



# DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DA INFECÇÃO ATIVA PELO HERPESVÍRUS HUMANO 6 (HHV-6) PELA ANTIGENEMIA E NESTED-PCR: IMPACTO CLÍNICO E CORRELAÇÃO COM O CITOMEGALOVÍRUS (HHV-5) EM TRANSPLANTADOS HEPÁTICOS



Allan Nobuyuki Sasaki, Ana Maria Sampaio, Ana Carolina Guardia,  
Paula Durante Andrade, Dra Sandra Cecília Botelho Costa

nobuyuki@fcm.unicamp.br

Fomento:  
CNPq/PIBC

Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, CP 6111  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Palavras-chave: HHV-6; NESTED-PCR; Citomegalovírus.

## 1 - INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As infecções pelos herpesvírus correspondem a uma importante fonte de complicações em pacientes transplantados hepáticos, gerando altos índices de morbi-mortalidade. Neste sentido, métodos eficazes e precoces de diagnóstico, como PCR e antigenemia (AGM), são de grande importância no prognóstico destes pacientes. Neste estudo, pesquisamos a interação clínica entre os herpesvírus humano do tipo 6 (citomegalovírus - HHV-5 ou CMV) e herpesvírus do tipo 6 (HHV-6), padronizamos a técnica de antigenemia para HHV-6 e a comparamos com o método de PCR.

## 2 - OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos:

- padronizar a técnica de antigenemia (AGM) em sangue periférico para a detecção do HHV-6 em pacientes submetidos ao transplante hepático e compará-lo ao método de PCR, considerado padrão ouro;
- determinar a co-infecção entre o HHV-5 e o HHV-6 em pacientes transplantados de fígado do Hospital de Clínicas (HC) da Unicamp;
- avaliar o impacto clínico destes vírus no grupo dos pacientes estudados.

## 3 - METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizadas duas técnicas de pesquisa de material viral, a antigenemia (AGM) e a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) a partir de amostras de sangue periférico.

Foram feitos testes de antigenemia e PCR para o HHV-6 e comparados seus resultados quanto à sensibilidade e especificidade. Também foram realizados exames de antigenemia e PCR para o citomegalovírus, os quais serviram de base para determinar a co-infecção entre os herpesvírus HHV-6 e HHV-5. O impacto clínico desta correlação foi avaliado a partir da análise de prontuário médico dos pacientes incluídos neste estudo.

**3.1 - Critérios Diagnósticos:** Foram considerados os seguintes critérios para o diagnóstico de infecção ativa pelo HHV-5, HHV-6, e da doença CMV:

- dois ou mais resultados positivos consecutivos de N-PCR num intervalo menor ou igual a 30 dias;
- um teste positivo de antigenemia;

A doença CMV é definida como o diagnóstico de infecção ativa na vigência de manifestação clínica compatível.

Para o HHV-6 foram adotados os mesmos critérios para o citomegalovírus.

**3.2 - Antigenemia para HHV-5 e HHV-6:** Para as técnicas de antigenemia foram extraídas amostras de sangue periférico dos pacientes da Unidade de Fígado e Transplante Hepático do Hospital das Clínicas da Unicamp em centro cirúrgico pré-transplante, e em ambulatório no período pós-transplante. Os testes laboratoriais foram realizados no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular da FCM-UNICAMP. As amostras de sangue periférico coletadas em tubos com o anticoagulante EDTA foram processadas no prazo de até 6 horas após a coleta. Na interpretação das lâminas, por microscópio da marca Nikon, as células positivas para HHV-5 apresentavam o núcleo marrom, coloração total ou perinuclear em polimorfonucleares e ocasionalmente em monócitos, enquanto as negativas apresentavam núcleo azul. (Figura 1)

