

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

INFECÇÃO POR HHV-6 E ASSOCIAÇÃO
COM CMV E MORBIDADE NO PRIMEIRO ANO
PÓS-TRANSPLANTE RENAL

Aluna: Regina Barbosa Schröder

Orientadora: Elizete Keitel

Co-orientadora: Tatiana Michelon

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Aos meus filhos, **Álvaro e Manoela**, pelo amor, carinho, e estímulo permanente para a conquista de um espaço profissional melhor.

Ao **Ataides**, pelo companheirismo e dedicação em todos os momentos, estimulando-me sempre a aceitar desafios.

À minha mãe **Geni**, pelo amor, carinho, compreensão e apoio de sempre na busca da realização.

Ao meu pai, **Raul**, sempre presente, cuja curiosidade intelectual sempre me surpreendeu, e que me ensinou o gosto pelas letras.

À minha irmã **Marta** pelo carinho, atenção e incentivo em todos os momentos.

Ao meu irmão, **Adalberto**, aos cunhados, **Clarisse** e **Ariano**, e aos sobrinhos, **Dúnia, Felipe, Mariana e Anna Júlia** pelo amor e carinho.

Às minhas irmãs de coração, **Adriana** e **Tatiana**, pela amizade, companheirismo e conselhos sempre pertinentes, que contribuíram para o meu melhor.

AGRADECIMENTOS

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

- À Prof^a. Dr^a **Elizete Keitel**, pela amizade, pela atenção cuidadosa aos detalhes importantes e pelo incentivo em manter a pesquisa em nosso meio.

- Ao diretor do Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre, Dr **Jorge Neumann**, pelo incentivo constante à qualificação do seu grupo de profissionais, pela cooperação neste trabalho e pelo exemplo de dedicação ao conhecimento científico.

- À Dr^a **Tatiana Michelon**, por me ajudar a manter o caminho quando este parecia obscuro, pela amizade sincera, otimismo e parceria incansável em todas as etapas deste trabalho e pelo exemplo de dedicada pesquisadora.

- Ao Prof. Dr **Mario Wagner**, tanto pela ajuda nas análises estatísticas como pela amizade e exemplo de profissional dedicado, que soube seguir os passos paternos e aprofundar sua própria trilha.

- Aos meus **colegas de trabalho**, do Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre, especialmente à bióloga **Janaína Silveira** pela amizade e imprescindível colaboração.

- Ao **Qualimune** Laboratório de Imunogenética, especialmente ao biólogo **Luciano dos Santos** e à biomédica **Renata Adamy**, pela disponibilidade e competência em sua colaboração.

- À estudante de medicina da UFCSPA **Gabriela Garbin**, pela ajuda preciosa e incansável.

- À Prof^a. Dr^a **Adriana Veras**, pela amizade e carinho com que atuou na correção da escrita em português e inglês.

- Ao **Serviço de Transplante Renal** da Santa Casa de Porto Alegre, especialmente ao seu diretor, Dr **Valter Garcia**, pela busca constante da excelência, aliando assistência e pesquisa.

- Ao Departamento de **Pesquisa Clínica** do serviço de transplante renal da Santa Casa de Porto Alegre, principalmente ao bioquímico **Diego Gnata**, pela ajuda nos momentos certos.

- Ao **Banco de Sangue** da Santa Casa de Porto Alegre, principalmente ao **Dr Dario Brum** e à bioquímica **Maria Luiza Assmann** pela ajuda valiosa.

- Ao **setor de Informática** da UFCSPA, principalmente ao **Everton**, pela ajuda preciosa na formatação deste trabalho.

- Ao **Curso de Pós-Graduação em Patologia**, principalmente ao coordenador Prof Dr **Antonio Hartmann**, ao Prof Dr **Paulo Zen** e à secretária **Maristela** pela inestimável ajuda.

- Aos meus **familiares e amigos**, pela ternura e tolerância com que suportaram os momentos difíceis e as longas ausências na minha dedicação a este trabalho.

Qual é, em verdade, o destino ou, melhor, a significação, em sentido muito especial, de que está revestido todo o trabalho científico, tal como, aliás, todos os outros elementos da civilização sujeita à mesma lei? É o que toda a ciência acabada não tem outro sentido senão o de fazer surgirem novas “indagações”: ela pede, portanto, que seja “ultrapassada” e envelheça. Quem pretende servir à ciência deve resignar-se a tal destino (...). Repito, entretanto, que na esfera da ciência, não só nosso destino, mas também nosso objetivo é o de vermos, um dia, ultrapassados (...). Por que motivo, então, nos entregamos a uma tarefa que jamais encontra fim e não pode encontrá-lo?

Max Weber

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 Virologia | 10 |
| 1.2 Família <i>Herpesviridae</i> | 10 |
| 1.3 Herpesvírus Humano Tipo 6 (HHV-6) | 12 |
| 1.3.1 Estrutura Viral | 12 |
| 1.3.2 Infecção Primária | 13 |
| 1.3.3 Variantes do HHV-6 e Formas Clínicas | 14 |
| 1.3.4 Reativação Viral | 15 |
| 1.3.5 HHV-6 no Sistema Nervoso Central | 16 |
| 1.3.6.HHV-6 no Sistema Imune | 17 |
| 1.3.7 HHV-6 em Transplantes | 18 |
| 1.3.8.HHV-6 em Neoplasias | 20 |
| 1.3.9 Diagnóstico Laboratorial | 21 |
| 1.3.9.1 Sorologia | 21 |
| 1.3.9.2 Isolamento Viral Por Cultivo Celular | 22 |
| 1.3.9.3 Testes Moleculares | 22 |
| 1.3.9.3.1 PCR Qualitativo | 23 |
| 1.3.9.3.2 PCR Quantitativo | 23 |
| 1.3.9.4 Antigenemia | 25 |
| 1.3.10 Tratamento | 26 |
| 2. REFERÊNCIAS | 28 |
| 3. OBJETIVOS | 32 |
| 4. ARTIGO CIENTÍFICO 1 | 34 |
| 4.1 Em Inglês | 34 |
| 4.2 Em Português | 41 |
| 5. ARTIGO CIENTÍFICO 2 | 48 |
| 5.1 Em Inglês | 48 |

| | |
|--------------------------------|------------|
| 5.2 Em Português | 75 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 105 |
| 7. ANEXOS | |

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas e Siglas

| | |
|----------------|---|
| CD4 | Marcador de Superfície de Linfócito T Auxiliar |
| CD8 | Marcador de Superfície de Linfócito T Citotóxico |
| CMV | Citomegalovírus |
| CYA | Ciclosporina |
| Cr | Creatinina |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| EBV | Vírus Epstein Barr |
| ELISA | Ensaio Imunoenzimático |
| IgG | Imunoglobulina da Classe G |
| IgM | Imunoglobulina da Classe M |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HHV-1 | Herpesvírus Humano Tipo 1 |
| HHV-2 | Herpesvírus Humano Tipo 2 |
| HHV-6 | Herpesvírus Humano Tipo 6 |
| HHV-6 A | Herpesvírus Humano Tipo 6 Variante A |
| HHV-6 B | Herpesvírus Humano Tipo 6 Variante B |
| HHV-7 | Herpesvírus Humano Tipo 7 |
| HHV-8 | Herpesvírus Humano Tipo 8 |
| HLA | Antígenos Leucocitários Humanos |
| JCV | Poliomavírus JC |
| LCR | Líquido Cefalorraquidiano |

| | |
|--------------------------------|---|
| NK | Células <i>Natural Killer</i> |
| OKT3 | Anticorpo Policlonal Anti-CD3 |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| PML | Células Polimorfonucleares |
| RT-PCR | PCR em Tempo Real |
| SIDA | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| Th | Linfócito T <i>helper</i> |
| TGO | Transaminase Glutâmico-oxalacética |
| TGP | Transaminase Glutâmico-pirúvica |
| TNF α | Fator de Necrose Tumoral α |
| VZV | Vírus Varicela Zoster |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Virologia

Vírus são parasitas de vida intracelular obrigatória com algumas propriedades particulares. São partículas extremamente pequenas e com grande potencial de infectividade, isto é, são capazes de transferir-se de célula a célula e de hospedeiro a hospedeiro a partir da replicação do seu genoma. Este é composto por ácido desoxirribonucléico (DNA) ou por ácido ribonucléico (RNA) e induz a célula do hospedeiro a sintetizar componentes do virion e novas partículas virais, disseminando, assim, a infecção a novas células (Fields e cols., 2002).

As infecções causadas por vírus se caracterizam por apresentarem uma fase aguda, que cursa com ou sem sintomas, seguida por cronificação, latência ou resolução completa da infecção. A resolução destas infecções sistêmicas é principalmente devida à resposta mediada por célula, mantendo proteção em longo prazo através da formação de anticorpos específicos (Mendes e cols., 2002).

1.2 Família *Herpesviridae*

A família *herpesviridae* atualmente é composta por oito membros. Baseados em análises genéticas, estes vírus foram divididos em três subfamílias - alfa, beta e gama. A subfamília *alfa* é composta pelos herpesvírus simples tipos 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2), além do vírus varicela zoster (VZV). A subfamília *beta* compreende os herpesvírus tipos 6 (HHV-6) e 7 (HHV-7) e o citomegalovírus (CMV). Finalmente, a subfamília *gama* inclui o herpesvírus tipo 8 (HHV-8) e o vírus Epstein Barr (EBV) (Rossi e cols., 2001).

A principal característica que estes vírus compartilham é a capacidade de permanecer latente ou em estado persistente no hospedeiro, reativando em momentos de imunossupressão (Tiansheng e Hudnall, 2006).

A prevalência dos herpesvírus na população adulta é alta, com algumas variações geográficas, com excessão do HSV-2 e do HHV-8. Os alfa herpesvírus HSV-1 e HSV-2, que foram os primeiros a serem descobertos, são neurotrópicos e podem causar febre, lesões bolhosas orais e genitais, respectivamente, e ocasionalmente encefalite. O VZV causa a varicela como doença primária, usualmente em crianças, sendo que reativações são comuns em pacientes imunossuprimidos e pessoas com idade avançada. As lesões de pele tipo zoster são características e auto-limitadas. Todavia, em alguns pacientes, a complicação com neuralgia pós-herpética resulta em morbidade importante. Os gama herpesvírus são vírus linfotrópicos e os únicos com potencial oncogênico. O EBV está relacionado aos quadros clínicos de mononucleose na adolescência e de doença linfoproliferativa pós-transplante, enquanto que o HHV-8 está etiológicamente ligado ao sarcoma de Kaposi (De Bolle e cols., 2005).

A infecção congênita por CMV é a principal causa de doença auditiva em recém-nascidos e associada a retardo mental. Em pacientes imunossuprimidos, a reativação do vírus é causa de importante morbimortalidade, principalmente em transplantados de órgãos e pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), podendo causar retinite, pneumonite e infecções generalizadas. Ainda não é claro o potencial patogênico do HHV-7, porém este vírus foi associado a alguns casos de exantema em crianças. Em transplantados, a sua reativação pode potencializar o desenvolvimento da doença por CMV. O HHV-6 possui duas variantes (6A e 6B), que possuem 92% de homologia em sua sequência de

nucleotídeos. Estas variantes diferem quanto ao seu potencial patogênico, nas formas clínicas das infecções que causam e na distribuição epidemiológica (Brennan e cols., 2002; De Bolle e cols., 2005).

No contexto geral dos transplantes, os herpesvírus estão implicados na etiologia e na patogênese das principais causas de perda do enxerto: infecção, aterosclerose e desenvolvimento de neoplasia pós-transplante (Brennan e cols., 2002). O melhor entendimento dessas viroses pode auxiliar na concepção de estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento adequados, com vistas à redução da morbidade e aumento da sobrevida do enxerto e do paciente após a realização de um transplante.

1.3 O Herpesvírus Humano Tipo 6

1.3.1. Estrutura Viral

O herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6) foi isolado pela primeira vez em 1986 a partir de uma cultura de leucócitos de sangue periférico de pacientes com SIDA e doença linfoproliferativa (Lusso e cols., 1996; Dockrell e cols., 1999; Abdel-Haq e Asmar, 2004).

O HHV-6 tem 67% de homologia com a sequência de aminoácidos do CMV. O diâmetro da sua partícula viral é de 200 nm, com simetria icosaédrica e seu genoma de dupla fita de DNA contém aproximadamente 160.000 pares de base, codificando mais de 100 genes (Lusso e cols., 1996).

Quanto ao seu tropismo celular, inicialmente acreditou-se que este vírus infectava predominantemente linfócitos B; daí a designação preliminar de “vírus humano B-linfotrópico” (HBLV). A partir dos estudos envolvendo o cultivo celular,

caracterizou-se a célula T, particularmente o linfócito T auxiliar (*T helper*; Th) como o principal alvo da infecção por este vírus, sendo renomeado como HHV-6. Monócitos, macrófagos e, muito provavelmente, oligodendrócitos também constituem tipos celulares de replicação viral eficaz. Os linfócitos B podem ser infectados somente quando imortalizados pelo EBV. As infecções por HHV-6 podem ser agrupadas em 2 categorias: infecção primária (usualmente em crianças) e reativação da infecção latente (usualmente em indivíduos imunossuprimidos) (Lusso, 1996).

1.3.2 Infecção Primária

A infecção primária pelo HHV-6 geralmente ocorre entre 6 e 15 meses de idade, apresenta um período de incubação de aproximadamente 2 semanas e está etiologicamente relacionada ao exantema súbito, também conhecido como *roseola infantum*. Caracteriza-se por febre alta e *rash* cutâneo, ocasionalmente com convulsões e encefalite. Esta infecção é também considerada a principal causa de doença aguda febril na primeira infância, sendo, todavia, assintomática na maioria dos casos (Lusso, 1996; Singh e Peterson, 2000; De Bolle e cols., 2005).

Apesar de haver a possibilidade de transmissão vertical, a transmissão horizontal, através da eliminação de partículas virais pela saliva de indivíduos com infecção primária, é a forma mais comum. Acredita-se que o HHV-6 persista em sua forma latente predominantemente nas células mononucleares de sangue periférico, em glândulas salivares, linfonodos, rim e fígado. Nos primeiros anos de vida, a infecção primária também pode ser detectada no líquido cefalorraquidiano (LCR). Isto sugere que o sistema nervoso central (SNC) possa também ser um sítio de latência da infecção (Collot e cols., 2002).

Em adultos, a infecção primária pelo HHV-6 tem sido implicada como causa de uma síndrome clínica semelhante à mononucleose (*mononucleose-like*), linfadenopatia e encefalite focal (Lusso, 1996).

A prevalência de anticorpos contra o HHV-6 na população adulta é alta, chegando a 90% (Dockrell e Paya, 2001). Uma exceção é observada no Marrocos, onde a soroprevalência é muito baixa, ao redor de 20% (Ranger e cols., 1991). No nordeste do Brasil esta taxa é de 78% (Freitas e Linhares, 1997).

1.3.3 Variantes do HHV-6 e Formas Clínicas

Existem dois sub-grupos ou variantes do HHV-6, A e B, descobertas por Ablashi e cols. (1993). Apesar da alta similaridade genética (90%), as variantes diferem entre si em importantes características, tais como: modo de transmissão, prevalência, tipos de células que infectam e manifestações clínicas (Ratnamohan e cols., 1998). As diferenças são significativas o suficiente para justificar os esforços da comunidade científica para classificar estas variantes como vírus distintos. O conclave atual é de não se admitir a caracterização simplificada do HHV-6 como agente etiológico propriamente dito, com uma perspectiva de se reclassificar a variante B como um herpesvírus do tipo 9 (HHV-9) (Komaroff e cols., 2006).

Desta forma, é importante definir as principais diferenças entre eles. Enquanto o HHV-6B é usualmente transmitido pela saliva, este modo de transmissão não é definitivo para a variante A. O isolamento da variante A a partir de secreção salivar é conseguido apenas de forma intermitente, impedindo a melhor caracterização do seu modo de transmissão (Komaroff e cols., 2006).

A principal manifestação clínica da infecção por HHV-6 da variante B é o exantema súbito, a doença febril e a encefalite em crianças, enquanto que alterações

neuroológicas são as manifestações características da variante A. A infecção primária pela variante A do HHV-6 pode causar infecção disseminada em pacientes imunossuprimidos (Rossi e cols., 2001).

O HHV-6B é ubíquo em crianças de mais idade e em indivíduos saudáveis. Todavia, o HHV-6A raramente é isolado nesta população (Casserta e cols., 2004). A prevalência de isolamento da variante A é de cerca de 5% usando o método molecular em tempo real em plasma e saliva de indivíduos saudáveis, de portadores de SIDA e de receptores de transplantes. A co-infecção pelas variantes A e B é rara (Boutolleau e cols., 2006).

Ambas as variantes do HHV-6, A e B, podem ser isoladas a partir de tecido cerebral, onde podem causar invasão e doença. A variante B pode estar envolvida com a invasão do SNC na infecção primária (Campadelli-Fiume e cols., 1999). Por outro lado, a variante A é a mais neurotrópica e, por isso, mais associada a doenças do SNC (De Bolle e cols., 2005).

O isolamento da variante A a partir do LCR é mais comum em pacientes portadores de SIDA e de esclerose múltipla, enquanto que a variante B é o tipo mais comumente isolado no LCR de indivíduos saudáveis controles (Ahlqvist e cols., 2005). O HHV-6A também apresenta alta afinidade por células da pele, o que não ocorre com o HHV-6B (Boutolleau e cols., 2006).

1.3.4 Reativação Viral

Como os outros herpesvírus, o HHV-6 estabelece latência no hospedeiro, podendo ser reativado em momentos de imunossupressão (Singh e Peterson, 2000). A reativação do HHV-6 em transplante de órgãos é comum, e os efeitos consistem usualmente em febre e *rash* cutâneo, frequentemente de forma sub-clínica e benigna

(Caserta e cols., 2004). Todavia, muitos dos efeitos graves relacionados a esta infecção são descritos nesta população (Campadelli-Fiume e cols., 1999).

Nestes indivíduos transplantados, a reativação do HHV-6 ocorre em 14 a 82% dos casos (Dockrell e cols., 1999), podendo estar associada com o desenvolvimento de pneumonite intersticial, supressão da medula óssea, encefalite, hepatite, doença febril, entre outras (Singh e Peterson, 2000). O HHV-6A demonstra maior virulência com a imunossupressão, quando comparado ao HHV-6B (Singh e Carrigan, 1996).

Em transplante de medula óssea, Reddy e Manna (2005), empregando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, verificaram prevalência de positividade para HHV-6 em plasma de 17%, sendo 97% deles identificados como a variante B. Apesar de a reativação da variante B ser a mais comum, e provavelmente menos grave, existe a sugestão de que o HHV-6A seja a variante mais efetivamente associada a infecções ativas e sintomáticas das células do sistema imune e do SNC após o transplante (Boutolleau e cols., 2006).

1.3.5 HHV-6 no Sistema Nervoso Central

Isolado a partir de oligodendrócitos, astrócitos, micróglia e neurônios de diferentes regiões do SNC, o HHV-6 está associado a doenças neurológicas de etiologia pouco clara, como a síndrome de Guillain-Barré, paralisia de Bell e esclerose múltipla. Além disso, este vírus é implicado como um fator associado na etiologia da leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), até então ligada exclusivamente à infecção pelo poliomavírus JC (JCV). Evidências recentes sugerem que o HHV-6 e o JCV cooperam na etiologia desta doença, tendo sido ambos isolados a partir de oligodendrócitos de lesões desmielinizantes características desta patologia (Yoshikava e Asano, 2000; Dewhurst, 2004).

Seguindo uma linha de investigação similar, Challoner e cols. (1995) propuseram a associação do HHV-6 com a doença humana desmielinizante mais comum, a esclerose múltipla. Nesta patologia, existe a sugestão de que o vírus esteja implicado na transformação e na alteração da remielinização de células do SNC. Além disso, o HHV-6 é capaz de aumentar a suscetibilidade dos oligodendrócitos a citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), envolvido na fisiopatologia desta doença (Dietrich e cols., 2004).

No contexto dos transplantes, encefalite e/ou encefalopatia associada ao HHV-6 é uma consequência rara da imunossupressão, também encontrada na SIDA. As formas clínicas subagudas são mais comumente descritas em receptores de transplante de células tronco hematopoéticas que não receberam profilaxia antiviral (Visser e cols., 2005).

1.3.6 HHV-6 e o Sistema Imune

O estudo do HHV-6, inicialmente motivado pelos importantes efeitos sobre o SNC, já possui evidências da sua repercussão significativa sobre o funcionamento das células do sistema imune. O HHV-6 entra na célula através da interação com o receptor CD46, expresso na membrana de todas as células nucleadas e fisiologicamente envolvido na regulação do complemento (De Bolle e cols., 2005). Um efeito paradoxal consiste na redução da expressão de receptores de linfócitos T, como o CD3, dificultando a ativação deste tipo celular. Outra forma importante de evasão da resposta imune promovida pelo HHV-6 consiste na redução da sensibilidade do linfócito T a citocinas derivadas de células dendríticas, como IL-12 e IFN- γ , e indução da diferenciação pró-Th2 do linfócito T (Smith e cols., 2005).

O HHV-6 pode também induzir apoptose das células T CD4+ infectadas, além de células epiteliais tímicas, hematopoéticas e células *natural killer* (NK). O resultado final é a promoção de uma resposta imune menos eficiente na depuração de antígenos intracelulares, como a infecção viral (De Bolle e cols., 2005). Além disso, ele pode ser um vírus imunomodulador, com potencial de facilitação dos episódios de rejeição aguda e do desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto (Deborska-Materkowska e cols., 2006).

1.3.7.HHV-6 em Transplantes

A reativação da infecção por HHV-6 após o transplante é geralmente pela forma HHV-6B. A incidência da infecção varia entre 48% (28%-75%) para receptores de transplante de célula tronco hematopoética e 32% (0-82%) para receptores de órgãos sólidos, com pico entre duas e quatro semanas após o início da imunossupressão (De Bolle e cols., 2005).

Em transplantados renais, a infecção ativa pode variar de 38 a 82%, apesar de o impacto clínico ainda não estar bem determinado (Okuno e cols., 1990; Ratnamohan e cols., 1998; Deborska-Materkowska e cols., 2006).

A doença primária, que ocorre quando o doador é soropositivo e o receptor é soronegativo, usualmente acontece nas primeiras seis semanas após o transplante e apresenta envolvimento de órgãos alvo como pulmão, fígado e SNC. Um caso fatal de infecção primária por HHV-6A já foi relatado em receptor de transplante renal soronegativo, com manifestação de síndrome hemofagocítica aguda, hepatite e encefalopatia (Rossi e cols., 2001).

