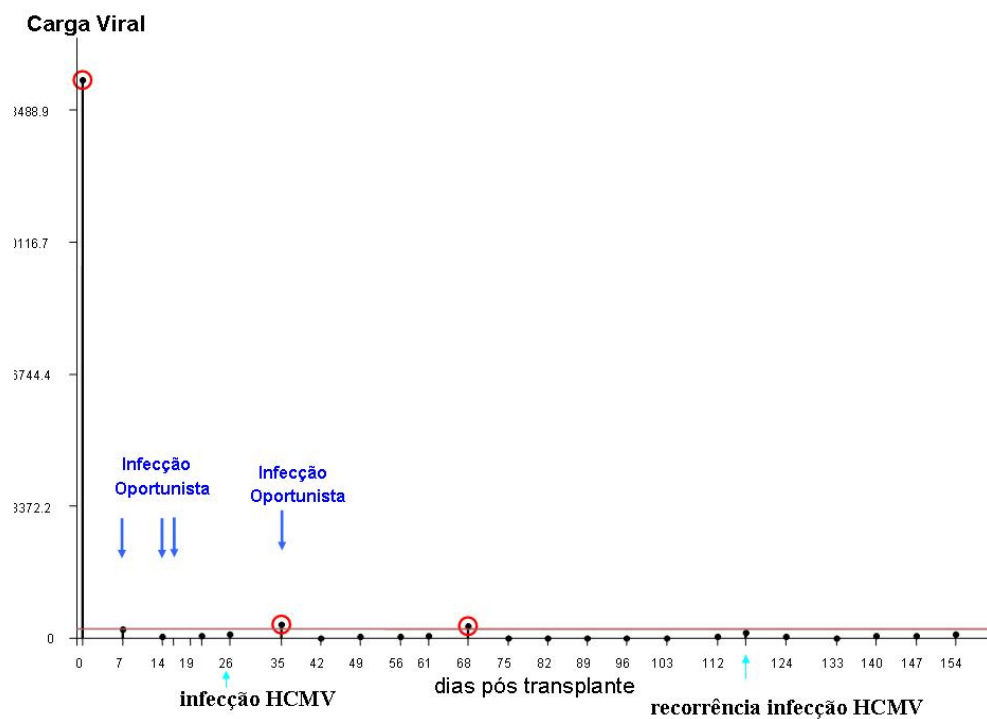


Gráfico 15- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 11.

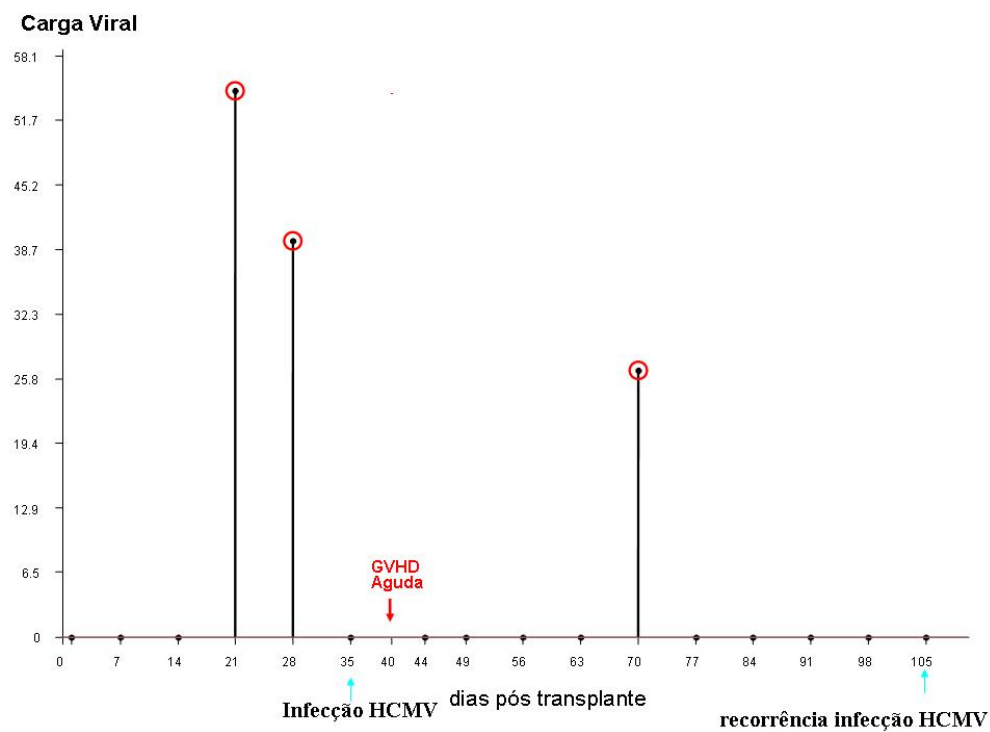


Gráfico 16- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 12.

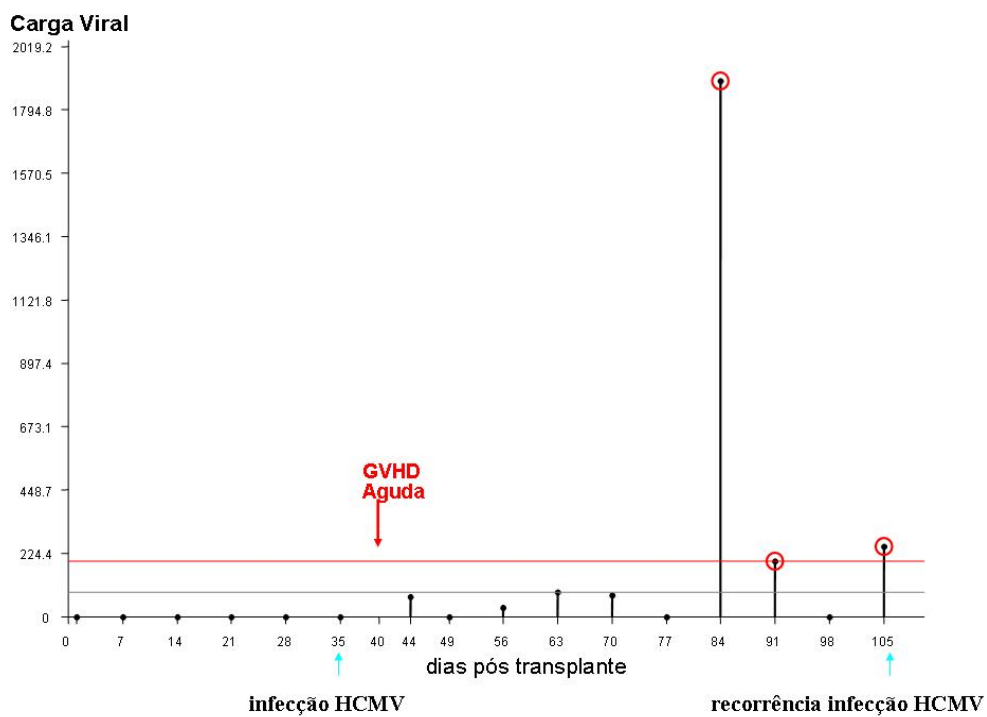


Gráfico 17- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 12.

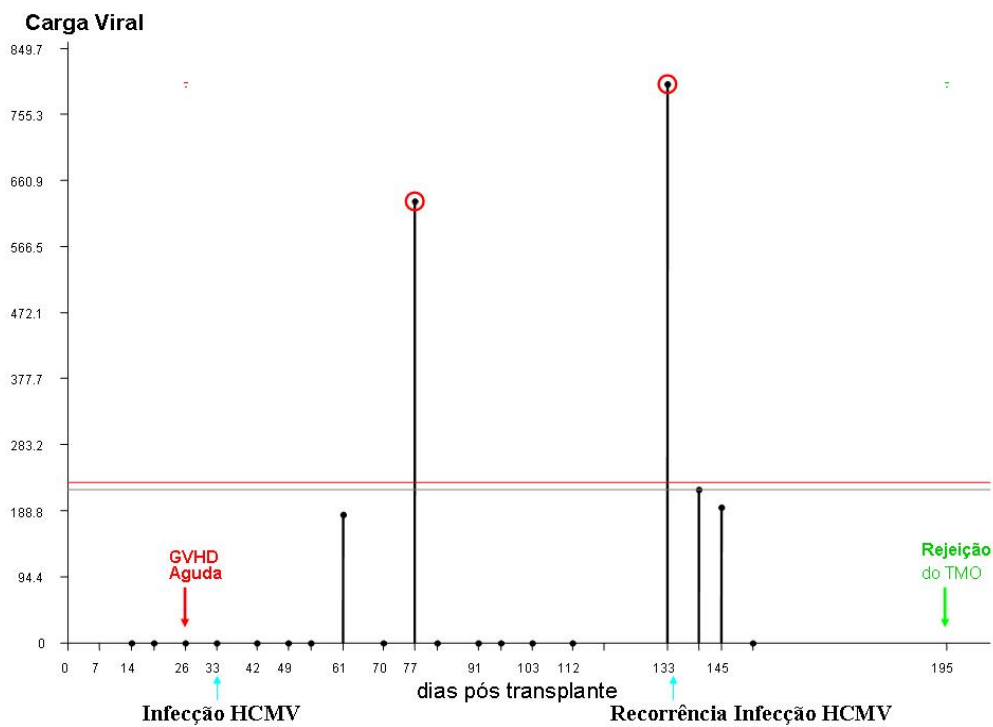


Gráfico 18- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 13. Este paciente não apresentou picos em amostras de DNA de soro.

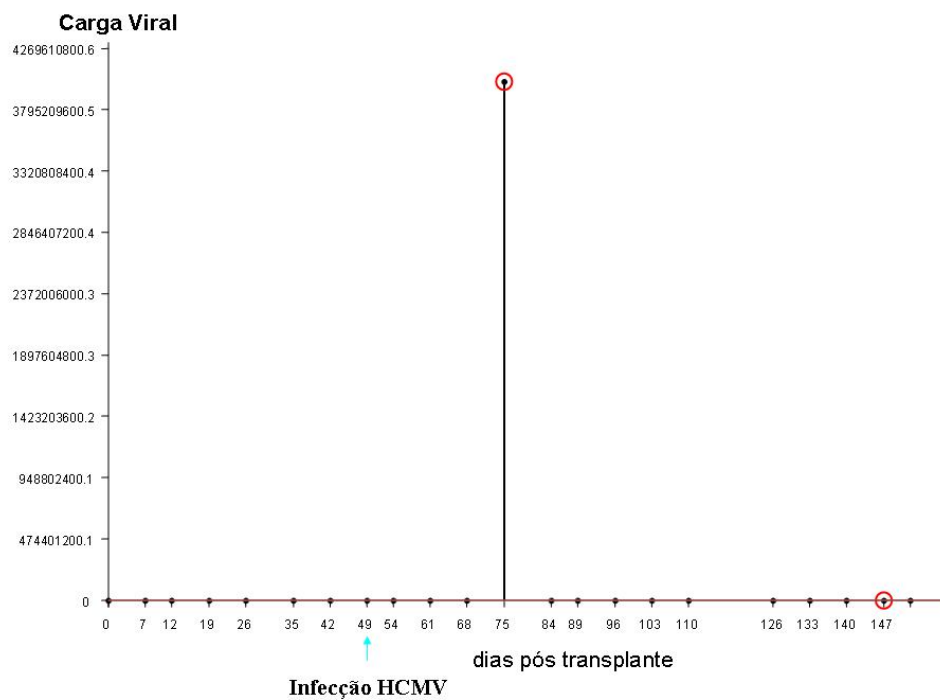


Gráfico 19- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 14.

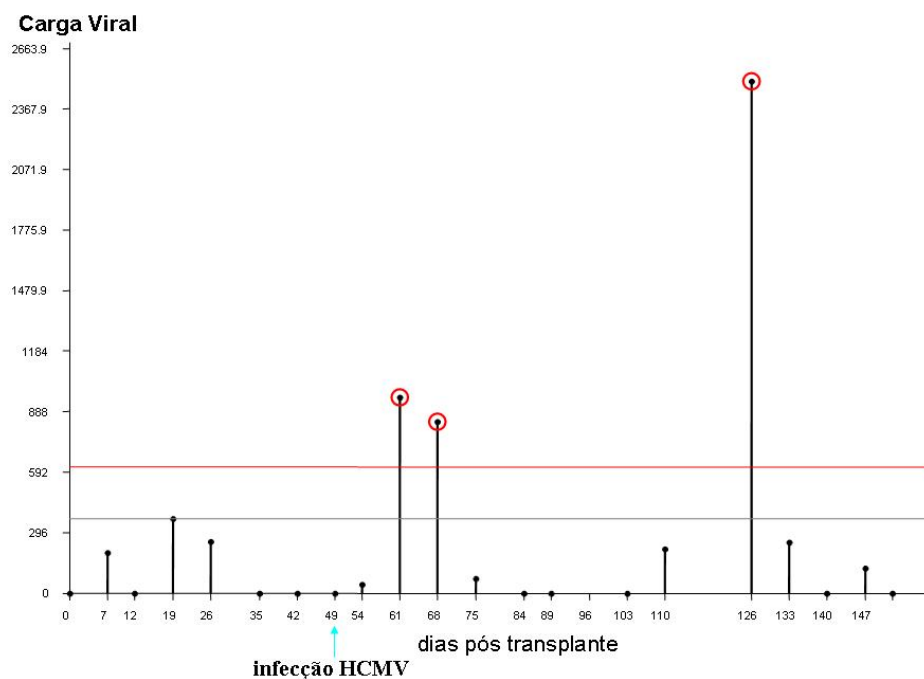


Gráfico 20- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 14

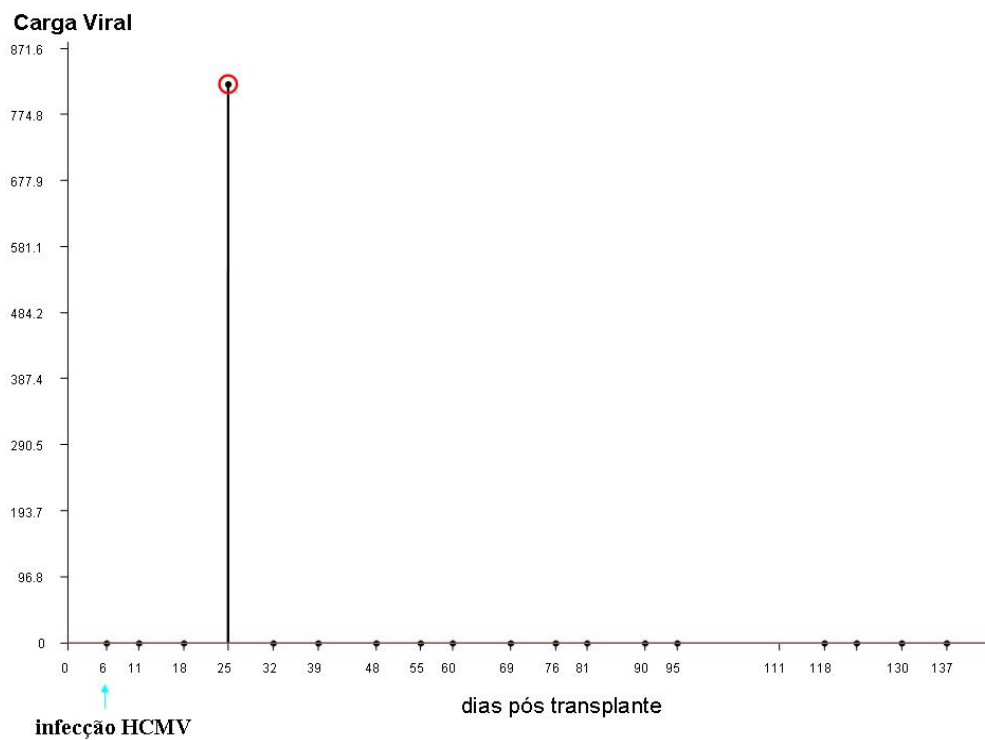


Gráfico 21- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 15. Este paciente apresentou amplificação e detecção da carga viral do HHV-6, mas não apresentou picos em amostras de DNA de leucócitos.

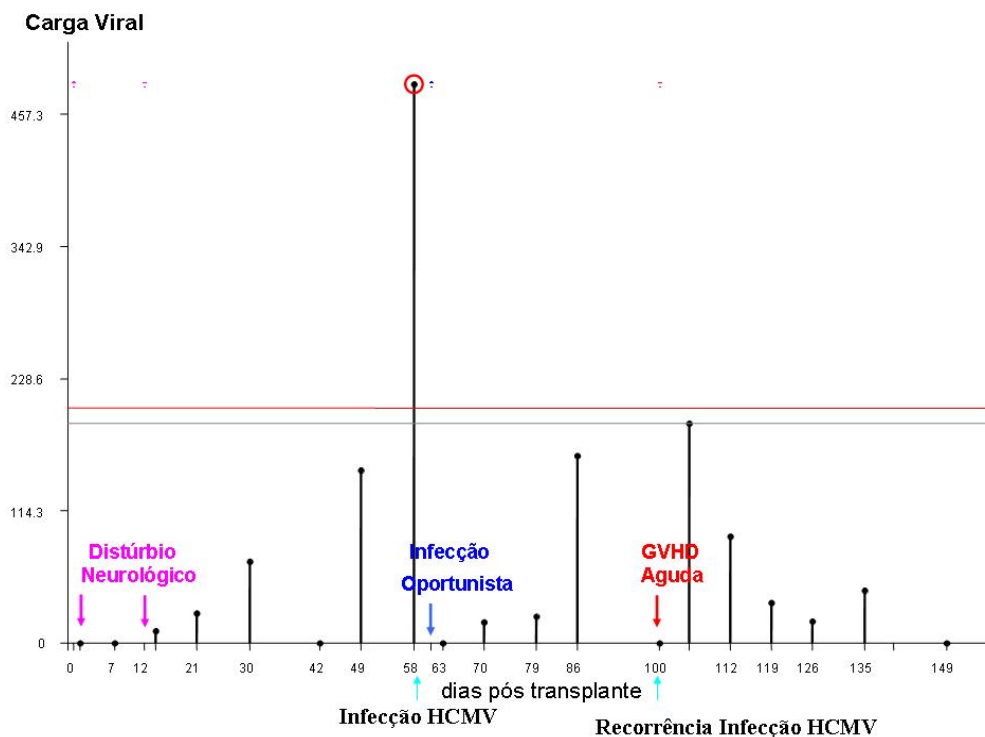


Gráfico 22- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 16.

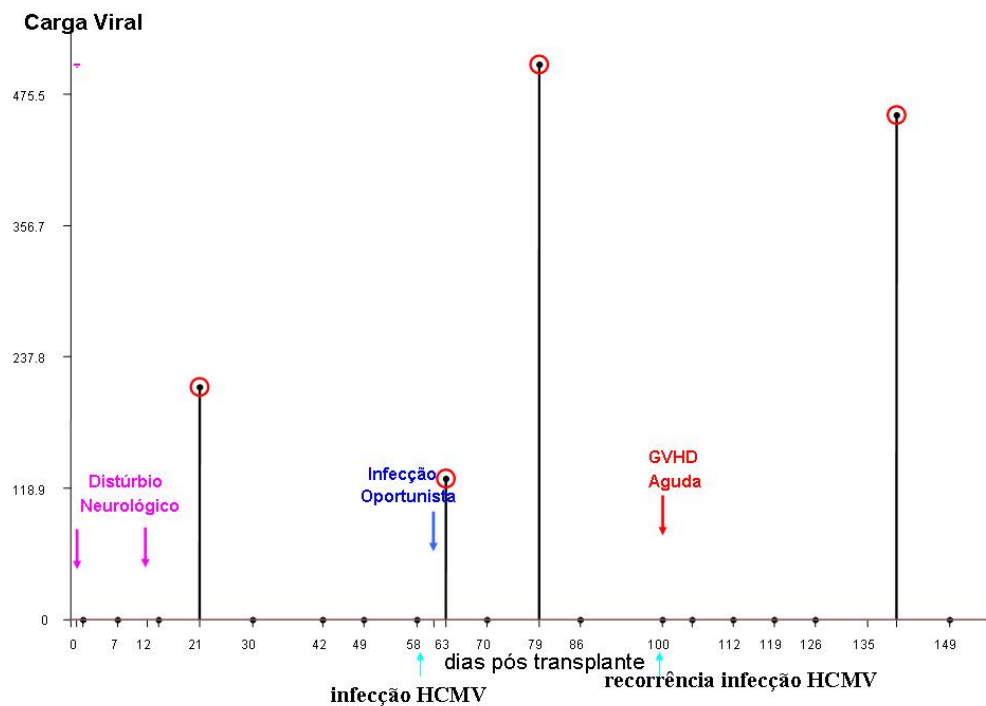


Gráfico 23- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 16.

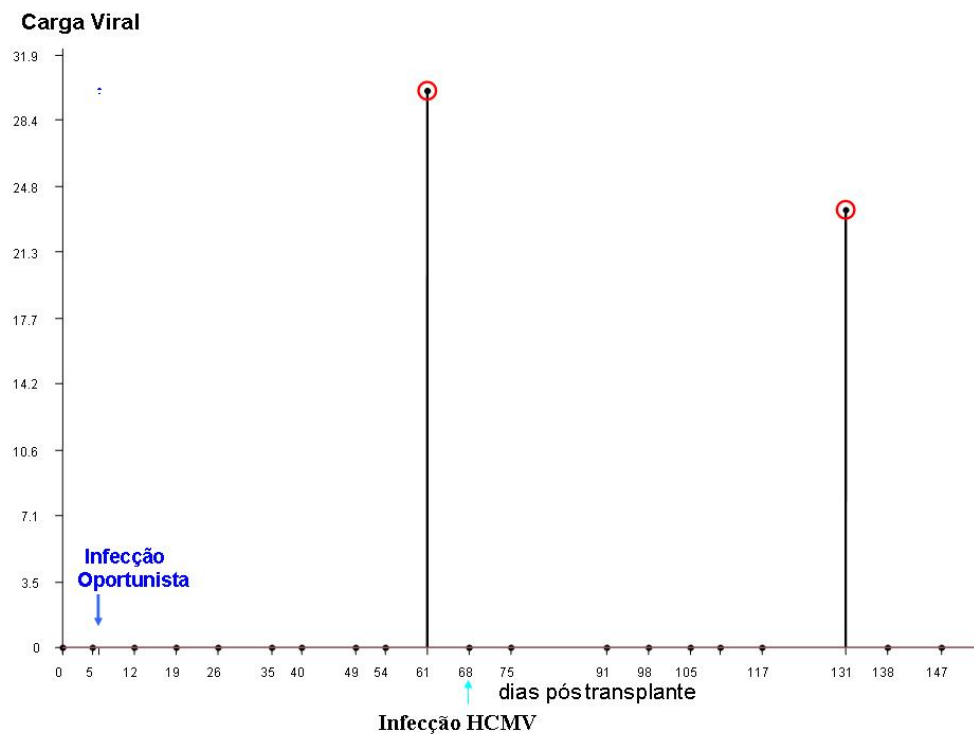


Gráfico 24- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 17.