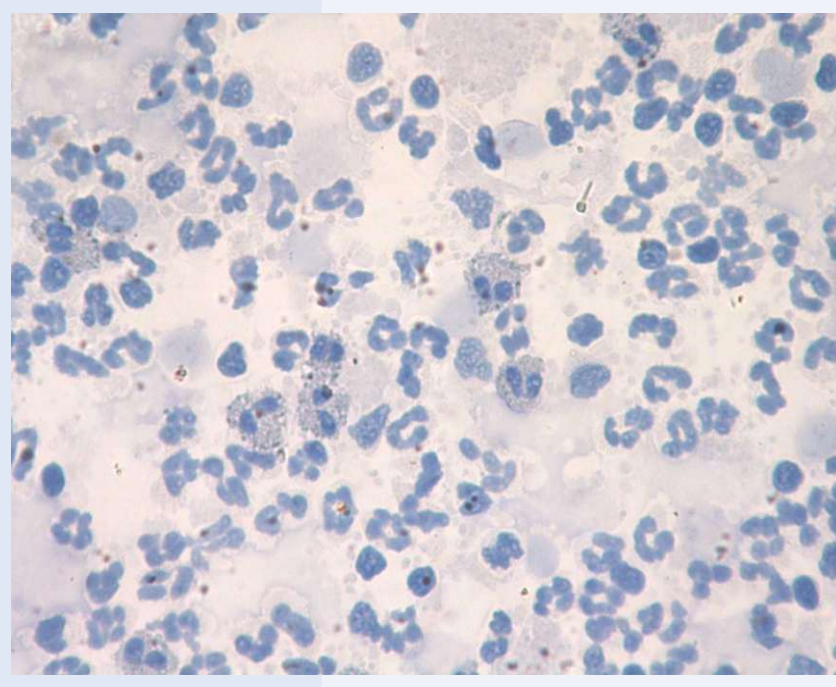


Figura 1. Teste de Antigenemia para CMV negativo: núcleos azuis. Foto gentilmente cedida por Dra. Ana Maria Sampaio.

As células positivas para HHV-6 apresentavam citoplasma corado em marrom e as células negativas apresentavam citoplasma corado em azul. (Figura 2)

