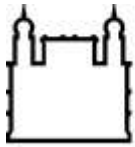


MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MULTIPLEX qPCR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DOS
VÍRUS DA SUBFAMÍLIA *BETAHERPESVIRINAE* EM PACIENTES COM FALÊNCIA
HEPÁTICA AGUDA SEM ETIOLOGIA DEFINIDA

JÉSSICA VASQUES RAPOSO

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Jéssica Vasques Raposo

MULTIPLEX qPCR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DOS
VÍRUS DA SUBFAMÍLIA *BETAHERPESVIRINAE* EM PACIENTES COM FALÊNCIA
HEPÁTICA AGUDA SEM ETIOLOGIA DEFINIDA

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Imunologia e Patogenia.

Orientador (es): Prof. Dra. Vanessa Salete de Paula

RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2017

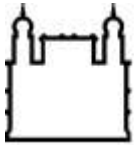
Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

R219 Raposo, Jéssica Vasques

Multiplex qPCR para detecção e quantificação simultânea dos vírus da subfamília *Betaherpesvirinae* em pacientes com falência hepática aguda sem etiologia definida / Jéssica Vasques Raposo. – Rio de Janeiro, 2017. xvii, 72 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017. Bibliografia: f. 58-65

1. Herpesvírus. 2. Falência hepática aguda. 3. qPCR. 4. Multiplex. 5. Hepatite. I. Título.
CDD 614.5812



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Biologia Parasitária

Jéssica Vasques Raposo

MULTIPLEX qPCR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DOS VÍRUS
DA SUBFAMÍLIA *BETAHERPESVIRINAE* EM PACIENTES COM FALÊNCIA HEPÁTICA
AGUDA SEM ETIOLOGIA DEFINIDA

ORIENTADOR (A): Prof. Dra. Vanessa Salete de Paula

Aprovada em: __/__/__

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Túlio Machado Fumian – Revisor e Presidente (FIOCRUZ/IOC/LVCA)

Prof.^a Dr. Otacílio da Cruz Moreira – Membro (FIOCRUZ/IOC/LBMD)

Prof.^a Dr.^a Tatiana Xavier de Castro - Membro (UFF)

Prof.^a Dr.^a Alexandra Rodrigues de Mendonca Favacho – Suplente (FIOCRUZ/IOC/LHR)

Prof.^a Dr.^a Ana Maria Viana Pinto - Suplente (UFF)

Rio de Janeiro, 23 de fevereiro de 2017.

**FICHA CATALOGRÁFICA A SER ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DE MANGUINHOS
PARA A VERSÃO FINAL DA TESE.**

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus por ter me concedido concluí-lo e a minha mãe por sempre ter me apoiado a alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus o primeiro amor da minha vida, por todas as oportunidades que me foram dadas e pela força de ter chegado até aqui. Sem Ele eu nada seria.

À minha mãe Maria das Graças, por toda essa vida ter sempre estado ao meu lado apoiando, construindo e vivendo meus sonhos comigo. Obrigado por mesmo nos momentos mais difíceis ter me mostrado que seria possível enfrentar, toda sua força e garra sempre foram meus espelhos para que eu chegasse até aqui. Tudo que sou hoje devo a você, mãe. Eu amo você. Obrigada!

A minha família que sempre com toda admiração entendeu e torceu por mim em todas as minhas conquistas profissionais. Obrigada, amo vocês!

Aos meus amigos por torcerem sempre por mim e estarem comigo em todos os momentos. Obrigada, por sempre fazerem parte de cada capítulo da história da minha vida. Amo cada um de vocês!

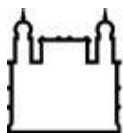
À minha orientadora Dra. Vanessa de Paula, por ser sempre essa pessoa maravilhosa, por todos esses anos de aprendizagem, crescimento profissional e pessoal. Obrigada por sempre me incentivar a seguir a diante!

Aos meus companheiros do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, em especial ao Arthur que durante esses anos sempre esteve do meu lado torcendo por mim e me ajudando, a Nathália que está comigo desde o primeiro período da faculdade e graças a Deus e a vida podemos seguir o mesmo rumo profissional e a Fernanda que mesmo em tão pouco tempo se tornou uma pessoa mais que especial na minha vida.

Agradeço também ao Dr. Marcelo Alves Pinto, que representa o nosso laboratório, por todo conhecimento compartilhado todo esse tempo. À todos os colegas de trabalho. Obrigada!

Ao Instituto Oswaldo Cruz/IOC e a Pós-graduação em Biologia Parasitária por me fornecerem mais uma oportunidade de fazer parte deste grande instituto de pesquisa científica, me proporcionando a chance de ter um aprendizado de excelência e experiência, que levarei comigo pelo resto da minha vida profissional. Além disso, obrigada por me fornecer a oportunidade de colaborar na construção da ciência de nosso país! À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ pelo auxílio financeiro. Obrigada!

“A alegria que se tem em pensar e aprender faz-nos
pensar e aprender ainda mais.” (Aristóteles)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

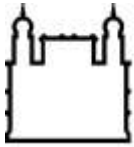
MULTIPLEX qPCR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DOS VÍRUS DA SUBFAMÍLIA *BETAHERPESVIRINAE* EM PACIENTES COM FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA SEM ETIOLOGIA DEFINIDA