A doença secundária ocorre alguns meses depois do transplante, podendo ser causada por reativação ou reinfeção por variante viral distinta adquirida a partir do

início da imunossupressão (Ratnamohan e cols., 1998). Em pacientes que recebem terapia com anti-CD3 para profilaxia ou tratamento da rejeição, a carga viral de HHV-6 pode ser alta (Desjardin e cols., 2001).

Em receptores de transplantes de órgãos sólidos, como por exemplo rim e fígado, os mais estudados, a principal causa de morbimortalidade associada à doença por HHV-6 está relacionada ao seu potencial neuro-invasivo e à suscetibilidade a outras infecções oportunistas. Alterações neurológicas nestes pacientes, desde alterações leves do sensório até encefalites graves, devem incluir sempre no seu diagnóstico diferencial a pesquisa da reativação do HHV-6, especialmente a variante HHV-6A (De Bolle e cols., 2005).

Em transplante de célula tronco hematopoética, o risco da reativação do HHV-6 está relacionado ao seu potencial de supressão medular e facilitação das infecções oportunistas. Neste caso, também pela variante B, a mais comum (De Bolle e cols., 2005). Pode ocorrer a co-infecção ativa, envolvendo o HHV-6, CMV e HHV-7 simultaneamente, em receptores de célula tronco hematopoética, rim ou fígado (Ihira e cols., 2001).

Em transplante hepático, estudos recentes têm demonstrado que infecções por HHV-6 e/ou HHV-7 podem ser causa de morbidade, levando à disfunção e rejeição do enxerto (Lautenschlager e cols., 2002).

Mendez e cols. (2001) estudaram a reativação dos três betaherpesvírus em 33 receptores de transplante hepático. A detecção de DNA viral de CMV, HHV-6 e HHV-7 ocorreu na oitava semana pós-transplante, com taxas de 70%, 33% e 42%, respectivamente. Em outro estudo, pacientes que fizeram soroconversão para HHV-6 representaram um grupo de risco para o desenvolvimento de doença por CMV após o transplante hepático (Humar e cols., 2000).

Ohashi e cols. (2008) demonstraram em um estudo prospectivo com receptores de transplante de fígado, que ser portador dos vírus B e/ou C da hepatite constituía um fator de risco significativo para infecção ativa por HHV-6 após o transplante. Nesta série, foi possível determinar o papel do HHV-6 como fator de risco para mortalidade pós-transplante, principalmente relacionado à sua associação com infecções graves por CMV e infecções fúngicas.

1.3.8 HHV-6 em Neoplasias

Sabendo-se que o EBV está associado ao linfoma e carcinoma nasofaríngeo e ao carcinoma gástrico, e que o HHV-8 está relacionado com o sarcoma de Kaposi, suspeita-se que os betaherpesvírus também possam constituir co-fatores para o desenvolvimento de alguns tipos tumorais. A infecção ativa por HHV-6 altera a fisiologia do sistema imune, podendo aumentar o risco para o desenvolvimento de doenças linfoproliferativas, incluindo leucemia linfoblástica, mieloma múltiplo, doença de Hodgking, linfoma de células T, síndromes mielolinfoproliferativas e linfoma de Burkitt não-endêmico. Nestes casos, a variante mais comumente isolada é a forma viral B, reconhecida pelo seu tropismo linfático (De Bolle e cols., 2005).

Um recente estudo demonstrou que o sarcoma de Kaposi não se desenvolve sem a co-infecção do HHV-6 com o HHV-8, seu principal agente etiológico. Outras sugestões sobre o potencial oncogênico do HHV-6 advêm da sua associação com o câncer oral e, quando em co-infecção com CMV, também com o câncer cervical e doença de Hodgking (De Bolle e cols., 2005).

Acredita-se que o HHV-6 possa estar envolvido em processos de neo-vascularização, críticos para o desenvolvimento dos tumores. Todavia, este mecanismo parece ser exclusivo da variante HHV-A. Neste caso, o vírus induz a

fusão de células T, formando células polinucleadas gigantes, a partir da interação entre as proteínas do envelope viral com os receptores CD46, junto a células epiteliais e endoteliais (Mori e cols., 2002).

1.3.9 Diagnóstico Laboratorial

Existe uma considerável variação na literatura internacional entre os resultados epidemiológicos e laboratoriais relativos à infecção pelo HHV-6, refletindo a heterogeneidade das populações estudadas e a diversidade das metodologias aplicadas.

Assim como o CMV, as várias formas clínicas da infecção e da doença pelo HHV-6 tornam o diagnóstico clínico bastante difícil, sendo fundamental a utilização de exames laboratoriais específicos. O diagnóstico precoce de infecção ativa nos pacientes imunossuprimidos pode evitar doenças graves, já que a terapia antiviral parece ser eficiente na redução da carga viral (Lusso, 1996).

O diagnóstico do HHV-6 pode ser baseado em métodos sorológicos, isolamento do vírus, identificação de antígenos virais ou detecção molecular do DNA viral utilizando a técnica de PCR.

1.3.9.1 Sorologia

A sorologia não revela o momento exato da infecção. A identificação de IgG anti-HHV-6 pode ser útil na determinação do padrão sorológico do paciente, permitindo a diferenciação entre infecção primária e reativação viral, quando em associação com técnicas que identificam replicação viral. Ela também é útil na avaliação do risco pré-transplante, determinando o padrão sorológico do par doador/receptor. Por outro lado não é o método mais adequado para o

acompanhamento de pacientes de risco, uma vez que a imunossupressão pode retardar ou ainda não permitir o desenvolvimento de anticorpos IgM e/ou IgG dificultando o diagnóstico (Deborska-Materkowska e cols., 2006).

1.3.9.2 Isolamento por Cultivo Celular

O isolamento do HHV-6 em cultura de células foi a técnica originalmente utilizada para a identificação deste herpesvírus. O cultivo celular é realizado em células mononucleares de sangue periférico ou obtidas do sangue de cordão umbilical de recém-nascidos. A replicação do vírus em cultura é altamente indicativa de infecção ativa. Todavia, é uma técnica laboriosa e que consome muito tempo entre a inoculação da amostra em cultivo de células e a visualização microscópica das modificações celulares características ou a detecção viral através de imunofluorescência ou PCR (Leland e Ginocchio, 2007).

1.3.9.3 Testes Moleculares

A introdução de ensaios moleculares para a detecção de patógenos revolucionou o diagnóstico de muitas doenças infecciosas. Nos últimos anos, a emergência de novos patógenos virais entre pacientes imunodeprimidos e a disponibilidade de antivirais eficazes têm aumentado a necessidade de diagnósticos rápidos e acurados. A amplificação de ácidos nucleicos por métodos de biologia molecular permite a produção de grandes quantidades de fragmentos de DNA específicos do vírus de interesse, a partir de concentrações diminutas presentes em amostras clínicas (Domiasi-Saad e Scheuermann, 2006).

Geralmente utiliza-se uma amostra de sangue total ou plasma colhido com EDTA, obtido por punção de veia periférica, para se estabelecer o diagnóstico de

viremia. Entretanto, em infecções de sítios isolados, como o SNC, pode ser necessário o acesso direto, uma vez que o vírus pode não estar circulante e/ou não encontrar-se em quantidades detectáveis (Domiaty-Saad e Scheuermann, 2006).

1.3.9.1 PCR Qualitativo

O teste de PCR qualitativo para a identificação de sequências de ácidos nucleicos específicos do DNA viral em sangue total, soro ou plasma, pode ser indicativo tanto de infecção latente como de infecção ativa em pacientes soropositivos. Infelizmente, a falta de padronização na metodologia empregada e na escolha dos primers nos estudos de HHV-6, bem como a impossibilidade de quantificar a carga viral, têm tornado a comparação dos resultados complicada, pouco objetiva e desprovida de impacto clínico (Opsahl e Kennedy, 2005).

1.3.9.2 PCR Quantitativo

Mais recentemente, um método de PCR quantitativo, a PCR em tempo real, adicionou muitas vantagens à PCR convencional para o diagnóstico de infecções virais. Consiste de um sistema fechado que elimina a necessidade da análise pós-PCR. Por isso, reduz o tempo de manipulação e o risco de resultados falso-positivos por contaminação durante o processamento. Existem dois sistemas de PCR em tempo real, ambos baseados na detecção e quantificação de sequências-alvo fluorescentes detectadas a cada ciclo de amplificação de ácido nucleico: SYBR Green[®] e Taqman[®]. O primeiro realiza a detecção e quantificação de dupla fita de DNA amplificada, na qual a molécula fluorescente se insere. No sistema Taqman, mais específico do que o anterior, empregam-se primers e sondas, as quais emitem fluorescência ao hibridizarem com a sequência-alvo. Várias plataformas de PCR em

tempo real estão comercialmente disponíveis, diferindo em termos de capacidade de amostras analisadas simultaneamente e métodos de excitação (*laser* e filtros) (Domiaty-Saad e Scheuermann, 2006).

O método baseia-se nos mesmos princípios da reação de PCR convencional, somado à detecção de produtos amplificados por sondas fluorescentes. Assim, associa-se uma máquina cicladora de temperatura (PCR convencional) a um sistema informatizado capaz de detectar a fluorescência emitida pelos produtos da PCR. Quanto maior a quantidade de produto formado, maior a fluorescência emitida e detectada pelo sistema. Comparando-se o número exato de ciclos em que os produtos amplificados se acumulam, em relação a um controle conhecido, o método de PCR em tempo real permite quantificar o número de partículas de DNA inicialmente presentes na reação, o que possui grande aplicabilidade prática, especialmente no monitoramento de infecções virais. O tempo requerido para a emissão do resultado final (aí incluídos extração do DNA/RNA a partir do espécime clínico, realização da PCR e detecção dos produtos amplificados) é em geral menor do que 4 horas, a partir do recebimento da amostra. Este tempo é consideravelmente menor do que aquele requerido por métodos tradicionais de PCR, além de haver acréscimo na sensibilidade. Diferentemente dos métodos anteriores de PCR, a PCR em tempo real permite visualizar a reação no momento em que a mesma ocorre (Yang e Rothman, 2004; Espy e cols., 2006; Gunson e cols., 2006).

Desta forma, esta metodologia de PCR em tempo real permite resultados mais rápidos e fidedignos, expressando a quantificação absoluta de carga viral na amostra analisada. Trata-se do método molecular mais adequado para o diagnóstico de infecção ativa e acompanhamento do tratamento antiviral (Yoshikawa e Asano, 2000; Lautenschlager e cols., 2000). Todavia, é fundamental que se utilizem testes

padronizados e validados, empregando-se metodologia Taqman, uma vez que os resultados podem ser demasiadamente discrepantes na quantificação da carga viral em amostras clínicas. Isto compromete a interpretação clínica, especialmente por tratar-se de um vírus cuja sintomatologia pode ser leve e/ou inespecífica, porém com importância epidemiológica em população imunodeprimida (Flamand e cols., 2008).

1.3.9.4 Antigenemia

A técnica de antigenemia pode ser usada para o diagnóstico de todos os membros da família betaherpesvírus, ou seja, CMV, HHV-6 e HHV-7 (Launteschager e cols., 2002). No Brasil, a técnica de antigenemia para diagnóstico de infecções pelos herpesvírus foi iniciada pelo CMV no início da década de 90, empregando o método originalmente descrito por Van Der Bij em 1988, sendo a única até hoje realizada de forma rotineira (Van Der Bij e Speich, 2001; Deboni, 2001; Schroeder, 2003; Schroeder e cols., 2004). A identificação de antígenos virais por esta metodologia em sangue periférico consiste de 3 etapas: a) isolamento celular de leucócitos de sangue periférico; b) imunocoloração em lâminas de microscopia, utilizando anticorpo monoclonal primário e c) leitura através de microscopia óptica (imunoperoxidase) ou de fluorescência (imunofluorescência) (Schroeder e cols., 2009).

A antigenemia é um teste quantitativo que informa o número de células mononucleares circulantes com replicação viral presentes na amostra analisada. O resultado permite o diagnóstico de infecção ativa e tem valor prognóstico para o desenvolvimento de doença em pacientes de risco. É um método sensível e específico, devendo ser analisado em até 8 horas após a colheita, para que não ocorra diminuição da sensibilidade. Este é um teste altamente dependente da

capacitação técnica específica. Em pacientes com leucopenia grave a técnica torna-se inviável, sendo indicados os métodos moleculares para a quantificação viral (Boeckh e Boivin, 1998).

Na antigenemia para o HHV-6, emprega-se a técnica de imunoperoxidase, que é laboriosa e pouco reprodutível. Utilizam-se células mononucleares separadas por gradiente de densidade (*Ficcol-hypaque*) e um anticorpo monoclonal primário específico (MAB8533 e MAB8536) dirigida contra uma proteína de 37KDa do HHV-6 e de 101 KDa específica do HHV-6 variante B, respectivamente. Aplica-se um anticorpo secundário marcado com peroxidase, sendo a revelação pelo 3-amino-9-etil-carbazol, usando a hematoxilina de Mayer para a coloração de fundo. Quando se observam as lâminas ao microscópio, verifica-se a positividade das células marcadas (positivas para HHV-6 com replicação) que apresentam coloração avermelhada (Lautenschlager e cols., 2000).

1.3.10 HHV-6 e Tratamento

As infecções em crianças imunocompetentes são auto-limitadas, prescindindo de tratamento específico. Todavia, esta infecção em pacientes imunocomprometidos pode representar risco de morte se não tratada adequadamente. Nenhum ensaio clínico com terapia antiviral para controle das infecções por HHV-6 em população de risco foi realizado. As drogas usadas clinicamente são as mesmas empregadas no tratamento de infecções por CMV, tais como ganciclovir, cidofivir ou foscarnet e, em doenças leves, o aciclovir (De Bolle e cols., 2005).

O ganciclovir e o foscarnet, os mais estudados, quando usados em pacientes transplantados de fígado, induzem melhora do quadro clínico e decréscimo significativo da carga viral do HHV-6, assim como de outros herpesvírus (Mendez e

cols., 2001; Abdel-Haq e Asmar, 2004).

Considerando-se a alta morbidade das infecções virais em imunossuprimidos e que o Laboratório de Imunologia de Transplantes e os serviços de transplantes da Santa Casa de Porto Alegre possuem vasta experiência com o diagnóstico e tratamento precoces de infecções por CMV (Schroeder e cols., 1999; Schroeder e cols., 2004; Schroeder e cols., 2005, Schroeder e cols., 2007; Schroeder e cols., 2009), entende-se necessária a ampliação do espectro diagnóstico destas infecções. Outros herpesvírus, como o HHV-6, à semelhança do CMV, podem eventualmente apresentar alta prevalência, fazendo-se necessário avaliar a importância de sua monitorização continuada a partir do início da imunossupressão.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Haq NM, Asmar BI. Human herpesvirus 6 (HHV6) infection. *Indian J Pediatr.* 2004;71(1):89-96.
- Ablashi DB, Agut Z, Berneman G. Human herpesvírus-6 strain groups; a nomenclatura. *Arch Virology.* 1993;129:363-366.
- Ahlqvist J, Fotheringham J, Akhyani N, Yao K, Fogdell-Hahn A, Jacobson S. Differential tropism of human herpesvirus 6 (HHV-6) variants and induction of latency by HHV-6A in oligodendrocytes. *J Neurovirol.* 2005;11(4):384-94,
- Aubin JT, Agut H, Collandre H, Yamanishi K, Chandran B, Montagnier L, ET al. Antigenic and genetic differentiation of the two putative types of human herpes virus 6. *J Virol Methods.* 1993;41(2):223-34.
- Boeckh M, Boivin G: Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):533-554.
- Boivin G: Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes* 2004;48-56,
- Boutolleau D, Duros C, Bonnafous P, Caiola D, Karras a, Castro ND, ET al. Identification of human herpesvirus 6 variants A and B by primer-specific real-time PCR may help to revisit their respective role in pathology. *J Clin Virol.* 2006;35(3): 257-63.
- Brennan DC. Highlights from the sixth annual AST winter symposium — Transplantation meets infection: Microbes, rejection, atherosclerosis, and malignancy. *Medscape Transplantation.* 2002;3(1):1-14-www.medscape.com (31/01/2003)
- Campadelli-Fiume G, Mirandola, P Menoti L. Human herpesvirus 6: An emerging pathogen. *Emerg Infect Dis.* 1999;5(3):353-66-www.cdc.gov.10/02/04
- Caserta MT, Mcdermott MP, Dewhurst S, Schnabel K, Carnahan JA, Gilbert L, ET al. Human herpesvirus 6 (HHV6) DNA persistence and reactivation in healthy children. *J Pediatr.* 2004;145(4):478-84.
- Chen T & Hudnall SD: Anatomical mapping of human herpesvirus reservoir of infection. *Modern Pathol.* 2006;19:726-37.
- Collot S, Petit D, Bordessoule S, Alain S, Touati M, Denis F, ET al. Real time PCR for quantification of human herpes-virus 6 DNA from lymph nodes and saliva. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:2445-2451.
- De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical fetures, and therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(1)217-245.
- Deboni L. Estudo da incidência da infecção por citomegalovirus em uma coorte de pacientes transplantados renais através da técnica de antigenemia [Mestrado]. Porto Alegre: UFRGS; 2001.
- Deborska-Materkowska D, Lewandowski Z, Sadowska A. Nowacka-Cieciura E, Chudzinski W, Czerwinski J, ET al. Fever, human herpesvirus 6 (HHV-6) seroconversion, and acute rejection episodes as a function of the initial

- seroprevalence for HHV-6 in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2006;38:139-143.
- Desjardin J A, Cho E, Supran S, Gibbons L, Werner BG, Snyderman DR. Association of human herpesvirus 6 reactivation with severe cytomegalovirus-associated disease in orthotopic liver transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2001;33(8):1358-62.
- Dewhurst S. Human herpesvirus type 6 and human herpesvirus type 7 infections of the central nervous system. *Herpes* 2004;11(2):105A-111A.
- Dietrich J, Blumberg BM, Roshal M, Baker JV, Hurley SD, Mayer PM, ET al. Infection with an endemic human herpesvirus disrupts critical glial precursor cell properties. *J Neurosci.* 2004;24(20):4875-83.
- Dockrell DH, Smith TF, Paya CV. Human herpesvirus 6. *Mayo Clin Proc.* 1999;74(2):163-70.
- Dockrell DH, Paya CV: Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation. *Rev Med Virol.* 2001;11(1):23-36.
- Domati-Saad R, Scheuermann RH. Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping. *Clin Chim Acta.* 2006;363(1-2):197-205.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vertter EA, ET al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:165-256.
- Fields B, Schaechter NC, Medoff G. In: *Microbiologia*; 2002;P 255-269.
- Flamand L, Gravel A, Boutolleau D, Alvarez-Lafuente R, Jacobson S, Malnati MS, ET al. Multicenter comparison of PCR assays for detection of human herpesvirus 6 DNA in serum. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2700-2706.
- De Freitas RB, Linhares AC. A prevalence of HHV-6 antibody in the in the population of Belem, Para, Northern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91(5):538-540.
- Gunson RN, Collins TC, Carman WF. Practical Experience Of High Throughput real-time PCR in the routine diagnostic virology setting. *J Clin Virol.* 2006;35:355-67.
- Humar A, Malkan G, Moussa G, Greig P, Levy G, Mazzulli T. Human herpesvirus-6 is associated with cytomegalovirus reactivation in liver transplant recipients. *J Infect Dis.* 2000;181:1450-3.
- Ihira M, Yoshikawa T, Suzuki K, Ohashi M, Suga S, Asonuma K, ET al. Correlation between human herpesvirus 6 and 7 infections after living related liver transplantation. *Microbiol Immunol.* 2001;45(3):225-32.
- Komaroff AL. Is human herpesvirus-6 a trigger for chronic fatigue syndrome? *J Clin Virol.* 2006;37(1):39-46.
- Komaroff AL, Jacobson S, De Clercq E, Yamanishi K. Highlights from 5th International Conference on HHV-6 and 7. *Herpes.* 2006;13(3):81-2.
- Lautenschlager I, Linnavuori K, Höckerstedt K. Human herpesvirus-6 antigenemia after liver transplantation. *Transplantation* 2000;69:2561-66.
- Lautenschlager I, Harma M, Hockerstedt K, Linnavuori K, Loginov R, Taskinen E. Human herpesvirus-6 infection is associated with adhesion molecule induction and lymphocyte infiltration in liver allografts. *J Hepatol.* 2002;37(5):648-54.

Leland DS, Ginocchio CC. Role of the cell culture for detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev.* 2007;1:49-78.

Lusso P: Human herpesvirus 6 (HHV-6). *Antiviral Res.* 1996;31:1-21.

Mendez JC, Dockrell DH, Espy MJ, Smith TF, Wilson JA, Harmsen WS, ET al. Human beta-herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients. *J Infect Dis.* 2001;183(2):179-184.

Mendes N, Veronesi R, Focacia R. *Virology.* In: Atheneu, Tratado de Infectologia 2002.

Mori Y, Seya T, Huang HL, Akkapiboon P, Dhepakson P, Yamanishi K. Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J Virol.* 2002;76(13):6750-61.

Okuno T, Higashi K, Shiraki K, Yamanishi K, Takahashi M, Kokado Y, ET al. Human herpesvirus6 infection in renal transplantation. *Transplantation* 1990;49:519-22.

Ohashi M, Sugata K, Ihira M, Asano Y, Egawa H, Takada Y, ET al. Human herpesvirus 6 infection in adult living related liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2008;14:100-109.

Opsahl ML, Kennedy PG: Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter. *Brain* 2005;128(3):516-27.

Rangert S, Patillaud S, Denis F, Himmich A, Sangare A, MBoup S, ET al. Seroepidemiology of human herpesvirus-6 in pregnant women from different parts of the world. *J Med Virol.* 1991;34(3):194-8.

Ratnamohan V, Chapman J, Howse H, Bovington K, Robertson P, Byth K, ET al. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6 both cause viral disease after renal transplantation. *Transplantation* 1998;66:877-82.

Rossi C, Delforge ML, Jacobs F, Wissing M, Pradier O, Remmelink M, ET al. Fatal primary infection due to human herpesvirus 6 variante A in a renal transplant recipient. *Transplantation* 2001;71:288-292.

Reddy S, Manna P. Quantitative detection and differentiation of human herpesvirus 6 subtypes in bone marrow transplant patients by using a single real-time polymerase chain reaction assay. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11(7):530-41.

Schroeder R, Mesko J, Santos A, Keitel E, Bittar A, Garcia V, ET al. Cytomegalovirus antigenemia and renal function post-kidney-transplantation. *Transplant Proc.* 1999;31(7):3027-8.