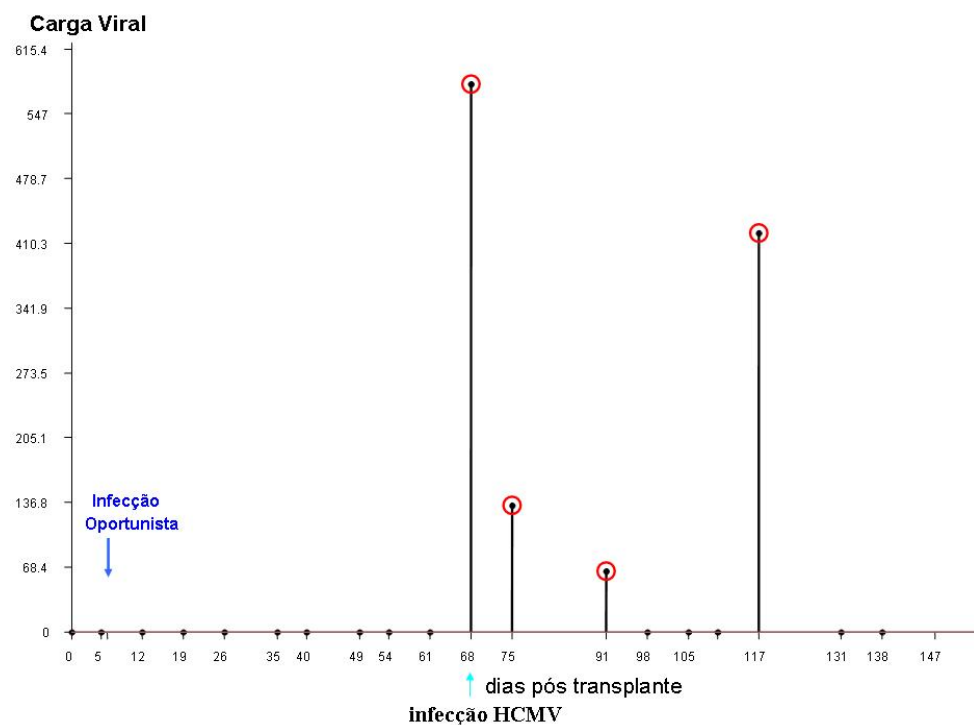


Gráfico 25- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 17.

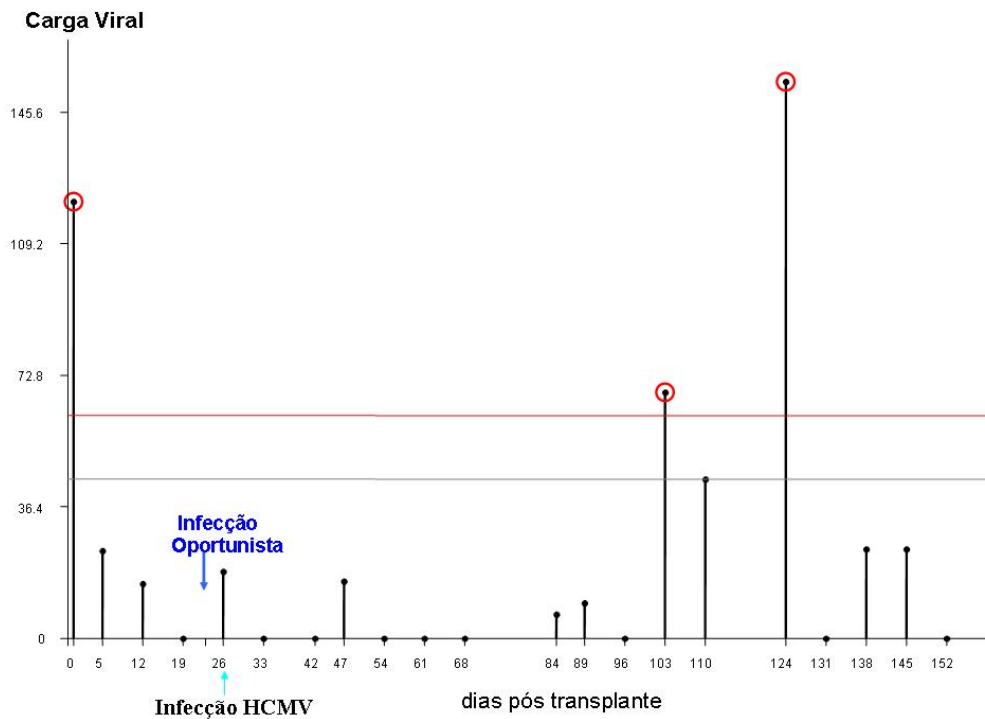


Gráfico 26- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 18. Este paciente apresentou amplificação e detecção da carga viral do HHV-6, mas não apresentou picos em amostras de soro.

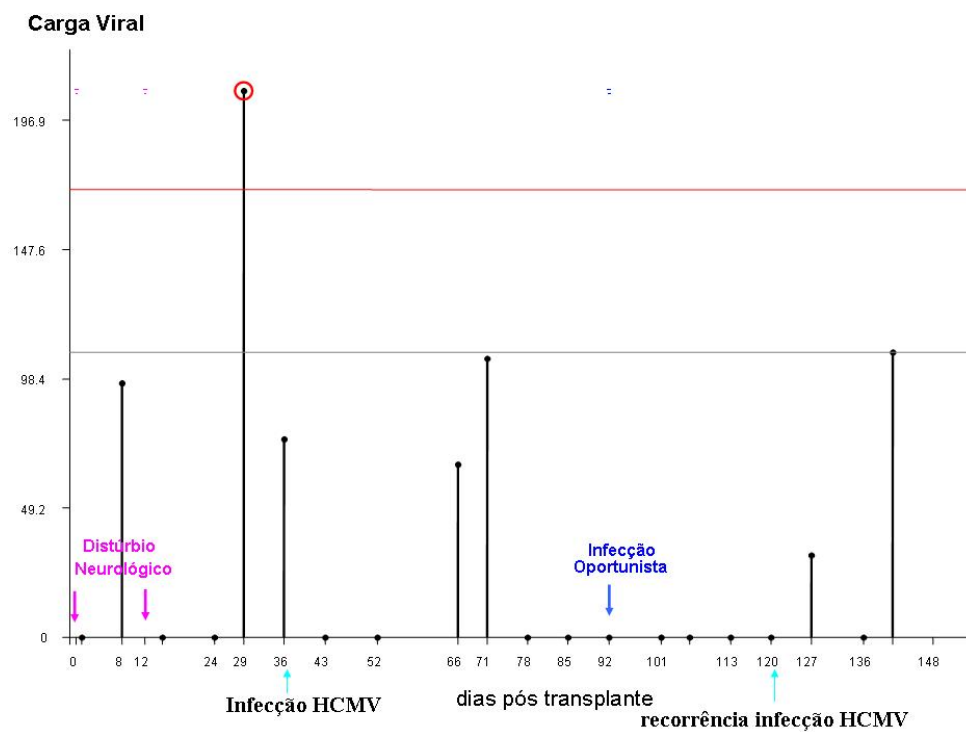


Gráfico 27- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 19.

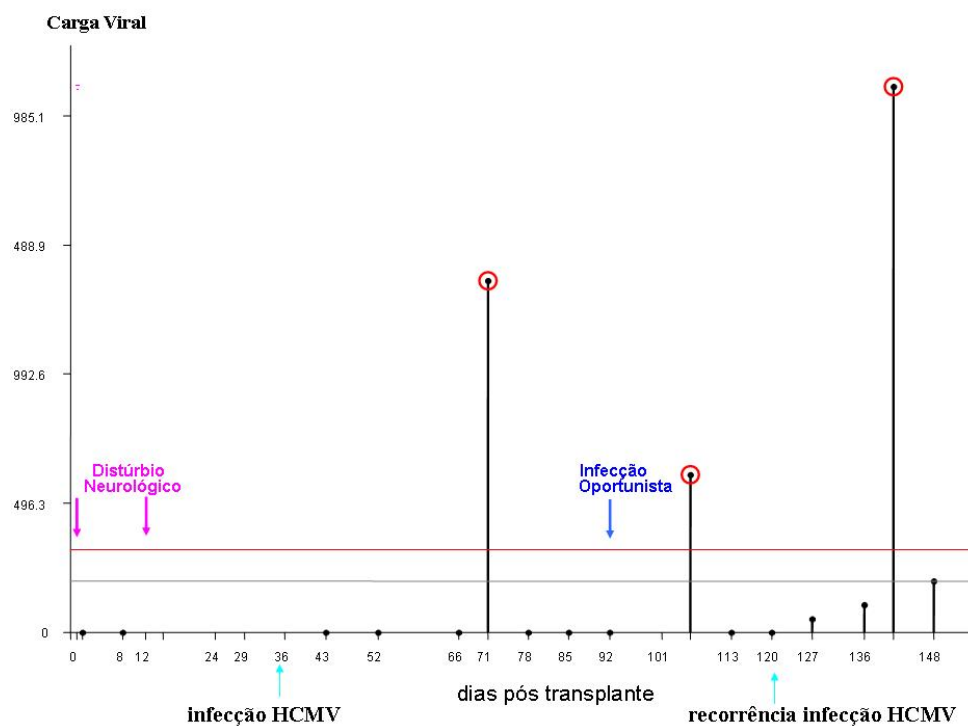


Gráfico 28- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 19.

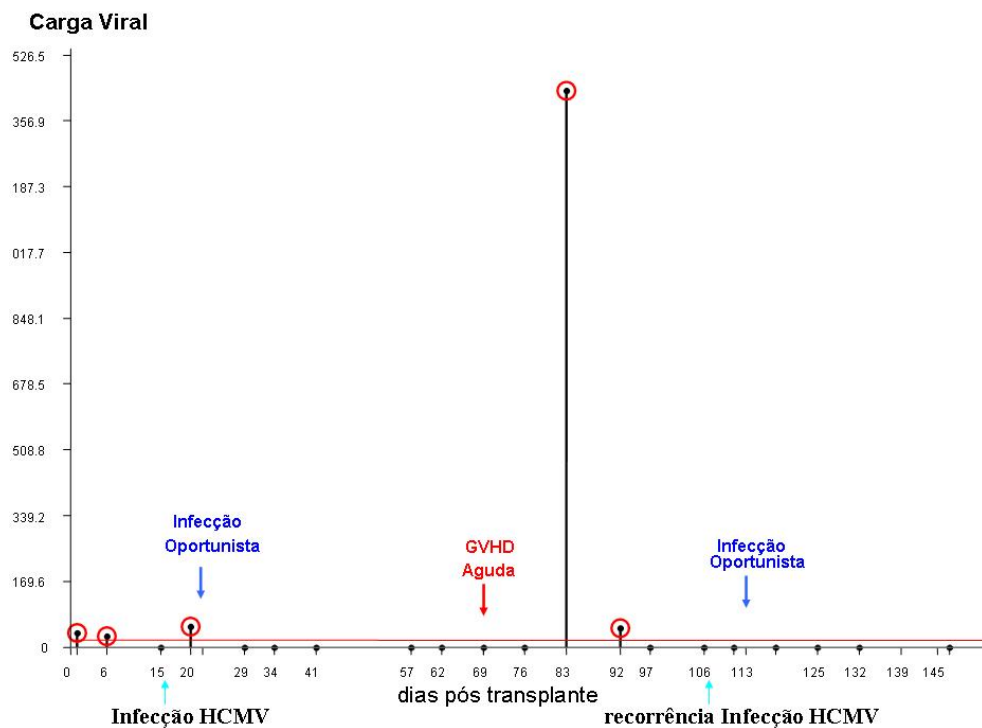


Gráfico 29- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 20.

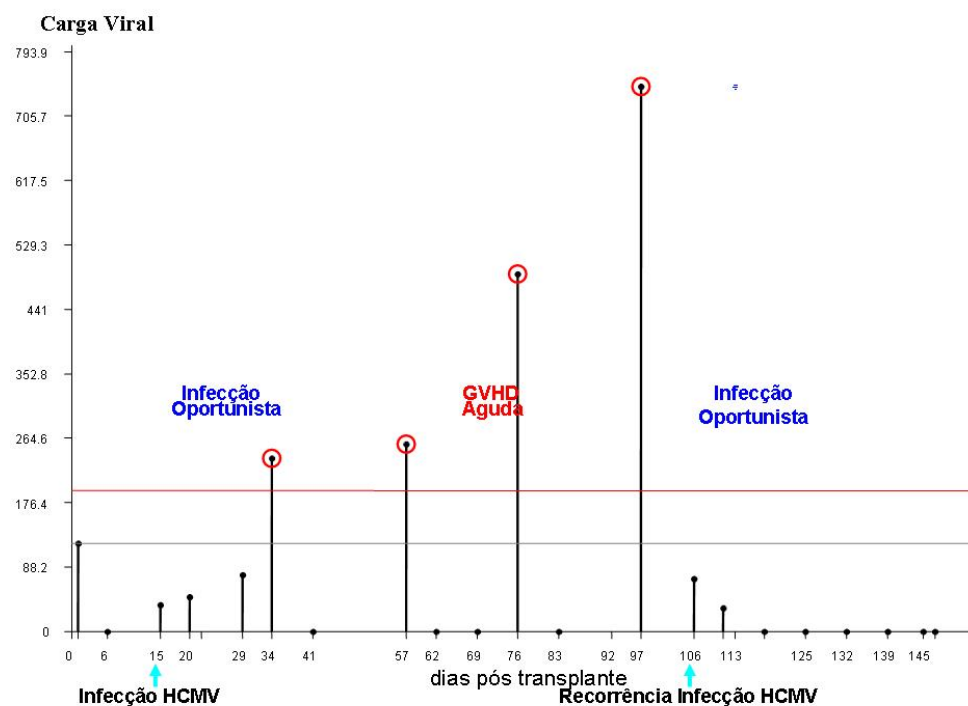


Gráfico 30- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 20.

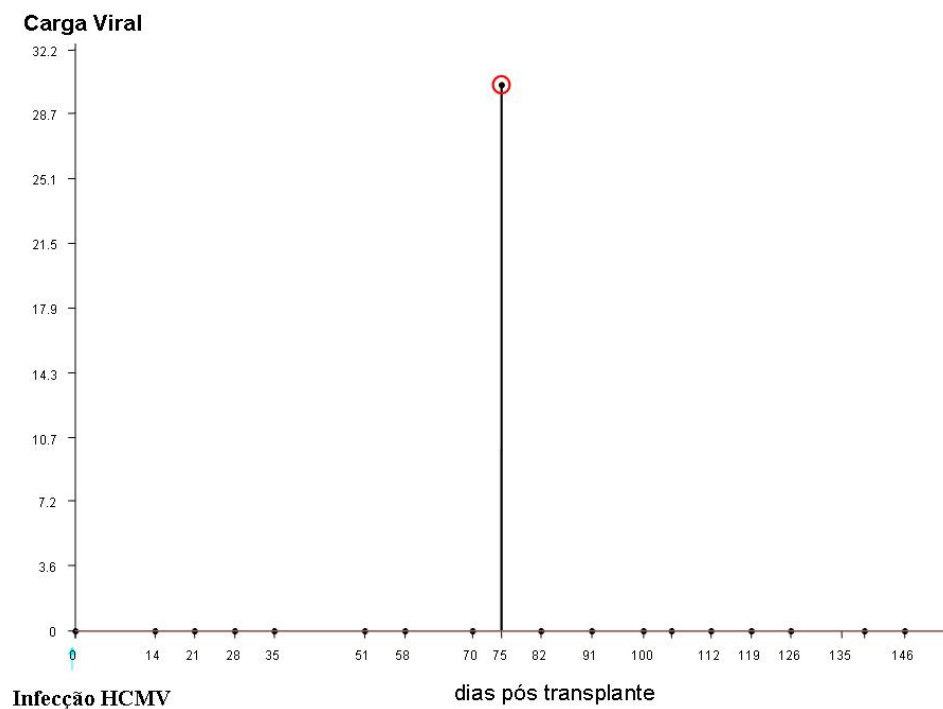


Gráfico 31- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 22.

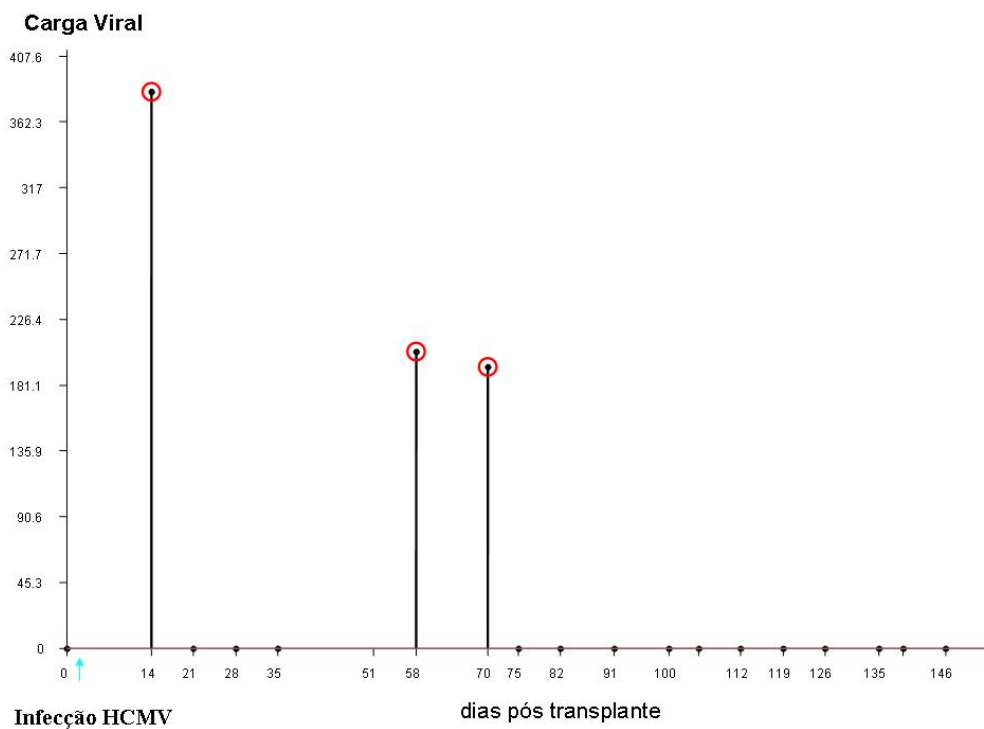


Gráfico 32- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 22.

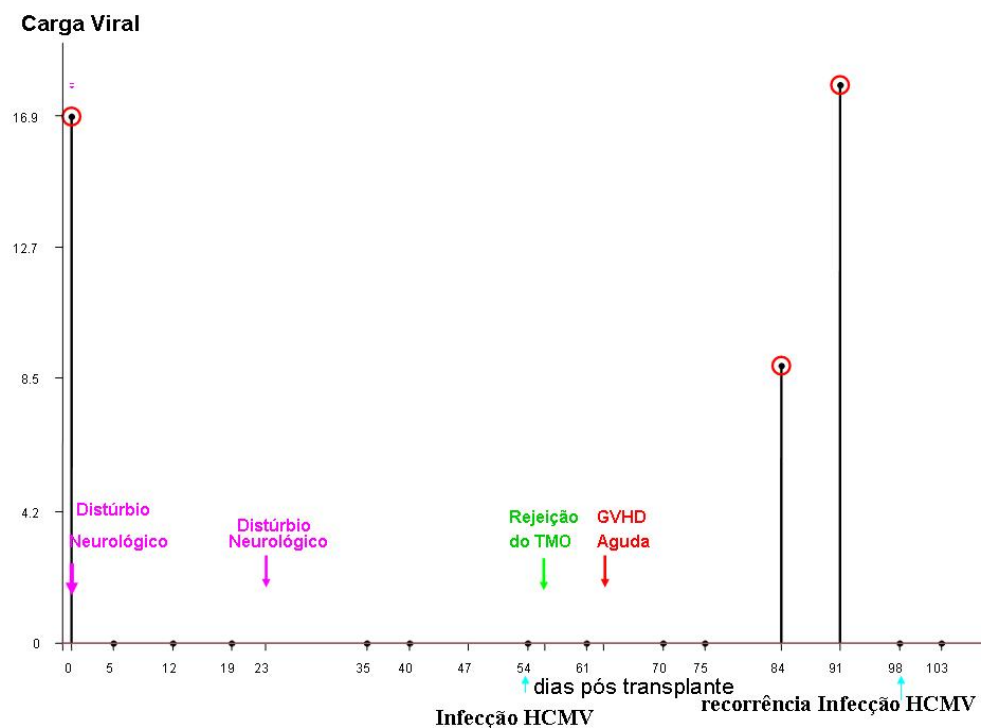


Gráfico 33- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 23.