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Jéssica Vasques Raposo

Os Betaherpesvírus são comuns em todo o mundo, com prevalência de 70-80% em indivíduos adultos. A infecção pelos Betaherpesvírus pode ser assintomática e passar despercebida, mas o vírus pode permanecer latente até que uma deficiência imunológica do hospedeiro favoreça sua reativação. Os Betaherpesvírus estão relacionados a diversas doenças. O HCMV, o HHV-6 A/B e o HHV-7 já foram relatados em casos de pacientes com falência hepática aguda (FHA). O mau prognóstico da evolução para hepatite nos casos de herpes está associado ao diagnóstico tardio e ao atraso no tratamento específico com terapia antiviral. Portanto, a necessidade de um diagnóstico precoce para iniciar a terapia é evidente. Para a detecção e quantificação dos Betaherpesvírus foi otimizado a qPCR multiplex e curvas sintéticas padrões foram utilizadas para quantificação da carga viral em amostras de soro e fígado de pacientes com FHA sem etiologia definida. No total, 25,7% (9/35) das amostras foram positivas para pelo menos um dos Betaherpesvírus, seis foram positivos para o fígado e três para o soro. Além disso, houveram duas co-infecções com mais de um Betaherpesvírus. As amostras que foram positivas no qPCR monoplex, também foram positivas no qPCR multiplex mostrando que é possível realizar apenas uma PCR em tempo real para detectar e diferenciar os Betaherpesvírus. Análises bioquímicas foram realizadas e houve um aumento nas enzimas hepáticas ALT, AST, GAMA-GT e Fosfatase Alcalina nas amostras de FHA positivas para os Betaherpesvírus em comparação com as amostras de FHA negativas e controles. A positividade das amostras ressalta a associação dos Betaherpesvírus a FHA. Assim, o diagnóstico diferencial para os Betaherpesvírus em caso de FHA pode auxiliar para uma terapêutica farmacológica adequada, poupando o paciente do transplante e o sistema da saúde dos custos a este relacionados.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MULTIPLEX qPCR FOR SIMULTANEOUS DETECTION AND QUANTIFICATION OF BETAHERPESVIRINAE FROM PATIENTS WITH ACUTE LIVER FAILURE OF UNKNOWN ETIOLOGY

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITIC BIOLOGY

Jéssica Vasques Raposo

Betaherpesviruses are common worldwide, with a prevalence of 70-80% in adult individuals. Betaherpesvirus infection may be asymptomatic, but the virus may remain dormant until a host immune deficiency favors its reactivation. Betaherpesviruses are related to several diseases. HCMV, HHV-6 A / B and HHV-7 have been reported in patients with acute liver failure (FHA). The poor prognosis of progression to hepatitis in cases of herpes is associated with late diagnosis and delay in specific treatment with antiviral therapy. Therefore, the need for an early diagnosis to initiate therapy is evident. For the detection and quantification of Betaherpesvirus the multiplex qPCR was optimized and standard synthetic curves were used to quantify viral load in serum and liver samples from FHA patients with no defined etiology. In total, 25.7% (9/35) of the samples were positive for at least one of the Betaherpesviruses, six were liver positive and three were serum positive. In addition, there were two co-infections with more than one Betaherpesvirus. Samples that were positive in the monoplex qPCR were also positive in the multiplex qPCR showing that it is possible to perform only a real-time PCR to detect and differentiate Betaherpesviruses. Biochemical analyzes were performed and there was an increase in liver enzymes ALT, AST, GAMA-GT and Alkaline Phosphatase in FHA-positive samples for Betaherpesvirus compared to negative FHA samples and controls. The positivity of the samples highlights the association of Betaherpesvirus to FHA. Thus, the differential diagnosis for Betaherpesvirus in the case of FHA can aid in adequate pharmacological therapy, saving the patient of the transplantation and the health system of the costs related to it.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 Vias de entrada dos Betaherpesvírus.....	4
Figura 1.2 Estrutura morfológica do HCMV.....	6
Figura 1.3 Organização genética citomegalovírus humano (HCMV).....	8
Figura 1.4 Manifestação de uma infecção na garganta por Citomegalovírus conhecida como citomegalomononucleose.....	10
Figura 1.5 Características ultraestruturais de HHV-6 e HHV-7 cultivadas em sangue de cordão umbilical humano.....	13
Figura 1.6 Roséola infantum.....	16
Figura 4.1 Resultado da otimização das curvas padrões.....	36
Figura 4.2 Padronização da qPCR multiplex para os Betaherpesvírus.....	37
Figura 4.3 Árvore Filogenética da região genômica Dpol (120 nt) inferida usando o método de Neighbor- Joining.....	44

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 3.1 Relação das amostras de soro e tecido testadas dos pacientes com FHA.....	22
Tabela 3.2 Sequências das curvas sintéticas padrões para quantificação dos Betaherpesvírus.....	25
Tabela 3.3. Sequência de oligonucleotídeos para busca de similaridade das regiões do HCMV utilizadas em trabalhos anteriores.....	26
Tabela 3.4. Sequência de oligonucleotídeos para busca de similaridade das regiões do HHV-6 utilizadas em trabalhos anteriores.....	27
Tabela 3.5. Sequência de oligonucleotídeos para busca de similaridade das regiões do HHV-7 utilizadas em trabalhos anteriores.....	28
Tabela 3.6 Sequências de iniciadores, sondas utilizados na PCR em tempo real para detecção e quantificação do Betaherpesvírus.....	29
Tabela 3.7 Termociclagem referente à PCR em tempo real para detecção e quantificação dos Betaherpesvírus.....	29
Tabela 3.8 Sequências de iniciadores utilizados na primeira etapa da PCR <i>Nested</i>	30
Tabela 3.9. Termociclagem referente à primeira etapa da PCR <i>Nested</i>	31
Tabela 3.10. Sequências dos iniciadores referentes à segunda etapa da PCR <i>Nested</i>	31
Tabela 3.11. Termociclagem referente à segunda etapa da PCR <i>Nested</i>	32
Tabela 4.1 Parâmetros das curvas padrões utilizadas para quantificar os Betaherpesvírus.....	35
Tabela 4.2 Média de Ct e desvio padrão e CV % da análise de sensibilidade para cada Betaherpesvírus....	38
Tabela 4.3 Análise de especificidade do qPCR para detecção e quantificação dos betaherpevírus.....	38
Tabela 4.4 Descrição do gênero da população geral de estudo.....	39
Tabela 4.5 Descrição da população β -Herpesvírus positiva.....	40
Tabela 4.6 Comparação da detecção dos Betaherpesvírus (Ct) das amostras de falência hepática aguda de soro e fígado no qPCR monoplex e multiplex.....	41
Tabela 4.7 Comparação da quantificação (Carga viral – cópias/mL) dos Betaherpesvírus (Ct) das amostras de falência hepática aguda de soro e fígado no qPCR monoplex e multiplex.....	41
Tabela 4.8 Avaliação do gene de RNase P humano como um controle interno endógeno de amplificação no T multiplex para Betaherpesvírus.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 4.1 Comparação das amostras de FHA de soro e fígado positivas para o HCMV, HHV-6 e HHV-7.....	42
Gráfico 4.2 Comparação dos níveis de AST entre as populações de estudo.....	45
Gráfico 4.3 Comparação dos níveis de ALT entre as populações de estudo.....	46
Gráfico 4.4 Comparação dos níveis de FA entre as populações de estudo.....	47
Gráfico 4.5 Comparação dos níveis de GAMA-GT entre as populações de estudo.....	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Por cento
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µM	Micromolar
A	Adenina
B	Beta
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Citosina
CPE	Efeito citopático
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Dinucleotídeos trifosfatados
DP	Desvio-padrão
DPOL	Gene que codifica a DNA polimerase dos Herpesvírus humanos
EBV	Vírus Epstein-Barr
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ES	Exantema Súbito
FDA	Food and Drug Administration
FHA	Falência Hepática Aguda
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Força gravitacional
g	Gramas
G	Guanina
gB	Glicoproteína B
gD	Glicoproteína D
gH	Glicoproteína H
gL	Glicoproteína L
HCMV	Citomegalovírus humano
HHV-6	Herpesvírus Humano 6
HHV-6A	Herpesvírus Humano 6A
HHV-6B	Herpesvírus Humano 6B
HHV-7	Herpesvírus Humano 7