Schroeder RB. Antigenemia para citomegalovírus no pós-transplante renal: Escolha de um ponto de corte para o diagnóstico de doença citomegálica [Mestrado]. Porto Alegre: PUCRS; 2003.

Schroeder R, Michelin T, Fagundes I, Bortolotto A, Lammerhirt E, Oliveira J, ET al: Cytomegalovirus disease latent and active infection rates during the first trimester after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2004;36(4):896-898

Schroeder R, Michelin T, Fagundes I, Bortolotto A, Lammerhirt E, Oliveira J, ET al: Antigenemia for Cytomegalovirus in Renal Transplantation: Choosing a Cutoff For

the Diagnosis Criteria in Cytomegalovirus Disease. *Transplant Proc.* 2005;37(6): 2781–2783.

Schröder RB, Michelon T, Wurdig J, Fagundes I, Schio S, Sanchez L, ET al. The Incidence of Cytomegalovirus Infection in Lung Transplant Recipients under Universal Prophylaxis with Intravenous Ganciclovir. *Braz J Infect Dis.* 2007;11(2):212-4.

Schroeder RB, Michelon T, Wurdig J, Keitel E, Neumann J. Comparação entre as Técnicas de Imunoistoquímica e de Imunofluorescência para a Antigenemia pp65 do Citomegalovírus (CMV) em Receptores de Transplante. *J Bras Transpl.* 2009;12:1038-41.

Smith AP, Paolucci C, Di Lullo G, Burastero SE, Santoro F, Lusso P. Viral replication-independent blockade of dendritic cell maturation and interleukin-12 production by human herpesvirus 6. *J Virol.* 2005;79(5):2807-13.

Singh N, Carrigan DR: Human herpesvirus-6 in transplantation: an emerging pathogen. *Ann Intern Med.* 1996;124(12):1065-71.

Singh N, Peterson D. Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in transplant recipients. *Transplantation* 2000;69:2474-2479.

Tiansheng C, Hudnall D: Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection. *Mod Pathol.* 2006;19:726-737.

Van Der Bij W, Speich R: Management of citomegalovirus infection and disease after solid-organ transplantation. *Clin Infect Dis.* 2001;33(1):32-37.

Visser AM, Van Doornum GJ, Coernelissen JJ, van den Bent MJ. Severe amnesia due to HHV-6 encephalitis after allogenic stem cell transplantation. *Eur Neurol.* 2005;54(4):233-4.

Yoshikawa T, Asano Y. Central nervous system complications in human herpesvirus-6 infection. *Brain Dev.* 2000;22(5):307-14.

Yang S, Rothman RE. PCR-Based Diagnostics For Infectious Diseases: Uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis.* 2004;4: 337-48.

3. Objetivos

3.1 Geral:

Avaliar o perfil das infecções precoces por HHV-6 após o transplante renal e a sua associação com infecção ativa por CMV e com morbidade pós-transplante.

3.2 Específicos:

3.2.1 Determinar a prevalência de infecção latente por HHV-6 no momento pré-transplante renal no par doador-receptor.

3.2.2 Determinar a incidência de infecção ativa (infecção primária e reativação) por HHV-6 nas primeiras 6 semanas pós-transplante renal.

3.2.3 Avaliar o risco de viremia por HHV-6 conforme o padrão sorológico pré-transplante.

3.2.4 Determinar a incidência de infecção ativa por ambos os vírus (HHV-6 e CMV), isolados ou associados, nos primeiros 3 meses pós-transplante renal.

3.2.5 Analisar a associação entre a ocorrência de infecção ativa precoce por HHV-6 e o desenvolvimento posterior de:

a) infecção ativa por CMV;

b) doença por CMV (DCMV);

c) gravidade da DCMV: antigenemia máxima e duração do tratamento com ganciclovir endovenoso.

3.2.6 Analisar a associação entre a infecção ativa precoce por HHV-6 e a morbidade pós-transplante, avaliada através de:

a) ocorrência de infecções (não-HHV-6 e não-CMV) no primeiro ano pós-transplante;

- b) ocorrência de infecções bacterianas no primeiro ano pós-transplante;
- c) ocorrência de infecções virais no primeiro ano pós-transplante;
- d) ocorrência de infecções fúngicas no primeiro ano pós-transplante;
- e) número de internações no primeiro ano pós-transplante;
- f) duração da primeira internação hospitalar (cirurgia do transplante, dias);
- h) dias de internação nos primeiros 6 meses pós-transplante;
- i) dias de internação no primeiro ano pós-transplante;
- j) função renal medida pela creatinina sérica: 1, 3, 6 e 12 meses;
- l) perda do enxerto;
- m) óbito.

4. ARTIGO CIENTÍFICO 1

4.1 EM INGLÊS

Pre-transplant HHV-6 Latent Infection does not Predict Risk related to the CMV Disease after Kidney Transplantation

R. Schroeder^{ },^{a, b}, T. Michelon^b, J Silveira^b, Gabriela Garbin^b, Luiza Assmann^b,
Dario Brum^b, V. Garcia^b, J. Neumann^b and E. Keitel^{a, b}

^a Pathology Post-Graduation Program – Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

^b Transplant Immunology Laboratory; Kidney Transplant Service; Blood Bank Unit –
Santa Casa Hospital - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO:

No periódico Transplantation Proceedings

**Pre-transplant HHV-6 Latent Infection does not Predict Risk related to the
CMV Disease after Kidney Transplantation**

R. Schroeder^{},^{a, b}, T. Michelon^b, J Silveira^b, Gabriela Garbin^b, Luiza Assmann^b,
Dario Brum^b, V. Garcia^b, J. Neumann^b and E. Keitel^{a, b}

^a Pathology Post-Graduation Program – Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

^b Transplant Immunology Laboratory; Kidney Transplant Service; Blood Bank Unit –
Santa Casa Hospital - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Funding Source: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES).

Address reprint requests to Regina Schroeder,

Transplant Immunology Laboratory – Santa Casa Hospital, Dom Vicente Scherer
Building.

Av Independencia 75, Porto Alegre, RS, CEP-94035-075, Brazil.

E-mail: regina@santacasa.tche.br

Key Words: kidney transplant; cytomegalovirus, human herpesvirus type 6, virus
infection, diagnosis.

Abstract

The aims of this study were to determine the pre-transplant seroprevalence of CMV and HHV-6 among controls and kidney transplant recipients, and to analyze the association between both latent infections with CMV-disease occurrence and severity after transplantation. IgG-anti-CMV (Roche, USA) and anti-HHV-6 (Pambio, USA) were analyzed by ELISA in the available sera of 122 donor-recipient pairs. As an additional control-group, sera from blood donors were also tested for IgG-anti-HHV-6 (BD; n=64). Recipients were followed by pp65 CMV antigenemia from 4th to 12th weeks after transplantation (APAAP immunocytochemical; Biotest, Germany). CMV disease (DCMV) was defined as the simultaneous positive antigenemia and presence of clinical signs/symptoms. IgG-anti-HHV-6 was detected in 83.6% (102/122) of patients, 59.6% (34/57) of the kidney donors (KD) and 68.7% (44/64) of the BD (Controls: KD+BD; P=0.000, OR=4.0[2.0-8.0]). CMV-IgG was detected in 93.4% (114/122) of the recipients and 90.2% (46/51) of the KD (P=0.529). There was no association between both virus infection before transplantation (cases: P=0.205; KD: P=0.115). DCMV occurred in 30.8% of the kidney recipients (36/117; 5 losses of follow-up in the 1st month), with a higher incidence among CMV IgG-negative patients (71.4% x 28.2%, P=0.028, OR=2.5[1.4-4.4]). Negative and positive-HHV-6 patients had the same DCMV incidence (P=0.999) and severity (P=0.913) after transplantation. There was a high prevalence of latent infection by CMV and HHV-6 in kidney recipients and a sample of general Brazilian population. Recipients had higher prevalence of HHV-6 infection before transplantation. Contrary to that observed for CMV, lacking IgG anti-HHV-6 had no clinical impact for DCMV thereafter.

Introduction

Viral infection is a major cause of morbidity after transplantation. Cytomegalovirus (CMV) disease is the commonest concerning the incidence and clinical expertise in transplant centers all over the world. HHV-6 is another *Herpesviridae* member, sharing the main characteristics with CMV. The most important is their potential for latency establishment in blood cells, with reactivation under immunosuppressant conditions.^{1,2,3}

Recently, some authors have reported that HHV-6 and CMV co-infections can cause a more severe viral disease and increase the risk for other opportunistic infections after transplantation. The general HHV-6 seroprevalence is variable, ranging from 20% in Marrocos to more than 90% in urban centers. In brazilian northeastern area this prevalence is around 78%. There is a lack of studies in immunossuppressed populations.^{2,3,4}

The aims of this study were to determine the pre-transplant seroprevalence of CMV and HHV-6 among controls and kidney transplant recipients, and analyze the association between both latent infections with CMV-disease occurrence and severity after transplantation.

Methods

IgG anti-CMV (Roche, USA) and anti-HHV-6 (Pambio, USA) were analyzed by ELISA in the available sera of 122 donor-recipient pairs. As an additional control group, sera from blood donors were also tested for IgG anti-HHV-6 (BD; n=64). Recipients were followed by pp65 CMV antigenemia from 4th to 12th weeks after transplantation (APAAP immunocytochemical; Biotest, Germany). CMV disease

(DCMV) was defined as simultaneous positive antigenemia and clinical signs/symptoms. The severity of the DCMV was evaluated by the maximum antigenemia observed during the follow-up.

Chi-square, Fisher exact, Student t and/or Mann-Whitney tests were applied as recommended, being significant P values ≤ 0.05 . Odds Ratio and 95% Confidence Intervals were calculated using the Statistical Package for Social Sciences, 14.0 version.

Results

In this series, transplant recipients were older than controls (40.3 ± 13.3 x 35.9 ± 11.9 years old; $P=0,007$). IgG anti-HHV-6 was detected in 83.6% (102/122) of the patients, 59.6% (34/57) of the kidney donors (KD) and 68.7% (44/64) of the BD (Controls: KD+BD; $P=0.000$, $OR=4.0[2.0-8.0]$). IgG-HHV-6 had no association with recipient's mean age ($P=0.281$). CMV-IgG was detected in 93.4% (114/122) of the recipients and 90.2% (46/51) of the KD ($P=0.529$). There was no association between both viruses before transplantation (cases: $P=0.205$; KD: $P=0.115$).

DCMV occurred in 30.8% of the kidney recipients (36/117; 5 losses during the 1st month), with a maximum $64 \text{ +cells}/10^5$ granulocytes. CMV IgG-negative patients had a higher prevalence of DCMV (71.4% x 28.2%, $P=0.028$, $OR=2.5[1.4-4.4]$). Negative and positive-HHV-6 patients had the same DCMV incidence after transplantation (30.8% x 29.9%, $P=0.999$). Highest antigenemia during the follow-up was also similar between negative and positive IgG-HHV-6 recipients ($P=0.913$).

Discussion

Laboratory and epidemiological data related to the HHV-6 infection are largely variable among different populations. Despite the clinical importance of the active infection after transplantation are not clear, there are reports ranging its incidence from 14% to 82%.^{1,2,3} This virus reaches its peak of reactivation during the first four weeks post-transplantation. The most severe manifestations related to the HHV-6 infection in these patients include encephalitis, interstitial pneumonia and aplastic anemia. However, all these pictures are not commonly seen after kidney transplantation, being the CMV infection the most frequently viral complication observed worldwide.^{4,5,6}

Recently, CMV and HHV-6 co-infection has gained attention, mainly focused on unusual manifestations associated with CMV reactivation, its slow decreasing under regular ganciclovir treatment or even late recurrence of the active infection. It is probable that a quantitative molecular approach during the risk period may elucidate the HHV-6 role after transplantation, even though it was not the aim of this study.^{1,3-5}

In conclusion, there was a high prevalence of latent CMV and HHV-6 infections in kidney recipients and in the studied sample of the general Brazilian population. Despite the higher prevalence of HHV-6 infection among kidney recipients before transplantation, it did not show any clinical impact concerning the risk and severity of DCMV thereafter. The opposite was seen among renal recipients without preformed IgG anti-CMV.

References

1. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E: Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(1):217-45.
2. Freitas RB, Linhares A. A prevalence of HHV-6 antibody in the in the population of Belem, Para, Northern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91:538-540.
3. Zerr DM, Meier AS, Selke SS, ET al. A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *N. Engl J. Med.* 2005;342:768.
4. Preiksaitis JK, Brennan CD, Fishman J, ET al. Canadian Society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *Am J Transplant.* 2005;5:218-227.
5. Komaroff Al, Jacobson S, De Clercq E, ET al: Highlights from 5th International Conference on HHV-6 and -7. *Herpes* 2006;13(3):81-2.

4.2 EM PORTUGUÊS

Infecção latente por HHV-6 não prevê risco para doença por CMV após o transplante renal

R. Schroeder   ^{1,4}, **T. Michelon**^{1,4}, **J Silveira**¹, **G. Garbin**⁴, **L. Assmann**³ **D. Brum**³, **V. Garcia**², **J. Neumann**¹ and **E. Keitel**^{2,4}

¹Laboratório de Imunologia de Transplantes, ²Serviço de Transplante Renal e ³Banco de Sangue da Santa Casa de Porto Alegre; ⁴ Programa de Pós Graduação em Patologia
- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brasil

Apoio: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Correspondência auto: Regina Schröder, Laboratorio de Imunologia de Transplantes,
Hospital Dom Vicente Scherer- 7 andar, Av Independencia 75, Porto Alegre, RS.
CEP-94035-075, Brasil. e-mail: regina@santacasa.tche.br

Palavras Chave: transplante renal; citomegalovírus, herpesvírus humano tipo 6,
diagnóstico, infecção viral.

Resumo

Os objetivos deste estudo foram determinar a soroprevalência pré-transplante para o CMV e HHV-6 entre controles e receptores de transplante de rim, e analisar a associação entre ambas as infecções latentes com a doença por CMV (DCMV) após o transplante. IgG anti-CMV (Roche, EUA) e anti-HHV-6 (Pambio, EUA) foram analisadas por ELISA no soro disponível de 122 pares doador-receptor. Um grupo controle adicional com doadores de banco de sangue foi testado para IgG anti-HHV-6 (BS; n=64). Os receptores foram acompanhados por antigenemia pp65 para o CMV entre a 4^a e a 12^a semanas pós-transplante por imunistoquímica (APAAP, Biotest, Alemanha). DCMV foi definida como antigenemia positiva na presença de sinais e/ou sintomas clínicos. IgG anti-HHV-6 foi detectada em 83,6% (102/122) dos pacientes, 59,6% (34/57) dos doadores de rim (DR) e 68,7% (44/64) dos BS (Controles: DR+BS, P=0,001, OR=4,0[2,0-8,0]). IgG anti-CMV foi detectada em 93,4% (114/122) dos receptores e 90,2% (46/51) dos DR (P=0,529). Não houve associação entre a infecção por ambos os vírus antes do transplante (casos: P=0,205; DR: P=0,115). DCMV ocorreu em 30,8% dos receptores (36/117; 5 perdas de seguimento no 1 mês), com maior incidência entre IgG anti-CMV negativos (71,4% x 28,2%, P=0,028, OR=2,5[1,4-4,4]). Pacientes negativos e positivos para HHV-6 apresentaram incidência (P=0,999) e gravidade (P=0,913) da DCMV semelhantes após o transplante. A prevalência de infecção latente por CMV e por HHV-6 foi elevada em receptores de rim antes do transplante e nessa amostra da população brasileira, sendo o HHV-6 mais frequente entre os receptores. Ao contrário do observado com o CMV, a ausência de IgG anti-HHV-6 não teve impacto sobre o risco de DCMV posterior.

Introdução

Infecção viral é uma das principais causas de morbidade após o transplante. Doença por citomegalovírus (CMV) é a mais comum, considerando-se a sua alta incidência e a vasta experiência clínica com esta infecção nos centros de transplante do mundo todo. HHV-6 é outro membro da família *Herpesviridae*, compartilhando as principais características já conhecidas para o CMV. Entre elas, a mais importante é o seu potencial para o estabelecimento de latência em células sanguíneas, podendo reativar sob condições de imunossupressão.^{1,2,3}

Recentemente, alguns autores têm descrito quadros de infecção viral mais grave e aumento do risco de infecções oportunistas associados à co-infecção por CMV mais HHV-6 após o transplante. A soroprevalência por HHV-6 na população em geral é variável, sendo tão baixa quanto 20% em estudo do Marrocos e maior do que 90% em diversos centros urbanos. No Brasil, estudo realizado no nordeste registra prevalência ao redor de 78%. Não há estudos de soroprevalência desta infecção viral em populações imunodeprimidas.^{2,3,4}

Os objetivos deste estudo foram determinar a soroprevalência pré-transplante da infecção por CMV e por HHV-6 entre os controles e os receptores de transplante renal, além de analisar a associação entre ambas as infecções latentes com a doença por CMV (DCMV) após o transplante.

Métodos

IgG anti-CMV (Roche, EUA) e anti-HHV-6 (Pambio, EUA) foram analisadas por método de ensaio imunoenzimático (ELISA) no soro disponível de 122 pares

doador-receptor. Um grupo controle adicional, representado por doadores de banco de sangue, também foi testado para IgG anti-HHV-6 (BS; n=64). Após o transplante, os receptores foram acompanhados para o risco de infecção por CMV através da realização da antigenemia pp65, por método de imunistoquímica (APAAP, Biotest, Alemanha), entre a 4^a e a 12^a semanas pós-transplante. DCMV foi definida como a presença de antigenemia positiva na vigência de sinais e/ou sintomas clínicos sugestivos da infecção. A gravidade da DCMV foi avaliada através do número máximo de células positivas no teste da antigenemia observada durante o acompanhamento.

Os testes do Qui-quadrado, Exato de Fisher, t de Student e/ou *Mann-Whitney* foram empregados, conforme recomendado, sendo significativos os valores de $P \leq 0,05$. *Odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%) foram calculados através do programa *Statistical Package for Social Sciences*, versão 14.0.

Resultados

Nesta série, a média de idade dos receptores de transplante renal foi mais elevada do que a dos controles ($40,3 \pm 13,3$ x $35,9 \pm 11,9$ anos; $P=0,007$). IgG anti-HHV-6 foi detectada em 83,6% (102/122) destes pacientes, em 59,6% (34/57) dos doadores de rim (DR) e em 68,7% (44/64) dos BS (Controles: DR+BS; $P=0,001$, $OR=4,0[2,0-8,0]$). Não houve associação entre a média de idade do receptor e a presença de IgG anti-HHV-6 ($P=0,281$). IgG anti-CMV foi detectada em 93,4% (114/122) dos receptores e em 90,2% (46/51) dos DR ($P=0,529$). Não houve associação entre as duas infecções latentes pré-transplante (casos: $P=0,205$; DR: $P=0,115$).

DCMV ocorreu em 30,8% dos receptores renais (36/117; 5 perdas no primeiro mês), com mediana de antigenemia máxima de 64 células+/10⁵ granulócitos. Pacientes transplantados com IgG anti-CMV negativa apresentaram maior incidência de DCMV (71,4% x 28,2%, P=0,028, OR=2,5[1,4-4,4]). A incidência de DCMV foi semelhante entre os pacientes negativos e positivos para IgG anti-HHV-6 pré-transplante renal (30,8% x 29,9%, P=0,999), assim como a antigenemia máxima atingida ao longo do acompanhamento (P=0,913).

Discussão

Dados epidemiológicos e laboratoriais relacionados à infecção pelo HHV-6 são altamente variáveis entre as diferentes populações estudadas. Apesar de a importância clínica da infecção ativa por esse vírus após o transplante ainda não ser clara, a sua incidência pode variar 14% a 82%.^{1,2,3} O HHV-6 atinge seu pico de reativação durante as primeiras quatro semanas pós-transplante. As manifestações mais graves relacionadas à infecção pós-transplante por esse agente incluem encefalite, pneumonia intersticial e anemia aplástica. Entretanto, tais manifestações clínicas são incomuns após o transplante renal, sendo a infecção por CMV a complicação viral mais frequentemente observada em todo o mundo.^{4,5,6}

Recentemente, a co-infecção por CMV e HHV-6 tem despertado interesse clínico, principalmente por ocasião de manifestações incomuns associadas à reativação do CMV, casos de resolução lenta da infecção sob terapia com ganciclovir, bem como diante da ocorrência de infecção ativa tardia por CMV. É provável que uma abordagem molecular quantitativa durante o período de risco para as respectivas infecções virais possam auxiliar no entendimento do papel do HHV-6 após o transplante, embora esse não tenha sido o objetivo do presente estudo.^{1,3-5}

Em conclusão, infecção latente por HHV-6 e por CMV são altamente prevalentes em receptores de transplante renal, bem como na amostra da população brasileira hígida estudada como controle. Apesar da maior prevalência de infecção latente por HHV-6 entre os receptores de transplante de rim, a mesma não modificou o risco e nem a gravidade da DCMV após o transplante. O contrário foi observado entre os receptores de rim sem IgG anti-CMV pré-formada.

Referências

1. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E: Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(1):217-45.
2. Freitas RB, Linhares A. A prevalence of HHV-6 antibody in the in the population of Belem, Para, Northern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91:538-540.
3. Zerr DM, Meier AS, Selke SS, ET al. A population-based study of primary human herpesvírus 6 infection. *N. Engl J. Med.* 2005;342:768.
4. Preiksaitis JK, Brennan CD, Fishman J, ET al. Canidian Society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *Am J Transplant.* 2005;5:218-227.
5. Komaroff Al, Jacobson S, De Clercq E, ET al: Highlights from 5th International Conference on HHV-6 and -7. *Herpes* 2006;13(3):81-2.

5. ARTIGO CIENTÍFICO 2

5.1 EM INGLÊS

Early HHV-6 Replication is associated with morbidity non-related to CMV Infection after Kidney Transplantation

**Regina Schroeder^{1,2}, Tatiana Michelon^{1,2}, Gabriela Garbin¹, Janaina Silveira²,
Luciano Santos², Valter Garcia², Jorge Neumann² and E. Keitel^{1,2}**

¹Pathology Post-Graduation Program – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

² Transplant Immunology Laboratory; Kidney Transplant Service – Santa Casa Hospital - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Funding Source: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES)

Address: Regina Barbosa Schröder, Laboratorio de Imunologia de Transplantes,
Hospital Dom Vicente Scherer, Av Independencia 75, Porto Alegre, RS, CEP-94035-
075, Brazil. e-mail: regina@santacasa.tche.br

Key Words: kidney transplant; cytomegalovirus, human herpesvirus type 6, virus infection, diagnosis, Real Time PCR.