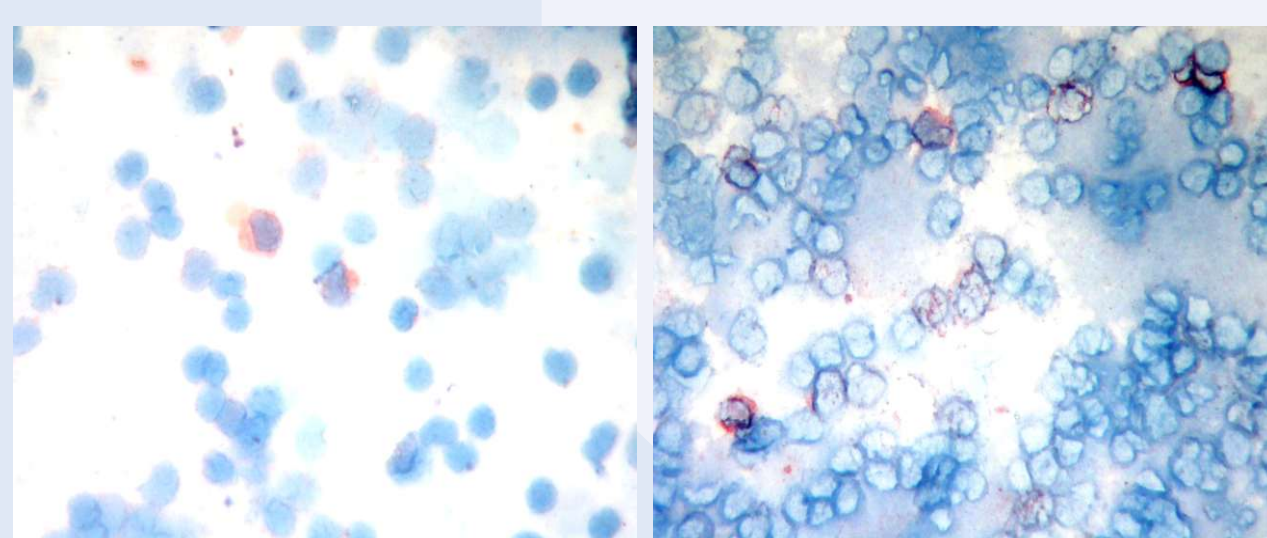


Figura 2. Teste de Antigenemia positiva para HHV-6: citoplasma acastanhado. Fotos cedidas gentilmente por Dra. Ana Maria Sampaio.

**3.3 - Nested-PCR para HHV-5 e HHV-6:** Os precipitados leucocitários remanescentes dos testes de antigenemia foram submetidos ao processo de PCR, com o produto desta reação submetido à eletroforese e posterior detecção de fragmentos de DNA específicos aos vírus HHV-5 (159 pb) e HHV-6 (258 pb) (figura 3).

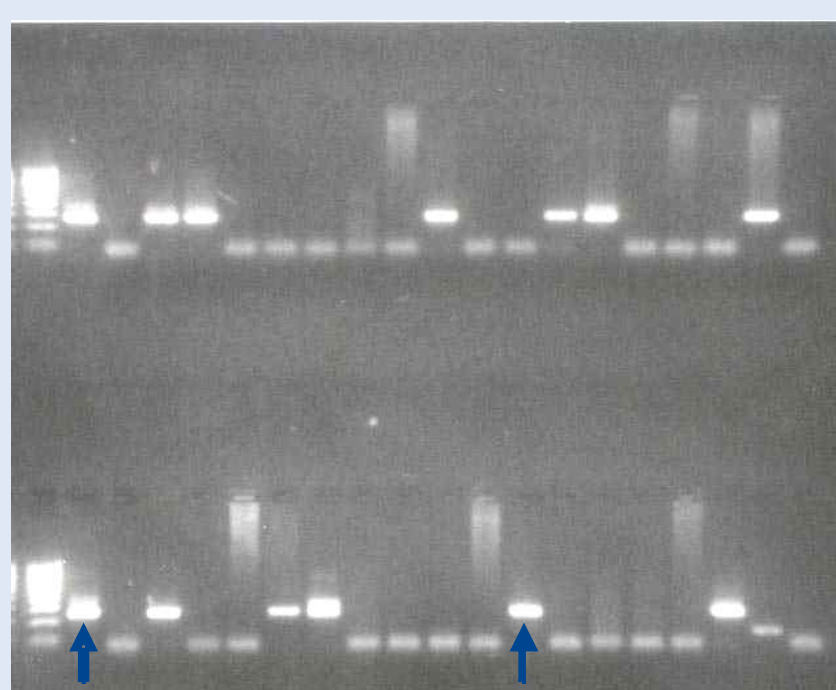


Figura 3. PCR para HHV-6: as bandas indicadas correspondem a positividade (fragmentos de 258 pb do DNA do HHV-6).

## 4 - CASUÍSTICA

Foram incluídos os pacientes que ingressaram na Unidade de Fígado e Transplante Hepático do Hospital de Clínicas de janeiro de 2005 a janeiro 2008.

**4.1 - Critérios de Inclusão:** consentimento do paciente para a coleta de amostras de sangue para a análise pré-transplante e monitorização pós-transplante por um período de três meses a um ano; consentimento da família do doador (cadáver) para a coleta de amostras, sobrevida dos pacientes transplantados e do fígado de pelo menos um mês após o transplante hepático; e acompanhamento regular (semanalmente até 30 dias do transplante, quinzenalmente até 90 dias e mensalmente até o fim do seguimento).