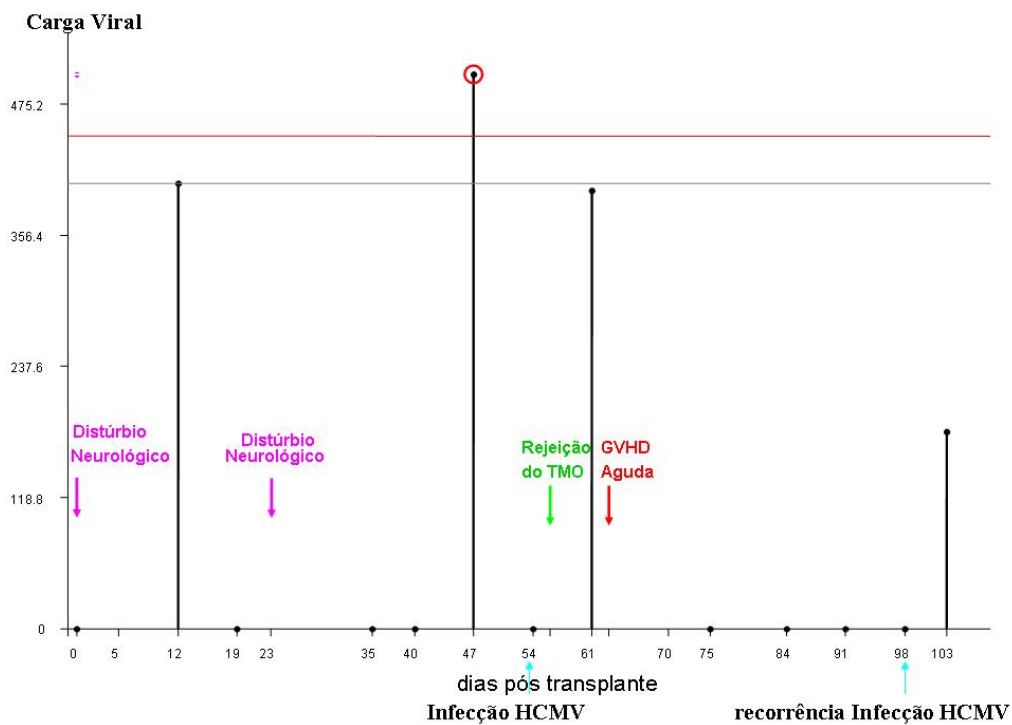


Gráfico 34- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 23.

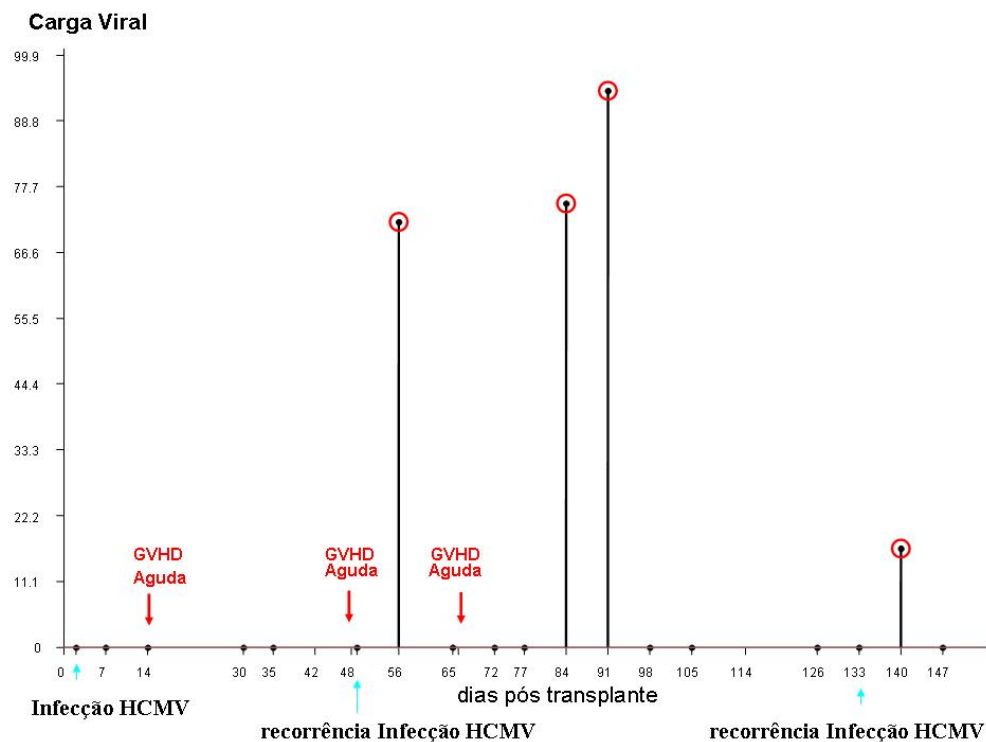


Gráfico 35- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 24.

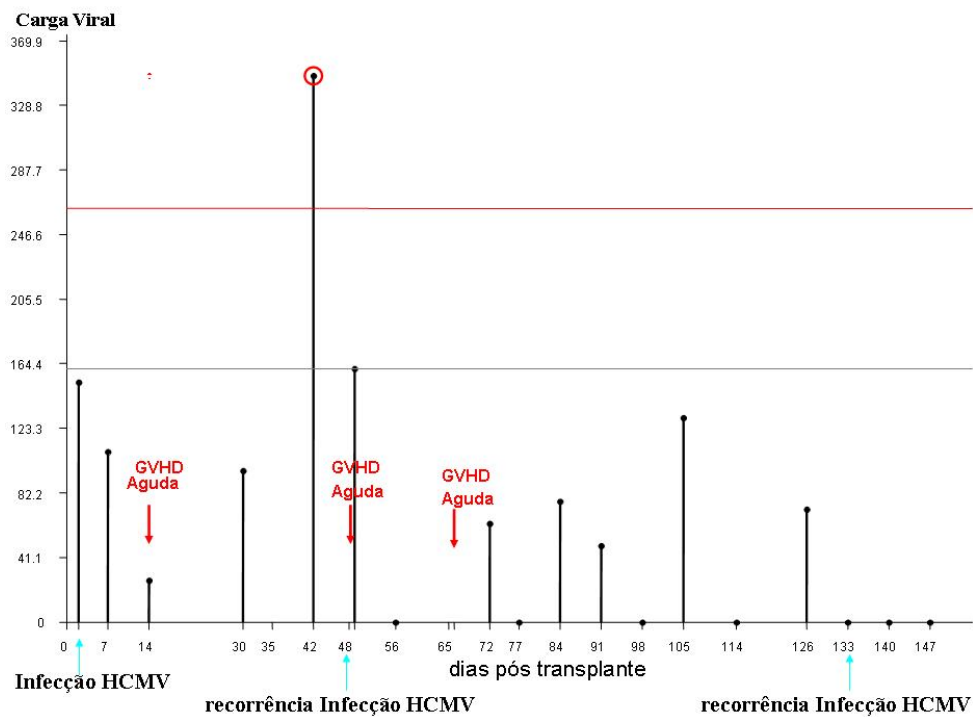


Gráfico 36- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 24.

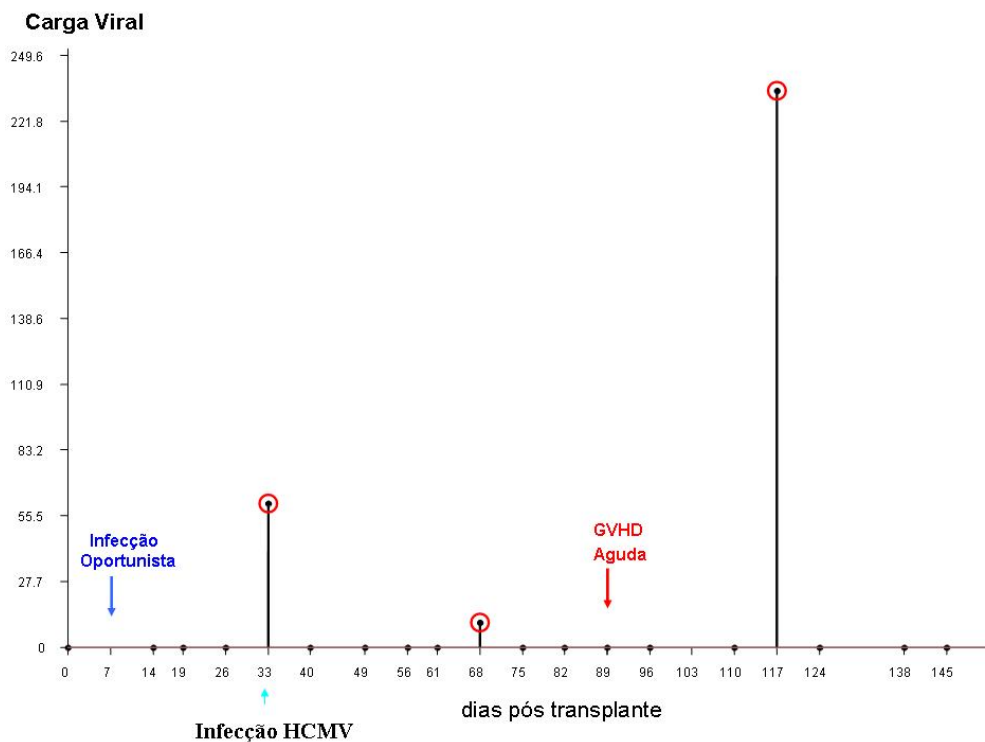


Gráfico 37- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 25. Este paciente apresentou, não apresentou picos em amostras de soro.

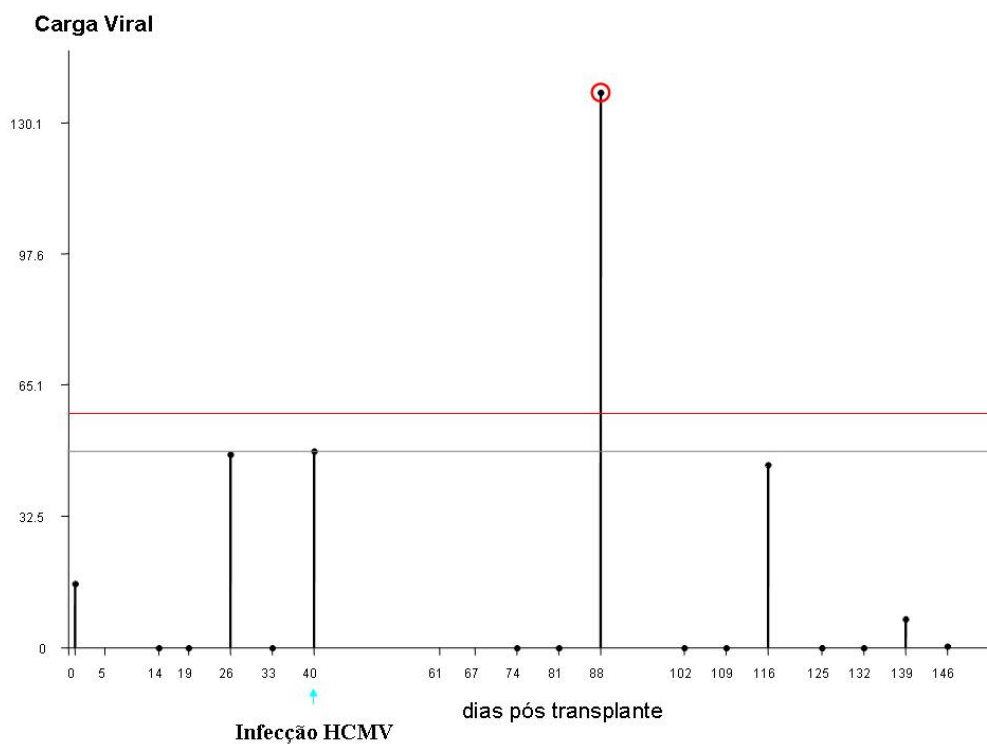


Gráfico 38- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 26. Este paciente não apresentou picos em amostras de DNA soro.

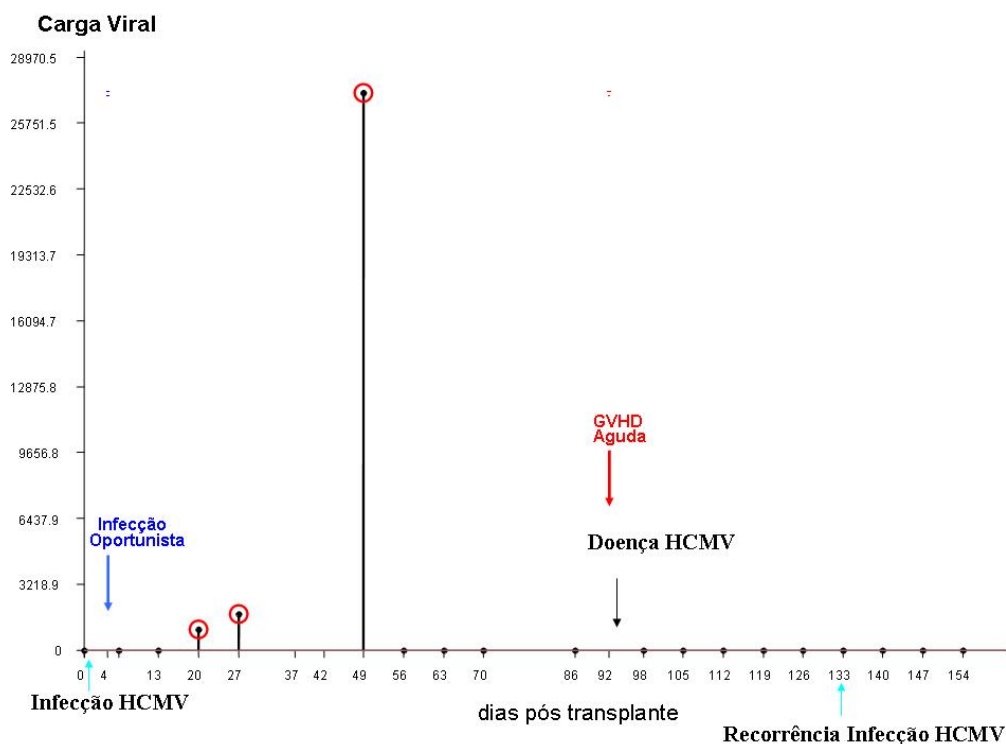


Gráfico 39- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 27.

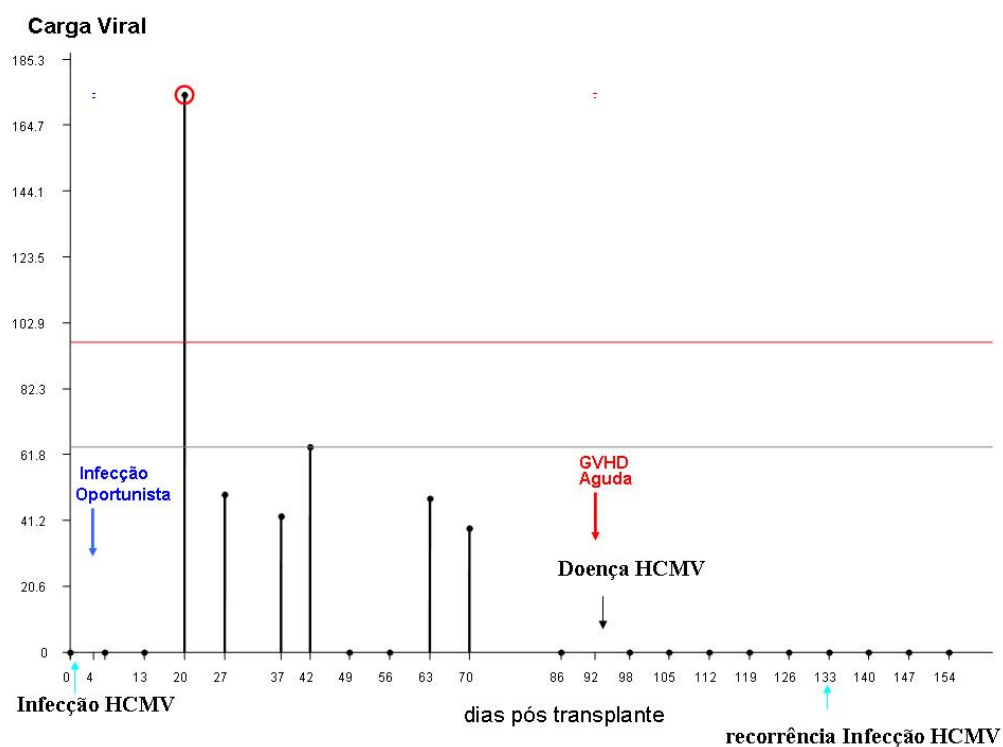


Gráfico 40- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 27.

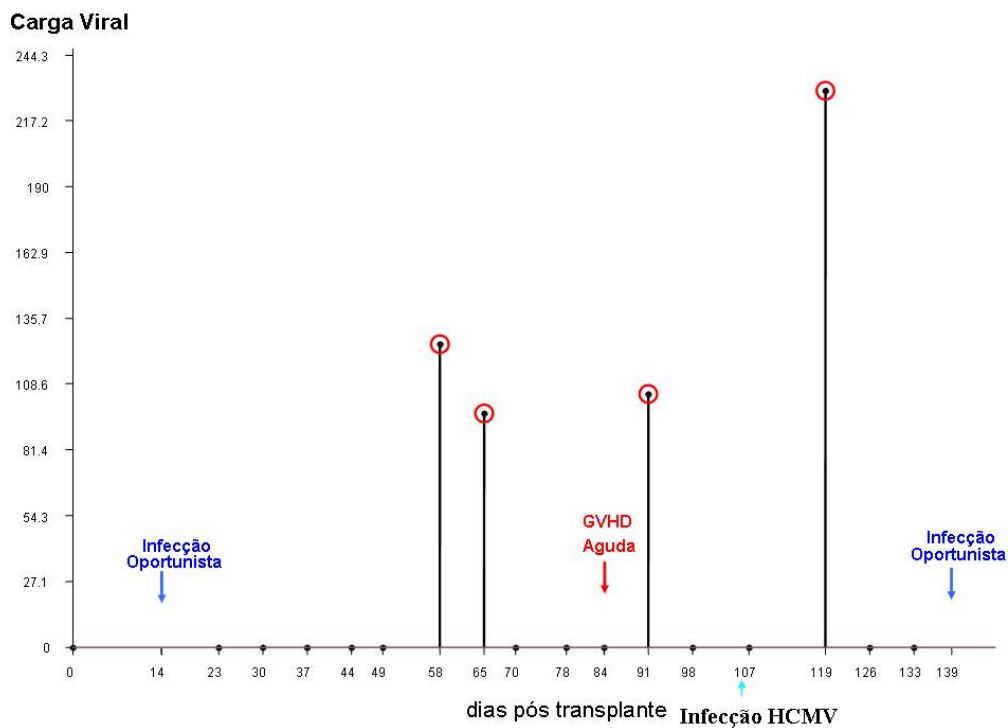


Gráfico 41- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 29.

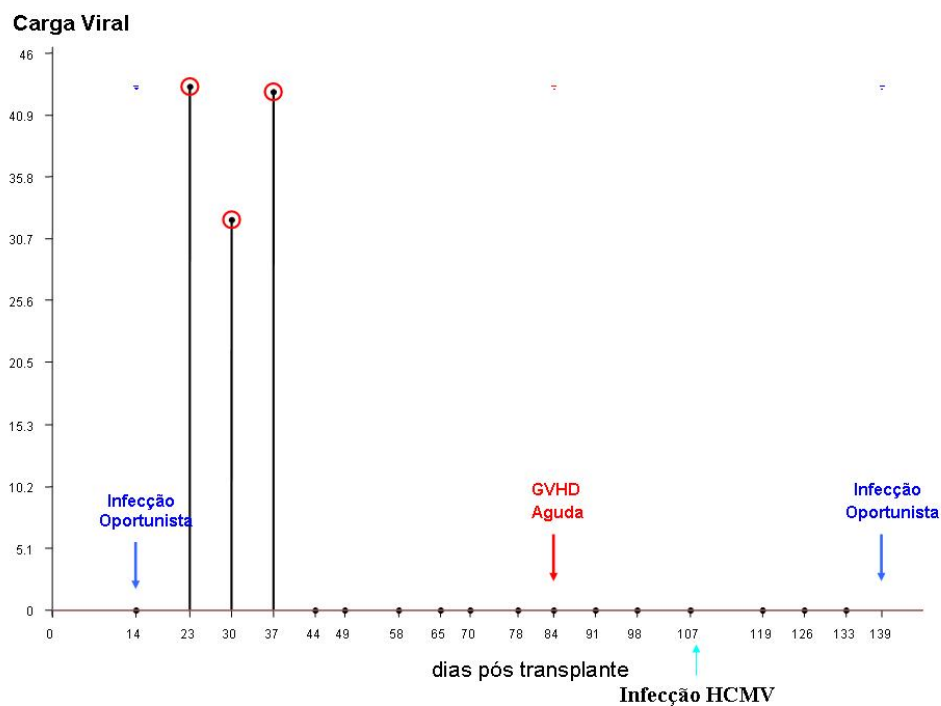


Gráfico 42- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 29.

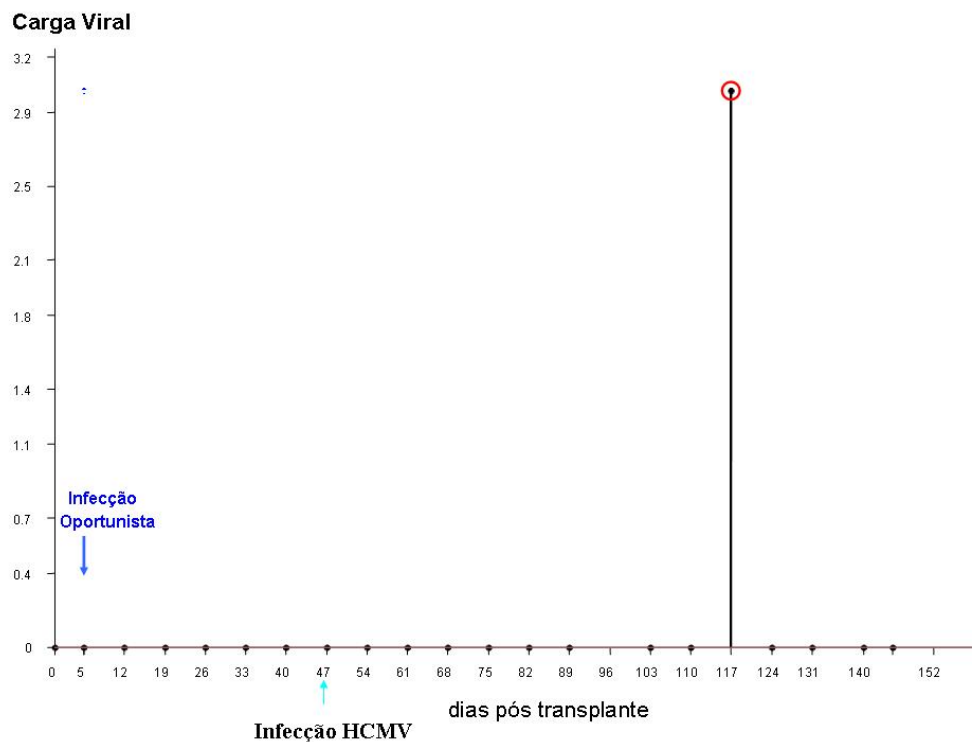


Gráfico 43- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de DNA de leucócitos do paciente 30.