Abstract

Introduction: Herpesvirus type 6 (HHV-6) has been associated with morbidity and mortality after liver transplantation, as well as it is known for cytomegalovirus (CMV) in transplants of different organs and tissues. The frequency and importance of latent and active infection by HHV-6 in early kidney transplantation need to be elucidated.

Objective: The aim of this study was to determine the HHV-6 seroprevalence among donor-recipient pairs, analyze the incidence of early active infection, its clinical manifestation, interaction with CMV and the related morbidity in the first year after kidney transplantation.

Patients and Methods: There were studied 46 donor-recipient pairs, that had IgG researched before transplantation by ELISA: HHV-6 (Pambio, USA) and CMV (Roche, USA). A frozen whole blood sample weekly collected (from 1st to 6th) was retrospectively tested for HHV-6 viral load (VL) determination by real time quantitative PCR (qPCR; Nanogen, Italy). Patients were preemptively surveyed for CMV by pp65 antigenemia (Ag; APAAP immunohistochemistry, Biotest, Germany) from 4th to 12th weeks after transplantation. Active infection was defined as qPCR-HHV6+ (viral load/ml; VL) and Ag+ (+cells/10⁵granulocytes), for HHV-6 and CMV, respectively. DCMV was defined as simultaneous positive antigenemia and suggestive signs/symptoms. Concerning +qPCR-HHV6, associated factors, clinical manifestation, interaction with CMV and morbidity were searched. Statistical Package for Social Sciences was applied for chi-square with Yates correction or Fisher's exact, Student's test or Mann-Whitney. $P \leq 0.05$ was considered significant, being described the respective relative risk (RR) and 95% confidence interval (95%CI).

Results: Pre-transplant HHV-6 seroprevalence was significantly higher among kidney recipients compared to their donors (82.6 x 54.8%; $P=0.005$ [3.9(1.4-10.4)]). Active infection by this virus occurred in 26.1% (12/46), with no association with previous IgG ($P=0.412$). Median VL was 125 copies/ml (53-11.264), and the median Ag was 21+cells (2-740). There was no association between HHV-6 and CMV activation after transplantation ($P=0.441$), neither concerning DCMV ($P=0.596$). Median highest Ag+ and days of ganciclovir were similar between qPCR-HHV6 + or – ($P=0.206$ and $P=0.124$, respectively). qPCR-HHV6+ was associated with higher incidence of bacterial ($P=0.009$) and fungal ($P=0.001$) infections, and higher number ($P=0.001$) of hospital admission and longer lasting during the first 6 and 12 months post-transplantation ($P=0.033$ and $P=0.001$, respectively).

Conclusion: Latent HHV-6 infection is commoner among recipients than donors before kidney transplantation. Early active infection by this pathogen after transplantation does not increase DCMV incidence or severity during the first 3 months of follow-up. However, early HHV-6 replication is associated with other infections and hospitalizations in the first year post-kidney transplantation.

Introduction

Viral infections are one of the major causes of morbidity and mortality after organ and tissue transplants. Besides the etiological agent, the risk of a viral infection depends on the pathogen epidemiology and host's immunity. Because transplants imply the use of immunosuppressant drugs for avoiding graft rejection, the diagnosis of a viral infection relies on its kinetics and clinical suspicion, frequently before signs/symptoms. One of the most studied families of virus in transplantation is the *Herpesviridae*, which comprehends eight different viruses. The majority of them is highly prevalent in general population and shows an immunomodulatory effect.¹⁻⁵

The deleterious role of the Cytomegalovirus (CMV) after transplantation is well recognized, being its active replication systematically searched. At the beginning, this active infection was associated with high mortality and morbidity.¹⁻¹⁰ These were the reasons that brought about the current practice of early diagnosis and treatment in risk populations. Nowadays, the morbidity and cost related to the specific antiviral treatment are still major concerns. In addition, late recurrences of CMV, slow decrease of viral replication rate or even drug resistance have concerned clinicians.¹¹⁻¹⁵

CMV replication has been surveyed after kidney, kidney-pancreas, lung, liver, heart and hematopoietic stem cell transplantation in order to avoid end-organ disease.^{3,13,15-21} In our hospital, preemptive strategy for CMV was introduced in 1993 using antigenemia (Ag) from 4th to 12th weeks post-solid organ transplantation and whenever under clinical suspicion. Based on this, the cumulative incidence of CMV disease (CMVD) in the first 3 months among kidney recipients has ranged from 27-38%, and severe cases have not been frequent.^{3,13}

Nevertheless, sporadic patients spending more than 21 days of intravenous ganciclovir, cases with low cellularity on Ag showing signs/symptoms, and, sometimes, unusual clinical manifestations for patients being surveyed preemptively (as severe bone marrow suppression or central nervous systems involvement) can be seen. These observations brought the hypothesis than other viral agent could be implicated, as HHV-6, which has also a known immunomodulatory potential.^{1,5,7,18,22,23}

HHV-6, as other Herpesvirus, can remain latent into host's cells and reactivate as soon as the immunosuppression starts. Usual sites for latency after primary infection include salivary glands, lymph nodes, mononuclear cells, and liver and renal parenchyma.⁶ Clinically, HHV-6 causes a mononucleosis-like syndrome, lymphadenopathy, hepatitis, bone marrow suppression, interstitial pneumonitis and severe focal encephalitis, well-reported in liver transplant recipients.^{4,7,8}

Concerning that epidemiology and clinical role of the latent and early-active HHV-6 infection after kidney transplantation are not clear, we designed this study. The purpose was to determine HHV-6 seroprevalence in donor-recipient pairs, the incidence of early viral replication after kidney transplant, its clinical repercussion, interaction with CMV and association with morbidity during the first year after transplantation.

Patients and Methods

This was a cohort study which included all the adult kidney transplants performed between April and September/2002 in a tertiary hospital, national reference for transplants (N=46).

There were analyzed donor's and recipient's serology, collected before transplantation, for latent infection determination. HHV-6 active infection was described as viral load (VL) measured by real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR-HHV6) in peripheral blood collected between 1st and 6th weeks and frozen -80⁰C.

Patients were surveyed preemptively, as routine, with serial CMV-Ag from 4th to 12th weeks post-transplantation. Intravenous Ganciclovir was used prophylactically during 14 days in CMV-IgG negative recipients (n=3). CMV active infection was defined as CMV-Ag+, and CMVD was an increasing of number of +cells on Ag combined with signs/symptoms. Treatment was also performed using intravenous Ganciclovir for 14 days or more, until Ag became negative.

Donor and recipient's demographic data (age and gender) and transplant characters (donor source, isolated kidney/ simultaneous pancreas-kidney, cold ischemia time, initial immunosuppression, induction therapy and delayed graft function) were analyzed. Delayed graft function was defined as the necessity for dialysis in the first week post-transplantation.

Clinical and laboratorial signs studied that could be associated with HHV-6 included: total leukocytes and lymphocytes (1st-6th weeks), liver enzymes (aspartate- and piruvate-amminotransferase, 1st-12th weeks). Serum creatinine levels were evaluated as a graft function marker (1st-12th weeks, monthly until 6th month and annually until 4th year). Morbidity in the first year was evaluated by: biopsy-proven acute graft rejection, development of other infections (non-HHV-6 and non-CMV), hospital admission (number and lasting), and graft loss and death. Information was taken from medical records.

Variables described above were compared, qualitative and quantitatively, as indicated, between patients who developed HHV-6 active infection (+qPCR-HHV6) and those who remained negative for this virus. In order to avoid a bias due to CMV infection, all comparisons were performed between positive and negative patients, as follow: a) HHV-6 active infection (qPCR-HHV6+), b) CMV active infection (CMV-Ag+) and c) active infection by both viruses (qPCR-HHV6 + CMV-Ag+) after transplantation, each one analyzed during its higher risk period.

For the study of HHV-6 latent and early replication effects upon CMV infection thereafter, there were analyzed the following associations: a) incidence of CMV active infection, b) incidence of CMVD and c) CMVD severity (highest Ag+ and days of Ganciclovir treatment).

This study was approved by the institutional ethics committee, and all patients assigned an informed consent to be included.

HHV-6 and CMV Serology

Immunoenzimatic test (ELISA) for specific IgG was performed in the sera of all donor-recipient pairs collected before the transplant, either for HHV-6 (Pambio, USA) and CMV (Roche, USA). Inconclusive results were repeated, and the ones remained undetermined were excluded from the analysis for this factor (inconclusive HHV6-IgG: n=4 donors).

CMV pp65 Antigenemia (CMV-Ag)

Antigenemia was performed in blood samples collected with EDTA by immunohistochemistry method after granulocyte isolation. A monoclonal antibody (C10/C11) directed against pp65 CMV matrix protein was applied (APAAP- Biotest-

Germany). This test gives a quantitative result, indicating the number of positive cells which represent those with viral replication ($+cells/10^5$ granulocytes).

HHV-6 Quantitative Real Time PCR (qPCR-HHV6)

HHV-6 VL was determined by qPCR using DNA extracted (Invisorb, Spin Blood Mini kit, Invitex, Germany) from whole blood collected with EDTA. A commercial kit for HHV-6 (HHV-6 Q-PCR Alert AmpliMIX, Nanogen, Italy) was applied in a ABI Applied Biosystems 7300 equipment. This test is a multiplex reaction, including an internal control (human β -globin gene) being simultaneously amplified with the HHV-6 ORF13R region as target. This region is common for both variants of HHV-6 (A and B). The standard-curve has four known quantitative points of VL (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5), allowing a precise quantification of the initial sample VL. The limit for detection is 40 copies/reaction. The provided software for analysis shows the following results: a) negative, b) <2000 copies/ml and c) absolute number of copies when it is ≥ 2000 copies/ml. For the purposes of this study, the following formula was applied to determine absolute number of copies in positive samples showing $VL < 2000$ copies/ml: cN (initial copy number in the sample) = F_e (unit for VL description in the sample; 1ml) \times eE (extraction method equivalent efficiency; $1/1,0=1$) \times F_a (extracted and amplified DNA volume ratio; $200\mu l/5\mu l=40$) \times number of copies (VL obtained in the reaction).

Statistical Analysis

Variables were described as percentage, mean and standard deviation (SD) or median. Chi-square with Yates correction or Fisher's exact and Student's t test or Mann-Whitney were applied, as indicated, using *Statistical Package for Social*

Sciences (SPSS 14.0). $P \leq 0.05$ was considered significant, being described the respective relative risk (RR) and 95% confidence interval (95% CI).

Results

Pre-transplant HHV-6 and/or CMV latent infection

Prevalence of HHV-6 latent infection was significantly higher among recipients than donors (Recipients: 82.6% [38/46] x Donors: 54.8% [23/42], respectively; $P=0.005$; $RR=3.9[1.4-10.4]$). CMV-IgG seroprevalence was similar between them at the time of transplantation (Recipients: 93.5% [43/46] x Donors: 84.8% [39/46]; $P=0.315$).

Post-transplant HHV-6 and/or CMV active infection

HHV-6 active infection occurred in 26.1% (12/46) of the recipients during the first six weeks of transplantation. Primary infection was seen in 37.5% (3/8) of the HHV-6-IgG negative, and reactivation and/or reinfection in 23.7% (9/38) of the IgG+ patients ($P=0.412$). Median VL was 125 copies/ml (53-11.264), mostly showing <2000 copies/ml (83.3% [10/12]). HHV-6 latent infection did not change significantly the incidence of: a) HHV-6 active infection (IgG+: 23,7% [9/38] x IgG-: 37,5% [3/8]; $P=0,412$); b) CMV active infection (HHV-6 IgG+: 76.0% [29/38] x IgG-: 75.0% [6/8]; $P=0.999$) and c) CMVD (HHV-6 IgG+: 42.0% [16/38] x IgG-: 50.0% [4/8]; $P=0.713$).

There was also no association between early active replication of HHV-6 and later CMV-Ag+ (qPCR+: 66.7% [8/12] x qPCR-: 79.0% [27/34]; $P=0.441$) or CMVD (qPCR+: 50.0% [6/12] x qPCR-: 41.2% [14/34]; $P=0.596$). Highest CMV-Ag+ was

also not associated with HHV-6 active infection, neither among patients who developed CMVD (qPCR+: 93[6-600] x qPCR-: 53[15-740]+cells; P=0.857) nor among who did not (qPCR+: 7[3-11] x qPCR-: 5[2-12]+cells; P=0.387). The mean duration time of Ganciclovir treatment for CMVD was similar between patients who previously had + or - qPCR-HHV6 respectively (18.2±3.8 x 15.5±3.0 days; P=0.124).

CMV viremia occurred in 76.1% (35/46) of the recipients. All 3 patients transplanted with CMV-IgG negative needed additional Ganciclovir treatment, despite the intravenous prophylaxis performed during the first 14 days post-transplantation with the same drug. Among CMV-IgG+ patients, 74.4% (32/43) developed Ag+ (IgG-:100.0% x IgG+:74.4%; P=0.999). CMVD occurred in 43.5% (20/46), being 100.0% among who had primary infection and 39.5% among those who reactivated and/or had reinfection after transplantation (IgG-:3/3 x IgG+: 17/43; P=0.075). Median highest Ag+ was 21 +cells (2-740), being 65+cells (6-740) and 5+cells (2-12) among patients with or without CMVD, respectively (P=0.001).

Active infection by both viruses occurred in 17.4% (8/46) of the recipients during the first 3 months. Additional 58.7% (n=27) of the sample had only CMV-Ag+, 15.2% (n=7) became always negative for both, and 8.7% (n=4) had only qPCR-HHV6+.

Figure 1 shows the time of the first evidence of viral replication during the first 12 weeks of kidney transplantation, according to the protocol used in this study. The majority of them were observed in the first 4 weeks of risk-period considered for each virus: HHV-6 until 4th week (9/12; 75.0%) and CMV from 4th to 8th weeks (33/35; 94.2%).

Associated factors with active viral replication after transplantation

Table 1 presents the general transplant characteristics and their association with active infection by HHV-6, CMV or both after kidney transplant. Mean age was similar between positive or negative qPCR-HHV6 after transplantation (qPCR+: 32.7 ± 13.9 x qPCR-: 39.1 ± 13.7 ; $P=0.178$), and also between double positive HHV-6+CMV along the first weeks than the others (+: 38.4 ± 13.6 x -: 37.2 ± 14.2 ; $P=0.836$). CMV-Ag positivity occurred more frequently among older patients at the time of transplantation (Ag+: 40.4 ± 13.7 x Ag-: 28.0 ± 10.0 ; $P=0.008$). Gender (male 23/46, 50.0%) and cold ischemia time (21.5 ± 6.9 hours[12.2-36.0]) were not different between patients + or – for HHV-6, CMV or both infections (data not shown). Donor source, kidney or simultaneous pancreas-kidney transplant, induction therapy and delayed graft function were not associated with HHV-6, CMV or both viral replications during the follow-up.

The distribution of different combination of drugs for initial immunosuppression was not different between patients with or without active infection by HHV-6, CMV or both. However, mofetil mycophenolate (MMF) seemed to be more frequently associated with the CMV replication thereafter ($P=0.032$; $RR=2.5[0.9-6.7]$).

Clinical outcomes related to the post-transplant active infections by HHV-6, CMV or both

Laboratory parameters analyzed in this study were not associated with HHV-6 infection, neither qPCR-HHV6+ nor HHV-6+CMV. Patients who had CMV-Ag+ showed higher serum creatinine at the following moments compared to those who remained negative for this virus: 6th (1.9 ± 0.8 x 1.3 ± 0.4 ; $P=0.038$), 7th (1.7 ± 0.6 x

1.3±0.4; P=0.037), 10th (1.5±0.5 x 1.2±0.3; P=0.034) and 12th (1.6±0.5 x 1.2±0.3; P=0.018) weeks post-transplantation.

Table 2 describes first year post-kidney transplant clinical outcomes, presenting cumulative incidences and their distributions according to the early viruses' infection: HHV-6, CMV or both, respectively.

qPCR-HHV6+ was associated with higher incidence of other infections in the first year after transplantation (qPCR+: 100% x qPCR-: 67.6%; P=0.044; RR=1.5[1.1-1.9]), mainly caused by: bacteria (qPCR+: 100% x qPCR-: 58.8%; P=0.009; RR=1.6[1.2-2.0]) and fungi (qPCR+: 66.7% x qPCR-: 11.8%; P=0.001; RR=5.6[2.0-15.3]). Even though there was no case of deep mycosis, the only two cases who achieved HHV-6 VL_≥2000 copies/ml showed fungi diseases and both had severe bacterial infections.

CMV viremia was associated with higher incidence of viral infections (non-HHV-6 and non-CMV) (P=0.000, RR=2.7[1.2-6.0]). These other viral infections were not dependent on the MMF initial immunosuppression (MMF: 92.6% [25/27] x no MMF: 57.9% [14/19]; P=0.107). In this series, viral infections (non-HHV6 and non-CMV) were diagnosed based on clinical and laboratory findings, including: human papillomavirus, simplex herpesvirus (types 1 and 2), varicella-zoster virus (both clinical presentations), upper respiratory viral infections, verruca vulgaris, molluscum contagiosum and meningitis. Bacterial clinical syndromes observed along the follow-up included: piodermatitis, wound infection, arteriovenous fistulae infection, cystitis, prostatitis, graft's acute pyelonephritis, perirenal abscess, sinusitis, bronchopneumonia, spontaneous bacterial peritonitis and sepsis. The infections caused by fungi were, respectively: genital candidiasis, tinea cruris, dermatophytosis and onicomycosis.

The single case of viral meningitis had no etiological definition and occurred in a diabetic recipient of simultaneous pancreas-kidney transplant. This patient had received daclizumab induction therapy and combined immunosuppression with sirolimus, tacrolimus and MMF. She developed CMVD and many bacterial infections, some of them highly severe, but never showed early qPCR-HHV6+ in the follow-up screening.

Length of hospital after transplant surgery was similar for patients who developed or not HHV-6 and/or CMV replication thereafter. On the other hand, patients who had qPCR-HHV6+ during the first 6 weeks after transplantation needed a higher number of hospitalizations and a longer stay in the hospital in 6 and 12 months post-transplantation. These outcomes were not associated with CMV viremia. The results can be seen in Table 2.

Besides qPCR-HHV6+, viral ($P=0.001$) and fungal infections ($P=0.002$) were associated with higher number of hospitalizations in the first year. Initial immunosuppression including prednisone protected against this (with prednisone: 2.9 ± 1.4 x without: 5.5 ± 0.7 ; $P=0.023$). No single drug could be associated with hospitalizations (number and duration). However, different infectious agents were associated with hospital length at 6 or 12 months, respectively: Bacterial: $P=0.058$ and $P=0.022$; Viral: $P=0.001$ and $P=0.001$; Fungal: $P=0.004$ and $P=0.011$. CMVD was an independent risk factor for bacterial and viral infection in a binary analysis (Bacterial: $RR=1.9[1.2-2.8]$; $P=0.001$ and Viral: $RR=1.3[1.0-1.7]$; $P=0.014$, respectively).

Graft loss and death were not associated with the studied viral infections (HHV-6, CMV or both). In this series, patients returned to dialysis ($n=6$; 13.0%) only after the fourth year of transplantation, all due to transplant chronic nephropathy.

Among the other 6 (13.0%) patients who died during the study, 3 (50.0%) were during the first year: 1 had sepsis due to spontaneous bacterial peritonitis, other had a cardiac arrest and another one died by external cause (trauma) with stable graft function.

Discussion

In the last decade, there was a wide increasing of the interest for HHV-6, mainly as an emergent or co-pathogen in complex diseases. It is possible that the higher immunological risk transplants that have being performed using numerous new immunosuppressant agents could contribute to the emergency of new pathogen potentially dangerous to the graft or host.^{1,5,7,18,23} HHV-6 can be one of them and can compromise transplant's clinical outcome. This virus has being especially studied among liver and hematopoietic stem cell recipients. Its role in kidney transplant is no clear so far.

Our healthy population represented by organ donors showed a marginal low incidence of latent infection by this virus compared to North American reports (55% x 59-100%).^{4,5,9,15,18} It was significantly lower than the rate observed among kidney transplant recipients immediately before engraftment, which could be explained by the relative immunosuppression conferred by chronic renal disease and hemodialysis.^{1,5} Nevertheless, the prevalence of HHV-6 latent infection before kidney transplantation is similar to that described for kidney and liver recipients in other centers.²² Important is the observation that HHV-6 serology before transplantation was not as helpful as CMV-IgG determination for predicting viral active infection thereafter, as suggested by others, needing confirmation with a higher number of subjects.^{1,3,5,7,18}

The incidence of HHV-6 active infection in present study was also relatively lower (26%) than that observed in other solid organ transplant centers (31-50%).^{1,5,7,4}^{8,10} Nevertheless, the technical methodology applied and social and economic factors have no longer been considered in these analysis. The time for diagnosis could be another difference. Strategically, we investigated HHV-6 active replication between the 1st and 6th weeks post-transplantation because this is the major risk period for that. According to some authors, this is the time when the majority of primary infections are seen, usually developing severe disease with involvement of end-organs. This is also the risk period for secondary disease by this virus, appearing generally from the second to sixth weeks post-transplantation, which was exactly what was seen in this study.^{1,2, 11, 17,18}

No clinical or transplant-related factor seems to be clearly associated with early HHV-6 replication. However, as it was expected, prophylaxis or treatment with anti-CD3 has already been described as an independent risk factor.^{12,23}

The clinical importance of HHV-6 is well known among liver recipients, mainly because the major signs/symptoms related to this infection are also the traditional presentation of graft dysfunction, imposing specific differential diagnosis. Besides hepatitis and liver graft loss, HHV-6 can cause meningoencephalitis due to its peculiar neuroinvasiveness potential and predisposition for opportunist infections.^{1,17,20,22, 9,24} Although acute onset of neurological symptoms is not common early after kidney transplant, HHV-6 might be an important differential diagnosis whenever a meningoencephalitis occurs after transplantation.^{1,4,5,11,18}

Many authors have explored the indirect effects of the HHV-6, mainly simultaneously with CMV infection, with contradictory results. Some of them described higher severity patterns of the viral disease, while others did not find it.