**4.2 - Critérios de exclusão:** sobrevida menor que 1 mês e acompanhamento irregular.

Foram seguidos 33 pacientes, dos quais 11 foram excluídos. Desta forma, a casuística final foi composta por 22 pacientes, com as seguintes características: mediana de idade no dia do transplante de 44,5 anos (mínima de 18 anos, máxima de 71 anos), maioria do sexo masculino (17/22 - 77,27%). As indicações para o transplante estão representadas na tabela 1. A mediana do tempo de seguimento de 16,5 meses (mínimo de 4 meses e máximo de 37 meses). Nesta casuística, 3 pacientes não tiveram seguimento de 1 ano, sendo que 2 pacientes faleceram antes de completar este período e 1, por razões desconhecidas, não possui seguimento ou anotações em prontuário após 4 meses, não havendo indicação de alta.

Tabela 1. Indicações dos Transplantes

Indicação	Número de pacientes
Cirrose hepática por HCV isoladamente	5/22 22,72%
Cirrose hepática por HBV isoladamente	4/22 18,18%
Cirrose hepática alcoólica isoladamente	3/22 13,63%
Cirrose hepática criptogênica	2/22 9,09%
Cirrose hepática por HCV+alcooolismo	2/22 9,09%
Cirrose hepática auto-imune	2/22 9,09%
Insuficiência Hepática secundária a doença de Wilson	2/22 9,09%
Cirrose hepática por amiloidose familiar	1/22 4,54%
Cirrose hepática secundária a colangite biliar primária	1/22 4,54%

## 5 - RESULTADOS

Foram colhidas amostras de sangue periférico para a realização dos testes propostos, sendo realizados para o CMV, 193 testes de Antigenemia para CMV e 204 testes de N-PCR, enquanto para o HHV-6 foram realizadas 144 testes de antigenemia e 145 testes de PCR. Foram calculadas as sensibilidades (S), a especificidade (E), os valores preditivos positivo (VP+) e negativo (VP-) (tabelas 2 e 3).

Tabela 2. AGM X PCR para infecção ativa por CMV

CMV	Infecção Ativa	Não-Infecção Ativa	TOTAL
AGM +	5	3	8
AGM -	7	7	14
TOTAL	12	10	22

S: 41,67% VP+: 62,5% E: 70% VP-: 50%

Tabela 3. AGM X PCR para infecção ativa por HHV-6

HHV-6	Infecção Ativa	Não-Infecção Ativa	TOTAL
AGM +	8	1	9
AGM -	1	5	6
TOTAL	9	6	15

S: 88,89% VP+: 88,89% E: 83,37% VP-: 83,37%

A tabela 4 representa a comparação dos resultados obtidos durante o período de seguimento para cada paciente, sendo o caso representado por um número (N=22). Foram avaliados como parâmetros clínicos durante o seguimento: infecção ativa por CMV e HHV-6, doença CMV, alterações laboratoriais (hemograma, enzimas hepáticas, e outras alterações), manifestações clínicas, infecções oportunistas e a ocorrência de rejeição do enxerto. Foram avaliadas também a correlação dos resultados dos testes com as complicações durante a evolução dos pacientes (tabela 5).