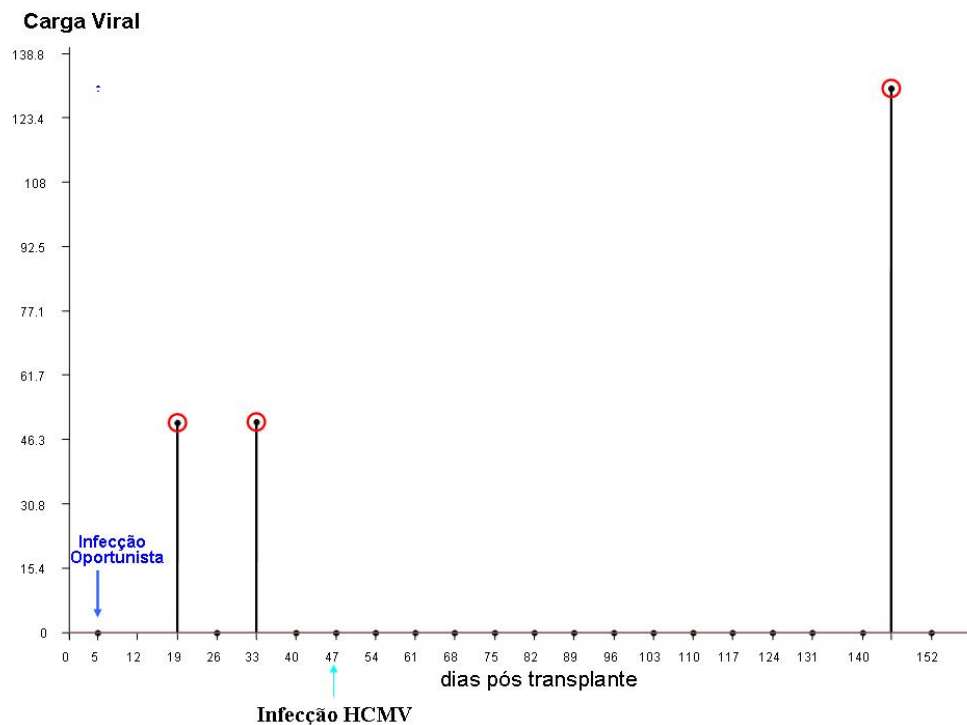


Gráfico 44- Perfil dos picos de carga viral do HHV-6 em PCR em tempo real em amostras de soro do paciente 30.

4.13- Incidência de doença por HCMV e provável doença por HCMV

Dos 30 pacientes monitorados neste estudo, 2 desenvolveram doença por HCMV com uma mediana de 86,5 dias (80-93 dias) após TCTH e ambos apresentaram doença gastrointestinal com confirmação da doença por biopsia gastrointestinal. Dois pacientes apresentaram provável doença por HCMV com mediana de 70,5 dias (30-111 dias) após TCTH, 1 com infecção gastrointestinal e outro com pneumonia intersticial, ambos sem confirmação por biopsia.

O paciente 9 apresentou doença causada por HCMV confirmada no dia 80 pós-transplante. As manifestações clínicas relacionadas com a doença no TGI ocorreram concomitantemente com elevação da carga viral do HCMV tanto em leucócitos quanto em soro como demonstrado nas figuras 16 e 17, e o reaparecimento dos sintomas ocorreu juntamente com novo pico de carga viral. Houve rejeição ao transplante no dia 149, que se localizava no período de elevação da carga viral. Durante as elevações da carga viral do HCMV também ocorriam elevações da carga viral do HHV-6 neste paciente (figura 18)

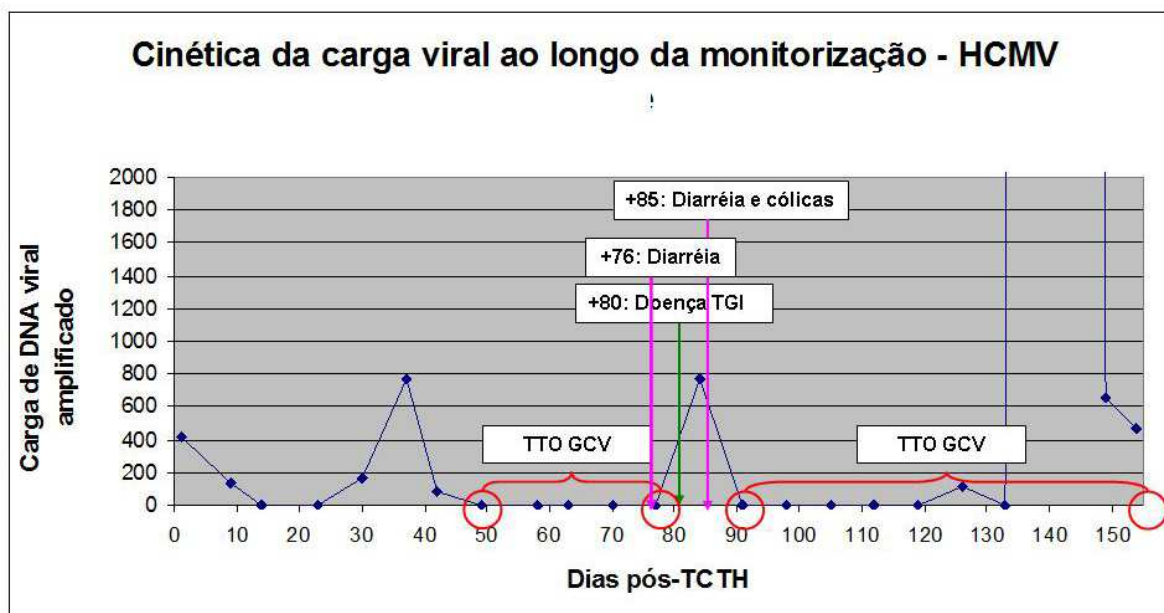


Figura 16- Cinética da carga viral do HCMV em amostras de DNA de leucócitos durante monitoramento do paciente 9, que apresentou doença causada por HCMV no TGI. TTO GCV= tratamento com ganciclovir.

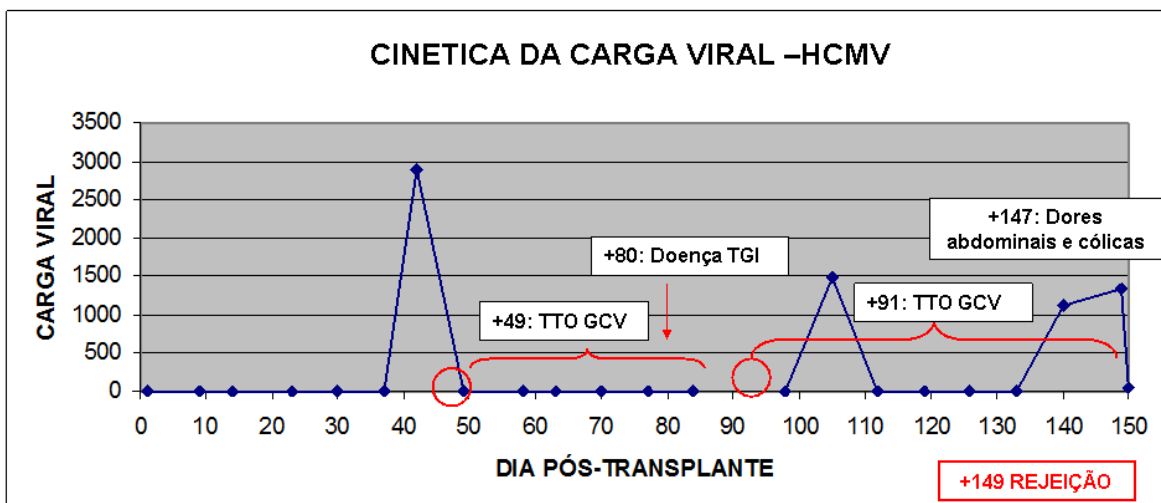


Figura 17- Cinética da carga viral do HCMV em amostras de DNA de soro durante monitoramento do paciente 9, que apresentou doença causada por HCMV no TGI. TTO GCV= tratamento com ganciclovir.

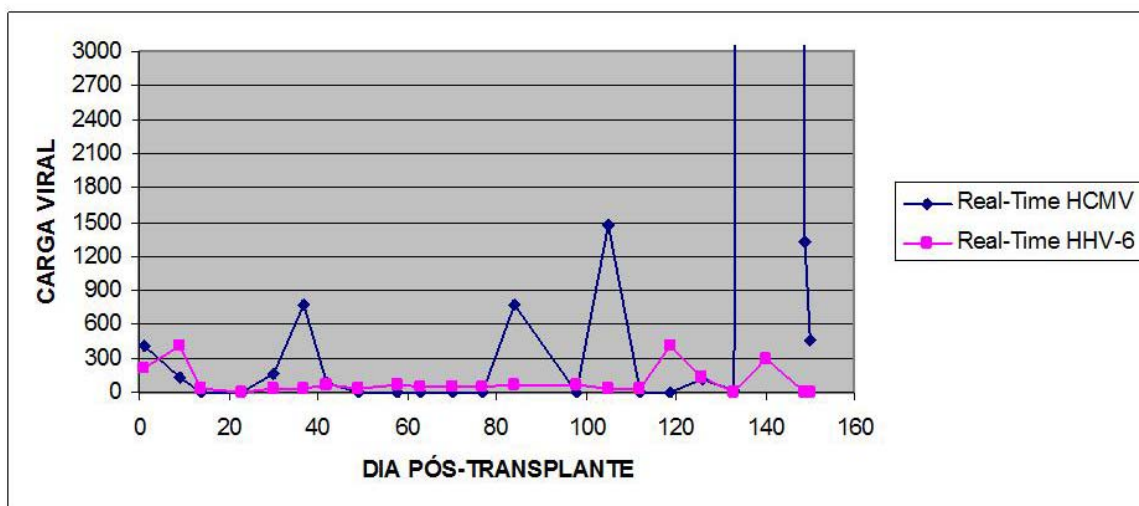


Figura 18- Cinética da carga viral do HCMV e do HHV-6 durante monitoramento do paciente 9.

O outro paciente que apresentou doença causada por HCMV no TGI (paciente 27), apresentou manifestações clínicas no dia 36 pós-transplante quando ocorria também pico de carga viral do HCMV. Com o início do tratamento houve queda da carga viral, porém no dia 147 durante tratamento de manutenção houve novo pico de carga viral e reaparecimento dos sintomas da doença causada por HCMV (figura 19). A ocorrência de

infecção oportunista neste paciente foi durante elevação de carga viral do HCMV como demonstrado na figura 20. A elevação da carga viral do HHV-6 ocorreu em dois momentos concomitantemente com a do HCMV (figura 21).

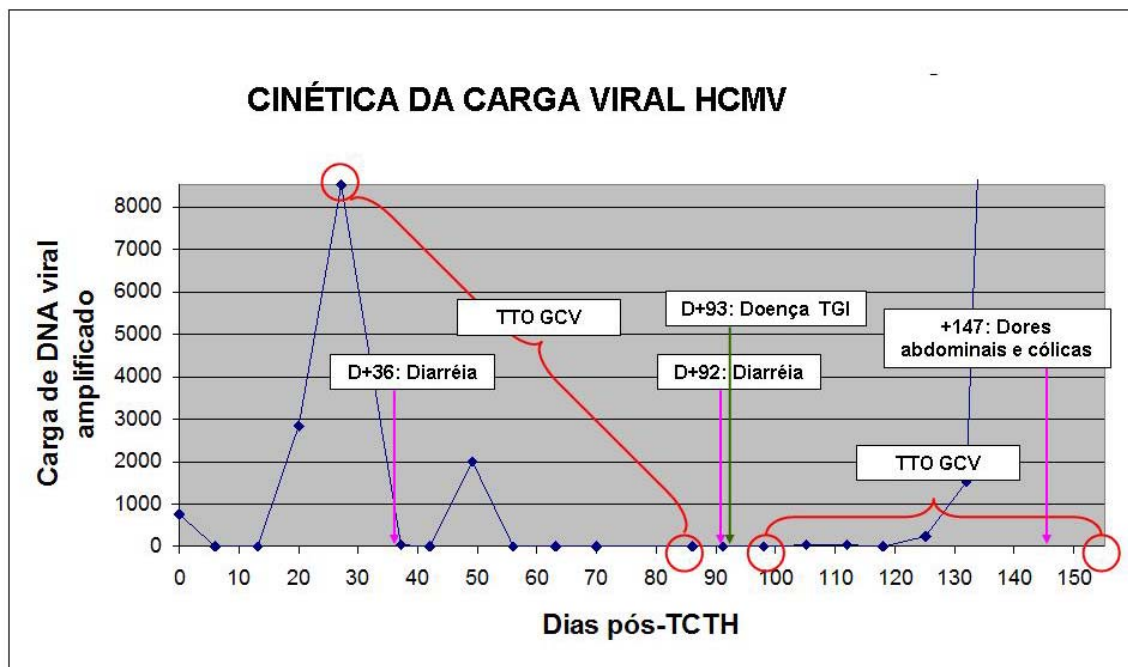


Figura 19- Cinética da carga viral do HCMV em amostras de DNA de leucócitos durante monitoramento do paciente 27, que apresentou doença causada por HCMV no TGI. TTO GCV= tratamento com ganciclovir.

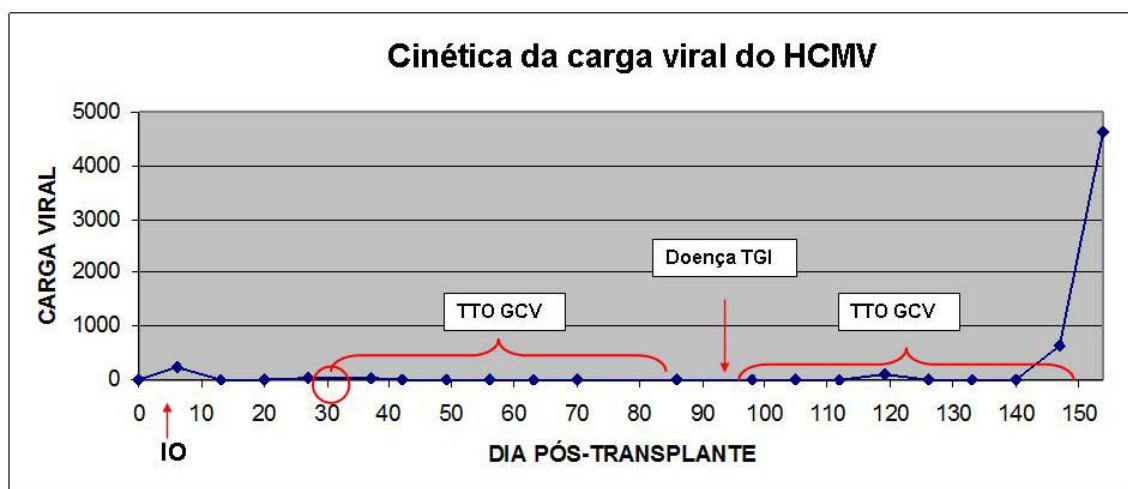


Figura 20- Cinética da carga viral do HCMV em amostras de DNA de soro durante monitoramento do paciente 27, que apresentou doença causada por HCMV no TGI. TTO GCV= tratamento com ganciclovir, IO= infecção oportunista.

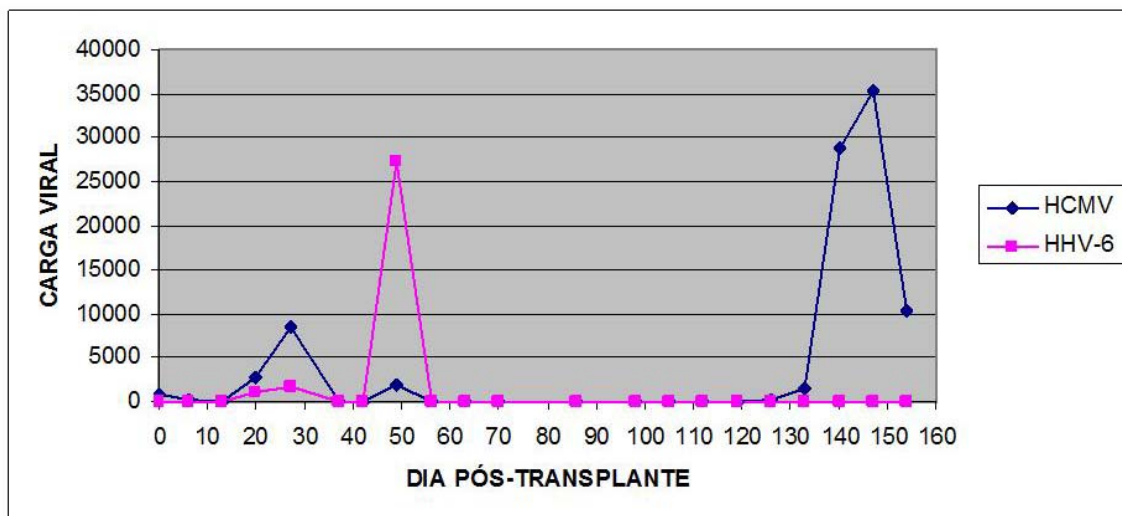


Figura 21- Cinética da carga viral do HCMV e do HHV-6 durante monitoramento do paciente 27.

4.14- Principais complicações associadas à infecção ativa viral (HHV-6 E HCMV) e transplante de células tronco hematopoiéticas

Dentre as principais ocorrências em TCTH, o grupo monitorado apresentou 13 pacientes (43,33%) com DECH (doença do enxerto contra o hospedeiro), 21 (70%) com infecção oportunista, 5 (16,67%) tiveram rejeição ao transplante e 4 (13,33%) apresentaram distúrbio neurológico.

4.15- Monitoramento da terapia antiviral

A terapia antiviral instituída foi precoce com ganciclovir. Dos 30 pacientes 9 não foram tratados. Destes 6 pacientes não apresentaram infecção ativa por HCMV em nenhum dos testes diagnósticos (antigenemia/nested-PCR em leucócitos) pelos quais são monitorados na rotina do serviço de transplante de medula óssea. Porém 5 deles apresentaram infecção ativa pelos testes realizados neste estudo, 4 para HCMV e HHV-6 e 1 só para HCMV.

Dos 3 pacientes que apresentaram infecção ativa por HCMV pela rotina, 1 não foi tratado, pois, apresentou infecção ativa apenas pela nested-PCR sem apresentar complicações e apresentou negatização dos testes diagnósticos em seguida. O paciente 6 não foi tratado, pois, quando apresentou confirmação da infecção ativa pelos testes diagnósticos da rotina, havia apresentado complicações mais severas não associada e evoluiu a óbito. O paciente 16 apresentou infecção ativa pela rotina no final do acompanhamento deste estudo e pode ter sido tratado após este período.

Dos pacientes que apresentaram infecção ativa somente pelos testes envolvidos neste estudo e que não fazem parte do monitoramento da rotina do STMO, 2 apresentaram infecção oportunista e um deles apresentou rejeição ao transplante.

Os gráficos 45 a 65 demonstram o monitoramento da carga viral nestes pacientes, as datas das complicações apresentadas e o início e término (quando ocorreu dentro do período do acompanhamento do estudo) do tratamento antiviral. Alguns pacientes não apresentam a data de término, pois, estavam recebendo as doses de manutenção.