HSV-1	Vírus herpes simples 1
HSV-2	Vírus herpes simples 2
ICTV	International Comittee for Víruses Taxonomy
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
kb	Quilobase
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NT	Neutralização
NTC	No template control
pb	Pares de bases
PCR	Polimerase chain reaction ou reação em cadeia da polimerase
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
qPCR	Quantitative Polimerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RJ	Estado do Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
T	Timina
TAE	Tris Acetato EDTA
TK	Timidina quinase
U	Unidade
UNG	Uracil-N-glicosilase
VP23	Proteína do capsídeo do vírion dos HHV-6A e HHV-6B

ÍNDICE

Agradecimentos.....	vi
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Falência Hepática Aguda (FHA) e suas etiologias.....	1
1.2 Subfamília Betaherpesvirinae.....	3
1.3 Replicação da subfamília Betaherpesvirinae.....	4
1.4 Citomegalovírus	5
1.4.1 Histórico	5
1.4.2 Classificação e morfologia.....	5
1.4.3 Organização do Genoma.....	6
1.4.4 Transmissão e manifestações clínicas	9
1.4.5 Diagnóstico	10
1.4.6 Epidemiologia	11
1.4.7 Prevenção e Controle	12
1.5 <i>Roseolovírus</i> : Herpes Vírus Humano 6 (HHV-6A e HHV-6B) e Herpes Vírus Humano 7 (HHV-7).....	12
1.5.1 Histórico	12
1.5.2 Classificação e morfologia.....	13
1.5.3 Organização do Genoma.....	14
1.5.4 Transmissão e Manifestações Clínicas	14
1.5.5 Diagnóstico.....	16
1.5.6 Epidemiologia	17
1.5.7 Prevenção e Controle.....	17
1.6 Justificativa	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Aspectos éticos da pesquisa.....	21

3.2 Seleção de pacientes.....	21
3.3 Coleta das amostras.....	21
3.4 Extração do DNA dos Betaherpesvírus em amostras de soro	23
3.5 Extração do DNA dos Betaherpesvírus em amostras de fígado	24
3.6 Detecção e quantificação por PCR em tempo real.....	24
3.6.1 Validação da Curva Sintética.....	24
3.6.2 PCR em tempo real para detecção e quantificação dos Betaherpesvírus	25
3.7 Controle interno de referência Ribonuclease P (RNase P)	29
3.8 Pan PCR convencional para detecção dos Betaherpesvírus.....	30
3.9 Sequenciamento do genoma dos Herpesvírus humanos e análise filogenética	33
3.10 Análise Bioquímica das amostras	34
3.11 Análise Estatística.....	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Otimização das curvas sintéticas padrão.....	35
4.2 Otimização da PCR em tempo real para detecção e quantificação dos Betaherpesvírus	37
4.3 Análise de precisão, reprodutibilidade e especificidade da qPCR multiplex para os Betaherpesvírus	38
4.4 Descrição da população de estudo.....	39
4.5 Detecção e quantificação dos Betaherpesvírus por qPCR multiplex.....	40
4.6 Controle endógeno interno (RNase P)	42
4.7 Detecção de Betaherpesvírus por Pan-Herpesvírus.....	43
4.8 Sequenciamento e Análise Filogenética.....	43
4.9 Avaliação de Aspartato aminotransferase (AST)	45
4.10 Avaliação de Alanina aminotransferase (ALT)	46
4.11 Avaliação de Fosfatase Alcalina (FA)	47
4.12 Avaliação de Gama-Glutamil Transferase (GAMA-GT).....	48
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO	56

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8. ANEXOS	67
Anexo 1 – Projeto submetido ao comitê de ética em pesquisa	67

Introdução

1.1 Falência Hepática Aguda (FHA) e suas etiologias

De acordo com o ministério da saúde, as hepatites virais são doenças provocadas por diferentes agentes etiológicos, com tropismo primário pelo fígado, que apresentam características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais distintas. Existem diferentes formas de manifestações clínicas de hepatite como, forma aguda, crônica ou fulminante, também denominada de falência hepática aguda. A falência hepática aguda (FHA) é definida como uma lesão aguda e grave, em pacientes sem doença hepática prévia, sendo de mau prognóstico (Strauss, 2011). Trey e Davidson, em 1970, propuseram a definição mais amplamente aceita, pela qual a FHA se manifesta com o desenvolvimento de encefalopatia no período de oito semanas desde o início da doença. A apresentação clínica vai depender da severidade e da etiologia do dano hepático. Sintomas inespecíficos como náuseas, vômitos e desconforto abdominal poderão ser as apresentações iniciais dos pacientes com FHA (Fonseca-Neto, 2008). Os resultados dos testes de função hepática e coagulação indicarão a severidade da agressão no fígado. Praticamente, todos os sistemas são acometidos direta ou indiretamente pela FHA. Ela pode apresentar encefalopatia, coagulopatia, alteração cardiovascular e nefrometabólica (Strauss, 2011).