Tabela 4. Resultado comparativo dos métodos

N=22	Sorologia CMV	AGM CMV	PCR CMV	AGM HHV-6	PCR HHV-6
1	IgG +/IgM -	-	154	28, 35,49,70, 84	35,49,70,105, 154,203
2	IgG +/IgM -	-	69,83	-	-
3	IgG +/IgM -	35	48,69	7, 21, 28, 35, 48, 55, 69, 76, 97, 111, 170, 201, 233, 263	7, 21, 28, 35, 48, 76, 97, 111, 170
4	IgG +/IgM -	43	43, 93	0, 43, 83	93, 121
5	IgG +/IgM -	-	16	-	-
6	IgG +/IgM -	-	45, 59	23, 69, 78, 86	7, 23, 78, 86
7	IgG +/IgM -	-	37, 51, 65, 72	-	37
8	IgG +/IgM -	-	29	29, 57	29, 57, 71, 169
9	IgG +/IgM -	32, 39	25, 32, 39, 137	4, 11, 25, 32, 39	4, 11, 32, 39
10	IgG +/IgM -	-	14, 21, 28, 35, 42, 77, 42, 77	0, 14, 21	14, 21, 28, 42, 77
11	IgG +/IgM -	-	19, 28, 33, 40, 47	-	19, 89, 93
12	IgG +/IgM -	-	54	54	54
13	IgG +/IgM -	60	32, 46, 60, 74	-	18
14	IgG +/IgM -	-	48, 62, 111	-	-
15	IgG ?/IgM?	-	27	-	-
16	IgG +/IgM -	25, 35	34	-	-
17	IgG +/IgM -	-	13	-	-
18	IgG +/IgM -	12	17, 24, 31	-	-
19	IgG +/IgM -	-	48, 62	-	-
20	IgG +/IgM -	-	-	-	-
21	IgG +/IgM -	92	-	-	-
22	IgG +/IgM -	38	17, 38, 45, 52, 59	-	-

IgG e IgM, imunoglobulinas específicas G e M (sorologia pré-transplante para o CMV), os números correspondem aos dias pós-operatórios em que os testes apresentaram resultados positivos, o sinal (+) equivale a resultados negativos, o símbolo (?) significa ausência de resultado ou teste não realizado e o sinal (?) significa que não eram conhecidas as sorologias pré-transplante. Números em azul correspondem a testes positivos para CMV e HHV-6 concomitantemente.

Dos 22 pacientes, 15 (68,18%) apresentaram infecção ativa por CMV, 9 (40,90%) apresentaram infecção ativa por HHV-6, sendo que 4 (18,18%) apresentaram infecção concomitante por ambos os vírus e 1 (4,54%) paciente apresentou infecções ativas subsequentes. No total, foram 19 em 22 (86,37%) casos de infecção ativa por CMV ou HHV-6 (Gráfico 1), levando ainda em consideração que testes para o HHV-6 não foram realizados em 6 pacientes por problemas operacionais.

Infecção Ativa Detectada (N=22)