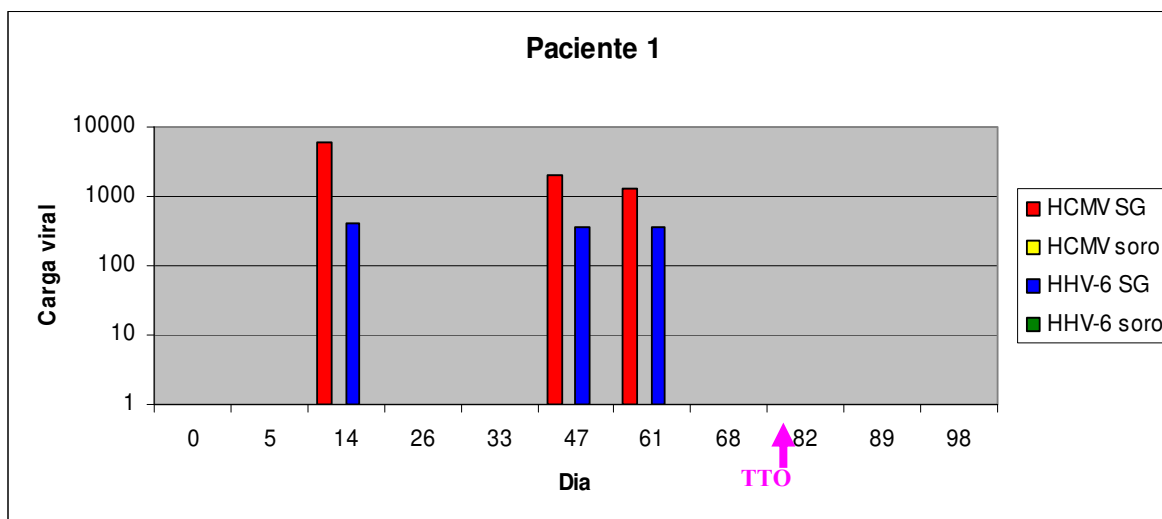


Gráfico 45- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 1. TTO = início do tratamento

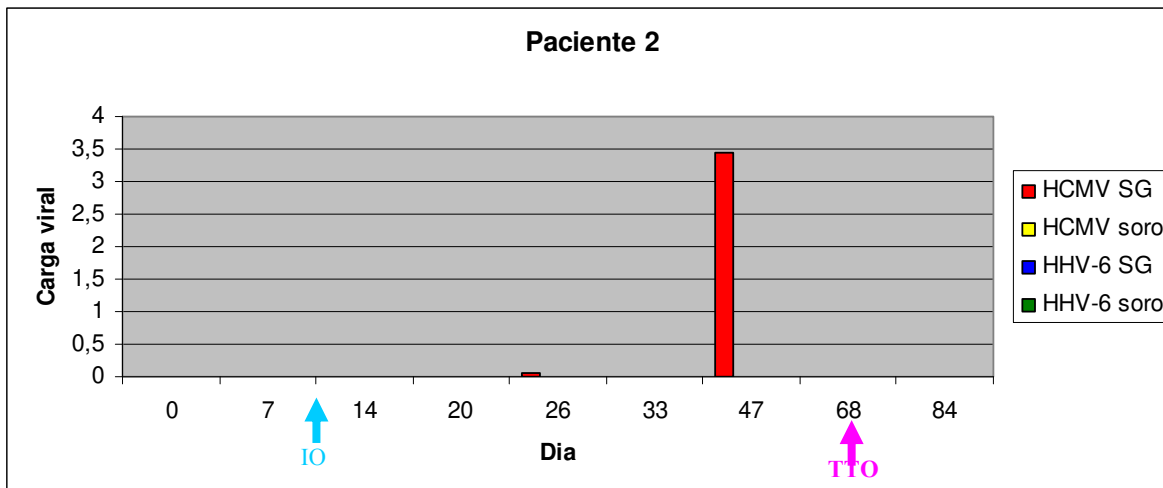


Gráfico 46- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 2. TTO = início do tratamento, IO = infecção oportunista.

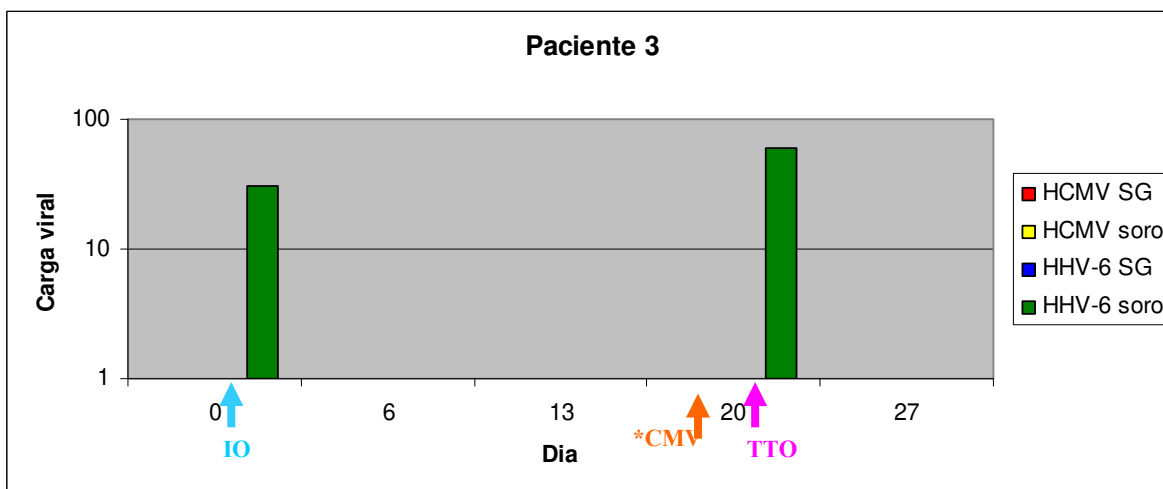


Gráfico 47- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 3. TTO = início do tratamento, IO = infecção oportunista, * CMV = provável doença por HCMV.

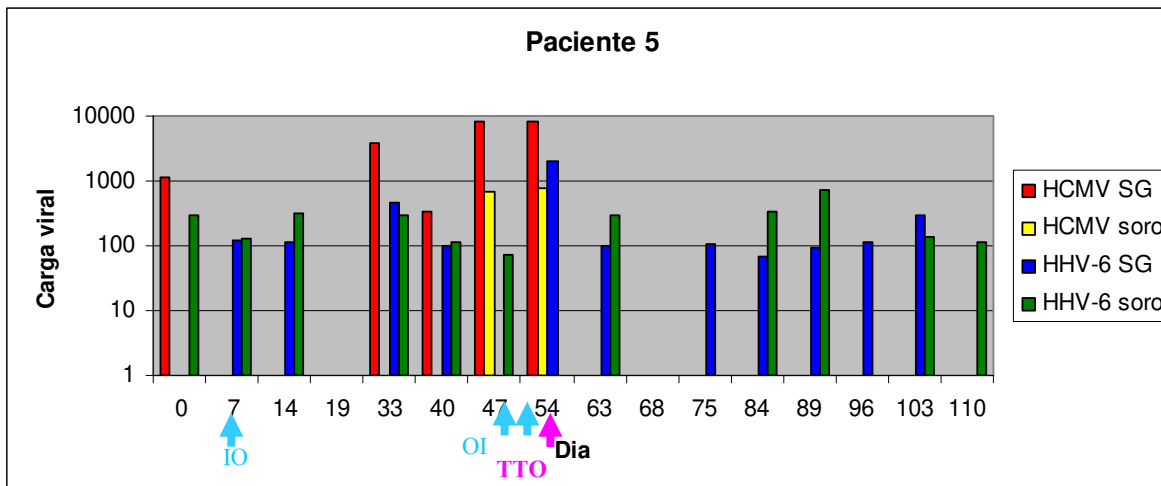


Gráfico 48- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 5. TTO = início do tratamento, IO = infecção oportunista.

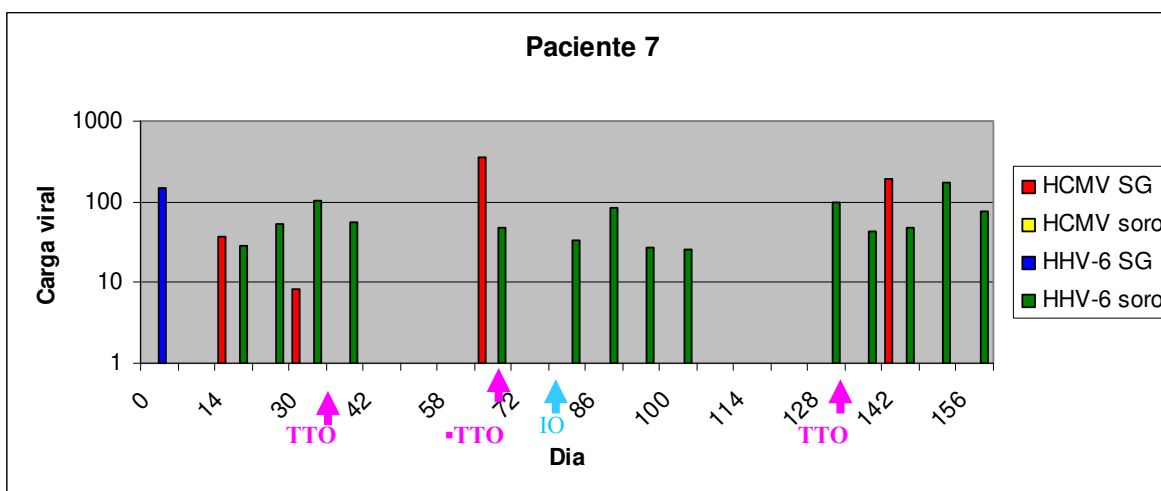


Gráfico 49- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 7. TTO = início do tratamento, •TTO = término do tratamento, IO = infecção oportunista.

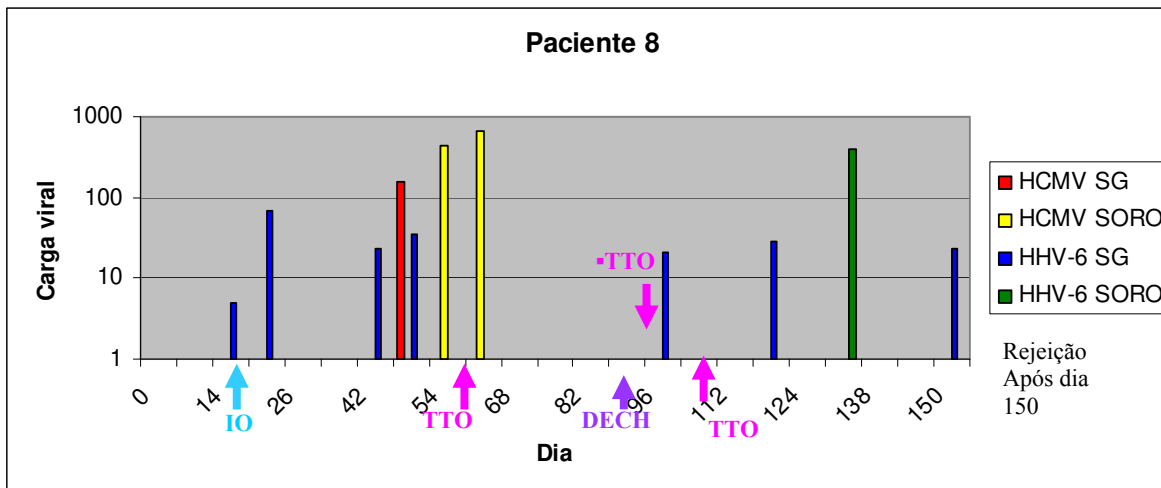


Gráfico 50- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 8. TTO = início do tratamento, ■ TTO = término do tratamento, IO = infecção oportunista, DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro.

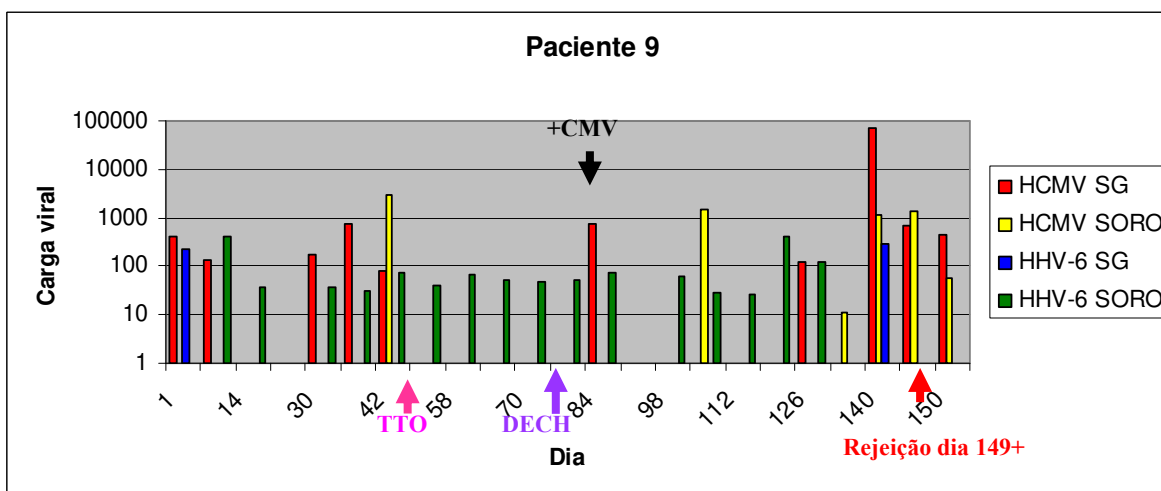


Gráfico 51- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 9. TTO = início do tratamento, DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro, + CMV = doença por HCMV.

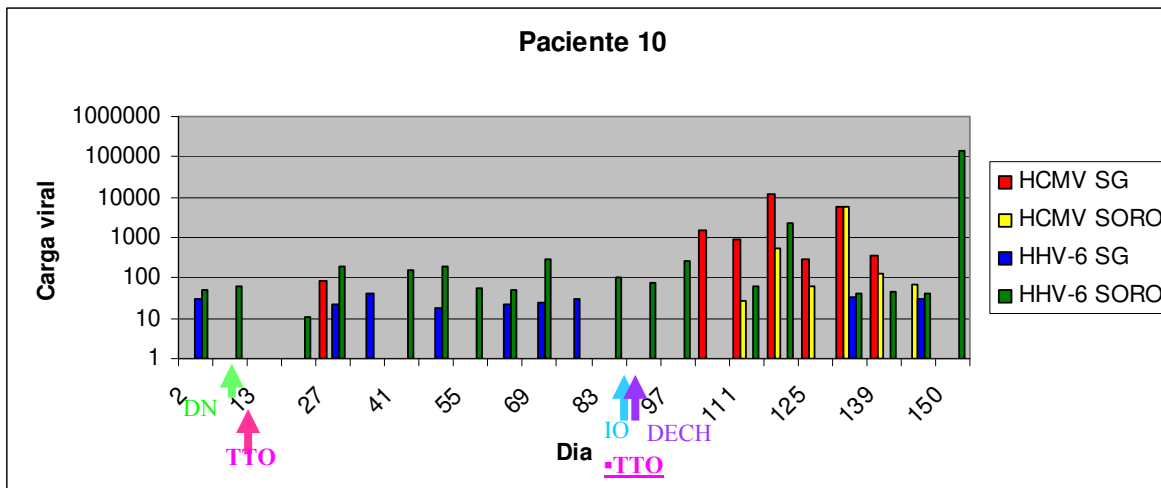


Gráfico 52- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 10. TTO = início do tratamento, ■ TTO = término do tratamento, IO = infecção oportunista, DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro, DN = distúrbio neurológico.

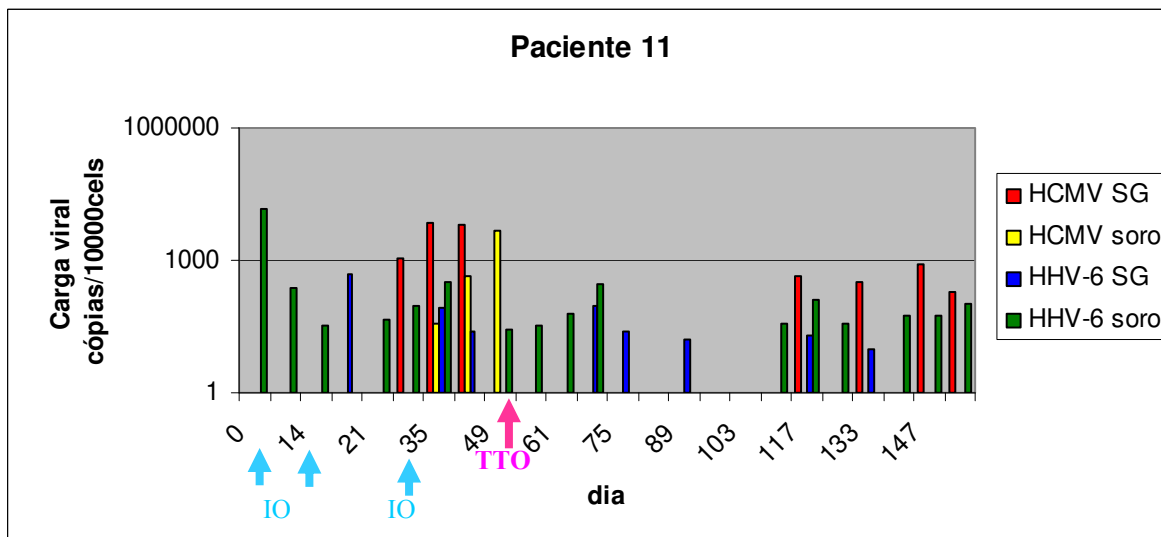


Gráfico 53- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 11. TTO = início do tratamento, IO = infecção oportunista.

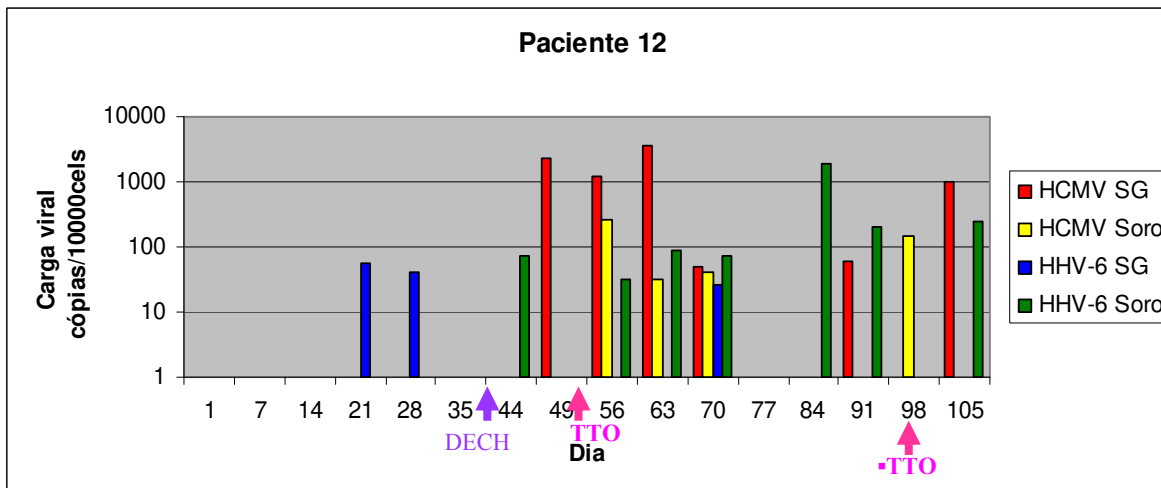


Gráfico 54- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 12. TTO = início do tratamento, ■ TTO = término do tratamento, DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro.

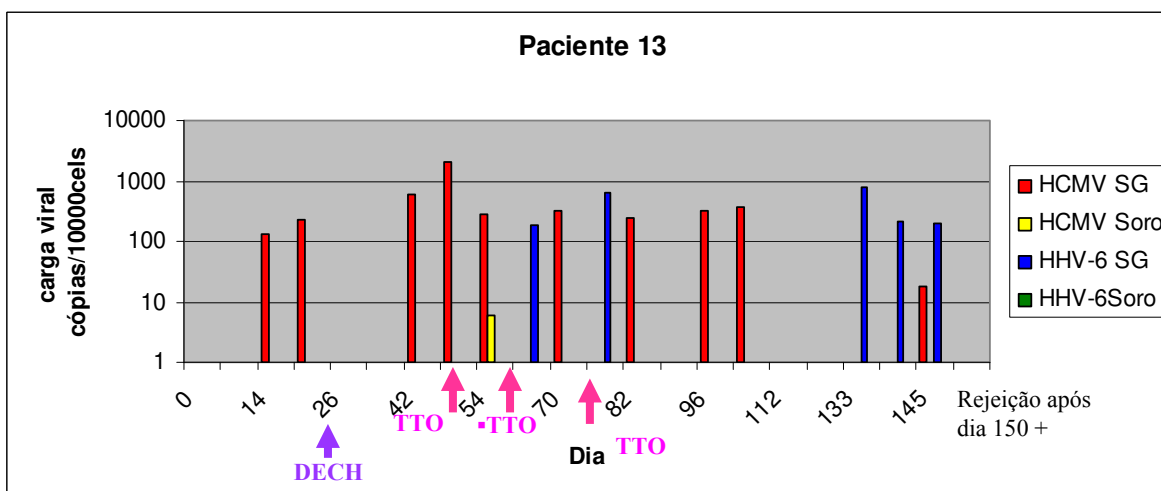


Gráfico 55- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 13. TTO = início do tratamento, ■ TTO = término do tratamento, DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro.

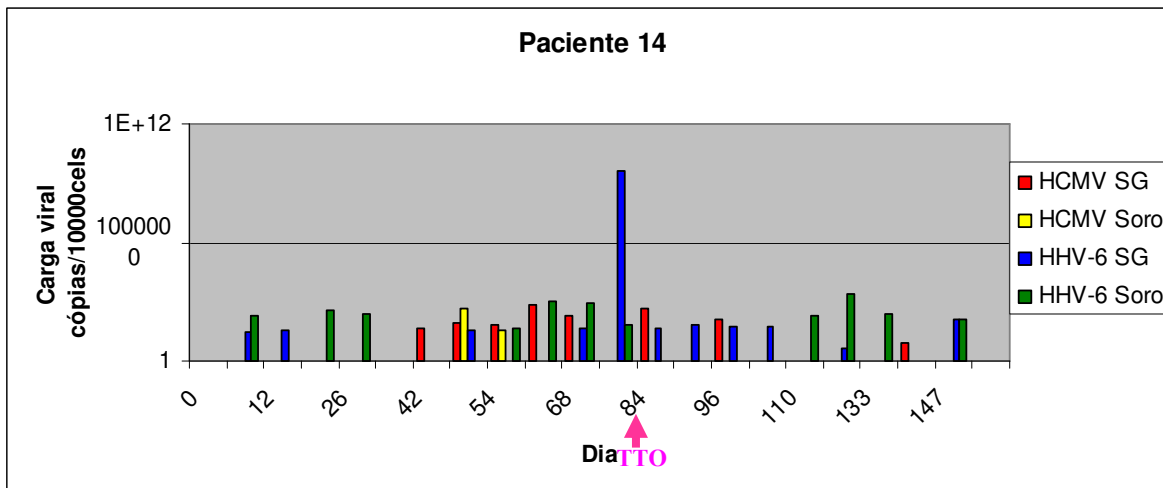


Gráfico 56- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 14. TTO = início do tratamento.