Além das manifestações clínicas, marcadores bioquímicos também são fatores importantes para o diagnóstico da doença (Saúde, 2007). As aminotransferases transaminases – a aspartato aminotransferase (AST) e a alanino aminotransferase (ALT) são marcadores de agressão hepatocelular. Nas formas agudas, chegam a atingir, habitualmente, valores até 25 a 100 vezes acima do normal. A Fosfatase alcalina (FA) está presente predominantemente no fígado, tanto nos ductos biliares como próxima à membrana biliar dos hepatócitos. A FA possui maiores alterações nas hepatites por vírus em formas colestáticas, quando se apresenta em níveis elevados. A Gama-glutamilttransferase (GAMA-GT) está presente no fígado, tanto em epitélio biliar quanto em hepatócitos, e em outros órgãos, como pâncreas e rins. A GAMA-GT é a enzima mais relacionada aos fenômenos colestáticos, sejam intra e/ou extra-hepáticos e assim como a FA possui uma elevação discreta em hepatites virais, exceto nas formas colestáticas (Saúde, 2007).

A investigação criteriosa de todos os possíveis agentes etiológicos de FHA, entretanto, nem sempre é bem sucedida, e cerca de 40% a 50% dos casos ficam sem

etiologia determinada (Strauss, 2011). Entre os vírus classicamente hepatotrópicos, estão os vírus das hepatites com via de transmissão entérica como o vírus da hepatite A (HAV) e vírus da hepatite E (HEV) que podem estar associados com casos de hepatite fulminante com falência hepática (Al Midani *et al.*, 2011). Contudo, formas agudas e fulminantes de hepatite também podem estar associadas aos vírus da família *Herpesviridae* (Abbo *et al.*, 2007).

Os vírus da família *Herpesviridae* que estão relacionados a casos de hepatites são o Citomegalovírus Humano (HCMV) ou Herpesvírus Humano 5; Vírus do Epstein-Barr (EBV) ou Herpesvírus Humano 4; Herpes vírus simples (HSV) ou Herpesvírus Humano 1 e 2; vírus varicela-zoster (VZV) ou Herpesvírus Humano 3 e Herpesvírus Humano 6 (HHV-6). Todos são vírus de DNA que induzem doença por destruição direta dos tecidos, causando uma resposta imunológica e patológica, e/ou facilitando a transformação neoplásica (Cisneros-Herreros e Herrero-Romero, 2006). A hepatite é causada principalmente pelo efeito citopático direto do Herpesvírus. Os Herpesvírus têm tropismo celular específico, os hepatócitos não são células-alvos, a hepatite não é, por conseguinte, uma manifestação característica de infecção por essa família. Todos os Herpesvírus induzem o hospedeiro após a infecção primária com infecção latente por toda vida. Por se manter no organismo do hospedeiro, os Herpesvírus podem desencadear doenças, incluindo hepatite. O tipo de infecção e o estado imunológico do paciente determinam a incidência e gravidade das manifestações clínicas da doença. A morbimortalidade da hepatite é mais elevada na infecção primária e em pacientes imunodeprimidos (Cisneros-Herreros e Herrero-Romero, 2006).

A hepatite causada por HCMV é uma manifestação comum de mononucleose, a causa mais comum da infecção por HCMV primária na população imunocompetente. Essa infecção auto-limitante que afeta adultos jovens (faixa de 18-66), se manifesta por febre prolongada e hepatite leve. A Hepatite por HCMV também afeta crianças com um curso autolimitado (Shibata *et al.*, 2005). Em pacientes imunocomprometidos a infecção por HCMV causa aumento da morbidade, especialmente em receptores de transplantes de órgãos. Nestes pacientes, a hepatite por HCMV ocorre de três formas principais: hepatite leve, aguda e hepatite em transplante hepático (Cisneros-Herreros e Herrero-Romero, 2006).

A infecção primária por HHV-6 pode ser uma causa frequente de hepatite, no caso de FHA não-A - não-E. Em um estudo de 15 casos, FHA por HHV-6 foi encontrada em 12 (80%) deles com nenhum outro diagnóstico alternativo (Harma *et al.*, 2006). Em receptores

de transplante, a reativação do vírus ocorre no fígado durante o primeiro mês em 50% dos receptores, e tem sido associada a vários quadros de febre, erupção cutânea, encefalite e hepatite. No caso de FHA em receptores de transplante pode ocorrer à rejeição do fígado (De Bolle *et al.*, 2005). Pelas características em comum com o HHV-6, acredita-se que o HHV-7 pode contribuir para o desenvolvimento de síndrome de hipersensibilidade induzida por fármacos, e causar hepatite, e, além disso, pode reativar o EBV. As complicações resultantes de infecção por HHV-7, também têm demonstrado ser um fator em transplantes de órgãos (De Bolle *et al.*, 2004).

1.2 Subfamília *Betaherpesvirinae*

Betaherpesvirinae é uma subfamília pertencente à família *Herpesviridae*. Os *betaherpevírus* são caracterizados por terem reprodução mais lenta do que outras subfamílias Herpesvírus (aproximadamente sete dias), além de causarem um efeito citopático (CPE) de citomegalia nas células que são infectadas (Fields *et al.*, 2007). Os vírus da subfamília *Betaherpesvirinae* estabelecem latência em glândulas secretoras, células linfocitárias, rins e outros tecidos. Diferentemente da subfamília *Alphaherpesvirinae*, a qual estabelece latência em neurônios, e a *Gamaherpesvirinae* que estabelece latência nas células do sistema imunológico, tais como células B (Griffiths, 2004; Das e Pellett, 2011).

A subfamília *betaherpesvirinae* apresenta um maior nível de divergência evolutiva e genética do que qualquer Herpesvírus alfa ou gama. Esta situação representa um desafio para os pesquisadores que tentam entender a biologia do vírus (Mocarski, 2002). Todos os *Betaherpesvírus* compartilham características comuns, incluindo aparência de micrografias eletrônicas, um ciclo de replicação prolongada em cultura celular, especificidade em espécies hospedeiras e um tropismo para células hematopoiéticas diferenciadas e tipos de células epiteliais (Griffiths, 2004).