^{14,15,16,24,25} Recently, Humar et al showed that co-infection with HHV-6 can impair results of the CMVD treatment with ganciclovir or valganciclovir, being associated with frequent recurrence of replication.²³

In order to clarify if early HHV-6 infection could impair CMV active replication between 4 and 12 weeks post-kidney transplant, the present study showed that it did not increase the incidence of CMV infection nor its severity. Besides the sample size, the apparent low clinical impact of the early HHV-6 replication among the studied population could result from the strict preemptive strategy on CMV monitoring and treatment. It is probable that diagnosing or treating CMV infection only in symptomatic patients, could better reveal a negative interaction of these viruses.³ It is supported by reports showing some degree of HHV-6 response to ganciclovir, even though no specific anti-HHV-6 treatment is available until now.^{24,25}

In the present study, every HHV-6 VL was considered significant, and it was associated with higher incidence of bacterial and fungal infections besides a higher number of admission and hospital length during the first 6 and 12 months post-transplantation. It was not clear if these infections were cause or consequence of the longer hospitalizations. Clarifying this association is extremely valuable because, at least in liver transplantation, fungal infections have been major cause of morbidity and mortality related to the HHV-6 infection.^{1,17,22} Even though there was no case of severe fungal infection among the studied kidney recipients justifying more necessity for hospitalization, toxicity of antifungal drugs and/or their pharmacological interaction with immunosuppressive drugs might be considered. Some drugs were also associated with other infections. Interesting was the paradoxical effect of MMF, apparently increasing risk for CMV and decreasing for fungal infection. The

independence of all these factors can only be checked by a multivariate analysis including a higher number of subjects.

In addition to the low immunological risk of the selected sample (adults receiving a first graft) and its small size, maybe the major limitation of the present study is the use of two different methodologies to evaluate HHV-6 and CMV, respectively. Both, Ag and qPCR, are well recognized for this purposes, but measure different aspects of the same condition – the viral replication.^{1,23,26-28} The way to attenuate this bias was applying a qualitative analysis, but it still could compromise the analysis of association between two viral infections.

Clinical valorization of low rates of viral activity has been a general difficulty, mainly when the aim is to avoid signs/symptoms. Concerning the Ag, we previously determined that >10+cells is risk for CMVD, suggesting the necessity for treatment.¹³ This cut-off analyzed by qPCR corresponds to >7000 copies/ml of whole blood, quite similar to that which has been practiced by other centers worldwide. It is important to note that sometimes, at least for CMV, VL up to 3000 copies/ml can not be detected by Ag test.⁹ Then, it would be reasonable to consider that such a low HHV-6 VLs found in this study (indicating low viral replication rate) could explain the benign presentation of the registered events. However, until now there is no study defining clinically the HHV-6 VL level which could differentiate latency from active viral replication.²⁹ Corroborating the presented results, an important study recently published by Humar et al describes 31% of HHV-6 active infection among 253 patients under CMVD treatment. They found a median highest VL of 281 copies/ml of whole blood, being seldom as high as 100.000 copies/ml.^{12,23}

Finally, this paper showed that early HHV-6 replication after kidney transplant seems to be weakly significant, even though it is associated with more

bacterial and fungal infections, more hospital admissions and length of hospitalization. These evidences suggest that HHV-6 is not an innocuous virus, and probably it figures as a marker for excessive immunosuppression.^{4,15,16,24} Nevertheless, there is no reason for systematic follow-up of this viruses, at least in patients whose are under preemptive monitoring for CMV. Until now, there is no evidence for HHV-6 worsening CMV outcomes in the highest risk period concerning its incidence and maximum Ag achieved, even though its role interfering with DCMV resolution under ganciclovir treatment should be confirmed in a more powerful study. HHV-6 was not associated with graft dysfunction or graft loss/death in the first year after kidney transplant.

Conclusion

HHV-6 latent infection is highly prevalent (>80%), being commoner among kidney transplant candidates than healthy donors. The incidence of early active infection after transplantation is 26%. Despite it does not impair CMV prognosis, it is associated with more bacterial and fungal infections and length hospitalization in the first 6 and 12 months.

References

1. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E: Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(1):217-45.
2. Zerr DM, Meier AS, Selke SS ET al. A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *N. Engl J. Med.* 2005;342:768.
3. Schroeder R, Michelon T, Fagundes I, ET al: Cytomegalovirus Disease Latent and active infection rates during the first trimester after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2004;36:896–898.
4. Singh N, Peterson D: Encephalitis Caused By Human Herpesvirus-6 In Transplant recipients. *Transplantation* 2000;69:2474-2479.
5. Brennan DC. Highlights From The Sixth Annual Ast Winter Symposium — Transplantation meets infection: Microbes, rejection, atherosclerosis, and malignancy. *Medscape Transplantation*; 2002;3(1):1-14- www.medscape.com (31/01/2003).
6. Tiansheng C, hudnall D: Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection. *Modern Pathology.* 2006;19:726-737.
7. Lusso P: Human herpesvirus 6 (HHV-6). *Antiviral Research* 1996;31:1-21.
8. Schmidt AC, Wilborn F, Weiss K, ET al: A Prospective Study Of Human herpesvirus type 6 detected by polymerase chain reaction after liver transplantation. *Transplantation* 1995;61:662.
9. Benito N, Moreno A, Pumarola M ET, al. Virus Del herpes humano tipo 6 y tipo 7 em receptores de transplante. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(8):424-32.
10. Rogers J, Rohal S, Carrigan D, ET al. Human Herpesvirus-6 In Liver Transplant recipients. *Transplantation* 2000;6:2566-73.
11. Ratnamohan V, Chapman J, Howse H: Cytomegalovirus and human herpesvirus 6

both cause viral disease after renal transplantation. *Transplantation* 1998;66:877-82.

12.Desjardin JA, Cho E, Supran S, ET al: Association Of Human Herpesvirus 6 Reactivation With severe cytomegalovirus-associated disease in orthotopic liver transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2001;33(8):1358-62.

13.Schroeder R, Michelon T, Fagundes I, ET al: Antigenemia for Cytomegalovirus in Renal Transplantation: Choosing a Cutoff For the Diagnosis Criteria in Cytomegalovirus Disease. *Transplant Proc*. 2005;37:2781–2783.

14.Lautenschlager I, Linnavuori K, Höckerstedt K: Human herpesvirus-6 antigenemia after liver transplantation. *Transplantation* 2000;69:2561-66.

15.Reddy S, Manna P: Quantitative detection and differentiation of human herpesvirus 6 subtypes in bone marrow transplant patients by using a single real-time polymerase chain reaction assay. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(7):530-41.

16.Visser AM, Van Doornum GJ, Coernelissen JJ, ET al: Severe amnesia due to HHV-6 Encephalitis after allogenic stem cell transplantation. *Eur Neurol*. 2005;54(4): 233-4.

17.Boutolleau D, Duros C, Bonnafous P, ET al: Identification Of Human Herpesvirus 6 Variants A and B by primer-specific real-time PCR may help to revisit their respective role in pathology. *J Clin Virol*. 2006;35(3):257-63.

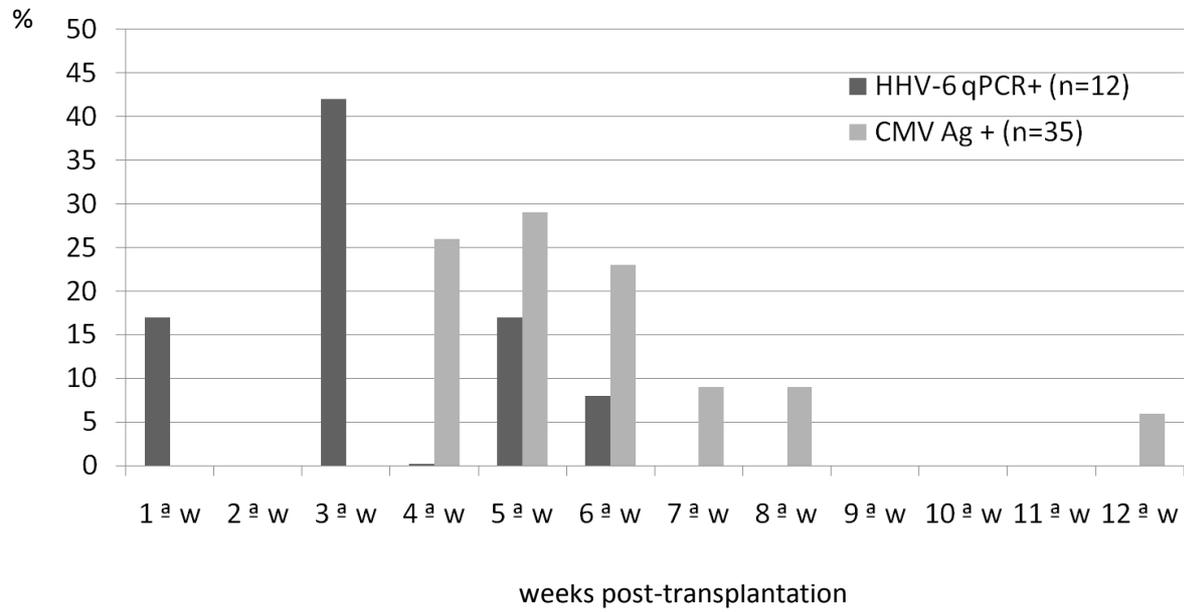
18.Komaroff Al, Jacobson S, et al: Highlights From 5th International Conference On HHV-6 and -7. *Herpes* 2006;13(3):81-2.

19.Deborska-Materkowska D, Lewandowski Z, Sadowska A, ET al: Fever, human herpesvirus 6 (HHV-6) seroconversion, and acute rejection episodes as a function of the initial seroprevalence for HHV-6 in renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 2006;38:139-143.

20. Lautenschlager I, Harma M, Hockerstedt K, ET al: Human Herpesvirus-6 Infection Is Associated with adhesion molecule induction and lymphocyte infiltration in liver allografts. *J Hepatol.* 2002;37(5):648-54.
21. Mendez JC, Dockrell DH, Espy MJ, ET al: Human Beta-Herpesvirus Interactions In Solid organ transplant recipients. *J Infect Dis.* 2001;183(2):179-184.
22. Ohashi M, Sugata K, Ihira M, ET al: Human Herpesvirus 6 Infection In Adult Living related liver transplant recipients. *Liver transplantation* 2008;14:100-109.
23. Humar A, Asberg A, Kumar D, ET al. An assessment of herpesvirus co-infection in patients with CMV disease: Correlation with clinical and virologic outcomes. *Am Jou of Transplantation.* 2009;9:374-381.
24. Desjardin JA, Gibbons L, Cho E, ET al. Human herpesvirus 6 reactivation is associated with cytomegalovirus and syndromes in kidney transplant recipients at risk for primary cytomegalovirus infection. *J Infect Dis.* 1998,178:1783.
25. Pacsa AS; Essa S; Voevodin A; ET al. Correlation between CMV genotypes, multiple infections with herpesviruses (HHV-6,7) and development of CMV disease in kidney recipients in Kuwait. *FEMS Immunol and Med Microbiol* 2003;35:125-130.
26. Yang S, Rothman RE. PCR-Based Diagnostics For Infectious Diseases: Uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis.* 2004;4:337-48.
27. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, ET al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:165-256.
28. Gunson RN, Collins TC, Carman WF. Practical Experience Of High Throughput real-time PCR in the routine diagnostic virology setting. *J Clin Virol.* 2006;35:355-67.

29. Schroeder R, Michelon T, Adamy R et al. Infecção por citomegalovírus no pós-transplante: comparação das técnicas de antigenemia pp65 por imunofluorescência e real time PCR. Anais do Congresso Brasileiro de Transplantes de órgãos. Recife 2009.

Figure 1: First evidence of HHV-6 and CMV active replication during the first 6 weeks and from 4th to 12th week post-kidney transplantation, respectively.



HHV-6 (1st-6th week): 75.0% up to the 4th week (9/12)

CMV (4th-12th week): 94.2% up to the 8th week (33/35)

Table 1. Transplant demographic data and their association with active infection caused by HHV-6, CMV or both after kidney transplantation.

| Transplant demographics | Total N=46 n (%) | HHV-6* | | | CMV** | | | +HHV-6 → +CMV*** | | |
|---|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|--------------------------|--------------------------|-------|--------------------|--------------------|-------|
| | | Positive (n=12) n (%) | Negative (n=34) n (%) | P | Positive (n=35) n (%) | Negative (n=11) n (%) | P | Yes (n=8) n (%) | No (n=38) n (%) | P |
| Deceased Donor | 27 (58.7%) | 5 (41.7) | 14 (41.2) | 0.976 | 13 (37.1) | 6 (54.5) | 0.307 | 3 (37.5) | 16 (42.1) | 0.999 |
| Simultaneous Pancreas-Kidney transplantation | 3 (6.5%) | 2 (16.7) | 1 (2.9) | 0.162 | 1 (2.8) | 2 (18.2) | 0.138 | 1 (12.5) | 2 (5.3) | 0.444 |
| Induction therapy | 18 (39.1%) | 5 (41.7) | 13 (38.2) | 0.834 | 14 (40.0) | 4 (36.4) | 0.999 | 3 (37.5) | 15 (39.5) | 0.999 |
| Initial immunosuppression[#] | | | | 0.282 | | | 0.083 | | | 0.937 |
| CyA-MMF-Pred | 26 (56.5) | 5 (41.7) | 21 (61.8) | | 23 (65.7) | 3 (27.3) | | 4 (50.0) | 22 (57.8) | |
| CyA-Aza-Pred | 14 (30.4) | 4 (33.3) | 10 (29.4) | | 9 (25.7) | 5 (45.4) | | 3 (37.5) | 11 (28.9) | |
| Rapa-FK-Pred | 4 (8.7) | 2 (16.7) | 2 (5.9) | | 2 (5.7) | 2 (18.2) | | 1 (12.5) | 3 (7.9) | |
| CyA-Aza | 1 (2.2) | 1 (8.3) | 0 | | 1 (2.9) | 1 (9.0) | | 0 | 1 (2.7) | |
| MMF-FK | 1 (2.2) | 0 | 1 (2.9) | | 1 (2.9) | 0 | | 0 | 1 (2.7) | |

| | | | | | | | | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|-------|-----------|----------|--------------------|----------|-----------|-------|
| Drugs: | | | | | | | | | | |
| MMF | 27 (58.7) | 5 (41.7) | 22 (64.7) | 0.163 | 24 (68.6) | 3 (27.3) | 0.032 ^α | 4 (50.0) | 23 (60.5) | 0.700 |
| Aza | 15 (32.6) | 5 (41.7) | 10 (29.4) | 0.436 | 9 (25.7) | 6 (54.5) | 0.075 | 3 (37.5) | 12 (31.5) | 0.999 |
| CyA | 5 (10.9) | 10 (83.3) | 31 (91.2) | 0.594 | 32 (91.4) | 9 (81.8) | 0.580 | 7 (87.5) | 34 (89.5) | 0.999 |
| FK | 5 (10.9) | 2 (16.7) | 3 (8.8) | 0.594 | 3 (8.6) | 2 (18.2) | 0.580 | 1 (12.5) | 4 (10.5) | 0.999 |
| Sirolimus | 5 (10.9) | 2 (16.7) | 3 (8.8) | 0.594 | 2 (5.7) | 3 (27.2) | 0.080 | 1 (12.5) | 4 (10.5) | 0.999 |
| Delayed graft function[#] | 22 (47.8) | 5 (41.7) | 17 (50.0) | 0.619 | 17 (37.7) | 5 (45.4) | 0.857 | 3 (37.5) | 19 (50.0) | 0.702 |

* Comparison between patients with and without HHV-6 active infection (qPCR-HHV6) from 1st to 6th weeks after transplantation

** Comparison between patients with and without CMV active infection (CMV-Ag) from 4th to 12th weeks post-transplantation

*** Comparison between patients who had both viral active infections after transplantation (HHV-6 and CMV)

#CyA: cyclosporine; MMF: mofetil micofenolate; Pred: prednisone; Rapa: sirolimus; FK: tacrolimus; AZA: azatioprina

Necessity for dialysis in the first week after transplantation

α: RR=2.5 (0.9-6.7)

Table 2: First year clinical outcomes according to occurrence of post-transplant viral active infection: HHV-6, CMV or both.

| First year clinical outcomes | Total N=46 n (%) | qPCR-HHV6 | | | CMV-Ag | | | +HHV-6 → +CMV *** | | |
|--|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | Positive (n=12) n (%) | Negative (n=34) n (%) | P | Positive (n=35) n (%) | Negative (n=11) n (%) | P | yes (n=8) n (%) | No (n=38) n (%) | P |
| Acute rejection | 26 (56.5) | 9 (75.0) | 17 (50.0) | 0.183 | 17 (48.6) | 9 (81.8) | 0.082 | 5 (62.5) | 21 (55.3) | 0.999 |
| Other infections: | | | | | | | | | | |
| General | 33 (71.7) | 12 (100.0) | 23 (67.6) | 0.044 ^δ | 25 (71.4) | 8 (72.7) | 0.999 | 6 (75.0) | 27 (71.0) | 0.999 |
| Bacterial | 32 (69.5) | 12 (100.0) | 20 (58.8) | 0.009 ^ε | 23 (65.7) | 9 (81.8) | 0.460 | 8 (100.0) | 24 (63.1) | 0.085 |
| Viral | 39 (84.8) | 11 (91.7) | 28 (82.3) | 0.657 | 35 (100.0) | 4 (36.4) | 0.001 ^α | 8 (100.0) | 31 (81.5) | 0.325 |
| Fungal | 12 (26.1) | 8 (66.7) | 4 (11.8) | 0.001 ^β | 10 (2.8) | 2 (18.2) | 0.701 | 6 (75.0) | 6 (15.8) | 0.002 ^γ |
| Hospital admissions (median, minimum-maximum): | | | | | | | | | | |
| N⁰ in the 1st year | 3.0 (1-6) | 4.0 (2-6) | 2.5 (1-6) | 0.001 | 3.0 (1-6) | 2.0 (1-5) | 0.103 | 4.5 (3-6) | 3.0 (1-6) | 0.001 |
| Surgical admission (days)* | 20.0 (7-69) | 19.5 (14-69) | 20.5 (7-57) | 0.688 | 20.0 (7-69) | 20.0 (14-57) | 0.897 | 18.0 (14-69) | 21.0 (7-57) | 0.459 |
| 1st 6 months (days) | 33.5 (14-108) | 40.0 (25-108) | 29.5 (14-104) | 0.033 | 40.0 (15-108) | 25.0 (14-99) | 0.094 | 50.5 (25-108) | 31.5 (14-104) | 0.049 |

| | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|---------------|---------------|---------------|-------|---------------|--------------|-------|---------------|---------------|-------|
| 1st year (days) | 42.5 (14-156) | 80.0 (33-120) | 29.5 (14-156) | 0.001 | 45.0 (15-156) | 25.0 (14-99) | 0.226 | 85.0 (40-120) | 31.5 (14-156) | 0.002 |
| Graft loss # | 12 (26.1) | 3 (25.0) | 9 (26.5) | 0.999 | 10 (28.6) | 11 (18.2) | 0.701 | 1 (12.5) | 11 (28.9) | 0.660 |
| Death# | 6 (13.0) | 4 (11.8) | 2 (16.7) | 0.644 | 5 (14.3) | 1 (9.0) | 0.999 | 1 (12.5) | 5 (13.1) | 0.999 |

CMV-Ag: CMV antigenemia from 4th to 12th weeks post-transplantation. Positive CMV-Ag = active infection

qPCR-HHV6: quantitative real time PCR for HHV-6. Positive qPCR-HHV6 = active infection

*Hospitalization for transplantation

Outcome analyzed until 2009

Relative Risk (RR); confidence interval 95% (CI95%)

α : RR=2.7 (1.2-6.0)

β : RR=5.6 (2.0-15.3)

γ : RR=4.7 (2.1-10.9)

δ : RR=1.5 (1.1-1.9)

ϵ : RR=1.6 (1.2-2.0)

5.2 EM PORTUGUÊS

Replicação Precoce de HHV-6 é causa de Morbidade não-relacionada à Infecção por CMV após o Transplante Renal

Regina Schroeder^{1,3}, Tatiana Michelon^{1,3}, Gabriela Garbin³, Janaina Silveira¹, Luciano Santos¹, Valter Garcia², Jorge Neumann¹ and E. Keitel^{2,3}

¹Programa de Pós Graduação em Patologia - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

²Laboratório de Imunologia de Transplantes; Serviço de Transplante Renal da Santa Casa de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Apoio: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Endereço de correspondência: Regina Barbosa Schröder, Laboratorio de Imunologia de Transplantes, Hospital Dom Vicente Scherer, Av Independencia 75, Porto Alegre, RS, CEP-94035-075, Brasil. e-mail: regina@santacasa.tche.br

Palavras Chave: transplante renal; citomegalovírus, herpesvírus humano tipo 6, infecção viral, diagnóstico, PCR em tempo real.

Resumo

Introdução: O Herpesvirus tipo 6 (HHV-6) tem sido associado a morbidade e mortalidade após o transplante de fígado, o que já é bem conhecido para o Citomegalovírus (CMV) após o transplante de diferentes órgãos e tecidos. A frequência e a importância da infecção latente e ativa pelo HHV-6 após o transplante renal ainda necessitam ser elucidadas.

Objetivo: Determinar a soroprevalência do HHV-6 nos pares doador-receptor antes do transplante e analisar a incidência da infecção ativa precoce, suas manifestações clínicas, sua interação com o CMV e a morbidade a ela relacionada ao longo do primeiro ano pós-transplante renal.

Pacientes e Métodos: Foram estudados 46 pares doador-receptor, os quais foram avaliados para a presença de IgG específica previamente à realização do transplante através de imunoenensaio enzimático (ELISA): HHV-6 (Pambio, USA) e CMV (Roche, USA). Uma alíquota de sangue total criopreservada, colhida semanalmente (1^a até a 6^a semana), foi retrospectivamente analisada para a determinação da carga viral (CV) de HHV-6 através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR; Nanogen, Itália). Os pacientes foram acompanhados preemptivamente para CMV através de antigenemia pp65 (Ag; APAAP imunistoquímica, Biotest, Alemanha) entre a 4^a e a 12^a semanas pós-transplante. Infecção ativa foi definida como qPCR-HHV6+ (CV/ml) e Ag+ (células+/10⁵ granulócitos), para HHV-6 e CMV, respectivamente. Definiu-se doença por CMV (DCMV) como a presença de Ag+ na vigência de sinais e/ou sintomas sugestivos. Considerando-se os pacientes qPCR-HHV6+, foram avaliados: fatores associados, manifestações clínicas, interação com CMV e morbidade no primeiro ano. O programa *Statistical Package for Social Sciences* foi empregado para os testes

de qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher, teste t de Student ou Mann-Whitney, conforme o caso. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos, sendo descritos os respectivos riscos relativos (RR) e intervalos de confiança 95% (IC95%).