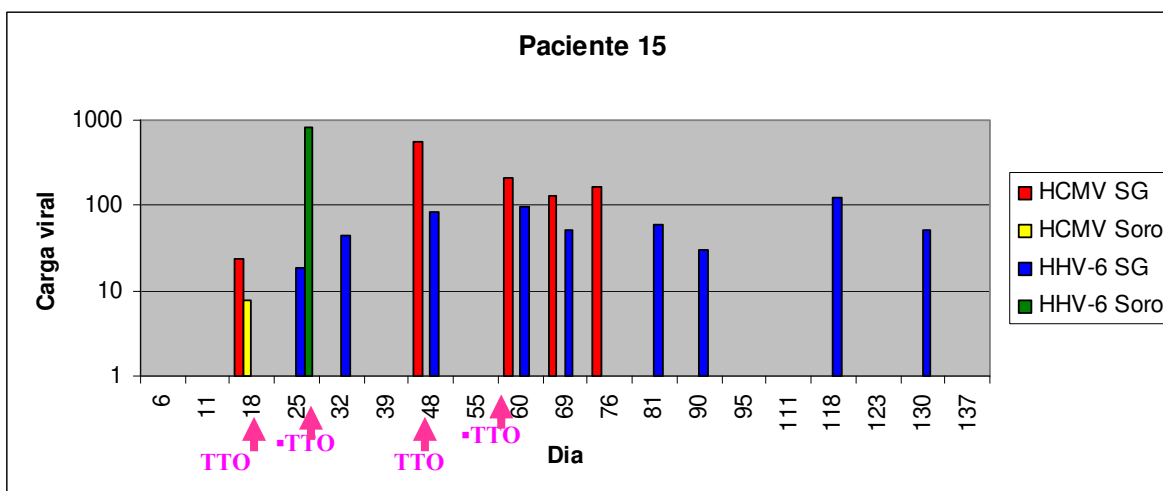


Gráfico 57- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 15. TTO = início do tratamento, ■ TTO = término do tratamento.

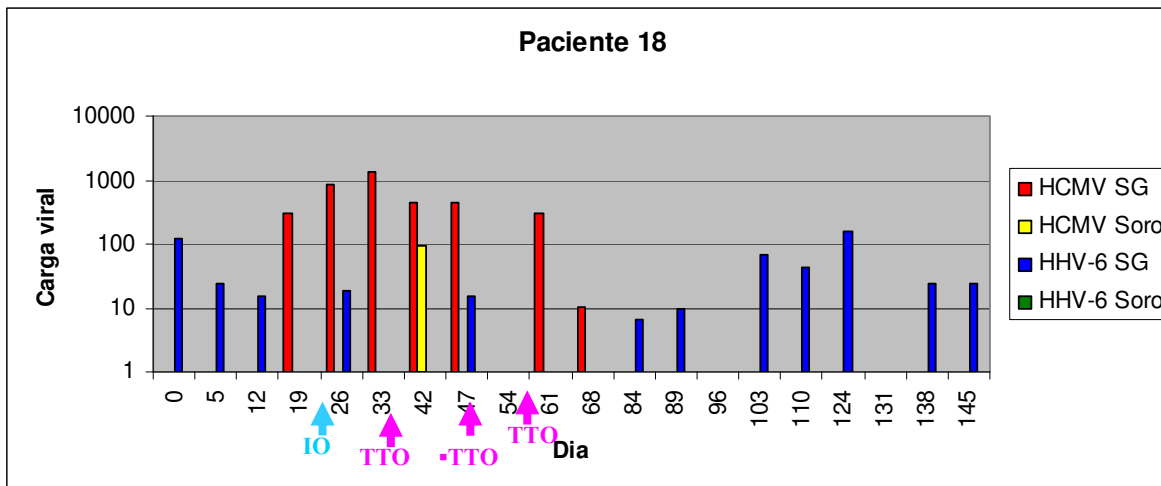


Gráfico 58- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 18. TTO = início do tratamento, ■ TTO = término do tratamento, IO = infecção oportunista.

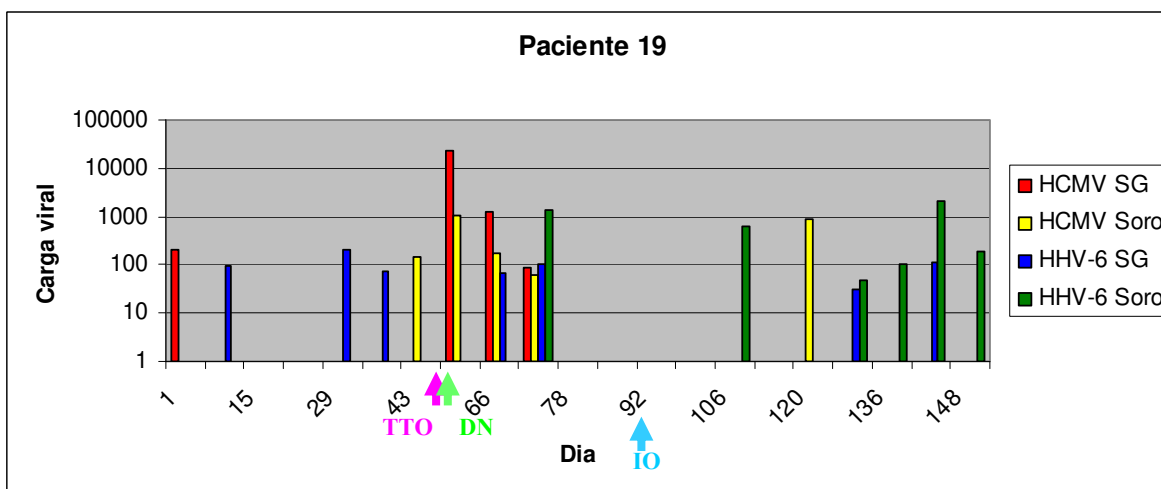


Gráfico 59- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 19. TTO = início do tratamento, IO = infecção oportunista, DN = distúrbio neurológico.

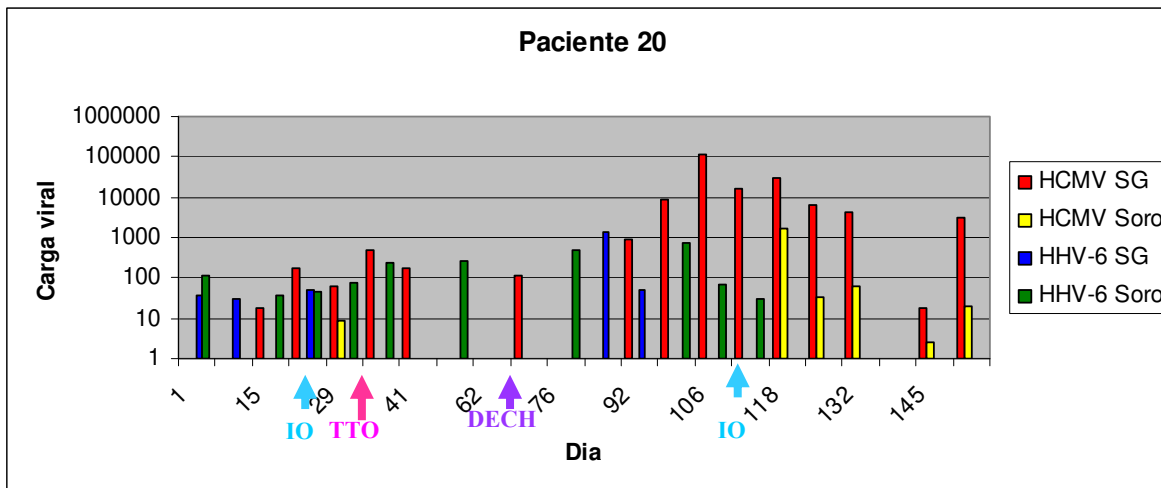


Gráfico 60- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 20. TTO = início do tratamento, IO = infecção oportunista, DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro.

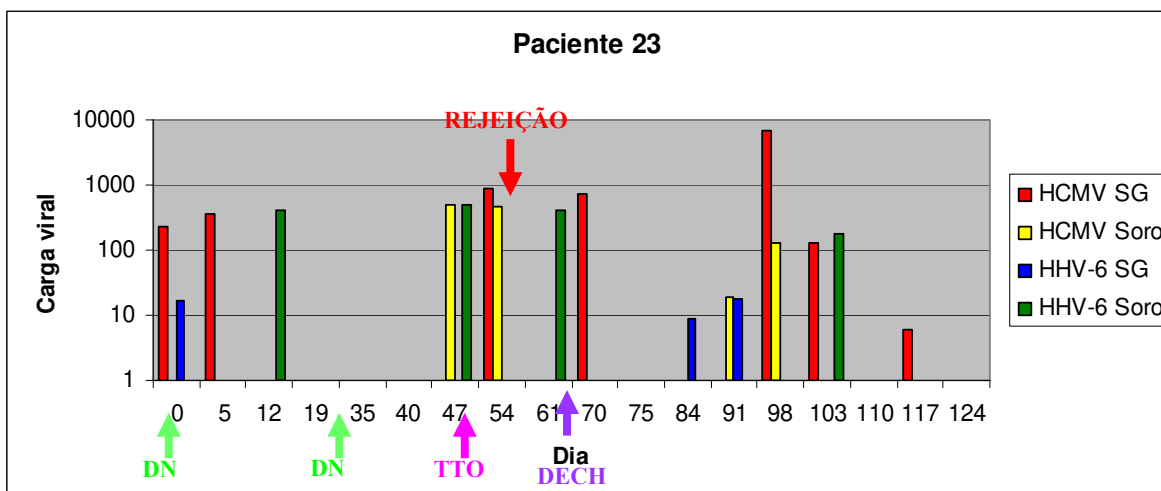


Gráfico 61- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 23. TTO = início do tratamento, IO = infecção oportunista, DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro, DN = distúrbio neurológico.

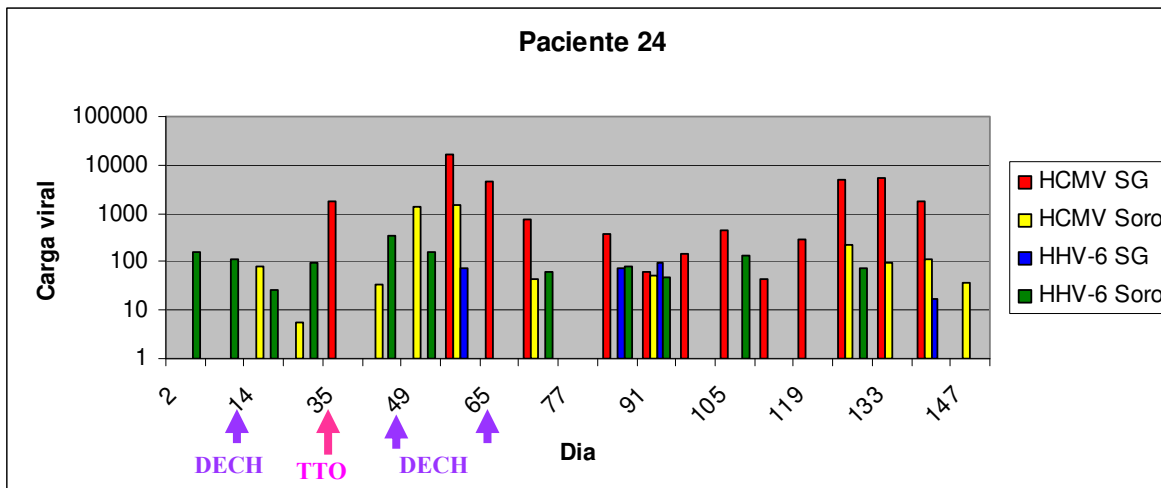


Gráfico 62- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 24. TTO = início do tratamento, DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro.

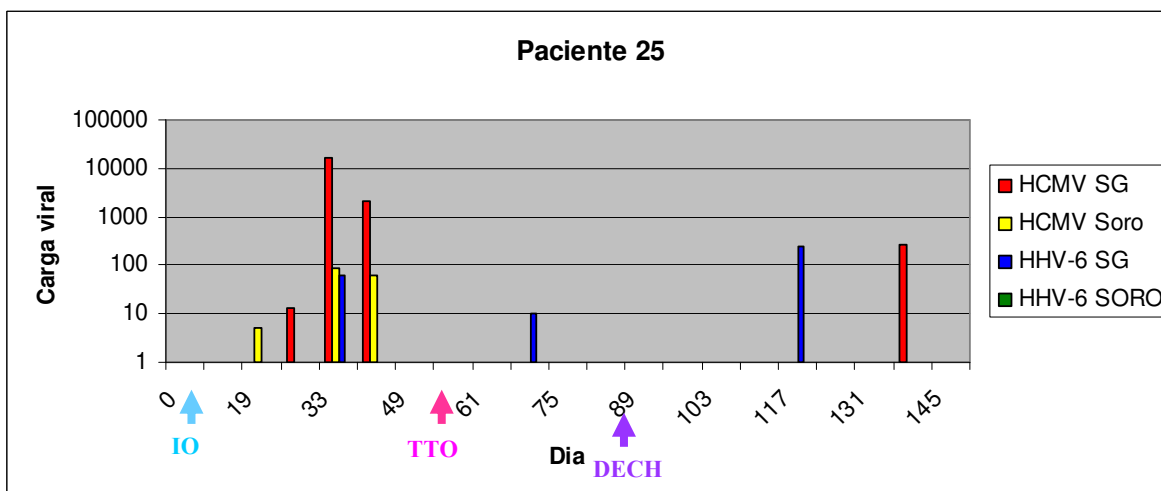


Gráfico 63- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 25. TTO = início do tratamento, IO = infecção oportunista, DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro.

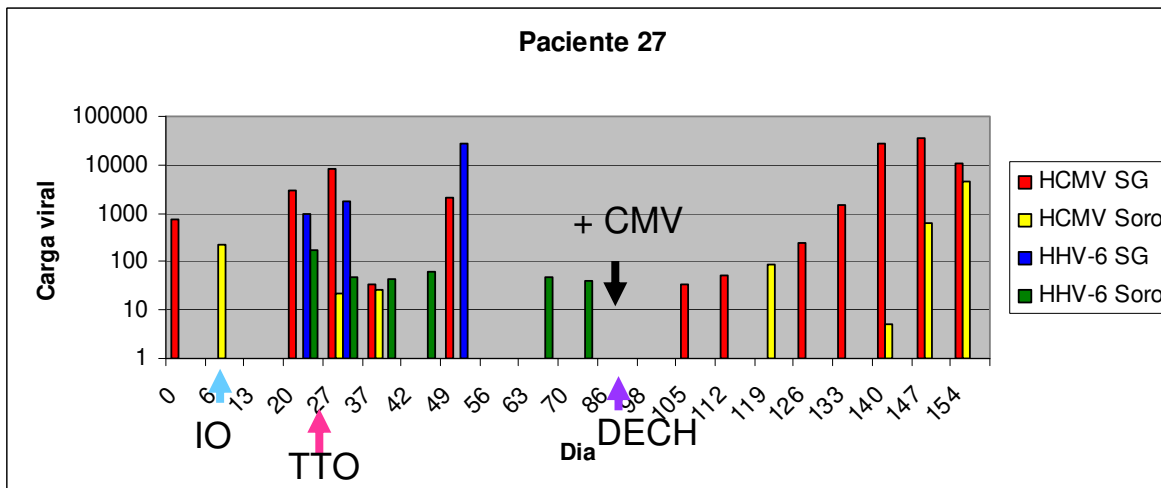


Gráfico 64- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 27. TTO = início do tratamento, IO = infecção oportunista, DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro, + CMV = doença por HCMV.

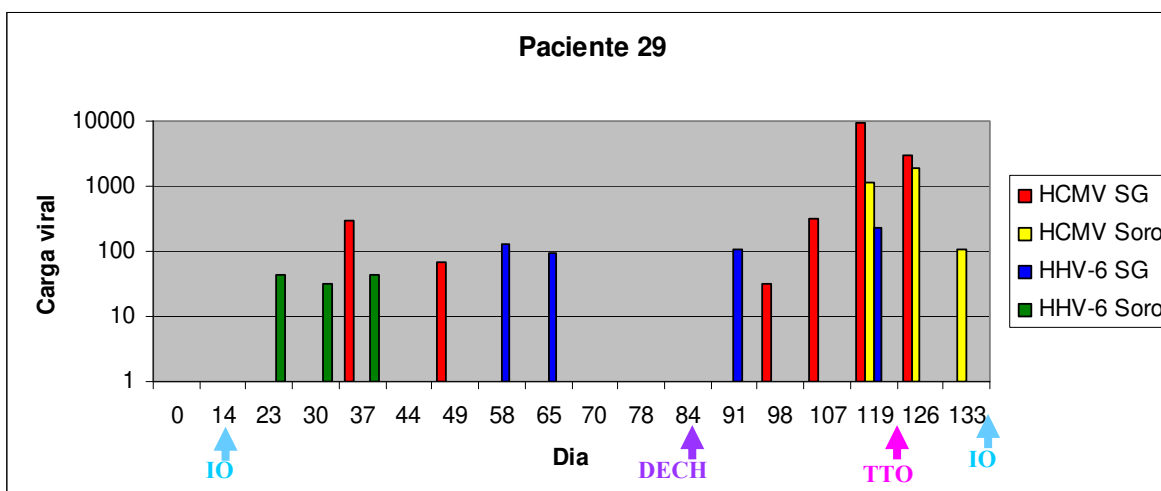


Gráfico 65- Monitoramento da terapia antiviral e carga viral do HCMV e HHV-6 no paciente 29. TTO = início do tratamento, IO = infecção oportunista, DECH = doença do enxerto contra o hospedeiro.

As cargas virais estão representadas em valores absolutos em escala logarítmica. Os valores em amostras de leucócitos são dados em número de cópias/ 10^4 células devido a correlação com a antigenemia. Para o HHV-6 também fizemos a transformação para número de cópias/ng de DNA para comparação com a literatura. Os valores de soro são expressos em número de cópias/ml.

4.16- Incidência de doença/provável doença por HHV-6

Neste grupo de estudo, mesmo detectando viremia do HHV-6 e sintomas associados a doença por HHV-6, não foi possível isolar todas as variáveis e afastar todas as demais possibilidades para caracterizar doença por HHV-6

4.17- Causas dos óbitos

Os 30 pacientes monitorados, 13(43,33%) morreram após o transplante com uma mediana de 203 dias (33-534). Cinco pacientes morreram por progressão da doença (2 por leucemia linfóide aguda, 1 por leucemia mielóide aguda, 1 por doença de Kodgkin e 1 por mielofibrose), 1 evoluiu a óbito por doença por HCMV associada a GVHD agudo, um por provável doença por HCMV, dois por infecção oportunista por *Fusarium*, um por infecção hospitalar por *Acinetobacter baumannii*, um por pericardite, um por sinusite fúngica e um por infecção fúngica.

5- DISCUSSÃO



A doença provocada por citomegalovirus é uma das principais complicações após transplante de células tronco hematopoiéticas. O risco de desenvolver infecção ativa por HCMV é maior em pacientes que recebem transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas. A identificação e monitoramento da infecção ativa, reinfecção ou reativação da infecção ativa e um tratamento preventivo são críticos para estes pacientes.

A reação em cadeia da polimerase qualitativa até recentemente era o método mais usado para detecção da infecção ativa, porém, a PCR em tempo real (real-time-PCR) que permite uma análise quantitativa, já que determina a carga viral, tem se tornado o método de escolha, devido à sua rapidez e sensibilidade (Martin-Davila et al.,2005). No Brasil, o primeiro estudo que utilizou a PCR na identificação da infecção ativa pelo HCMV foi o trabalho de COSTA *et al*, 1999, utilizando a PCR simples, seguida de hibridização específica em amostras de urina de 37 pacientes transplantados renais. Os resultados foram comparados com testes sorológicos (ELISA e Imunofluorescência) e mostraram que 32/37 pacientes (86,48%) apresentaram evidências de infecção ativa por HCMV; destes, 16 (43,2%) apresentaram manifestações clínicas sugestivas de provável doença por HCMV. Esse estudo confirma a relevância da infecção ativa pelo HCMV após o transplante renal.

A associação entre carga do DNA do HCMV e risco para desenvolvimento da doença por HCMV foi descrita implicando na necessidade de realizar uma quantificação e monitoramento da carga do DNA do HCMV no período pós-transplante.

Neste trabalho desenvolvemos um ensaio de PCR em tempo real, construindo uma curva padrão específica para o *herpesvirus humano 6* (HHV-6) e uma curva padrão específica para o *citomegalovirus* humano também denominado *herpesvirus humano 5* (HCMV), utilizando primers e sondas específicos. Utilizando esta metodologia encontramos uma sensibilidade de 100% para a PCR em tempo real em amostras de leucócitos, e especificidade de 100% para PCR em tempo real em soro, o que sugere que estas técnicas foram desenvolvidas com sucesso e são boas metodologias para detecção da infecção ativa por HCMV. Para os pacientes receptores de transplante de células tronco hematopoiéticas, o teste de antigenemia para detecção da infecção ativa por HCMV é realizado rotineiramente, o que permitiu que estes dados pudessem ser utilizados para a determinação de um ponto de corte para diferenciar infecção ativa de latência viral.

A determinação do ponto de corte para amostras de leucócitos foi realizada através da construção da curva ROC (receiver operator characteristic). Esta análise é feita utilizando os valores de carga viral obtidos com a PCR em tempo real em leucócitos e os valores encontrados com a antigenemia. O teste de antigenemia do antígeno *pp65* é usado como padrão sendo 1 célula positiva/ 2×10^5 considerada como referencia.

Para o HHV-6 os testes de antigenemia não são realizados rotineiramente, e sem estes valores para relacionar com a PCR em tempo real e construir a curva ROC, não foi possível determinar um ponto de corte para este vírus. No entanto a literatura apresenta estudos em pacientes receptores de células tronco hematopoiéticas, utilizando os mesmos testes e a mesma relação que estabelecemos neste estudo para o HCMV para a determinação do ponto de corte para o HHV-6. Utilizamos o valor de ponto de corte encontrado na literatura de 100 cópias/ μ g de DNA para identificar a infecção ativa por HHV-6 em amostras de DNA de leucócitos nos pacientes monitorados no presente estudo. Este valor é alto e somente 2 pacientes apresentaram infecção ativa, apesar de termos detectado alta carga viral em vários casos.