A subfamília *Betaherpesvirinae* é composta pelo Citomegalovírus Humano (HCMV) também conhecido como Herpes Vírus Humano 5 (HHV-5), Herpes Vírus Humano 6 (HHV-6A e HHV-6B) e Herpes vírus Humano 7 (HHV-7). Estes vírus foram recentemente reorganizados (Das e Pellett, 2011): Citomegalovírus conhecido como vírus de primatas e humanos CMV/HCMV; Betaherpesvírus causadores de roséola (vírus do herpes humano tipo 6B [HHV-6B]), bem como dois vírus filogeneticamente próximos (HHV-6A e HHV-7) (Das e Pellett, 2011).

1.3 Replicação da subfamília *Betaherpesvirinae*

Os vírus da subfamília *Betaherpesvirinae* apresentam como material genético dsDNA. A replicação dos Betaherpesvírus se inicia com a entrada do vírus na célula hospedeira através da fusão do envelope viral com a membrana plasmática desta célula (pH independente) ou da fusão do envelope viral com a membrana endocítica após a endocitose da partícula viral (pH dependente) (Figura 1.1) (Connolly *et al.*, 2011).

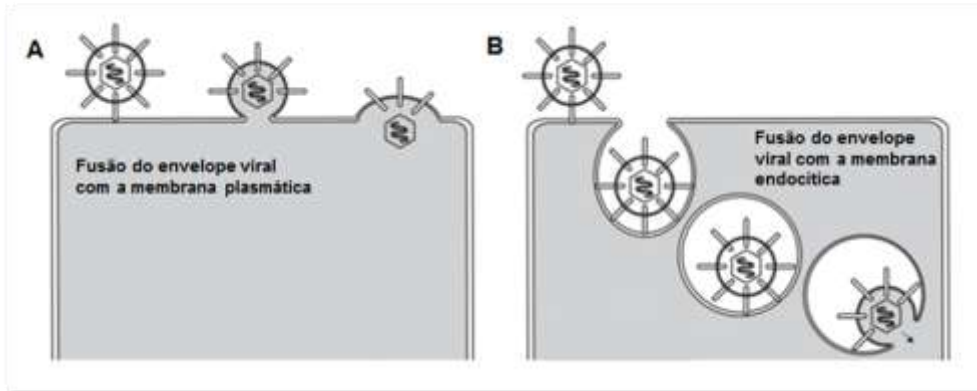


Figura 1.1. Vias de entrada dos Betaherpesvírus. Desenho esquemático mostrando os mecanismos de entrada dos Betaherpesvírus na célula hospedeira: por fusão com a membrana plasmática (A) e por fusão com a membrana endocítica (B). (Adaptado - Connolly *et al.*, 2011).

Entretanto, para que isso ocorra é necessário que haja a adsorção do vírus nesta célula através da interação das glicoproteínas virais com receptores celulares específicos (Connolly *et al.*, 2011), como as gB, gH e gL. Após isso, o poro de fusão é formado resultando na liberação do núcleocapsídeo viral e proteínas do tegumento no citoplasma da célula hospedeira (Connolly *et al.*, 2011). Estas proteínas do tegumento realizam as primeiras fases de replicação dos Betaherpesvírus, incluindo a inibição da síntese de proteínas da célula hospedeira e a ativação dos genes virais iniciais (Johnson e Baines, 2011). Por meio do sistema de microtúbulos, o núcleocapsídeo, é levado em direção à membrana nuclear e é desmontado, liberando o DNA viral no interior do núcleo através de seus poros (Johnson e Baines, 2011) onde, uma vez neste, rapidamente se torna circular (episoma).

A partir de então, inicia-se o processo de replicação viral no núcleo, com a expressão de genes iniciais, que codificam proteínas relacionadas à regulação gênica das próximas etapas de transcrição. Após isso, são expressos genes precoces, que, por sua vez, codificam proteínas relacionadas à replicação do genoma viral. Os últimos a serem expressos são os genes tardios, os quais codificam as proteínas estruturais dos

Betaherpesvírus, ou seja, as proteínas que formam o capsídeo, o tegumento e o envelope (glicoproteínas) (Paludan *et al.*, 2011).

1.4 Citomegalovírus

1.4.1 Histórico

A primeira infecção pelo Citomegalovírus (CMV) descrita foi nos primeiros anos do século XX através de inclusões intracelulares encontradas por histopatologistas em tecidos. Essas inclusões, por apresentarem aparência diferente pensou-se a princípio, resultar de um protozoário. Em 1910, foi proposto por um grupo de pesquisadores o *Entamoeba mortinatalium* como suposto agente. Em 1920, foi vista uma semelhança das inclusões produzidas por varicela, em cobaias com CMV, o qual foi transmitido por extratos de glândula salivar processados através de um filtro de Berkefeld N. Apesar destas duas evidências que sugerem uma etiologia viral, relatórios ainda estavam ocorrendo no final de 1940 atribuindo a doença a uma infecção por protozoários ainda não conhecidos. Em 1956, três laboratórios simultaneamente isolaram o CMV e obtiveram sucesso no desenvolvimento da tecnologia de cultura de células, de modo que a verdadeira natureza dos agentes infecciosos era aparente. Um destes três investigadores, Weller, nomeou o vírus a partir dos efeitos produzidos em cultura celular (citomegalia), de modo que CMV é o nome do seu efeito citopático (CPE) (Griffiths, 2004).

1.4.2 Classificação e morfologia

O ponto de partida para a classificação do CMV em seres humanos e outros animais é a biologia comparativa, características físico-químicas, e morfologia do virion. O CMV foi isolado a partir de uma ampla variedade de espécies de mamíferos, incluindo cavalos, cães, vacas e porcos, embora muitos não foram totalmente caracterizados (Hertel, 2014). O Citomegalovírus murino e o humano apresentam muitos atributos biológicos comuns na patogênese, imunomodulação e latência, mas exibem produtos de genes e mecanismos evolutivamente divergentes. Assim, continua a existir uma necessidade de investigação intensiva da infecção do CMV natural e imunidade (7).