Resultados: A soroprevalência pré-transplante do HHV-6 foi significativamente mais elevada entre os receptores comparada aos doadores de rim (82,6 x 54,8%; $P=0,005$ [3,9(1,4-10,4)]). Infecção ativa por esse vírus ocorreu em 26,1% (12/46), sem associação com a IgG pré-transplante ($P=0,412$). A mediana da CV foi 125 cópias/ml (53-11.264), e a mediana da Ag foi 21 células+ (2-740). Não houve associação entre a ocorrência de replicação ativa de HHV-6 e de CMV após o transplante ($P=0,441$), tampouco entre qPCR-HHV-6+ e o desenvolvimento de DCMV ($P=0,596$). A mediana da Ag+ máxima e o número de dias de tratamento com ganciclovir foi semelhante entre os pacientes qPCR-HHV6 + ou - ($P=0,206$ e $P=0,124$, respectivamente). qPCR-HHV6+ foi associado a maior incidência de infecções bacterianas ($P=0,009$) e fúngicas ($P=0,001$), além de maior número de internações hospitalares ($P=0,001$) e maior número de dias sob internação ao longo dos primeiros 6 e 12 meses pós-transplante renal ($P=0,033$ e $P=0,001$, respectivamente).

Conclusão: Infecção latente por HHV-6 é mais comum entre os receptores do que entre os doadores antes do transplante renal. Infecção ativa precoce por esse patógeno não aumentou a incidência e nem a gravidade da DCMV nos primeiros 3 meses pós-transplante. Contrariamente, a replicação precoce do HHV-6 foi associada à ocorrência posterior de infecções e a hospitalizações mais frequentes e mais prolongadas ao longo do primeiro ano pós-transplante renal.

Introdução

Infecções virais constituem importante causa de morbidade e de mortalidade após transplantes de órgãos e de tecidos. Além do agente etiológico propriamente dito, o risco de uma infecção viral depende da epidemiologia do patógeno e da imunidade do hospedeiro. Uma vez que a realização do transplante implica o uso de imunossuppressores para evitar a rejeição ao enxerto, o diagnóstico de uma infecção viral depende fundamentalmente da cinética da infecção e da suspeita clínica, frequentemente antes da manifestação de sinais e/ou sintomas específicos. Uma das famílias virais mais estudadas em receptores de transplantes é a família *Herpesviridae*. Esta família compreende oito vírus distintos, a maioria altamente prevalente na população em geral e com efeito imunomodulatório intrínseco.^{1,5}

O papel deletério do Citomegalovírus (CMV) em imunodeprimidos é muito bem determinado, sendo sistemática a pesquisa clínica de sua replicação ativa após a realização de um transplante.¹⁻¹⁰ Inicialmente, essa infecção foi associada a alta morbidade e mortalidade, o que motivou a prática atual de diagnóstico e de tratamento precoces em populações de risco. Atualmente, a morbidade e o custo relacionado ao tratamento antiviral específico são ainda preocupações importantes. Além disso, recorrências tardias de doença por CMV (DCMV), lento declínio da taxa de replicação viral ou mesmo resistência ao agente antiviral têm sido preocupantes para os clínicos envolvidos em transplantes.¹¹⁻¹⁵

A replicação do CMV é rotineiramente monitorizada após os transplantes de rim, simultâneo de rim e pâncreas, pulmão, fígado, coração e célula tronco hematopoética, em centros do mundo todo, com o objetivo de se evitar a ocorrência de doença em órgão-alvo.^{3,13,15,17,21,28,30} A Santa Casa introduziu a prática da estratégia preemptiva para diagnóstico e tratamento precoces de infecções por CMV

em 1993, através da realização da antigenemia (Ag) semanal, entre a 4^a e a 12^a semanas pós-transplante de órgãos sólidos e a qualquer tempo diante da suspeita clínica. A partir dessa estratégia, a incidência de DCMV nos primeiros 3 meses pós-transplante renal tem oscilado entre 27 e 38%, e casos graves não têm sido frequentes.^{3,13}

Todavia, ocasionalmente observam-se pacientes necessitando mais de 21 dias de tratamento com ganciclovir endovenoso, casos de receptores com baixa celularidade na antigenemia apresentando sinais/sintomas característicos e, algumas vezes, a observação de manifestações clínicas não usuais para pacientes sob acompanhamento preemptivo (como supressão medular grave ou envolvimento do sistema nervoso central). Tais observações levantam a hipótese de que outro agente viral possa estar implicado, tal como o HHV-6, um vírus reconhecido pelo seu potencial efeito imunomodulador.^{1,5,7,18,23}

O HHV-6, assim como os outros Herpesvirus, pode permanecer latente nas células do hospedeiro e reativar em momentos de imunossupressão. Os sítios usuais de latência após a infecção primária incluem glândulas salivares, linfonodos, células mononucleares e parênquima renal e hepático.⁶ Clinicamente, o HHV-6 causa uma síndrome mononucleose-*like*, com linfadenopatia, hepatite, supressão da medula óssea, pneumonite intersticial e encefalite focal grave, bem documentados em receptores de transplante hepático.^{4,7,8}

A escassez de informações sobre a epidemiologia e a importância clínica da infecção latente e da infecção ativa precoce por HHV-6 após o transplante renal motivou a realização do presente estudo. Nosso objetivo foi determinar a soroprevalência da infecção por HHV-6 no par doador-receptor e a incidência de replicação viral precoce após o transplante renal, analisar sua repercussão clínica, sua

interação com o CMV e sua associação com morbidade ao longo do primeiro ano pós-transplante.

Pacientes e Métodos

Realizou-se um estudo de coorte, incluindo todos os transplantes renais realizados em indivíduos adultos entre abril e setembro de 2002 em hospital terciário, referência nacional em transplantes (Santa Casa de Porto Alegre) (N=46).

A sorologia pré-transplante do par doador-receptor foi analisada para a determinação de infecção latente. A infecção ativa por HHV-6 foi descrita através da carga viral (CV) medida através da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR-HHV6) em amostras de sangue periférico colhida entre a 1^a e a 6^a semanas e congeladas a -80^oC.

Os pacientes foram acompanhados preemptivamente para a infecção por CMV através de Ag, conforme a rotina do serviço, entre a 4^a e a 12^a semanas pós-transplante. Ganciclovir endovenoso foi empregado profilaticamente durante os primeiros 14 dias nos receptores IgG anti-CMV negativos (n=3). Infecção ativa por CMV foi definida como a presença de Ag+ e DCMV como um aumento do número de células positivas na Ag acompanhado por sinais e/ou sintomas. O tratamento foi realizado com ganciclovir endovenoso por 14 dias ou mais, até a negatividade da Ag.

Foram analisados os dados demográficos dos doadores e dos receptores (idade e gênero) e as características do transplante (tipo de doador, rim isolado ou simultâneo de rim e pâncreas, tempo de isquemia fria [TIF], imunossupressão inicial, terapia de indução e disfunção inicial do enxerto. Disfunção inicial do enxerto foi definida como a necessidade de diálise na primeira semana pós-transplante renal.

Os sinais clínicos e laboratoriais estudados potencialmente relacionados à infecção por HHV-6 incluíram: leucócitos totais e linfócitos (1^a-6^a semanas), enzimas hepáticas (aspartato e piruvato-aminotransferases, 1^a-12^a semanas). A creatinina sérica foi avaliada como um marcador da função do enxerto (1^a-12^a semanas, mensalmente até o 6^o mês e anualmente até o 4^o ano pós-transplante). Morbidade ao longo do primeiro ano foi avaliada através de: rejeição aguda ao enxerto comprovada por biópsia, desenvolvimento de outras infecções (não-HHV-6 e não-CMV), internação hospitalar (número e dias de permanência), perda do enxerto e óbito. As informações foram obtidas através dos registros em prontuários médicos.

As variáveis acima foram comparadas qualitativa e quantitativamente, conforme indicado, entre os pacientes que desenvolveram infecção ativa por HHV-6 (qPCR-HHV6+) e aqueles que permaneceram com CV indetectável para esse vírus. A fim de evitar viés pela infecção por CMV, todas as comparações foram realizadas entre os pacientes positivos e negativos, conforme segue: a) infecção ativa por HHV-6 (qPCR-HHV6+), b) infecção ativa por CMV (CMV-Ag+) e c) infecção ativa por ambos os vírus (qPCR-HHV6 + CMV-Ag+) após o transplante, cada um analisado ao longo do período de maior risco para a sua replicação ativa.

Para a análise do efeito da infecção latente e ativa por HHV-6 sobre a infecção posterior por CMV foram estudadas as seguintes associações: a) incidência de infecção ativa por CMV, b) incidência de DCMV e c) gravidade da DCMV (Ag+ máxima e número de dias sob tratamento com ganciclovir endovenoso).

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética institucional, e todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido previamente à sua inclusão.

Sorologia para HHV-6 e CMV

A pesquisa de IgG anti-viral específica pré-formada foi realizada através de imunoensaio enzimático (ELISA) em alíquota de soro colhida do doador e do receptor antes da realização do transplante, tanto para o HHV-6 (Pambio, USA) como para o CMV (Roche, USA). Resultados inconclusivos foram repetidos e aqueles que permaneceram indeterminados foram excluídos da análise para este fator (IgG anti-HHV6 inconclusivo: n=4 doadores).

Antigenemia pp65 do CMV (CMV-Ag)

Antigenemia foi realizada em granulócitos isolados a partir de amostras de sangue periférico colhidas com anticoagulante EDTA, através da técnica de imunoistoquímica. Empregou-se um anticorpo monoclonal (C10/C11) dirigido contra a proteína pp65 da matriz viral (APAAP- Biotest, Alemanha). Este teste fornece um resultado quantitativo, indicando o número de células positivas, ou seja, com replicação viral ativa (número de células+/100.000 granulócitos).

PCR quantitativa em Tempo Real para HHV-6 (qPCR-HHV6)

A CV de HHV-6 foi determinada através de qPCR usando DNA extraído (Invisorb, Spin Blood Mini kit, Invitex, Alemanha) a partir de amostras de sangue total colhidas com EDTA. Empregou-se um kit comercial específico (HHV-6 Q-PCR Alert AmpliMIX, Nanogen, Italia) em equipamento ABI Applied Biosystems 7100. Este teste consiste de uma reação multiplex, incluindo a amplificação simultânea de um controle-interno (gene β -globina humano) e de uma região viral alvo, conhecida como ORF13R. Esta região é comum para ambas as variantes de HHV-6 conhecidas (A e B). A curva-padrão consiste de 4 pontos com CV conhecida (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5),

permitindo a precisa quantificação da CV presente na amostra inicial. O limite de detecção mínima do teste realizado é de 40 cópias/reacção. O software de análise disponibilizado pelo fabricante do kit fornece os seguintes resultados: a) negativo, b) <2000 cópias/ml e c) número absoluto de cópias com $CV \geq 2000$ cópias/ml. Para atender aos propósitos do estudo, a seguinte fórmula foi aplicada para o cálculo do número absoluto de cópias virais nas amostras consideradas positivas com $CV < 2000$ cópias/ml: cN (número de cópias na amostra inicial) = F_e (unidade para a descrição da CV na amostra; 1ml) x eE (eficiência equivalente do método de extração do ácido nucléico; 1/1,0=1) x F_a (razão entre o volume de DNA extraído da amostra e o volume de DNA utilizado na etapa de amplificação; $200\mu l/5\mu l=40$) x número de cópias (CV obtida na reacção).

Análise Estatística

As variáveis foram descritas como porcentagem, média e desvio-padrão (DP) ou mediana. Os testes qui-quadrado com correção de Yates ou exato de Fisher e teste t de Student ou Mann-Whitney foram empregados, quando indicado, calculados através do software *Statistical Package for Social Sciences (SPSS 14.0)*. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos, sendo descritos os respectivos riscos relativos (RR) e intervalos de confiança 95% (IC95%).

Resultados

Infecção Latente Pré-Transplante por HHV-6 e/ou CMV

A prevalência de infecção latente por HHV-6 antes da realização do transplante foi significativamente maior entre os receptores do que entre os doadores

(Receptores: 82,6% [38/46] x Doadores: 54,8% [23/42], respectivamente; $P=0,005$; $RR=3,9[1,4-10,4]$). A soroprevalência de IgG anti-CMV pré-formada foi semelhante entre eles (Receptores: 93,5% [43/46] x Doadores: 84,8% [39/46]; $P=0,315$).

Infecção Ativa por HHV-6 e/ou CMV Após o Transplante Renal

Infecção ativa por HHV-6 ocorreu em 26,1% (12/46) dos receptores ao longo das primeiras 6 semanas pós-transplante. Infecção primária foi observada em 37,5% (3/8) daqueles que eram IgG anti-HHV-6 negativos antes do transplante. Reativação e/ou reinfeção por esse vírus ocorreu em 23,7% (9/38) daqueles transplantados na vigência de IgG específica pré-formada ($P=0,412$). A mediana da CV foi 125 cópias/ml (53-11.264), com a maioria apresentando <2000 cópias/ml (83,3% [10/12]). A presença ou a ausência de infecção latente prévia por HHV-6 não modificou significativamente a incidência pós-transplante de: a) infecção ativa por HHV-6 (IgG+: 23,7% [9/38] x IgG-: 37,5% [3/8]; $P=0,412$); b) infecção ativa por CMV (HHV-6 IgG+: 76,0% [29/38] x IgG-: 75,0% [6/8]; $P=0,999$) e c) DCMV (HHV-6 IgG+: 42,0% [16/38] x IgG-: 50,0% [4/8]; $P=0,713$).

Não houve associação entre a replicação ativa precoce de HHV-6 e o desenvolvimento posterior de CMV-Ag+ (qPCR+: 66,7% [8/12] x qPCR-: 79,0% [27/34]; $P=0,441$) ou de DCMV (qPCR+: 50,0% [6/12] x qPCR-: 41,2% [14/34]; $P=0,596$). A infecção ativa por HHV-6 também não foi associada a resultados mais elevados de CMV-Ag+ máxima, nem entre os pacientes que desenvolveram DCMV (qPCR+: 93,5[6-600] x qPCR-: 53,5[15-740] células+; $P=0,857$) e nem entre aqueles que apenas positivaram o teste de Ag sem necessidade de tratamento preemptivo (qPCR+: 7,0[3-11] x qPCR-: 5,0[2-12] células+; $P=0,387$). A duração média do tratamento da DCMV com ganciclovir foi semelhante entre os pacientes com ou sem

evidência de replicação do HHV-6 no período de acompanhamento, respectivamente (qPCR-HHV6+: $18,2 \pm 3,8$ x qPCR-HHV6-: $15,5 \pm 3,0$ dias; $P=0,124$).

Viremia por CMV ocorreu em 76,1% (35/46) dos receptores. Os 3 pacientes que eram negativos para IgG anti-CMV antes do transplante necessitaram tratamento adicional com ganciclovir apesar da profilaxia endovenosa realizada nos primeiros 14 dias pós-transplante com o mesmo anti-viral. Entre os pacientes IgG anti-CMV positivos, 74,4% (32/43) desenvolveram Ag+ (IgG-:100,0% x IgG+:74,4%; $P=0,999$). DCMV ocorreu em 43,5% (20/46), sendo 100,0% entre aqueles que fizeram infecção primária e 39,5% entre os que reativaram ou sofreram reinfecção viral após o transplante (IgG-:3/3 x IgG+: 17/43; $P=0,075$). A mediana da Ag+ máxima foi 21 células+ (2-740), sendo 65,5 células+ (6-740) e 5,0 células+ (2-12) entre os pacientes com e sem DCMV, respectivamente ($P=0,001$).

Infecção ativa por ambos os vírus ocorreu em 17,4% (8/46) dos receptores ao longo dos primeiros 3 meses pós-transplante. Outros 58,7% ($n=27$) da amostra desenvolveram apenas CMV-Ag+, 15,2% ($n=7$) permaneceram sempre negativos para ambos os vírus pesquisados e 8,7% ($n=4$) apresentaram replicação ativa apenas do HHV-6.

A Figura 1 apresenta o momento da primeira evidência de replicação viral ativa ao longo das primeiras 12 semanas pós-transplante renal, conforme o protocolo empregado no presente estudo. A maioria dos pacientes apresentou positividade nas primeiras 4 semanas do período considerado de risco para cada um dos vírus pesquisados: HHV-6 até a 4^a semana (9/12; 75,0%) e CMV entre a 4^a e a 8^a semanas (33/35; 94,2%).

Fatores Associados à Replicação Viral Ativa após o Transplante Renal

A Tabela 1 apresenta as características gerais do transplante e sua associação à infecção ativa por HHV-6, por CMV e/ou por ambos após o transplante renal. A média de idade foi semelhante entre os receptores que desenvolveram qPCR-HHV6 positivo ou negativo no período avaliado (qPCR+: $32,7 \pm 13,9$ x qPCR-: $39,1 \pm 13,7$; $P=0,178$), e também entre aqueles que desenvolveram infecção ativa por HHV-6+CMV ou não (Ambos+: $38,4 \pm 13,6$ x Ambos-: $37,2 \pm 14,2$; $P=0,836$). A média de idade no momento da realização do transplante foi mais elevada entre aqueles que desenvolveram CMV-Ag+ do que entre aqueles que permaneceram negativos para este vírus (Ag+: $40,4 \pm 13,7$ x Ag-: $28,0 \pm 10,0$; $P=0,008$). A distribuição do gênero (masculino 23/46, 50,0%) e a média do TIF ($21,5 \pm 6,9$ horas [12,2-36,0]) não diferiram entre os pacientes + ou - para HHV-6, para CMV ou para ambas as infecções após o transplante (dados não demonstrados). O tipo de doador, transplante de rim isolado ou simultâneo de rim e pâncreas, uso de terapia de indução e disfunção inicial do enxerto não foram associados à replicação viral ativa precoce: HHV-6, CMV ou ambos.

A distribuição das diferentes drogas imunossupressoras iniciais não foi diferente entre os pacientes que desenvolveram ou não replicação ativa de HHV-6, de CMV ou de ambos os vírus no acompanhamento realizado. Todavia, houve tendência de uma associação entre o desenvolvimento de replicação ativa de CMV nos pacientes que iniciaram a imunossupressão usando o micofenolato mofetil (MMF) [$P=0,032$; $RR=2,5(0,9-6,7)$].

Desfechos Clínicos relacionados às Infecções Virais Ativas Pós-Transplante: HHV-6, CMV ou Ambos

Os parâmetros laboratoriais analisados não foram associados à infecção por HHV-6 – nem a qPCR-HHV6+ e nem a HHV-6+CMV. Pacientes que desenvolveram CMV-Ag+ permaneceram com creatinina sérica mais elevada nos seguintes momentos analisados, comparados àqueles que permaneceram negativos para este vírus: 6^a (1,9±0,8 x 1,3±0,4; P=0,038), 7^a (1,7±0,6 x 1,3±0,4; P=0,037), 10^a (1,5±0,5 x 1,2±0,3; P=0,034) e 12^a (1,6±0,5 x 1,2±0,3; P=0,018) semanas pós-transplante.

A Tabela 2 descreve os desfechos clínicos ao longo do primeiro ano após o transplante. Apresenta a incidência e distribuição de acordo com a evidência de replicação viral ativa precoce para HHV-6, CMV ou ambos, respectivamente.

qPCR-HHV6+ foi associado a maior incidência de infecções no primeiro ano pós-transplante (qPCR+: 100% x qPCR-: 67,6%; P=0,044; RR=1,5[1,1-1,9]), principalmente bacterianas (qPCR+: 100% x qPCR-: 58,8%; P=0,009; RR=1,6[1,2-2,0]) e fúngicas (qPCR+: 66,7% x qPCR-: 11,8%; P=0,001; RR=5,6[2,0-15,3]). Embora nenhum caso de micose profunda tenha sido documentado, os únicos dois pacientes que apresentaram CV de HHV-6 \geq 2000 cópias/ml desenvolveram doença fúngica e ambos desenvolveram patologias bacterianas graves.

Houve associação significativa entre a ocorrência de viremia por CMV e o desenvolvimento de outras infecções virais (não-HHV-6 e não-CMV) (P=0,001, RR=2,7[1,2-6,0]). A ocorrência destas outras infecções virais não foi significativamente associada à utilização de MMF na imunossupressão inicial (com MMF: 92,6% [25/27] x sem MMF: 57,9% [14/19]; P=0,107). Nesta série, o diagnóstico destas outras infecções virais foi baseado na apresentação clínica e em achados laboratoriais inespecíficos. Foram elas: papilomavírus humano, herpes

simples (tipos 1 e 2), vírus varicela-zoster (ambas as apresentações clínicas), infecções virais do trato respiratório superior, verruga vulgar, molusco contagioso e meningites. As síndromes clínicas de origem bacteriana diagnosticadas ao longo do acompanhamento incluíram: piodermite, infecção de ferida operatória, infecção de fístula arteriovenosa, cistite, prostatite, pielonefrite aguda do enxerto, abscesso perirrenal, sinusite, broncopneumonia, peritonite bacteriana espontânea e sepse. As infecções causadas por fungos incluíram, respectivamente: candidíase genital e inguinal, dermatofitoses e onicomicose.

O único caso de meningite viral diagnosticado ocorreu em paciente diabética, receptora de transplante simultâneo de rim e pâncreas, sem definição do agente etiológico específico. Esta paciente recebeu terapia de indução com daclizumab e imunossupressão combinada com sirolimo, tacrolimo e MMF. Ela desenvolveu DCMV e várias infecções bacterianas, algumas muito graves, sem evidência de qPCR-HHV6+ nas primeiras 6 semanas pós-transplante.

O tempo de permanência hospitalar por ocasião da cirurgia do transplante foi semelhante entre os pacientes que desenvolveram ou não replicação ativa por HHV-6 e/ou por CMV posteriormente. Por outro lado, pacientes que fizeram qPCR-HHV6+ durante as primeiras 6 semanas pós-transplante necessitaram de maior número de internações e de permanência hospitalar mais prolongada ao longo dos primeiros 6 e 12 meses pós-transplante renal. Esses achados não foram associados à ocorrência de viremia por CMV. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 2.

Além da qPCR-HHV6+, a ocorrência de infecções virais ($P=0,001$) ou fúngicas ($P=0,002$) também foi determinante, isoladamente, para o maior número de hospitalizações no primeiro ano. Imunossupressão inicial, incluindo aquela com prednisona, resultou em menor número de internações neste período (com

prednisona: $2,9 \pm 1,4$ x sem: $5,5 \pm 0,7$; $P=0,023$). Nenhuma droga imunossupressora isoladamente pode ser associada à necessidade de internações hospitalares (número e duração). Todavia, infecções causadas por diferentes agentes etiológicos resultaram em maior permanência hospitalar, de forma independente, nos primeiros 6 e 12 meses pós-transplante, respectivamente: Bacteriana: $P=0,058$ e $P=0,022$; Viral: $P=0,001$ e $P=0,001$; Fúngica: $P=0,004$ e $P=0,011$. DCMV constituiu fator de risco independente na análise binária para o desenvolvimento de infecções bacterianas e virais (Bacteriana: $P=0,001$; $RR=1,9[1,2-2,8]$ e Viral: $P=0,014$; $RR=1,3[1,0-1,7]$, respectivamente).