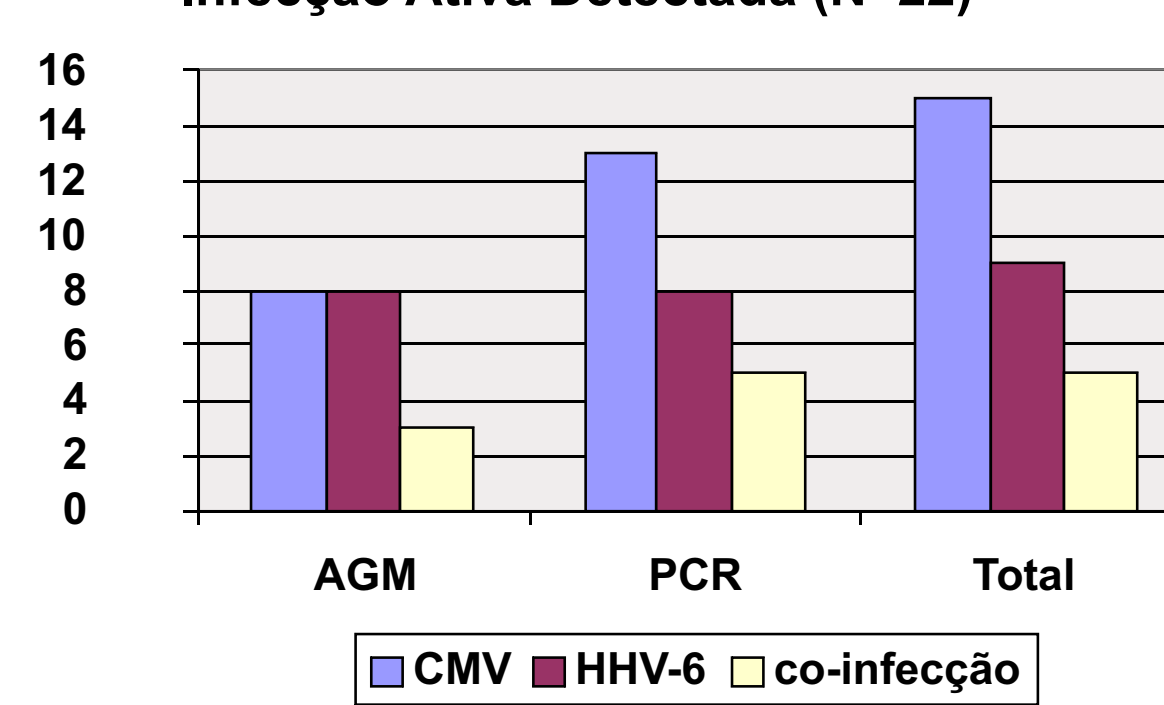


Gráfico 1. Infecção Ativa Detectada pelos métodos de PCR e AGM

**Rejeição:** 5 pacientes apresentaram episódios de rejeição aguda do enxerto confirmada por biópsia, sendo que todos tiveram detecção de algum dos vírus estudados no mesmo período do episódio, ou em períodos muito próximos.

**Doença CMV/HHV-6:** Em relação a doença causada por CMV ou HHV-6, não observamos nenhuma apresentação clínica atribuível exclusivamente a infecção por algum dos agentes.

**Infecção:** Nos primeiros três meses de acompanhamento, estas se mostraram frequentes, provavelmente decorrentes do procedimento cirúrgico e do estado geral dos pacientes. 11 dos 22 pacientes apresentaram, neste período, infecções manifestas ou culturais positivas.

**Alterações laboratoriais:** Nesta casuística, foram onipresentes alterações laboratoriais de hemograma e de enzimas hepáticas. Estas alterações dificultaram um nexo causal em relação às infecções ativas pelos vírus estudados, não sendo identificado nenhuma manifestação laboratorial das infecções por estes vírus, pois ao longo do seguimento de cada paciente estas alterações mantinham-se presentes com certa constância, com flutuações pequenas e/ou próximas dos limites de normalidade.

**Outras complicações:** Durante o seguimento foram observados outros eventos, como desenvolvimento de neoplasias e distúrbios tromboticos. 2 pacientes apresentaram febre e trombose vascular sendo que um caracterizado como trombose de ramo de artéria hepática e o segundo paciente apresentou trombose de veia cava inferior. 1 paciente apresentou dor abdominal e febre na vigência de infecção ativa por CMV, sendo submetido a colocação de prótese endobiliar anteriormente ao quadro. 1 paciente apresentou aumento de transaminases associado a dor abdominal na vigência de infecção ativa por CMV (41 dias pós-transplante), apresentando neste mesmo momento, sorologias IgG e IgM positivas para Epstein-Barr virus (EBV), sendo que a sorologia para EBV pré-transplante era IgG positiva com IgM negativa. 2 pacientes apresentaram alteração ultrassonográfica de fígado na vigência de infecção ativa por CMV e CMV/HHV-6, respectivamente, sendo que no primeiro caso foi interrogado cisto hepático ou coleção de bile(biloma) no lobo hepático esquerdo, e no segundo caso foi caracterizado coleção líquida em hilo hepático.