O DNA do Citomegalovírus Humano (HCMV) está cercado por um capsídeo composto por 162 capsômeros, a qual cada um está em uma cavidade hexagonal em secção

transversal. O capsídeo é por sua vez rodeado por uma área delimitada, o tegumento, que é envolvido por um envelope (Griffiths, 2004) (Figura 1.2). Durante a infecção natural, o HCMV compromete células epiteliais e mielóides (monócitos / macrófagos e dendríticos), bem como fibroblastos e células endoteliais (Revello e Gerna, 2010). Esta característica está associada com um distinto compartimento citoplasmático de montagem viral (CA) composto de membranas celulares e organelas que suportam passos finais virais em maturação e liberação (Das e Pellett, 2011). Quando propagado em fibroblastos humanos, isolados clínicos de HCMV adquirem mutações sugerindo um processo de adaptação em cultura celular (Stanton *et al.*, 2010). A latência natural de HCMV ocorre na medula sanguínea – derivadas células hematopoiéticas, onde o DNA viral está presente em frequências muito baixas e carga viral de 2 a 10 equivalentes do genoma por célula (Bego e St Jeor, 2006). A condição viral precisa e a regulação do HCMV durante a infecção ao longo da vida continua a ser um tema de investigação ativa (Dolan *et al.*, 2004).

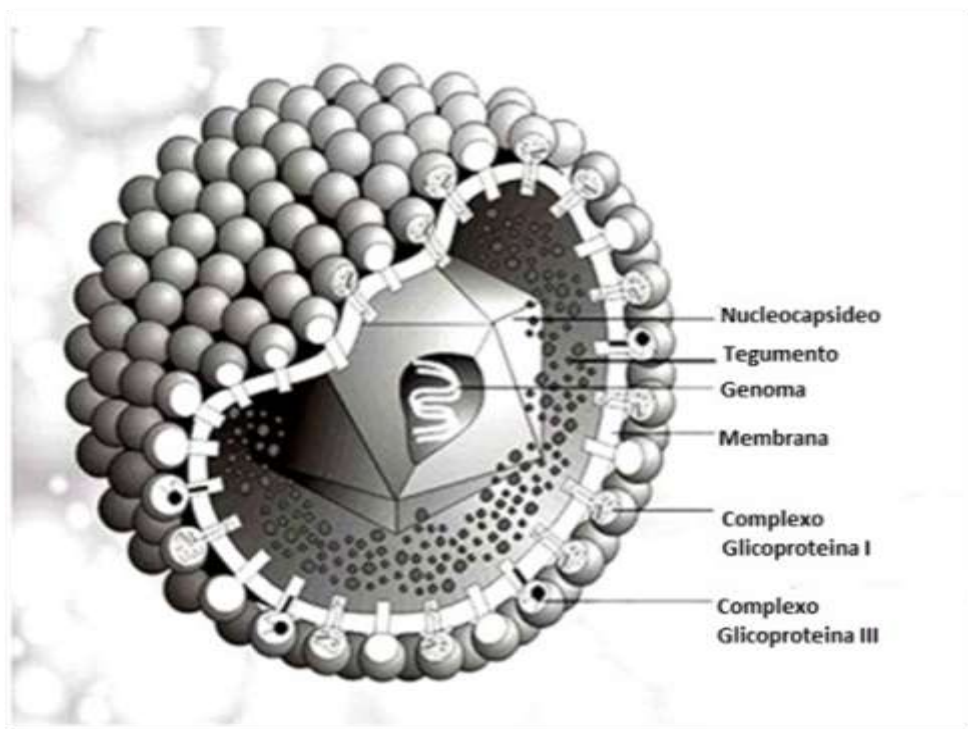


Figura 1.2 Estrutura morfológica do HCMV – Retirado de <http://www.virologyj.com> 22/05/2015.

1.4.3 Organização do Genoma

O genoma do HCMV é o mais caracterizado entre os Herpesvírus, com 236.000 pb com uma capacidade para codificar, pelo menos, 167 genes (Gatherer *et al.*, 2011). Outros Betaherpesvírus exibem um nível similar, ao passo que os *Roseolovírus* têm genomas menores que codificam aproximadamente 85 genes. Relações evolutivas entre

Betaherpesvírus emergem de comparações de sequências codificantes de proteína previstas e parecem seguir relações de espécies animais hospedeiros consistentes com longa co-evolução patógeno-hospedeiro (Mocarski, 2002). O genoma é composto por DNA linear, de cadeia dupla que consiste em duas regiões únicas, cada um flanqueado por repetições invertidas. A estrutura é representada como ab-UL-b'a'c'-US-ca, onde UL e US denotam as regiões únicas longas e curtas e ba / b'a'c' e ca / C'A' indicam as repetições invertidas (Figura 1.3).

Muitos estudos têm demonstrado que as cepas de HCMV são muito divergentes no subconjunto de genes que codificam para proteínas secretadas ou associadas à membrana (Dolan *et al.*, 2004). Estas observações sugerem que a hipervariação é um resultado da seleção imunológica e que os grupos alélicos têm uma longa história, talvez tendo surgido durante a evolução das populações de seres humanos (Mcgeoch *et al.*, 1995). Além disso, há grande evidência de que a recombinação ocorreu durante a evolução do HCMV, e que as infecções por HCMV frequentemente envolvem múltiplas cepas (Rasmussen *et al.*, 2002). Esses fatores adicionam complexidades significativas para a avaliação das associações entre a constituição genética de cepas de HCMV e a evolução da doença (Mocarski, 2002).