Outro meio de identificação da infecção viral ativa é através da detecção de transcritos de genes tardios. A presença de mRNA viral oferece uma grande vantagem na diferenciação entre latência e infecção ativa (Gozlan et al, 1992), pois, não requer a quantificação da carga viral. A transcrição reversa acoplada a PCR para detecção de mRNA de regiões de splicing do HCMV tem sido demonstrados para regiões dos genes imediatamente precoces (IE) (Taylor-Wiedeman, 1991, Bitsh 1993; Velzing 1994), mas o valor desta técnica como marcador da infecção ativa por HCMV pode ser questionada, pois, os genes imediatamente precoces são transcritos durante período de latência em monócitos (Taylor-wiedman, 1994). RT-PCR que detecta transcritos tardios do HCMV é um método mais relevante para identificação da infecção ativa viral.

Baseado em estudos de PCR para detecção de genes transcritos tardios em regiões de splicing do HCMV e do HHV-6, desenvolvemos RT-PCR para diagnostico da infecção ativa por HCMV (Nelson et al 1996) e HHV-6(Norton,1999). Estes ensaios permitem amplificar produtos com tamanhos diferentes de fragmentos que diferem RNA de contaminação com DNA residual.

Entre os parâmetros que caracterizam a utilidade clínica da RT-PCR, o valor preditivo positivo (VPP) é o mais importante. O valor preditivo positivo encontrado neste estudo foi de 86,7% para o HCMV, o que é comparável com outros estudos (Boriskin et al, 2002, Gerna et al, 2000) que encontraram um VPP entre 80 e 100%. O estudo que encontrou um VPP de 100% usou com “padrão ouro” testes de antígeno do HCMV que são limitados. Nós comparamos a RT-PCR com a Nested-PCR e PCR em tempo real que são testes superiores em termos de sensibilidade e especificidade.

No presente estudo, 30 pacientes que receberam transplante de células tronco hematopoiéticas foram monitorados para identificação da infecção ativa por HCMV e HHV-6 pela nested PCR em amostras de DNA de soro e leucócitos, PCR em tempo real em amostras de DNA de soro e leucócitos e pela RT-PCR. Utilizando todos os testes a infecção ativa por HCMV foi detectada em 29 pacientes (96,66%) e este achado sustenta a relevância do HCMV como fator de risco para o desenvolvimento de complicações pós-transplante.

Utilizando todos os testes a infecção ativa por HHV-6 foi identificada em 26 pacientes (86,66%), porém, como relatado na literatura a PCR para detecção do DNA do HHV-6 em sangue não é um bom marcador para infecção ativa por HHV-6, pois, não distingue entre estágio de latência e replicação (IHIRA, et al, 2002). A detecção do DNA do HHV-6 em amostras de soro ou plasma é uma ferramenta mais útil para caracterização da infecção ativa (Nitsche, 2001), porém, identificamos apenas 1 paciente com infecção ativa por esta técnica. Eliminando-se então os dados da nested-PCR em leucócitos, como marcador de replicação viral, encontramos 25 pacientes (83,33%) positivos para infecção ativa por HHV-6.

Dentre os testes para detecção da infecção ativa encontramos correlação entre a RT-PCR e a PCR em tempo real em leucócitos.

Além de todas as complicações associadas ao HHV-6 em pacientes transplantados, seus efeitos indiretos parecem ser mais importantes do que as doenças atribuídas a ele. Estudos sugerem que o HHV-6 possui um efeito imunomodulatório e pode estar associado com a rejeição ao transplante e ocorrência da doença causada por citomegalovírus (Singh, 1997; Dockrell, 1997; Desjardins, 1998).

Há grandes evidências que sugerem o efeito imunomodulador do HHV-6. Estudos *in vitro* demonstraram que a infecção em células T por HHV-6 resultam em imunossupressão, caracterizado por uma alteração na regulação do mRNA da interleucina-2 e da síntese protéica, acompanhada de uma significativa redução na resposta celular proliferativa (Flammand, 1995). A imunossupressão geral induzida pelo HHV-6 predispõe o paciente a infecções oportunistas ou pode ter interações mais específicas com o HCMV. O HHV-6 modula a expressão de citocinas em células mononucleares infectadas, incluindo uma potente indução na produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) (Flammand, 1991). O TNF- α estimula a região promotora de genes imediatamente precoce do HCMV, resultando em reativação do HCMV. Os estudos que avaliaram a relação entre infecção por HHV-6 e desenvolvimento da doença por HCMV geralmente focaram suas análises em marcadores sorológicos. Dockrell et al, (1997) demonstrou que a soroconversão do HHV-6 é um fator de risco para desenvolvimento da doença sintomática por HCMV em pacientes transplantados hepáticos, independente do uso de Muromonab-CD3 e do sorostato D⁺/R⁻. Desjardins et al (1998) avaliou a soroconversão do HHV-6 em receptores de transplante renal e verificou sua associação com a doença sintomática e assintomática por HCMV. Estes estudos possuem como limitação o uso de testes sorológicos, que não são métodos eficientes, como marcadores da infecção por HHV-6.

Este presente estudo tem como vantagem o emprego de métodos moleculares como marcadores da infecção ativa por HHV-6. Identificamos 25 pacientes com infecção ativa por HHV-6 e que também apresentaram infecção ativa por HCMV. Nos 4 pacientes que apresentaram infecção ativa somente por HCMV, o HHV-6 foi detectado antes demonstrando que o HCMV não apareceu isoladamente em nenhum paciente.

O HHV-6 é detectado geralmente antes da doença por HCMV na maioria dos pacientes, dado este, confirmado neste estudo, onde dos 29 pacientes com infecção por HCMV, o HHV-6 foi detectado precocemente em 17 pacientes e em 7 pacientes a detecção foi concomitante, sendo assim o HCMV foi detectado precocemente em apenas 5 pacientes.

Os dois pacientes que apresentaram doença por HCMV apresentaram os dois vírus, sendo que a detecção do HHV-6 foi precoce em ambos, um deles com alta carga viral do HHV-6 em todo seguimento. Os dois pacientes com provável doença por HCMV,

também apresentaram detecção precoce do HHV-6. Estes dados sugerem o efeito imunomodulador do HHV-6 e sua interação com o HCMV.

O paciente 9, que desenvolveu doença por HCMV, apresentou dois episódios de pico da carga viral do HHV-6 em leucócitos. O primeiro pico ocorreu no dia 1+ (217,5487 cópias/ 10^4 células) e o outro pico dia 140+ (296,8179 cópias/ 10^4 células), sendo que no dia 1 apresentou também infecção ativa por HCMV, no dia 140+ apresentou recorrência da infecção por HCMV e no dia 149+ ocorreu rejeição ao transplante. Em soro apresentou dois pontos de pico dia 9+ (402,97 cópias/0,2ml) e dia 119+ (402,97 cópias/0,2ml).

O paciente 27 com também doença por HCMV, apresentou picos da carga viral do HHV-6 no sangue, nos dias 20+ (992,8436 cópias/ 10^4 células), 27+(1760,555 cópias/ 10^4 células) e 49+(27221,5 cópias/ 10^4 células), e pico no soro no dia 20+ (174,0816 cópias/0,2ml), apresentando infecção ativa por HCMV nos dias 20 e 27 e recorrência da infecção no dia 49+.

O paciente 8 com provável doença por HCMV apresentou picos de carga viral do HHV-6 no sangue dias 21+ (68,87239 cópias/ 10^4 células) e 47+ (34,96016 cópias/ 10^4 células), no soro apresentou pico dia 131+ (402,5122 cópias/0,2ml) e a infecção ativa por HCMV ocorreu dia 47+.

Um dos principais problemas para iniciar a terapia precoce está na determinação do melhor método para detecção da infecção ativa viral. A antigenemia é reconhecida como um método sensível e útil de monitorização da infecção ativa por HCMV (BOECK *et al*, 1996), porém apresenta muitas desvantagens. O uso da citometria de fluxo para solucionar os problemas encontrados com a antigenemia apresentou alguns promissores resultados, porém ainda não é uma técnica completamente satisfatória. (IMBERT-MARCILLE, 1997; POIRIER-TOULEMONDE, 2000). Estudos indicam (MORI, 2002; MORI 2000) que a PCR em tempo real é mais sensível e se correlaciona melhor com os efeitos do tratamento antiviral que a antigenemia. A PCR em tempo real orienta mais eficientemente a terapia precoce, mas não previne completamente a ocorrência de doença por HCMV. Neste presente estudo 9 pacientes não foram tratados precocemente

com ganciclovir durante o período de acompanhamento do estudo. Destes, 6 pacientes não apresentaram detecção da infecção ativa por HCMV pelos testes de detecção da rotina que são a nested-PCR em leucócitos e a antigenemia, porém, 5 deles apresentaram detecção da infecção ativa por HCMV pela PCR em tempo real, e 4 apresentaram algum tipo de complicação como GVHD ou infecção oportunista. Um dos pacientes não tratados durante o seguimento, apresentou nested-PCR positiva no final do monitoramento, sendo, então tratados após este período, porém, a PCR em tempo real já havia detectado a infecção ativa por HCMV com três semanas de antecedência com resultados consistentes e consecutivos. A infecção ativa por HHV-6 também foi detectada neste mesmo paciente, pela PCR em tempo real, ainda no início do seguimento (dia+21).

Em outro caso de paciente não tratado, pela não detecção da infecção viral ativa, pelos testes da rotina, houve rejeição ao transplante no período de elevação da carga viral do HCMV. Estes dados corroboram com dados da literatura que apontam a PCR em tempo real como melhor método como estratégia para guiar a terapia precoce.

A identificação do melhor material para as análises de PCR ainda vem sendo investigada. As amostras de DNA provenientes de soro indicam replicação viral ativa, já que detecta somente partículas virais livres, porém, as detecções de infecção ativa por HCMV em amostras de DNA de leucócitos (PCR em tempo real e nested-PCR) foram precoces em relação às análises de amostras de soro. Para o HHV-6 a PCR em tempo real em soro foi mais precoce que a detecção em células.

A correlação entre GVHD ou DECH agudo e infecção ativa por HCMV são conhecidas há tempo (Miller et al,1986), e no presente estudo todos os pacientes que apresentaram GVHD agudo foram positivos para infecção ativa por HCMV em mais de um teste diagnóstico, corroborando com os dados publicados na literatura. Encontramos correlação entre nested-PCR em soro e GVHD agudo.

6- CONCLUSÃO



- Monitorizou-se, prospectivamente, pacientes submetidos a TCTH em relação à infecção ativa e doença por HCMV e HHV-6 utilizando as técnicas de nested-PCR, PCR em tempo real e transcrição reversa acoplada a nested-PCR;
- Para detecção da infecção ativa por HCMV os melhores resultados encontrados foram: melhor sensibilidade e valor preditivo negativo pela PCR em tempo real em leucócitos de 100%, melhor especificidade e valor preditivo positivo pela PCR em tempo real em soro de 100%.
- De um modo geral o melhor teste para identificação infecção ativa por HCMV foi a nested-PCR em soro com sensibilidade e especificidade de 83% e 82% e valores preditivo positivo e negativo de 77% e 87% respectivamente.
- O método mais precoce para detecção da infecção ativa por HCMV é a nested-PCR em leucócitos com mediana de 33 dias.
- Para detecção da infecção ativa por HHV-6 os melhores resultados encontrados foram: melhor especificidade e valor preditivo positivo pela PCR em tempo real em leucócitos de 100%, melhor especificidade pela PCR em tempo real em soro de 85%, e valor preditivo positivo em conjunto pela PCR em tempo real em soro e RT-nPCR de 72 %.
- O método mais precoce para detecção da infecção ativa por HHV-6 é a PCR em tempo real em soro com mediana de 14 dias.
- Na maioria dos casos o HHV-6 foi detectado precocemente em relação ao HCMV.
- Nos 25 casos de co-infecção, a maioria das infecções ativas foi precoce por HHV-6.
- As complicações pós-transplante de células tronco hematopoiéticas, infecção oportunista, rejeição ao transplante, DECH e doença por HCMV tiveram alto impacto clínico, resultando em 6 óbitos, os outros 5 óbitos ocorreram por progressão da doença.

- Encontramos correlação entre DECH e infecção ativa por HCMV.
- Encontramos correlação entre nested-PCR em soro e PCR em tempo real em soro para detecção da infecção ativa por HCMV.
- Encontramos correlação entre nested-PCR em soro e PCR em tempo real em leucócitos para detecção da infecção ativa por HCMV
- Encontramos correlação entre nested-PCR em leucócitos e RT-*n*PCR para detecção da infecção ativa por HHV-6.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



ADAMS, O., KREMP, C., KOGLER, G., WERNET, P., AND SCHEID, A. Congenital infections with human herpesvirus 6. *J. infect. Dis.* 178: 544-546, 1998.

ALFORD, C.A. & BRITT, W.J. – Cytomegalovirus. In: FIELDS, BN, KHIFE, DM.- **Virology**, 2^a ed. New York, Raven Press Ltda.: 1981-2010, 1990.

ARITAKI, K. et al. A rapid monitoring system of human herpesviruses reactivation by LighCycler in stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, 28: 975-980, 2001

ARRIBAS, J.R.; CLIFFORD, D.B.; FICHTENBAUM, C.J.; COMMINS, D.L.; POWDERLY, W.G.; STORCH, G.A. – Level of Cytomegalovirus (CMV) DNA in Cerebrospinal Fluid of Subjects with AIDS and CMV Infection of the Central Nervous System. **Journal of Infectious Diseases**, 172: 527-531, 1995.

BADLEY, A.D.; PATEL, R.; PORTELA, D.F.; HARMSSEN, W.S.; SMITH, T.F.; ILSTRUP, D.M.; STEERS, J.L.; WIESNWR, R.H.; PAYA, C.V. – Prognostic Significance and Risk Factors of Untreated Cytomegalovirus Viremia in Liver Transplant Recipients. **Journal of Infectious Diseases**, 173: 446-449, 1996.

BAILEY, T.C.; BULLER, R.S.; ETTINGER, N.A.; TRULOCK, E.P.; GAUDREAULT-KEENER, M.; LANGLOIS, T.M.; FORNOFF, J.E.R.; COOPER, J.D.; STORCH, G.A. – Quantitative Analysis of Cytomegalovirus Viremia in Lung Transplant Recipients. **Journal of Infectious Diseases**, 171: 1006-1010, 1995.

BALDANTI, F., LILLERI, D., GERNA, G. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. *J. Clin. Virol.* 2008: 41,237-241.

BETHGE, W.; BECK, R.; JAHN, G.; MUNDINGER, P.; KANZ, L.; EINSELE, H.- Successful Treatment of Human Herpesvirus 6 Encephalitis After Bone Marrow Transplantation. **Bone Marrow Transplant**, 24: 1245-1248, 1999.

BITSCH, A., KIRCHNER, DUPKE, R., BEIN, G. Cytomegalovirus transcripts in peripheral blood leukocytes of actively infected transplant patients detected by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 167: 740-743, 1993.

BOECKH, M. & BOIVIN, G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Review*, 13(3): 533-554, 1998.

BOECKH, M.; GOOLEY, T.A.; MYERSON, D.; CUNNINGHAM, T.; SCHOCH, G.; BOWDEN, R.A. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. **Blood**. 15;88(10):4063-71, 1996.

BOECKH M, BOWDEN R. Cytomegalovirus infection in marrow transplantation. *Cancer Treat Res*. 1995; 76:97–136.

BONON S.H., MENONI S.M., ROSSI C.L., DE SOUZA C.A., VIGORITO A.C., COSTA D.B., COSTA S.C. Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. **J Infect**. 50(2):130-7, 2005.

BONON SHA. Diagnóstico e Monitorização da Infecção Por Citomegalovírus em Transplantados Alogênicos de Células Progenitoras Hematopoéticas. [Tese- Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.

BORISKIN, Y. S.; FULLER, K.; POWLES, R. L.; VIPOND, I. B.; RICE, P. S.; BOOTH, J. C.; CAUL, E. O.; BUTCHER, P. D. – Early detection of cytomegalovirus (CMV) infection in bone marrow transplant patients by reverse transcription-PCR for CMV spliced late gene UL21.5: a two site evaluation. **Journal of Clinical Virology**, 24: 13-23, 2002

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

BOWDEN, R.A.; SLICHTER, S.J.; SAYERS, M.H.; MORI, M.; CAYS, M.J.; MEYERS, J.D. Use of leukocyte-depleted platelets and cytomegalovirus-seronegative red blood cells for prevention of primary cytomegalovirus infection after marrow transplant. **Blood** 78: 246-50, 1991.

BRAUN, D.K., DOMINGUEZ, G., and PELLET, P. E. Human herpesvirus 6. **Clin Microbiol reviews**, 10: 521-567, 1997.

BRUGGEMAN, C.A.; MARJORIE, H.J.; NELISSEN; VRANCKEN, G. — Cytomegalovirus. **Ativiral Research**, **43**: 135-144, 1999.

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

BUCHBINDER, S.; ELMAAGACLI, A.H.; SCHAEFER, U. W.; ROGGENDORF, M. — Human Herpesvírus 6 is a Important Pathogen in Infectious Lung Disease After Allogenic Bone Marrow Transplatation. **Bone Marrow Transplant**.**26**:639-644, 2000.

CHEVRET L, BOUTOLLEAU D, HALIMI-IDRI N, BRANCHEREAU S, BAUJARD C, FABRE M, GAUTHERET-DEJEAN A, DEBRAY D. — Human herpesvirus-6 infection: a prospective study evaluating HHV-6 DNA levels in liver from children with acute liver failure. **J Med Virol**. Jun;80(6):1051-7, 2008.

CLEMENTI, M. — Quantitative Molecular Analysis of Virus Expression and Replication. **Journal of Clinical Microbiology**, **38(6)**: 2030-2036, 2000.

CONCEIÇÃO OJG, FOCACCIA R, VERONESI R. CITOMEGALIA. IN: VERONESI R. Doenças Infecciosas e Parasitárias. 8 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005. 206-10.

COSTA, S.C.B. — Infecções por Citomegalovirus (CMV): Epidemiologia e tratamento. **Rev Bras de Clín Ter**, **25 (1)**: 18-28,1999.

COSTA, S.C.B.; MIRANDA, S.R.P.; ALVES, G.;FIGUEIREDO, L. T.M.; COSTA, F. Detection of cytomegalovirus infections by PCR in renal transplant patients. *Braz J Med and Biol res*. 32(8): 953-959,1999.

DE BOLLE, L., NAENSENS, L., DE CLERCQ, E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features and therapy. **Clin Microbiol reviews**. **18**: 217-245, 2005.

DESJARDIN, J. A., CHO, E., SUPRAN, S., GIBBONS, L., WERNER, B. G. & SNYDMAN, D. R. Association of human herpesvírus 6 reactivation with severe cytomegalovirus-associated disease in orthotopic liver transplant recipients. *Clin Infect Dis* **33**, 1358-1362, 2001.

DESJARDIN, J. A., GIBBONS, L., CHO, E., SUPRAN, S., FALAGAS, M.E., WERNER, B. G. & SNYDMAN, D. R. Human herpesvirus 6 reactivation is associated with cytomegalovirus infection and syndromes in kidney transplant recipients at risk for primary cytomegalovirus infection. **J. Infect. Dis.** **178**:1783-1786, 1998.

DI LUCA, D. et al. Human herpesvirus 6 and 7 in salivary glands and shedding in saliva of healthy and human immunodeficiency virus positive individuals. *J. Med. Virol.* 45: 462-468, 1995.

DOCKRELL, D.H.; *et al.* — Seroconversion to Human Herpesvirus 6 Following Liver Transplantation Is a Marker of Cytomegalovirus Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, **176**: 1135- 1140, 1997.

DZIECIATKOWSKI T, PRZYBYLSKI M, TOROSIAN T, TOMASZEWSKA A, LUCZAK M. — Prevalence of human herpesvirus 6 antibodies and DNA in allogeneic stem cell transplant patients: two-year single centre experience. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, 56(3):201-6. Epub 2008 May 30.

EINSELE H, EHNINGER G, HEBART H, WITTKOWSKI KM, SCHULER U, JAHN G et al. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood*. 1995;86: 2815–20.

EMERY VC. Prophylaxis for CMV should not now replace preemptive therapy in solid organ transplantation. *Rev Med Virol.* 2001; 11:83–6.

FLAMAND L, GRAVEL A, BOUTOLLEAU D, ALVAREZ-LAFUENTE R, JACOBSON S, MALNATI MS, KOHN D, TANG YW, YOSHIKAWA T, ABLASHI D. — Multicenter comparison of PCR assays for detection of human herpesvirus 6 DNA in serum. **J Clin Microbiol**, 46(8):2700-6. 2008 .

FLAMAND L, GOSSELIN, J., STEFANESCU, I., ABLASHI, D., MENEZES, J. Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. **Blood** **85**: 1263-1271, 1995.

FLAMAND L, GOSSELIN, J., D'ADDARIO, M., HISCOTT, J., ABLASHI, D., GALLO, R.C., MENEZES, J. Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. **J. Virol.** **65**: 5105-5110, 1991.

GERNA, G.; PERCIVALLE, E.; BALDANTI, F.; SARASINI, A.; ZAVATTONI, M.; FURIONE, M.; TORSELLINI, M.; REVELLO, M.G. – Diagnostic Significance and Clinical Impact of Quantitative Assays for Diagnosis of Human Cytomegalovirus Infection/Disease in Immunocompromised Patients. **Microbiologica**, **21**: 293-308, 1998.

GERNA, G.; ZAVATTONI, M.; BALDANTI, F.; SARASINI, A.; CHEZZI, L.; GROSSI, P.; REVELLO, M.G. – Human Cytomegalovirus (HCMV) LeukoDNAemia Correlates more Closely with Clinical Symptoms than Antigenemia and Viremia in Heart and Heart-Lung Transplant Recipients with Primary HCMV Infection. **Transplantation**, **65(10)**: 1378-1385, 1998(a).

GOODRICH, J.M., MORI, M., GLEAVES, C.A., MOND, C., CAYRS, M., EBELING, D., BUHLES, W.C., DEARMOND, B., MEYERS, J.D. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. **N Engl J Med** **235(23)**: 1601-1607, 1991.

GOODRICH, J.M.; BOECKH, M.; BOWDEN, R. Strategies for the prevention of cytomegalovirus disease after marrow transplantation. **Clin Infect Dis**; **19**: 287-298, 1994.