1 paciente desenvolveu GIST colorretal e 1 paciente foi submetido a exérese de carcinoma espinocelular que se desenvolveu em região pré-auricular direita. 1 paciente foi internado no 11º mês com perda de peso importante (de etiologia a esclarecer), recebendo alta com melhora do quadro nutricional. Este paciente apresentou no mês anterior, alteração hepática compatível com hemangioma capilar hepático. Um paciente apresentou episódio de hemorragia digestiva alta por ruptura de variz esofágica, evidenciando-se trombose de veia porta, no 10º mês de seguimento, sendo submetido a desconexão ázigo-portal. Outro paciente evoluiu com diabetes mellitus de difícil controle com diversas crises de hiperglicemia, que melhorou após mudança da medicação imunossupressora (tacrolimus para ciclosporina) e de esquema de insulinização. Um paciente apresentou ascite refratária, devido descompensação devido a pansinusite crônica agudizada. Apresenta também doença celíaca e no mesmo período (4º mês de seguimento), apresentou um quadro de eczema numular. Este paciente apresentou como causa de cirrose, hepatite auto-imune. Um paciente evoluiu com estenose de anastomose biliar no 4º mês, sendo submetido a correção cirúrgica.

**Óbitos:** Nesta casuística ocorreram dois óbitos, sendo que o primeiro foi decorrente de falência múltipla de órgãos após longo período de sepse em tratamento intensivo. O segundo óbito foi decorrente de metástases múltiplas de carcinoma hepatocelular recidivante, paciente que havia sido transplantado por apresentar cirrose hepática por vírus da hepatite C e carcinoma hepatocelular.

**Evolução a longo prazo (tabela 6):** embora não estivesse entre os objetivos deste trabalho, foi realizado seguimento de longo prazo de alguns pacientes. Esta observação revelou que complicações tardias são frequentes, principalmente relacionados ao enxerto. Foram observados que 10 dos 22 pacientes apresentaram sinais de esteatose hepática ou hepatopatia crônica em algum momento do seguimento. Dois destes pacientes evoluíram ao óbito, sendo que ao final deste trabalho, 6 pacientes apresentavam sinais de esteatose hepática e 3 pacientes apresentavam sinais de hepatopatia crônica. 2 pacientes evoluíram com recidiva viral nos enxertos. 1 destes pacientes (reinfectado por vírus da hepatite B) também apresentou quadro de rejeição aguda no 29º mês de seguimento, e um quadro de diarreia acompanhado de febre. O outro paciente apresentou recidiva por HCV no 14º mês, um episódio de rejeição aguda neste mesmo período, apresentou trombose de veia porta com transformação cavernomatosa no 16º mês e evoluiu para hepatopatia crônica. Dois pacientes evoluíram com estenose da anastomose biliar sendo submetidos a cirurgia de derivação biliodigestiva. 2 pacientes apresentaram biópsias hepáticas sugestivas de infecção por CMV, um em investigação de rejeição aguda grave porém com PCR para CMV negativo nesta ocasião, e outro com sinais de hepatopatia crônica, porém com estudo imunohistoquímico negativo para CMV no tecido hepático. 1 paciente apresentou quadro de conjuntivite pseudomembranosa viral bilateral, acompanhado pelo serviço de oftalmologia do HC, que se resolveu no 15º mês de seguimento.

Tabela 6. Evolução a longo prazo

Paciente	EVOLUÇÃO A LONGO PRAZO
1	Seguimento 39 meses;
2	18º mês: rejeição aguda grave, biópsia compatível com infecção CMV (PCR-);34º mês: hepatopatia crônica
3	14º mês: esteatose leve;
4	15º mês: apresentou conjuntivite pseudomembranosa viral; 22º mês: submetido a hemiorrafia incisional
5	15º mês: estenose anastomose biliar, submetido a derivação biliodigestiva em Y de Roux; 37º mês: esteatose leve;
6	26º mês: otite média com perfuração timpânica;
7	29º mês: dor abdominal + diarreia + febre, rejeição aguda leve, esteatose leve, reinfecção por HBV no enxerto;
8	14º mês: hepatopatia crônica por HCV recidivada no enxerto, rejeição aguda leve; 16º mês: trombose porta + transformação cavernomatosa; 33º mês: hepatopatia crônica;
9	Seguimento 12 meses;
10	13º mês: hepatopatia crônica com alterações sugestivas de infecção por CMV, porém imunohistoquímica negativa; 22º mês: derivação biliodigestiva por estenose de anastomose biliar, esteatose leve;
11	Óbito
12	Seguimento 12 meses;
13	Seguimento 13 meses;
14	Seguimento 12 meses;
15	Seguimento 12 meses;
16	14º mês: esteatose leve;
17	Óbito
18	Seguimento 12 meses;
19	Seguimento 13 meses;
20	Seguimento 12 meses;