Perda do enxerto e óbito ao longo do acompanhamento não foram desfechos associados às infecções virais estudadas (HHV-6, CMV ou ambos). Nesta série, todos os pacientes que retornaram à diálise ($n=6$; 13,0%) o fizeram após o quarto ano de transplante, todos devido a nefropatia crônica do enxerto. Houve outras seis perdas (13,0%) por óbito do paciente ao longo do estudo, 3 (50,0%) delas durante o primeiro ano pós-transplante, todos com função estável do enxerto: uma sepse secundária a peritonite bacteriana espontânea, uma morte súbita por doença cardiovascular e outra por causa externa (trauma).

Discussão

Na última década houve um importante aumento do interesse pelo HHV-6, sendo estudado principalmente como um patógeno emergente e/ou envolvido em algumas doenças complexas. É possível que a realização de transplantes com maior risco imunológico, graças à introdução de numerosos agentes imunossupressores na última década, tenha contribuído para a emergência de outros patógenos com impacto clínico na evolução posterior dos transplantes, entre eles o HHV-6.^{1,5,7,18,23}

Clinicamente, esse vírus tem sido especialmente pesquisado entre receptores de transplante hepático e de células tronco hematopoéticas. Sua importância após o transplante renal ainda não é clara.

O estudo da população sadia brasileira, representada pelos doadores de rim, demonstrou uma incidência de infecção latente por HHV-6 no limite inferior das taxas descritas em estudos norte-americanos (55% x 59-100%).^{4,5,9,15,18} Esta incidência foi significativamente menor do que a observada entre os receptores de transplante de rim, avaliada imediatamente antes da sua realização, o que poderia ser justificada pela relativa imunossupressão conferida pela insuficiência renal crônica e tratamento hemodialítico.^{1,5} Apesar disso, essa prevalência observada foi semelhante ao descrito por outros autores em receptores de rim e de fígado.²² Importante é a observação de que a sorologia pré-transplante do HHV-6 não foi determinante para a predição de infecção ativa posterior. Todavia, este aspecto, que já é bem conhecido para o CMV, também já foi descrito por outros autores para o HHV-6, devendo ser confirmado em casuística maior.^{1,3,5,7,18}

Outros centros de transplante de órgãos sólidos também já descreveram incidências mais elevadas de infecção ativa por esse vírus (31-50%) do que a observada no presente estudo (26%).^{1,5,7,4,8,10} Tais discrepâncias podem derivar das diferenças metodológicas na detecção viral, além de fatores sociais e econômicos. Outro importante viés nesta avaliação é o momento em que se pesquisa a infecção ativa. Estrategicamente, pesquisou-se replicação ativa de HHV-6 entre a 1^a e a 6^a semanas pós-transplante por ser este o período considerado de maior risco. Conforme alguns autores, esse é o momento em que a maioria das infecções primárias acontece, usualmente desenvolvendo doença grave com envolvimento de órgãos-alvo. Este também é o período de risco para a doença secundária causada pelo HHV-6,

geralmente entre a 2^a e a 6^a semanas pós-transplante, exatamente o observado na presente casuística.^{1,2, 11, 17,18}

Nenhum fator clínico ou relacionado ao transplante parece estar claramente associado ao risco de desenvolvimento de replicação de HHV-6 ativa precoce após o transplante renal. Todavia, conforme seria esperado, profilaxia ou tratamento de rejeição aguda grave com anticorpo anti-CD3 já foi descrito por outros autores como um fator de risco independente.^{12,23}

A importância clínica do HHV-6 já é bem determinada em transplante hepático, principalmente porque a maioria dos sinais e/ou sintomas relacionados a essa infecção se confundem com a manifestação clínica da disfunção do enxerto, sendo fundamental o diagnóstico diferencial específico. Além de hepatite e perda do enxerto hepático, o HHV-6 pode causar meningoencefalite devido ao peculiar potencial de neuroinvasão e de predisposição às infecções oportunistas.^{1,17,20,22,9,24} Embora sintomas neurológicos agudos não sejam comuns precocemente após o transplante renal, infecção por HHV-6 pode ser um importante diagnóstico diferencial em qualquer meningoencefalite que se desenvolve após o transplante.^{1,4,5,11,18}

Muitos autores têm explorado os efeitos indiretos do HHV-6, principalmente na simultaneidade da infecção pelo CMV, com resultados contraditórios. Existem relatos de padrões de doença viral mais grave quando associados ao HHV-6, enquanto outros não confirmam tal associação.^{14,15,16,24,25} Recentemente, Humar e colaboradores (2009) demonstraram que a co-infecção CMV+HHV-6 simultaneamente resulta em diminuição da resposta da DCMV ao ganciclovir ou ao valganciclovir, estando associado a recorrências posteriores da reativação do CMV.²³

Com o objetivo de verificar se a infecção ativa precoce por HHV-6 poderia induzir maior replicação do CMV entre a 4^a e a 12^a semanas pós-transplante, o

presente estudo não revelou aumento significativo da incidência de viremia por CMV e nem de sua gravidade, porém não descarta uma eventual necessidade de terapia específica mais prolongada. Além do tamanho amostral, o baixo impacto clínico da replicação precoce de HHV-6 sugerido pelo estudo poderia ser decorrência da população estudada, considerada de baixo risco, principalmente por estar sob acompanhamento preemptivo rigoroso para a infecção por CMV. É provável que o diagnóstico e tratamento tardios da DCMV pudesse revelar a interação negativa entre esses dois agentes virais.³ Tal idéia pode ser corroborada pela observação de que existe algum grau de resposta do HHV-6 ao ganciclovir, embora não exista um tratamento anti-HHV-6 específico, controlando de forma precoce a atividade viral nos pacientes sob tratamento para DCMV.^{24,25}

No presente estudo, todas as CV-HHV-6 foram consideradas significantes, de forma que apresentar CV detectável de HHV-6 nas primeiras 6 semanas pós-transplante resultou em maior incidência de infecções bacterianas e fúngicas, além de maior necessidade de internações e tempo de permanência hospitalar mais prolongado ao longo dos primeiros 6 e 12 meses. Não é claro se tais infecções constituíram causa ou consequência da permanência mais prolongada em ambiente hospitalar. Definir tal associação é de extrema importância, uma vez que, pelo menos em receptores de transplante hepático, as infecções fúngicas têm sido importante causa de morbimortalidade relacionada à infecção por HHV-6.^{1,17,22} Embora nenhum caso grave de infecção fúngica tenha sido observado na casuística estudada, que pudesse justificar a maior necessidade de cuidados e permanência hospitalar, as infecções diagnosticadas devem ser consideradas quanto à necessidade de terapia anti-fúngica específica, sua toxicidade e interações farmacológicas com os agentes imunossupressores. Algumas drogas anti-rejeição também foram associadas às infecções pós-transplante.

Interessante foi o efeito paradoxal do MMF, aparentemente aumentando o risco de infecção ativa por CMV e reduzindo o risco de infecção fúngica. Somente uma análise multivariada incluindo um número maior de indivíduos poderá caracterizar a independência de todos esses fatores de risco para as infecções pós-transplante.

Apesar do baixo risco imunológico inicial da amostra selecionada (adultos recebendo seu primeiro transplante) e do seu reduzido tamanho, é provável que a principal limitação do presente estudo esteja na utilização de metodologias distintas para avaliar as diferentes infecções virais de interesse: HHV-6 e CMV. Ambas, Ag e qPCR, são técnicas bem reconhecidas para este fim, porém mensuram aspectos diferentes de uma mesma condição: a replicação viral.^{1,23,26-28} Como forma de atenuar esse viés, foram analisadas ambas as infecções por HHV-6 e por CMV de forma qualitativa, sem excluir, contudo, o comprometimento da análise de associação entre as duas infecções virais.

Conforme demonstrado neste estudo, a valorização clínica das baixas CV tem sido uma dificuldade generalizada, principalmente quando o objetivo é o diagnóstico precoce para evitar o desenvolvimento de sinais e/ou sintomas específicos relacionados à infecção viral. Com relação à Ag, um estudo prévio realizado em nosso centro determinou que pacientes com >10+células positivas indica risco para DCMV, sugerindo a necessidade de tratamento.¹³ Este ponto de corte, quando analisado através de qPCR, corresponde a >7200 cópias de CMV/ml de sangue total, muito semelhante ao já descrito em outros centros de transplante do mundo. É importante ressaltar que, pelo menos ocasionalmente, CV de até 3.000 cópias/ml podem não ser detectadas pelo teste de Ag.⁹ Desta forma, seria razoável se considerar que as CV baixas de HHV-6 observadas no presente estudo (indicando baixa replicação viral) poderiam explicar a apresentação clínica benigna dos eventos a ele

associados. Todavia, até o momento não existe estudo com definição de CV capaz de diferenciar infecção latente de infecção ativa pelo HHV-6.²⁹

Corroborando os resultados apresentados, um importante estudo recentemente publicado por Humar e colaboradores (2009) descreveu uma incidência de 31% de infecção ativa por HHV-6 entre 253 pacientes sob tratamento de DCMV. A mediana da CV máxima foi 281 cópias/ml de sangue total, sendo raramente maior do que 100.000 cópias/ml.^{12,23}

Em resumo, esse estudo demonstrou que a replicação ativa precoce de HHV-6 após o transplante renal parece ser pouco significativa clinicamente, embora esteja associada ao desenvolvimento mais frequente de infecções bacterianas e fúngicas, além de maior número de internações e permanência hospitalar mais prolongada no primeiro ano pós-transplante renal. Tais evidências sugerem não ser o HHV-6 um vírus inócuo, constituindo um provável marcador de imunossupressão excessiva.^{4,15,16,24} Todavia, atualmente, não há razões para o acompanhamento sistemático da infecção por HHV-6 em pacientes que estejam sob monitorização de CMV em estratégias preemptivas. A replicação precoce do HHV-6 não piora a função e nem indica risco para perda do enxerto e/ou óbito no primeiro ano pós-transplante renal. O seu papel interferindo na infecção pelo CMV deve ainda ser avaliado em estudo incluindo maior número de casos.

Conclusão

Infecção latente por HHV-6 é altamente prevalente em nosso meio (>80%), sendo mais comum entre os candidatos a transplante renal do que entre os seus doadores. A incidência de infecção ativa precoce por esse vírus após o transplante foi de 26%. Embora isso não tenha piorado o prognóstico da infecção por CMV, foi

associado a infecções bacterianas e fúngicas mais frequentes, além de maior necessidade de permanência hospitalar no primeiro ano pós-transplante renal.

Referências

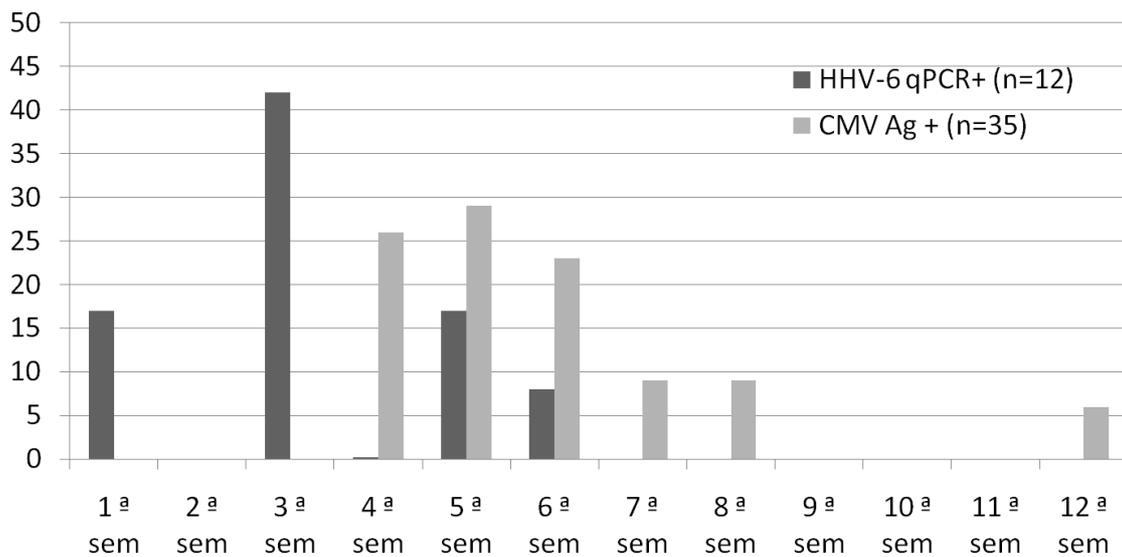
- 1 De Bolle L, Naesens L, De Clercq E: Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(1):217-45.
- 2 Zerr DM, Meier AS, Selke SS ET al. A population-based study of primary human herpesvírus 6 infection. *N. Engl J. Med.* 2005;342:768.
- 3 Schroeder R, Michelon T, Fagundes I, ET al: Cytomegalovirus Disease Latent and active infection rates during the first trimester after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2004;36:896–898.
- 4 Singh N, Peterson D: Encephalitis Caused By Human Herpesvirus-6 In Transplant recipients. *Transplantation* 2000;69:2474-2479.
- 5 Brennan DC. Highlights From The Sixth Annual Ast Winter Symposium — Transplantation meets infection: Microbes, rejection, atherosclerosis, and malignancy. *Medscape Transplantation*; 2002;3(1):1-14- www.medscape.com (31/01/2003).
- 6 Tianssheng C, hudnall D: Anatomical mapping of human herpesvirus reservoirs of infection. *Modern Pathology.* 2006;19:726-737.
- 7 Lusso P: Human herpesvirus 6 (HHV-6). *Antiviral Research* 1996;31:1-21.
- 8 Schmidt AC, Wilborn F, Weiss K, ET al: A Prospective Study Of Human herpesvirus type 6 detected by polymerase chain reaction after liver transplantation. *Transplantation* 1995;61:662.
- 9 Benito N, Moreno A, Pumarola M ET, al. Virus Del herpes humano tipo 6 y tipo 7 em receptores de transplante. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21(8):424-32
- 10 Rogers J, Rohal S, Carrigan D, ET al. Human Herpesvirus-6 In Liver Transplant recipients. *Transplantation* 2000;6:2566-73.

- 11 Ratnamohan V, Chapman J, Howse H: Cytomegalovirus and human herpesvirus 6 both cause viral disease after renal transplantation. *Transplantation* 1998;66:877-82.
- 12 Desjardin JA, Cho E, Supran S, ET al: Association Of Human Herpesvirus 6 Reactivation With severe cytomegalovirus-associated disease in orthotopic liver transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2001;33(8):1358-62.
- 13 Schroeder R, Michelon T, Fagundes I, ET al: Antigenemia for Cytomegalovirus in Renal Transplantation: Choosing a Cutoff For the Diagnosis Criteria in Cytomegalovirus Disease. *Transplant Proc.* 2005;37:2781–2783.
- 14 Lautenschlager I, Linnavuori K, Höckerstedt K: Human herpesvirus-6 antigenemia after liver transplantation. *Transplantation* 2000;69:2561-66.
- 15 Reddy S, Manna P: Quantitative detection and differentiation of human herpesvirus 6 subtypes in bone marrow transplant patients by using a single real-time polymerase chain reaction assay. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11(7):530-41.
- 16 Visser AM, Van Doornum GJ, Coernelissen JJ, ET al: Severe amnesia due to HHV-6 Encephalitis after allogenic stem cell transplantation. *Eur Neurol.* 2005;54(4): 233-4.
- 17 Boutolleau D, Duros C, Bonnafous P, ET al: Identification Of Human Herpesvirus 6 Variants A and B by primer-specific real-time PCR may help to revisit their respective role in pathology. *J Clin Virol.* 2006;35(3):257-63.
- 18 Komaroff Al, Jacobson S, et al: Highlights From 5th International Conference On HHV-6 and -7. *Herpes* 2006;13(3):81-2.
- 19 Deborska-Materkowska D, Lewandowski Z, Sadowska A, ET al: Fever, human herpesvirus 6 (HHV-6) seroconversion, and acute rejection episodes as a function of the initial seroprevalence for HHV-6 in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2006;38:139-143.

- 20 Lautenschlager I, Harma M, Hockerstedt K, ET al: Human Herpesvirus-6 Infection Is Associated with adhesion molecule induction and lymphocyte infiltration in liver allografts. *J Hepatol.* 2002;37(5):648-54.
- 21 Mendez JC, Dockrell DH, Espy MJ, ET al: Human Beta-Herpesvirus Interactions In Solid organ transplant recipients. *J Infect Dis.* 2001;183(2):179-184.
- 22 Ohashi M, Sugata K, Ihira M, ET al: Human Herpesvirus 6 Infection In Adult Living related liver transplant recipients. *Liver transplantation* 2008;14:100-109.
- 23 Humar A, Asberg A, Kumar D, ET al. An assessment of herpesvirus co-infection in patients with CMV disease: Correlation with clinical and virologic outcomes. *Am Jou of Transplantation.* 2009;9:374-381.
- 24 Desjardin JA, Gibbons L, Cho E, ET al. Human herpesvirus 6 reactivation is associated with cytomegalovirus and syndromes in kidney transplant recipients at risk for primary cytomegalovirus infection. *J Infect Dis.* 1998,178:1783.
- 25 Pacsa AS; Essa S; Voevodin A; ET al. Correlation between CMV genotypes , multiple infections with herpesviruses (HHV-6,7) and development of CMV disease in kidney recipients in Kuwait. *FEMS Immunol and Med Microbiol* 2003;35:125-130.
- 26 Yang S, Rothman RE. PCR-Based Diagnostics For Infectious Diseases: Uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis.* 2004;4: 337-48.
- 27 Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, ET al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:165-256.
- 28 Gunson RN, Collins TC, Carman WF. Practical Experience Of High Throughput real-time PCR in the routine diagnostic virology setting. *J Clin Virol.* 2006;35: 355-67.

29 Schroeder R, Michelon T, Adamy R et al. Infecção por citomegalovírus no pós-transplante: comparação das técnicas de antigenemia pp65 por imunofluorescência e real time PCR. Anais do Congresso Brasileiro de Transplantes de órgãos. Recife 2009.

Figura 1: Cronologia da primeira evidência de reativação dos vírus HHV-6 e CMV ao longo das primeiras 6 semanas e entre a 4ª e 12ª semanas pós-transplante, respectivamente.



HHV-6 (1ª-6ª sem): 75,0% até a 4ª sem (9/12)

CMV (4ª-12ª sem): : 94,2% até a 8ª sem (33/35)

Tabela 1. Características demográficas e sua associação com infecção ativa pós-transplante por HHV-6, por CMV e por ambos, respectivamente.

| Características Demográficas | Geral N=46 n (%) | HHV-6* | | | CMV** | | | HHV-6+ → CMV+ *** | | |
|--|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|--------------------------|--------------------------|-------|--------------------|---------------------|-------|
| | | Positivo (n=12) n (%) | Negativo (n=34) n (%) | P | Positivo (n=35) n (%) | Negativo (n=11) n (%) | P | Sim (n=8) n (%) | Não (n=38) n (%) | P |
| Doador Falecido | 27 (58,7%) | 5 (41,7) | 14 (41,2) | 0,976 | 13 (37,1) | 6 (54,5) | 0,307 | 3 (37,5) | 16 (42,1) | 0,999 |
| Transplante Rim+Pâncreas | 3 (6,5%) | 2 (16,7) | 1 (2,9) | 0,162 | 1 (2,8) | 2 (18,2) | 0,138 | 1 (12,5) | 2 (5,3) | 0,444 |
| Terapia de Indução | 18 (39,1%) | 5 (41,7) | 13 (38,2) | 0,834 | 14 (40,0) | 4 (36,4) | 0,999 | 3 (37,5) | 15 (39,5) | 0,999 |
| Esquema Imunossupressor Inicial[#] | | | | 0,282 | | | 0,083 | | | 0,937 |
| CyA-MMF-Pred | 26 (56,5) | 5 (41,7) | 21 (61,8) | | 23 (65,7) | 3 (27,3) | | 4 (50,0) | 22 (57,8) | |
| CyA-Aza-Pred | 14 (30,4) | 4 (33,3) | 10 (29,4) | | 9 (25,7) | 5 (45,4) | | 3 (37,5) | 11 (28,9) | |
| Rapa-FK-Pred | 4 (8,7) | 2 (16,7) | 2 (5,9) | | 2 (5,7) | 2 (18,2) | | 1 (12,5) | 3 (7,9) | |
| CyA-Aza | 1 (2,2) | 1 (8,3) | 0 | | 1 (2,9) | 1 (9,0) | | 0 | 1 (2,7) | |

| MMF-FK | 1 (2,2) | 0 | 1 (2,9) | | 1 (2,9) | 0 | | 0 | 1 (2,7) | |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-------|-----------|----------|--------------------|----------|-----------|-------|
| Imunossupressores: | | | | | | | | | | |
| Micofenolato | 27 (58,7) | 5 (41,7) | 22 (64,7) | 0,163 | 24 (68,6) | 3 (27,3) | 0,032 ^a | 4 (50,0) | 23 (60,5) | 0,700 |
| Azatioprina | 15 (32,6) | 5 (41,7) | 10 (29,4) | 0,436 | 9 (25,7) | 6 (54,5) | 0,075 | 3 (37,5) | 12 (31,5) | 0,999 |
| Ciclosporina | 5 (10,9) | 10 (83,3) | 31 (91,2) | 0,594 | 32 (91,4) | 9 (81,8) | 0,580 | 7 (87,5) | 34 (89,5) | 0,999 |
| Tacrolimo | 5 (10,9) | 2 (16,7) | 3 (8,8) | 0,594 | 3 (8,6) | 2 (18,2) | 0,580 | 1 (12,5) | 4 (10,5) | 0,999 |
| Sirolimo | 5 (10,9) | 2 (16,7) | 3 (8,8) | 0,594 | 2 (5,7) | 3 (27,2) | 0,080 | 1 (12,5) | 4 (10,5) | 0,999 |
| Disfunção Inicial do | | | | | | | | | | |
| Enxerto^{##} | 22 (47,8) | 5 (41,7) | 17 (50,0) | 0,619 | 17 (37,7) | 5 (45,4) | 0,857 | 3 (37,5) | 19 (50,0) | 0,702 |

* Comparação entre pacientes com e sem infecção ativa (qPCR-HHV6) por HHV-6 entre a 1^a e 6^a semanas pós-transplante.