GOODRICH, J.M.; BOWDEN, R.A.; FISHER, L.; KELLER, B.S.N.C.; SCHOCH, B.A.; MEYERS, J.D. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. **Ann Intern Med** **118**: 173-178, 1993.

GOZLAN, J.; LAPORTE, J. P.; LESAGE, S.; LABOPIN, M.; NAJMAN, A.; GORIN, N. C.; PETTI, J. C.- Monitoring of Cytomegalovirus Infection and Disease in Bone Marrow Recipients by Reverse Transcription-PCR and Comparison with PCR and Blood and Urine Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, **34(9)**: 2085-2088, 1996.

GOZLAN J., SALORD J.M., CHOUAÏD C., DUVIVIER C., PICARD O., MEYOHAS M.C., PETIT J.C. Human cytomegalovirus (HCMV) late-mRNA detection in peripheral blood of AIDS patients: diagnostic value for HCMV disease compared with those of viral culture and HCMV DNA detection. **J Clin Microbiol.** **31(7)**:1943-5, 1993.

GRUNDY, J.E.; SUPER, M.; SWENY, P.; MOORHEAD, J.; LUI, S.F.; BERRY, N.J.; FERNANDO, O.N.; GRIFFITHS, P.D. Symptomatic cytomegalovirus infection in seropositive kidney recipients: reinfection with donor virus rather than reactivation of recipient virus. **Lancet.** I:132-135, 1988.

GUIVER, M.; FOX, A. J.; MUTTON, K.; MOGULKOC, N.; EGAN, J. – Evaluation of CMV Viral Load Using Taqman™ CMV Quantitative PCR and Comparison with CMV Antigenemia in Heart and Lung Transplant Recipients. **Transplantation**, **71**: 1609-1615, 2001.

HALL, C. B., CASERTA, M. T., SCHNABEL, K. C., LONG, C., EPSTEIN, L. G., INSEL, R. A., DEWHURST, S. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin Infect Dis* 26, 132-137, 1998

HIBBERD, P.L.;& SNYDMAN, D.R.— Cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. **Infect Dis Clin of Nor Am**, **9 (4)**: 863-877, 1995.

HO, M. Epidemiology of cytomegalovirus infections. **Rev Infect Dis.** **12**: 701-710, 1990.

HUDNALL SD, CHEN T, ALLISON P, TYRING SK, HEATH A. — Herpesvirus prevalence and viral load in healthy blood donors by quantitative real-time polymerase chain reaction. **Transfusion.** Jun;48(6):1180-7, 2008.

HUMAR, A.; MALKAN, G.; MOUSSA, G.; GREIG, P.; LEVY, G.; MAZZULLI, T. — Human Herpesvirus-6 Is Associated With Cytomegalovirus Reactivation in Liver Transplant Recipients. **The Journal of Infectious Diseases**, **181**: 1450-1453, 2000.

IHIRA, M. et al. Monitoring of active HHV-6 infection in bone marrow transplant recipients by real time PCR; comparison to detection of viral DNA in plasma by qualitative PCR. **Microbiol.Immunol**, **46** : 701-705, 2002.

IMBERT-MARCILLE, B.M.; ROBILLARD, N.; POIRIER, A.S.; COSTE-BUREL, M.; CANTAROVICH, D.; MILPIED, N.; BILLAUDEL, S. Development of a method for direct quantification of cytomegalovirus antigenemia by flow cytometry. **J Clin Microbiol.** **35(10)**:2665-9, 1997.

JOO, C. H.; LEE, H.; KIM, E.; LEE, B.; CHO, Y. K.; KIM, Y. K.- Differential amplifying RT-PCR: a novel RT-PCR method to differentiate mRNA from its DNA lacking intron. **Journal of Virological Methods**, **100**: 71-81, 2002.

LANDOLF S, GARIGLIO M, GRIBAUDO G, LEMBO D. The Human Cytomegalovirus. *Pharmacol Ther.* 2003; 98: 269-97

LEACH,C.T., POLLOCK, B.H., MCCLAIN, K.L., PARMLEY, R.T., MURPHY, S.B., JENSON, H.B. HHV-6 and CMV infections in children with human immunodeficiency virus infection and cancer. **Pediatr Infect Dis J**, **21**: 125-32, 2002.

LEVY, J. A tree new human herpesvirus (HHV-6, HHV-7 and HHV-8). **The lancet**, **349**: 558-562,1997.

LIMAY, A.P., HUANG, M.L., LIESERING, W., STENSLAND, L.,COREY, L.,BOECKH, M.. Cytomegaloviru (CMV) DNA load in plasma for the diagnostic of CMV disease before engraftment in hematopoietic stem-cell transplant recipients. *J. Infect. Dis.*2001;183, 377-382.

LISZEWSKI, M. K., POST, T. W., ATIKISON, J. P. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu. Rev. Immunol.* 9:431-455, 1991.

LJUNGMAN, P. – Cytomegalovirus Infections in Transplant Patients. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplement 100**: 59-63, 1996.

LJUNGMAN, P. et al. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2006;91, 78-83

LJUNGMAN, P.; GRILFTHS, P.; PAYA, C.- Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients. **Immunocompromised Hosts.** **34**: 1094-1097, 2002.

LO, C.Y.; K.Y.YUEN; S.L.LUI; F.K.LI; T.M. CHAN; W.K.LO AND I.K.CHENG. 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***. **11**: 286-293, 1997.

LOCATELLI, G.; SANTORO, F.; VEGLIA, F.; GOBBI, A.; LUSO, P.; MALNATI, M. S. — Real-Time Quantitative PCR for Human Herpesvirus 6 DNA. ***Journal of Clinical Microbiology***, **38 (11)**: 4042-4048, 2000

MACLEAN, H. I., and DOUEN, A. G.- Severe Amnesia Associated with Human Herpesvirus 6 Encephalitis After Bone Marrow Transplantation. ***Transplantation***, **73**: 1086-1089, 1995

MARTÍN-DÁVILA, P. ET AL. Analysis of a quantitative PCR assay for CMV infection in liver transplant recipients: an intent to find the optimal CUT-off value. ***J Clin Virol***. **33**: 138-144, 2005.

MATSUDA, Y.; HARA, J.; MUYOSHI, H.; OSUGI, Y.; FUJISAKI, H.; TAKAI, K.; OHTA, H.; TANAKA-TAYA, K.; YAMANISHI, K.; OKADA, S. — Thrombotic Microangiopathy Associated with Reactivation of Human Herpesvirus 6 Following High Dose Chemotherapy With Autologous Bone Marrow Transplantation in Young Children. ***Bone Marrow Transplant***, **24**:919-923, 1999.

MAYA, T.C.; AZULAY, D.R. — Infecção pelo Citomegalovírus. In: LUPI, O.; SILVA, A.S.; PEREIRA Jr., A.C. — ***Herpes – Clínica, Diagnóstico e Tratamento***, 1ª edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda, 2000. Cap. 8, p. 135-156.

MEYER-KOENING, V.; ROMBERG, I.; SCHNEIDER, K.; WEIDMANN, M.; KERN, W.V.; HYERT, F. T.- Diagnostic Value of Reverse Transcription-PCR for Detection of Cytomegalovirus pp67 in Samples from Solid-Organ Transplant Recipients. ***J. Clin Microbiol***, **44(9)**: 3394-6, 2006.

MILLER W, FLYNN P, MCCULLOUGH J, BALFOUR HH JR., GOLDMAN A, HAAKE R, et al. Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation: an association with acute graft-versus-host disease. ***Blood***, **67**:1162-7, 1986.

MORI, Y., YANG, X., AKKAPAIBOON, P., OKUNO, T., YAMANISHI, K..Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L- glycoprotein Q complex associates with human CD46. **J. Virol.** **77**:4992-4999. 2003.

MORI, T.; OKAMOTO, S.; WATANABE, R.; YAJIMA, T.; IWAO, Y.; YAMAZAKI, R. ET AL. Dose-adjusted preemptive therapy for cytomegalovirus disease based on real-time polymerase chain reaction after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, **29(9)**:777-82, 2002.

MORI, T.; OKAMOTO, S.; MATSUOKA, S.; YAJIMA, T.; WAKUI, M.; WATANABE, R.; ET AL. Risk-adapted pre-emptive therapy for cytomegalovirus disease in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant.****25(7)**:765-9,2000.

MURRAY, B. M. — Management of Cytomegalovirus Infection in Solid Organ Transplant Recipients. **Imm Invest**, **26**: 243-255, 1997.

MUSTAFA, M.M. - Cytomegalovirus Infection and Disease in the Immunocompromised Host. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, **13**: 249-259, 1994.

NAJIOULLAH, F.; THOUVENOT, D.; LINA, B. — Development of a Real-time PCR Procedure Including an Internal Control for The Measurement of HCMV Viral Load. **Journal of Virological Methods**, **92**: 55-64, 2001.

NELSON, P. N.; RAWAL, B.K.; BORISKIN, Y.S.; MATHERS, K.E.; POWLES, R.L.; STEEL, H. M.; TRYHORN, Y. S.; BUTCHER, P. D.; BOOTH, J. C. — A polymerase chain reaction to detect a spliced late transcript of human cytomegalovirus in the blood of bone marrow transplant recipients. **Journal of Virological Methods**, **56**: 139-148, 1996

NITSCHKE, A.; MULLER, C. W.; RADONIC, A. *et al.* Human herpesvirus 6 DNA is detected frequently in plasma but rarely in peripheral blood leukocytes of patients after bone marrow transplantation. *J. Infect. Dis*, **183**:130-133,2001.

NITSCHKE, A.; STEUER, N.; SCHMIDT, C.A.; LANDT, O.; SIEGERT W. — Different Real-Time PCR Formats Compared for the Quantitative Detection of Human Cytomegalovirus DNA. **Clinical Chemistry**, **45**: 1932-1937, 1999.

NITSCHKE, A.; STEUER, N.; SCHMIDT, C.A.; LANDT, O.; ELLERBROK, H.; PAULI, G.; SIEGERT W. – Detection of Human Cytomegalovirus DNA by Real-Time Quantitative PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, **38(7)**: 2734-2737, 2000.

NIUBÓ, J.; PEREZ, J.L.; MARTINEZ-LACASA, J.T.; GARCIA, A.; ROCA, J.; FABREGAT, J.; GIL-VERNET, S. AND MARTIN, R. Association between quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. **Diagn. Microbiol. Infec. Dis.** **24**: 19-24, 1996.

NORTON, R.; CASERTA, M.; HALL, C. B.; SCHNABEL, K.; HOCKNELL, P.; DEWHURST, S. – Detection of Human Herpesvirus 6 by Reverse Transcription- PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, **37(11)**: 3672-3675, 1999.

PANNUTTI CS. Citomegalia. In: FERREIRA AW, ÁVILA SLM. Diagnóstico Laboratorial das principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. 2 ed. Editora Guanabara Koogan; 2001. 68-73.

PANNUTI CS; KALLÁS EG; MUCCIOLI C; ROLAND RK; FERREIRA EC; BUENO MHS; DO CANTO CLM; VILAS BOAS LS AND BELFORT, R. Cytomegalovirus Antigenemia in Acquired Immunodeficiency Syndrome Patients With Untreated Cytomegalovirus Retinitis. **Am J of Ophthalmology** **122**: 847-852, 1996.

PATEL, R.; & PAYA, C.V. – Infection in solid organ transplant. **Clin Microbiol Rev**, **10**: 86-124, 1997

PFEIFFER, B.; THOMSON, B.; CHANDRAN, B.- Identification and characterization of a cDNA derived from multiple splicing that encodes envelope glycoprotein gp105 of human herpesvirus 6. **Journal of Virology**, **69**:3490-3500.

PRADEAU, K.; BORDESSOULE, D.; SZELAG, J.; ROLLE, F.; FERRAT, P.; MEUR, Y.; TURLURE, P.; DENIS, F.; RANGER-ROGEZ, S.; - A Reverse transcription-Nested PCR Assay for HHV-6 mRNA Early Transcript Detection After Transplantation. **Journal of Virological Methods**, **134**: 41-47, 2006.

POIRIER-TOULEMONDE, A.S.; MILPIED, N.; CANTAROVICH, D.; MORCET, J.F.;BILLAUDEL, S.; IMBERT-MARCILLE, B.M. Clinical relevance of direct quantification of pp65 antigenemia using flow cytometry in solid organ and stem cell transplant recipients. **J Clin Microbiol.** **38(9)**:3143-9,2000.

RASMUSSEN, L. – Immune Response to Human Cytomegalovirus Infectious. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, **154**: 221-254, 1990.

RASMUSSEN, L.; MORRIS, S.; ZIPETO, D.; FESSEL, J.; WOLITZ, R.; DOWLING, A.; MERIGAN, T.C. – Quantitation of Human Cytomegalovirus DNA from Peripheral Blood Cells of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients Could Predict Cytomegalovirus Retinitis. **Journal of Infectious Diseases**, **171**: 177-182, 1995.

RASMUSSEN, L.; HONG, C.; ZIPETO, D.; MORRIS, S.; SHERMAN, D.; CHOU, S.; MINER, R.; DREW, W.L.; WOLITZ, R.; DOWLING, A.; WARFORD, A.; MERIGAN, T.C. – Cytomegalovirus gB Genotype Distribution Differs in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients and Immunocompromised Allograft Recipients. **Journal of Infectious Diseases**, **175**: 179-184, 1997.

RAZONABLE,R.R., FANNING, C., BROWN, R.A., ESPY, M.J., RIVERO, A., WILSON, J.,*et al.* Selective reactivation of human herpesvirus 6 variant A occurs in critically ill immunocompetent hosts. *J Infect Dis* 2002; 185:110-113.

ROGERS, J.; ROHAL, S.; CARRIGAN, D.R.;KUSNE, S.; KNOX, K.K.; GAYOWSKI, T.; WAGENER, M.M.; FUNG, J.J.; SINGH,N. — Human Herpesvirus-6 in Liver Transplant Recipients. **Transplantation**, **69**: 2566-2573, 2000.

ROSEN, H.R.; CORLESS, C.L.; RABKIN, J.M.; CHOU, S. – Association of Cytomegalovirus Genotype with Graft Rejection after Liver Transplantation. **Transplantation**, **66**: 1627-1631, 1998.

ROSENFELD, C. S.; RUBKA, W. B.; WEINLAUM, D.; CARRIGAN, D. R.; KNOX, K. K. ; ANDREWS, D. F.; SHADDUCK, R. K. – Late Graft Failure Due to Dual Bone Marrow Infection with Variants A e B of Human Herpesvírus 6. **Exp. Hematol**, **23**: 626-629, 1995.

RUBIN RH. Preemptive therapy in immunocompromised hosts. *N Engl J Med.* 1991; 324:1057-9.

RUBIN, R.H. Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. **Rev Infect Dis** . 12: 754-766, 1990

RÜGER, R.; BORNKAMM, G.W.; FLECKENSTEIN, B. – Human Cytomegalovirus DNA Sequences with Homologies to the Cellular Genome. **Journal of General Virology**, **65**: 1351-1364, 1984.

SACHIHARA, J.; TANAKA-TAYA, K.; TANAKA, S.; AMO, K.; MIYAGAWA, H.; HOSOL, G. ET AL. – High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. **Blood**, **100** (6): 2005-2011, 2002

SALAHUDDIN, S.Z., ABLASHI, D.V., MARKAN, P.D., JOSEPHS, S.F., STURZENEGGERS, S., KAPLAN, M. *et al.* Isolation of a new virus, HBIV, in patients with lymphoproliferative disorders. **Science** **234**: 596-601, 1986.

SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLISH, H.A. & ARNHEIN, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354, 1985.

SANTORO, E., KENNEDY, P. E., LOCATELLI, G., MALNATI, M. S., BERGER, E. A., LUSSO, P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 99:817-827, 1999.

SANTOS, R.L.B. Propriedades gerais dos herpesvirus. In: LUPI, A., SILVA, A.S., PEREIRA JR, A.C. **Herpes clinica, diagnóstico e tratamento**, 1ª edição, Medsi editora medica e científica ltda, cap 10, p.179-189, 2000.

SANTORO, F., KENNEDY, P.E., LOCATELLI, G., MALNATI, M. S., BERGER, E. A., LUSSO, P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. **Cell** **99**:817-827.

SASSENSCHEIDT, J., ROHAYEM, J., ILLMER, T., BANDT, D. Detection of β -herpesviruses in allogenic stem cell recipients by quantitative real-time PCR. *J. Virol. Methods.* 2006:138, 40-48.

SAYERS, M.H., ANDERSON, K.C., GOODNOUGH, L.T., KURTZ, S.R., LANE, T.A., PISCIOTTO, P., SILBERSTEIN, L.E. Reducing the risk for transfusion, transmitted cytomegalovirus infection. **Ann Internal Med.** 62: 55-62, 1992.

SECCHIERO, P.; CARRIGAN, D. R.; ASANO, Y.; BENEDETTI, L.; CROWLEY, R. W.; KOMAROFF, A.L. et al. Detection of Human Herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction. *J Inf Dis*, 171: 273-280, 1995.

SHIBATA, M.; TERASHIMA, M.; KIMURA, H.; KUSUSHIMA, K.; YOSHIDA, J.; HIRIBE, K.; MORISHIMA, T. – Quantitation of Cytomegalovirus DNA in Lung Tissue of Bone Marrow Transplant Recipients. **Human Pathology**, **23**: 911-915, 1992.

SINGH, N. , CARRIGAN, D.R., GAYOWSKI, T., MARINO, L.R. Human herpesvirus-6 infection in liver transplant recipients: documentation of pathogenicity. **Transplantation** **64**:674-678, 1997.

SINGH, N. & CARRIGAN, D.R. Human herpesvirus-6 in transplantation: An emerging pathogen. **Ann of Internal Med**, **124**: 1065-1071, 1996.

SPECTOR, D.H.; KLUCHER, K.M.; RABERT, D.K.; WRIGHT, D.A. – Human Cytomegalovirus Early Gene Expression. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, **154**: 21-45, 1990.

TANAKA, Y.; et al. Monitoring cytomegalovirus infection by antigenemia assay and two distinct plasma real-time PCR methods after hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, **30**: 315-319, 2002.

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**, **271**: 307-320, 2000.

TAKATSUKA, H.; WAKAE, T.; MORI, A.; OKADA, M.; FUJIMORI, Y.; TAKEMOTO, Y.; OKAMOTO, T.; KAMAMARU, A.; KAKISHITA, E. – Endothelial Damage Caused by Cytomegalovirus and Human Herpesvirus 6. **Bone Marrow Transplant**, **31**:475-479, 2003.

TAYLOR-WIEDEMAN, J. A., SISSONS, J.G.P., BORYSIEWICZ, L. K. AND SINCLAIR, J. H. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J. Virol.* 1994: 68, 1597-1604.

TAYLOR-WIEDEMAN, J. A., SISSONS, J.G.P., BORYSIEWICZ, L. K. AND SINCLAIR, J. H. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 1991:72, 2059-2064.

THE, T.H.; VAN DER PLOEG, M.; VAN DER BERG, A.P.; VLIEGER, A.M.; VAN DER GIESSEN, M.; VAN SON, W.J. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes: a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation* **54(2)**: 193-198, 1992.

VAN DEN BOSCH, G.; *et. al* – Development of Reverse Transcriptase PCR assay for Detection of Active Human Herpesvirus 6 infection. *Journal of Clinical Microbiology*, **39(6)**: 2308-2310, 2001.

VELZING J., ROTHBARTH P.H., KROES A.C., QUINT W.G. Detection of cytomegalovirus mRNA and DNA encoding the immediate early gene in peripheral blood leukocytes from immunocompromised patients. *J Med Virol.* **42(2)**:164-169, 1994.

ZAWILINSKA, B.; BULEK, K.; KOPEC, J.; KOSZVNICHAK, M.- In Situ Detection of DNA and mRNA of Human Cytomegalovirus to Distinguish Different Forms of Viral Infection in Leucocytes. *Acta Biochim Pol*, **53(3)**: 757-61, 2006.

WADA, K.; KUBOTA, N.; Ito, Y.; YAGASAK, H.; KATO, K.; YOSHIKAWA, T.; ONO, Y.; ANDO, H.; FUJIMOTO, Y.; KUICHI, T.; KOJIMA, S.; NISHYAMA, Y.; KIMURA, H.- Simultaneous Quantification of Epstein-Barr Virus, Cytomegalovirus and Human Herpesvirus 6 DNA in Samples from Transplanted Recipients by Multiplex Real- Time PCR Assay. *J. Clin Microbiol.* **45 (5)**:1426-32, 2007

WALTER, E.A.; BOWDEN, R.A. – Infection in the Bone Marrow Transplant Recipient. *Infectious Disease Clinics of North America*, **9(4)**: 823-847, 1995.

WINSTON DJ, HO WG, BARTONI K, DU MOND C, EBELING DF, BUHLES WC et al. 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: 179–84.

WOLF, D.G.,SPECTOR, S.A..Early diagnosis of human cytomegalovirus disease in transplant recipients by DNA amplification in plasma. *Transplantation*. 1993;56,377-382.

YAMANE, A. et al. Risk factors for developing human herpesvirus 6 (HHV-6) reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and its association with central nervous system disorders. **Bio of Blood and Marrow Transp** 13: 100-106, 2007.

8- ANEXO





CEP, 26/05/09
(PARECER CEP: Nº 125/2005)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “DETECÇÃO DA CARGA VIRAL DOS HERPESVIRUS HHV-5 (CITOMAGALOVIRUS) E HHV-6 PELA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA ACOPLADA A PCR EM PACIENTES TRANSPLANTADOS HEPÁTICOS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Claudia Raquel Quantarelli Costa

II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a Emenda que altera o título para: “**DETECÇÃO DA CARGA VIRAL DOS HERPESVIRUS HHV-5 (CITOMAGALOVIRUS) E HHV-6 EM PACIENTES RECEPTORES DE TRANSPLANTES DE CÉLULAS TRONCO HEMETOPOÉTICAS**”, a inclusão do Serviço de Transplantes de Medula Óssea do Hemocentro/UNICAMP e a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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

III - DATA DA REUNIÃO.

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de maio de 2009.


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

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br