Pacientes que apresentaram complicações durante o seguimento a longo prazo. Pacientes que apresentem o tempo total de seguimento não apresentaram complicações durante este seguimento de longo prazo.

## 6 - DISCUSSÃO

Em relação ao método padronizado para a antigenemia para HHV-6, embora não realizado em todos os pacientes por questões operacionais do laboratório, se mostrou superior ao método padronizado anteriormente para o CMV, sendo a sensibilidade de 88,89% e especificidade de 83,37%, contra sensibilidade de 41,67% e especificidade de 70%, indicando ser um teste razoável, permanecendo os testes de reação em cadeia de polimerase (PCR) como padrão-ouro. Os resultados destes testes aplicados em amostras dos pacientes seguidos nos mostram, confirmando dados da literatura, a grande importância destes agentes como causadores de morbidade em pacientes transplantados hepáticos, pela sua alta prevalência nesta população, e associação tanto com complicações infecciosas quanto à rejeição do enxerto. Em nossa casuística, a detecção da infecção ativa se concentrou nos primeiros três meses de seguimento, período importante de adaptação pós-operatória em que o controle da imunossupressão é crítico, sendo que para o CMV, o início da detecção ativa ocorreu cerca de 43,5 dias após o transplante, enquanto que para o HHV-6, o início foi cerca de 26,44 dias após o transplante, apresentando uma tendência do herpesvírus humano 6 causar uma infecção ativa mais precoce que o CMV.

## 7 - CONCLUSÃO

Este trabalho confirma os dados de literatura quanto à correlação dos vírus estudados e a morbi-mortalidade associada ao período pós-transplante hepático. Em relação aos objetivos deste trabalho, a padronização para a antigenemia para o HHV-6 foi realizada, e obteve-se sucesso quanto à detecção por este método. Para o CMV, este estudo demonstrou uma maior sensibilidade do método de PCR, enquanto a antigenemia se mostrou com razoável especificidade para a infecção ativa. Para o HHV-6, o método padronizado se mostrou ter boa sensibilidade e especificidade com valores preditivos razoáveis. A avaliação do impacto clínico deve ser aprofundada para que se possa criar um panorama mais claro das relações de morbi-mortalidade, através de estudos prospectivos. Não houve definição de quadros clínicos claros atribuíveis ao HHV-6 nesta casuística.

Tabela 5: Seguimento vs resultados

CMV	HHV-6	HHV-5	CMV/HHV-6	HHV-6	HHV-5	HHV-6	HHV-5	HHV-6	GIST	Rejeição	Doença Celíaca	Diabetes Mellitus	ECZEMA	Trombose	Estenose	Hemangioma	Infecção	Óbito	
1	+	+	+	+	+	+	+	+											
2	+	+	+	+	+	+	+	+											
3	+	+	+	+	+	+	+	+											
4	+	+	+	+	+	+	+	+											
5	+	+	+	+	+	+	+	+											
6	+	+	+	+	+	+	+	+											
7	+	+	+	+	+	+	+	+											
8	+	+	+	+	+	+	+	+											
9	+	+	+	+	+	+	+	+											
10	+	+	+	+	+	+	+	+											
11	+	+	+	+	+	+	+	+											
12	+	+	+	+	+	+	+	+											
13	+	+	+	+	+	+	+	+											
14	+	+	+	+	+	+	+	+											
15	+	+	+	+	+	+	+	+											
16	+	+	+	+	+	+	+	+											
17	+	+	+	+	+	+	+	+											