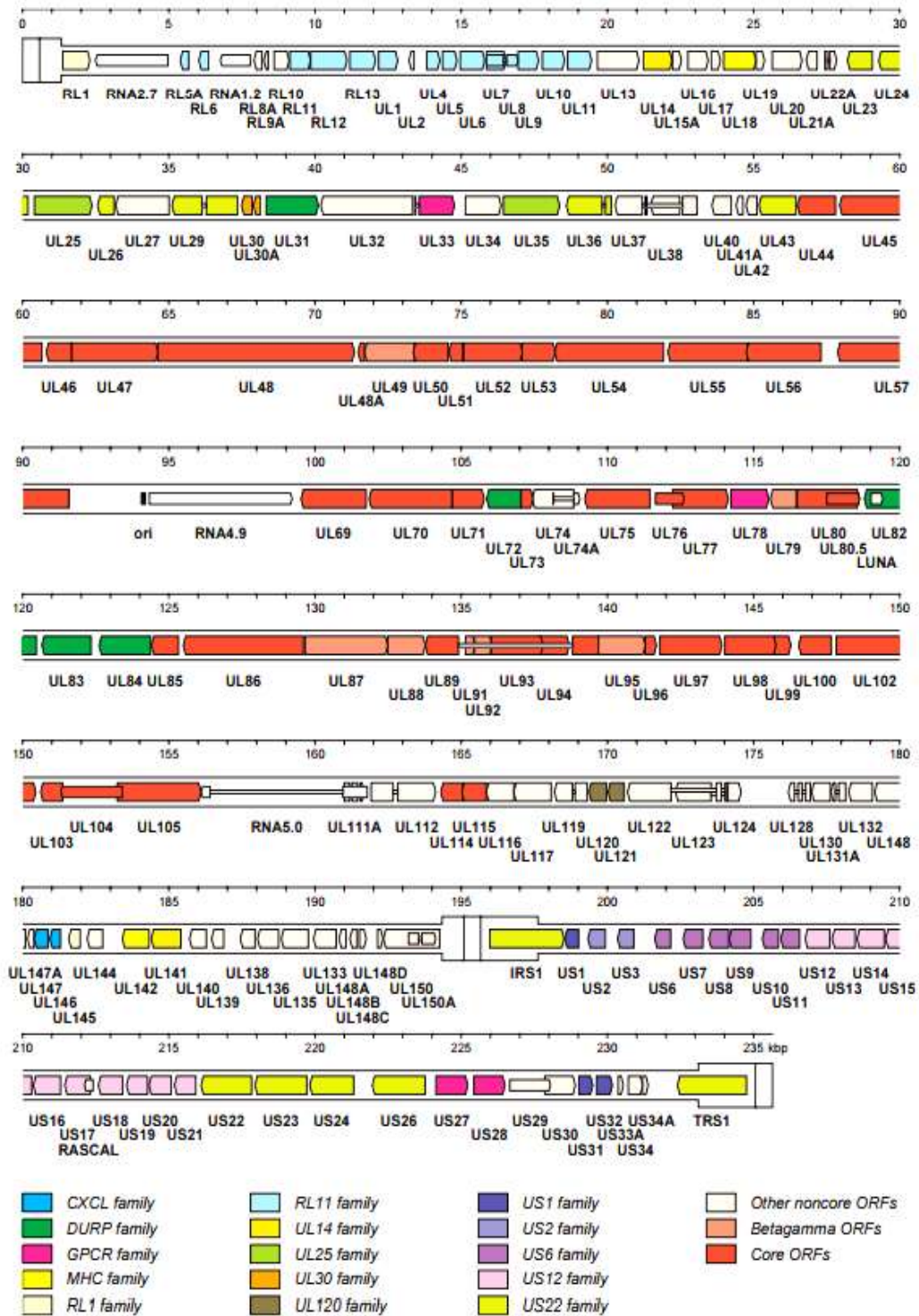


Figura 1.3 Organização genética Citomegalovírus humano (HCMV) com base em uma interpretação atualizada de seqüências de consenso. Genes do núcleo dos Herpesvírus e as famílias de genes são codificados por cores como indicado na legenda. Genes brancos são únicos (Adaptado – Fields, 2013).

1.4.4 Transmissão e manifestações clínicas

Além da infecção congênita, o HCMV se propaga através de outras vias de infecção como, a infecção perinatal, a infecção adquirida e a transmissão iatrogênica. A infecção perinatal é contraída no período peri-parto e até três semanas pós-natais, essa transmissão pode se dar durante o trabalho de parto ou por transfusão materno-fetal. A infecção adquirida é transmitida de forma horizontal, no período pós-natal através do contato de secreções corpóreas contaminadas, no período da infância quando a transmissão ocorre basicamente por contato de urina e saliva de outras crianças ou na idade adulta, onde a transmissão pode acontecer através do contato sexual, via sêmen e secreções do cérvix (Junqueira, 2008). A transmissão iatrogênica ocorre através de transfusões sanguíneas e transplantes de órgãos e só é possível devido à capacidade do vírus de permanecer latente, podendo ser reativado posteriormente (Junqueira, 2008).

Após uma infecção primária, geralmente assintomática, o vírus não é eliminado do organismo e, como os outros Herpesvírus, permanece de forma latente, e sua viremia se mantém em níveis reduzidos. Assim conhecido como um vírus oportunista, por sua reativação principalmente em hospedeiros imunossuprimidos, podendo provocar diversas doenças como pneumonia, esofagite, encefalite, hepatite, pancreatite, gastrite, enterocolite, retinite entre outras (Alford *et al.*, 1990; Brown e Abernathy, 1998; Couto *et al.*, 2003). Na fase aguda, a principal manifestação é a citomegalomononucleose, com sintomas semelhantes aos da mononucleose infecciosa (Figura1.4): febre, dor de garganta, aumento do fígado e do baço, presença de *linfócitos* atípicos. Dentre as principais manifestações se destacam o retardo do crescimento intra-uterino, a prematuridade, a icterícia colestática, a hepato-esplenomegalia, a plaquetopenia, a pneumonite e as manifestações neurológicas.



Figura 1.4 Manifestação de uma infecção na garganta por citomegalovírus conhecida como citomegalomononucleose – Retirado de <http://www.treatcurefast.com/> - 14/10/2016

1.4.5 Diagnóstico

Sorologia

Os testes sorológicos são úteis para determinar se um paciente teve a infecção por HCMV, no passado, determinada pela presença ou ausência de IgG anti-HCMV. Muitos ensaios diferentes foram descritos e avaliados para a detecção de anticorpos IgG. Entre estes estão o de fixação do complemento, ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência, anticomplemento, radioensaio, e hemaglutinação indireta (Alford *et al.*, 1990). A detecção de anticorpos IgM tem sido utilizado como um indicador de infecção aguda ou recente. Os ensaios de captura de IgM são largamente utilizados e baseiam-se na ligação seletiva de anticorpos IgM para a fase sólida. Os ensaios de IgM anti-HCMV utilizando proteínas e peptídeos recombinantes têm sido desenvolvidos na tentativa de padronizar testes sorológicos (Revello e Gerna, 2010). Os ensaios para o anticorpo IgM carecem de especificidade para a infecção primária por causa de resultados falsos positivos, porque o IgM pode persistir por meses após a infecção primária, e porque pode ser positivo em infecções por HCMV reativadas (Mocarski, 2002).