** Comparação entre pacientes com e sem infecção ativa (Ag-CMV) por CMV entre a 4^a e 12^a semanas pós-transplante.

*** Comparação entre pacientes com e sem infecção ativa simultânea por CMV e HHV6 após o transplante.

#CyA: ciclosporina; MMF: micofenolato mofetil; Pred: prednisona; Rapa: sirolimo; FK: tacrolimo; AZA: Azatioprina.

necessidade de diálise na primeira semana pós-transplante.

α : RR=2,5 (0,9-6,7).

Tabela 2: Desfechos clínicos no primeiro ano pós-transplante conforme a ocorrência de infecção ativa precoce por HHV-6, por CMV ou por ambos os vírus, respectivamente.

| Desfechos Clínicos no 1 ^o Ano Pós-Transplante | Geral N=46 n (%) | qPCR-HHV6 | | | Ag-CMV | | | HHV-6+ → CMV+ *** | | |
|--|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | | Positivo (n=12) n (%) | Negativo (n=34) n (%) | P | Positivo (n=35) n (%) | Negativo (n=11) n (%) | P | Sim (n=8) n (%) | Não (n=38) n (%) | P |
| Rejeição Aguda | 26 (56,5) | 9 (75,0) | 17 (50,0) | 0,183 | 17 (48,6) | 9 (81,8) | 0,082 | 5 (62,5) | 21 (55,3) | 0,999 |
| Outras Infecções: | | | | | | | | | | |
| Geral | 33 (71,7) | 12 (100,0) | 23 (67,6) | 0,044 ^δ | 25 (71,4) | 8 (72,7) | 0,999 | 6 (75,0) | 27 (71,0) | 0,999 |
| Bacterianas | 32 (69,5) | 12 (100,0) | 20 (58,8) | 0,009 ^ε | 23 (65,7) | 9 (81,8) | 0,460 | 8 (100,0) | 24 (63,1) | 0,085 |
| Virais | 39 (84,8) | 11 (91,7) | 28 (82,3) | 0,657 | 35 (100,0) | 4 (36,4) | 0,001 ^α | 8 (100,0) | 31 (81,5) | 0,325 |
| Fúngicas | 12 (26,1) | 8 (66,7) | 4 (11,8) | 0,001 ^β | 10 (2,8) | 2 (18,2) | 0,701 | 6 (75,0) | 6 (15,8) | 0,002 ^γ |
| Internações Hospitalares (Mediana, Mínimo-Máximo): | | | | | | | | | | |
| Número Total 1^o ano | 3,0 (1-6) | 4,0 (2-6) | 2,5 (1-6) | 0,001 | 3,0 (1-6) | 2,0 (1-5) | 0,103 | 4,5 (3-6) | 3,0 (1-6) | 0,001 |
| Dias 1^a internação* | 20,0 (7-69) | 19,5 (14-69) | 20,5 (7-57) | 0,688 | 20,0 (7-69) | 20,0 (14-57) | 0,897 | 18,0 (14-69) | 21,0 (7-57) | 0,459 |
| Dias 1^{os} 6 meses | 33,5 (14-108) | 40,0 (25-108) | 29,5 (14-104) | 0,033 | 40,0 (15-108) | 25,0 (14-99) | 0,094 | 50,5 (25-108) | 31,5 (14-104) | 0,049 |

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------|---------------|---------------|-------|---------------|--------------|-------|---------------|---------------|-------|
| Dias 1º ano | 42,5 (14-156) | 80,0 (33-120) | 29,5 (14-156) | 0,001 | 45,0 (15-156) | 25,0 (14-99) | 0,226 | 85,0 (40-120) | 31,5 (14-156) | 0,002 |
| Perda do Enxerto# | 12 (26,1) | 3 (25,0) | 9 (26,5) | 0,999 | 10 (28,6) | 11 (18,2) | 0,701 | 1 (12,5) | 11 (28,9) | 0,660 |
| Óbito# | 6 (13,0) | 4 (11,8) | 2 (16,7) | 0,644 | 5 (14,3) | 1 (9,0) | 0,999 | 1 (12,5) | 5 (13,1) | 0,999 |

Ag-CMV: antigenemia para CMV (4 a 12ª semanas pós-transplante). Ag-CMV positiva = infecção ativa por CMV.

qPCR-HHV6: reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa para HHV-6. qPCR-HHV6+ = infecção ativa por HHV-6.

* internação pós-cirurgia do transplante.

desfecho analisado em todo o acompanhamento pós-transplante (2002 a 2009).

α : RR=2,7 (1,2-6,0)

β : RR=5,6 (2,0-15,3)

γ : RR=4,7 (2,1-10,9)

δ : RR=1,5 (1,1-1,9)

ϵ : RR=1,6 (1,2-2,0)

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prevalência de infecção latente por HHV-6 e/ou CMV é elevada em receptores e em doadores de transplante renal, bem como em doadores de banco de sangue. Todavia, a infecção latente por HHV-6 é significativamente mais frequente entre os receptores do que entre os doadores antes da realização do transplante, sem associação entre os padrões sorológicos destes dois β -herpesvírus.

A incidência cumulativa de infecção ativa precoce por HHV-6 nas primeiras 6 semanas é da ordem de 26% em transplantes renais com baixo risco imunológico. Infecção primária ocorre em 37% dos receptores transplantados sem infecção previa e reativação e/ou reinfecção em 24% dos transplantados com IgG específica pré-formada. Infecção ativa por ambos os vírus – HHV-6 e CMV -, cada um analisado no seu período de risco máximo, ocorreu em 17% da amostra. Infecção ativa apenas por HHV-6 ocorreu em 9%, apenas por CMV em 59% e outros 15% permaneceram negativos para ambos. O presente estudo não atingiu poder estatístico suficiente para comprovar o benefício da avaliação sorológica de HHV-6 pré-transplante na determinação do risco de infecção ativa posterior, como já relatado por outros autores.

A atividade precoce do HHV-6 não parece aumentar o risco relacionado à infecção ativa por CMV nos primeiros 3 meses pós-transplante quando se emprega estratégia preemptiva de diagnóstico e tratamento para a infecção citomegálica. Não se observa aumento da incidência de infecção ativa por CMV ou de outros vírus, nem de DCMV e não induzem Ag máxima mais elevada.

Todavia, o HHV-6 não é um vírus inócuo após o transplante renal. A evidência de replicação ativa precoce do HHV-6 pode funcionar como um marcador de

imunossupressão excessiva devido à sua associação nos primeiros 6 e 12 meses à: a) maior incidência de infecções bacterianas e fúngicas e b) maior necessidade de permanência hospitalar. A independência destes dois fatores (HHV-6 e/ou outras infecções) como causa de internação, assim como a sugestão de que este vírus pode induzir necessidade de tratamento mais prolongado de DCMV merecem ser avaliados em estudo com maior número de pacientes.

Os resultados apresentados corroboram o baixo impacto clínico da replicação ativa precoce do HHV-6 após transplantes renais com baixo risco imunológico, sugerindo ser desnecessária sua monitorização rotineira quando se realiza acompanhamento preemptivo para CMV. Todavia, embora não tenha sido objeto do presente estudo, esse vírus deve figurar no diagnóstico diferencial durante quadros clínicos atípicos pós-transplante e/ou com comprometimento do sistema nervoso central, conforme demonstra a literatura atual.

7. ANEXOS

TRABALHO APRESENTADO EM CONGRESSO

SOROPREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR CMV E HHV-6 E ASSOCIAÇÃO COM INFECÇÃO ATIVA POR CMV NO PÓS-TRANSPLANTE RENAL

Schroeder R, Michelon T, Silveira J, Fabri D, Sandri C, Luiza Assmann, Brum D,
Graudenz M, Neumann J, D`Azevedo P

Categoria: Tema Livre Oral

X Congresso Brasileiro de Transplantes

XIX Congreso de la Sociedad de Transplantes de América Latina y el Caribe

VI congresso Luso-Brasileiro de Transplantes

Florianópolis, 2 a 5 de setembro de 2007.

Publicação: Livro de Resumo do congresso

TRABALHO APRESENTADO EM CONGRESSO

AVALIAÇÃO DA SOROPREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR HHV-6 NO PAR DOADOR-RECEPTOR E SUA ASSOCIAÇÃO COM DOENÇA POR CMV PÓS- TRANSPLANTE RENAL

Regina Barbosa Schroeder, Tatiana Michelon, Janaina Silveira, Gabriela Garbin, Bruna Suzigan, Carla Martins, Fernanda Swarowski, Adriene Stahlschmidt, Luiza Assmann, Dario Brum, Valter Garcia, Jorge Neumann, Elizete Keitel.

Categoria: Pôster

XI Congresso Brasileiro de Transplantes

XX Congreso de la Sociedad de Transplantes de América Latina y el Caribe

VII congresso Luso-Brasileiro de Transplantes

Recife, 13 a 16 de outubro de 2009.

Publicação: Livro de Resumo do congresso

TRABALHO ENVIADO AO CONGRESSO

HHV-6 does not increase frequency nor severity of CMV infection after kidney transplantation

Regina Schroeder, Tatiana Michelon, Janaina Silveira, Gabriela Garbin, Valter Garcia, Jorge Neumann, Elizete Keitel.

Categoria: Pôster

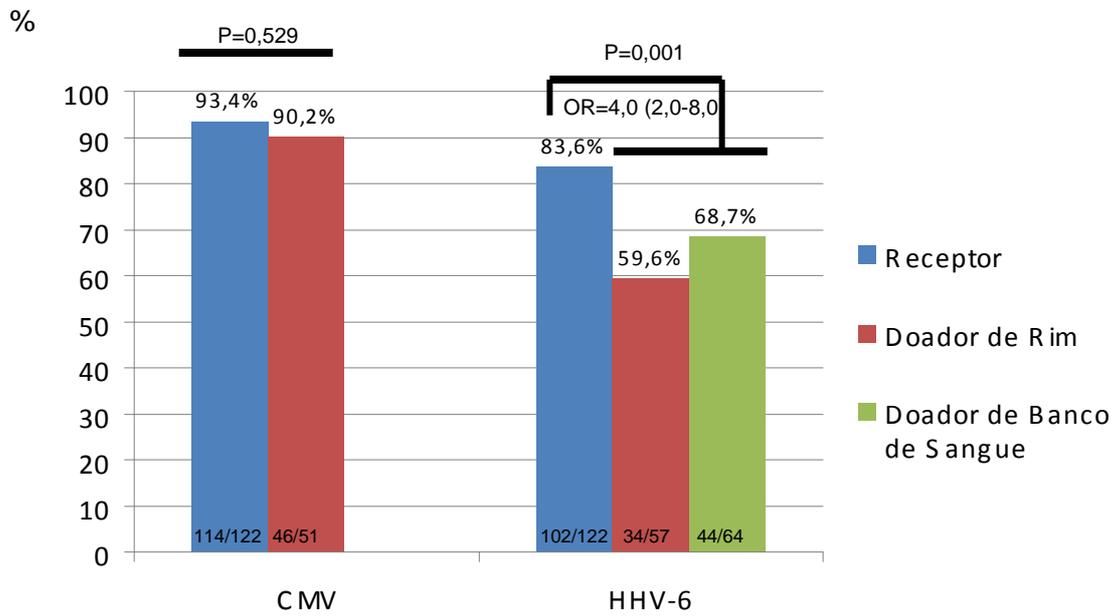
American Transplant Congress 2010

San Diego - California, 01 a 05 de maio de 2010.

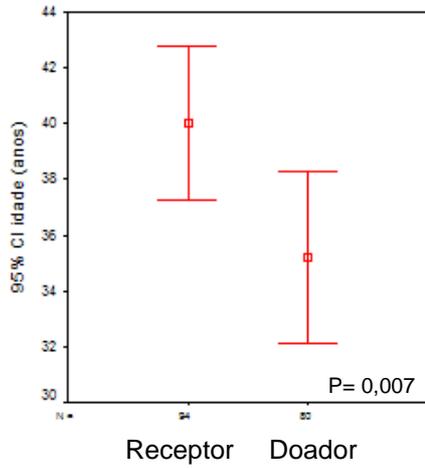
Trabalho aceito para apresentação.

GRÁFICOS DO ARTIGO 1

Prevalência de Infecção Viral Latente Pré-Transplante Renal (IgG+)

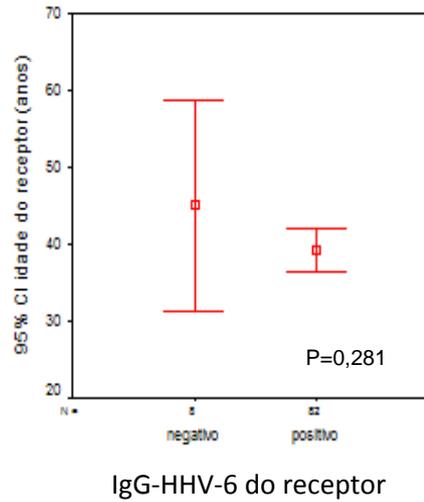


Idade do Receptor e Doadores de Rim



Sorologia Pré-Transplante para HHV-6 do Receptor

X

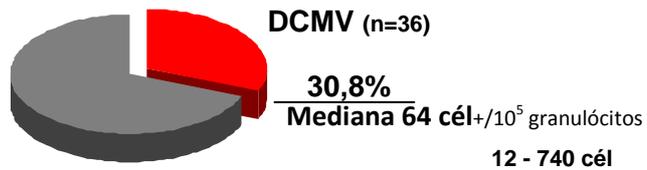


111

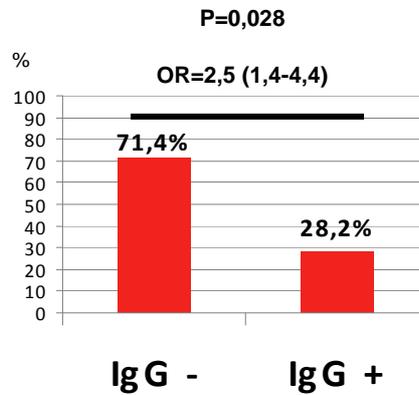
Incidência de DCMV

nos primeiros 3 meses Pós-Transplante Renal

N=117 5 perdas de seguimento no 1º mês



Incidência de DCMV conforme a Sorologia Pré-Transplante do Receptor **IgG anti-CMV**

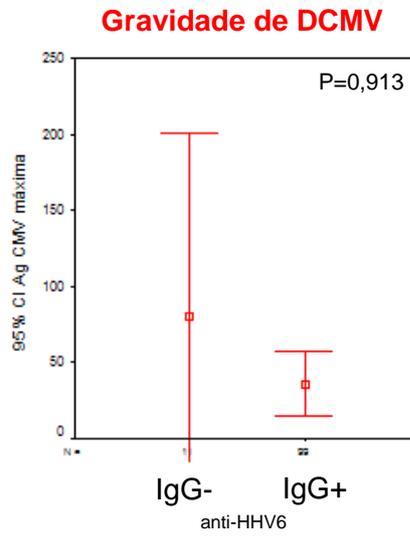
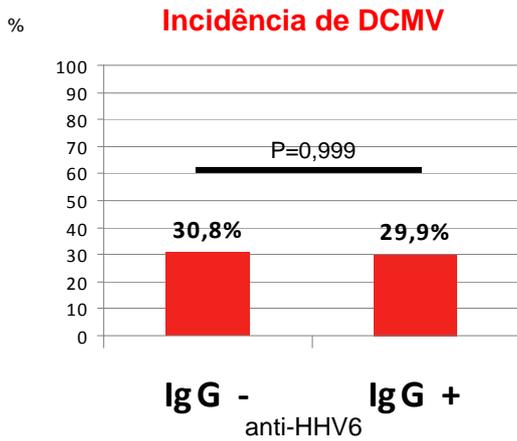


111

Incidência de DCMV

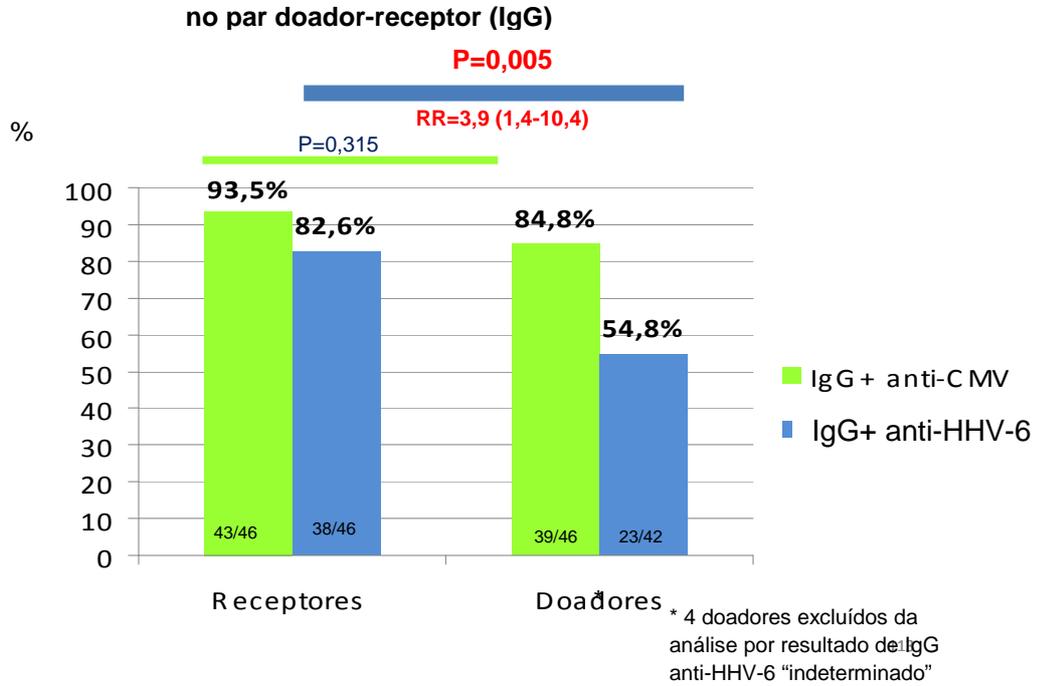
nos primeiros 3 meses Pós-Transplante Renal

Sorologia Pré-Transplante para HHV-6 do Receptor

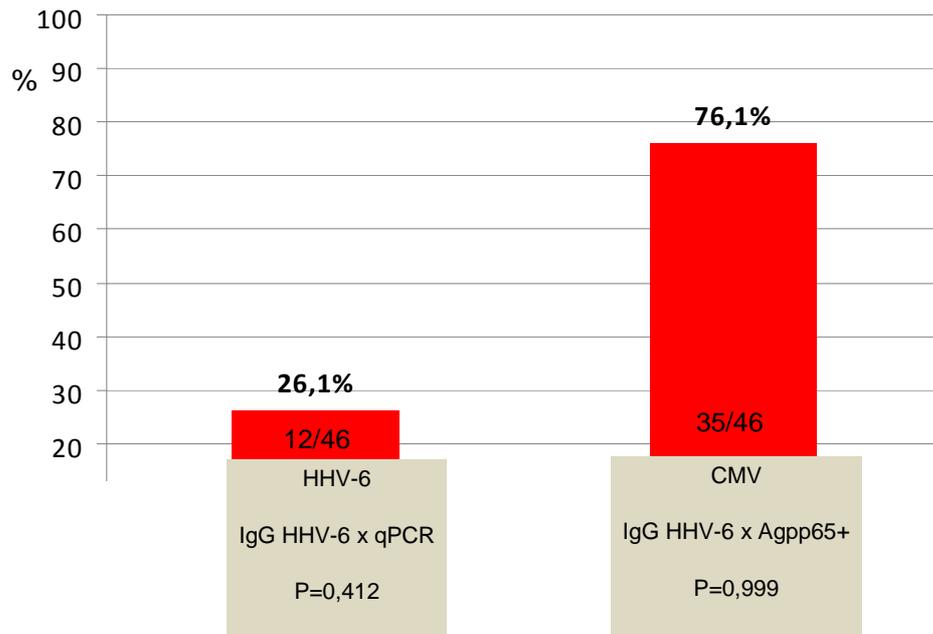


GRÁFICOS DO ARTIGO 2

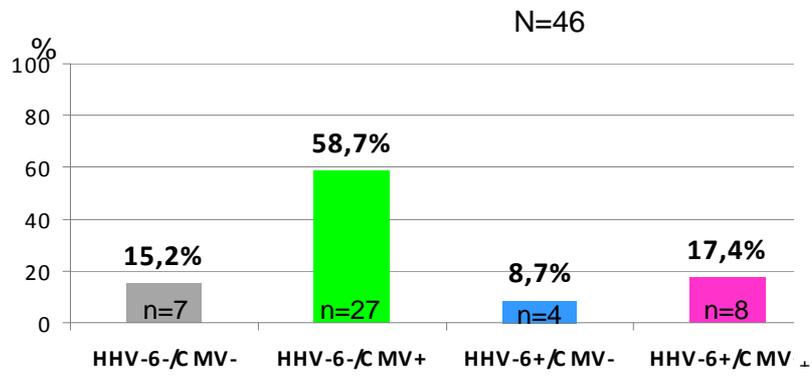
Prevalência de infecção latente pré-transplante por CMV e HHV-6



Infecção Viral Ativa Pós-Transplante Renal Precoce



Incidência de co-infecção de HHV-6 e CMV



Termo de Consentimento do Paciente de participar do estudo:

Estudo da prevalência da soropositividade e de incidência da infecção ativa pelo HHV-6 em pacientes transplantados renais.

O herpesvirus-6 (HHV-6) está presente em aproximadamente 80% da população em geral. Quando é iniciada a imunossupressão após o transplante, estes pacientes tem maior risco de fazer doença pelo HHV-6 assim como acontece com o Citomegalovírus (CMV).

O objetivo deste trabalho é diagnosticar a infecção latente e ativa pelo HHV-6 e acompanhar clinicamente estes pacientes. Isto fará parte do estudo para avaliar o risco de doença por este vírus.

A recusa em participar do estudo será respeitada. Os pacientes que aceitarem ingressar no estudo serão atendidos no ambulatório de transplante renal, tendo o direito de se retirar a qualquer momento sem nenhum prejuízo na sua assistência. A participação não implica gastos adicionais para o paciente. A coleta dos exames será feita na rotina do transplante.

Consentimento do paciente:

Eu _____ (nome em letra de forma),
consinto (concordo) em tomar parte neste estudo.

Confirmo que o propósito deste estudo foram-me explicados verbalmente e por escrito.

_____ / ____ / ____
Assinatura do paciente **Local** **Data**

_____ / ____ / ____
Médico responsável **Local** **Data**

COMITÊ DE ÉTICA

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)