Cultura celular

O método tradicional para a detecção de HCMV é por meio de cultura celular convencional. Esta abordagem utiliza amostras clínicas que são inoculados em células de fibroblastos humanos incubados e observados por um período de tempo variando de 2 a 21 dias. No ensaio de cultura celular, o HCMV exibe um CPE, caracterizado por focos de células planas, inchadas onde o CPE está diretamente relacionado com titulação do vírus. No entanto, este método é lento e requer 2-3 semanas até que um resultado pode ser classificado como negativo (Ross *et al.*, 2011).

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método rápido e sensível amplamente disponível de detecção para HCMV baseada na amplificação de ácidos nucleicos. As técnicas geralmente têm como alvo principal suas regiões bem conservadas (Rasmussen *et al.*, 2002). O DNA pode ser extraído a partir de sangue total, leucócitos, no plasma, ou qualquer outro tecido (as amostras de biópsia de tecido) ou líquido (urina, CSF, BAL) (Carraro e Granato, 2003). A PCR para detecção do HCMV-DNA pode ser qualitativa ou quantitativa, em que a quantidade de vírus DNA na respectiva amostra é medida. A PCR quantitativa (PCR em tempo real ou qPCR) permite o monitoramento contínuo de indivíduos imunocomprometidos para identificar pacientes de risco para a terapia preventiva e para determinar a resposta ao tratamento (Seehofer *et al.*, 2004). Este método, em comparação com o ensaio de antigenemia, é mais rápido, pois pode ser automatizado e é o mais utilizado atualmente. Os resultados são geralmente relatados como número de cópias/mL (Ross *et al.*, 2011).

1.4.6 Epidemiologia

A infecção por HCMV é bastante comum na população em geral com uma prevalência de 70-80% em indivíduos adultos, que desenvolvem um curso assintomático (Cisneros-Herreros e Herrero-Romero, 2006). O HCMV é a causa mais comum de infecção congênita mundial, com prevalência de 0,2 a 3% de todos os nascimentos, sendo maior em populações em que a soropositividade materna é elevada. Estudos têm documentado que até 90% das crianças infectadas no período intra-útero são assintomáticas, desenvolvendo os sintomas dentro de alguns meses ou mesmo anos. A infecção é

universalmente endêmica e sua prevalência aumenta com a idade, além de atingir os grupos populacionais de menor nível socioeconômico, portanto, países mais carentes também apresentam maior prevalência. Em determinadas regiões, praticamente 100% das pessoas são soropositivas. As taxas de incidência, baseadas em estudos sorológicos, mostram duas faixas em que ocorre maior transmissão da infecção: no primeiro ano de vida (36-56%) e na fase sexual aguda. Estudos mostram que a prevalência de anticorpos IgG anti-HCMV em países desenvolvidos aumenta em 1% ao ano desde a puberdade até a meia-idade (Griffiths, 2004).

1.4.7 Prevenção e Controle

A prevenção da transmissão horizontal de HCMV possui alguns desafios: indivíduos infectados transmitem o vírus por meses ou anos; a infecção em hospedeiros imunocompetentes é quase sempre clinicamente silenciosa e as exposições têm mais probabilidade de transmitir o HCMV, e assim são difíceis para evitar. Estas características de infecção do HCMV tornam difícil o planejamento de estratégias para prevenção com base em limitar a exposição ao vírus. Exposição à urina e saliva de crianças juntamente com adultos com atividade sexual continua a serem as fontes mais importantes de vírus. No entanto, tais exposições são uma parte normal da vida. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) recomenda informar aos cuidadores de crianças e jovens sobre como HCMV é transmitido e medidas de higiene como, por exemplo, a lavagem das mãos, para reduzir a transmissão; Além disso, é recomendado que mulheres grávidas que trabalham e estão expostas com jovens e crianças devem ser informadas sobre o risco de infecção com HCMV para ela e seu filho (CDC, 2016).

1.5 Roseolovírus: Herpes Vírus Humano 6 (HHV-6A e HHV-6B) e Herpes Vírus Humano 7 (HHV-7)

1.5.1 Histórico

O HHV-6 foi descoberto em 1986 e inicialmente nomeado *Vírus B-Linfotrópico humano*, por ser encontrado principalmente infectando e replicando em linfócitos da linhagem de células T. Os HHV-6 isolados são classificados em dois grupos estreitamente relacionados que foram denominados variantes A (HHV-6A) e B (HHV-6B), e agora reconhecidos como espécies distintas de Herpesvírus. O HHV-6B é o maior agente

causador de exantema súbito (ES), ainda com poucos estudos, a doença não tem sido claramente associada com HHV-6A (Yamanishi *et al.*, 1988).

O HHV-7 foi isolado em 1990 a partir de um indivíduo saudável, cujas células foram estimuladas com anticorpo contra CD3 e, em seguida, incubadas com interleucina-2 (IL-2) (Ablashi *et al.*, 2014). O HHV-7 é um dos agentes causadores de ES (Yoshikawa *et al.*, 2001) e tem sido associada a convulsões febris em crianças jovens (Ward *et al.*, 2007). O HHV-6A/B e HHV-7 são ubíquos, com mais de 85% de adultos com anticorpos contra ambos os vírus (Razonable, 2013).

1.5.2 Classificação e morfologia

Os Herpesvírus humanos 6A, 6B e 7 compartilham muitas propriedades, assim como, os demais Herpesvírus, incluindo a estrutura virion (Figura 1.5), muitos recursos da arquitetura genômica e genética, a sua elevada prevalência em hospedeiro natural, e a capacidade de estabelecer infecções latentes no hospedeiro. Estes vírus pertencem ao gênero *Roseolovírus*, e são caracterizados pelo crescimento em linfócitos T (embora também possam infectar outros tipos de células), alta prevalência e associação com febre e doença exantemática. (Lacoste *et al.*, 2005).

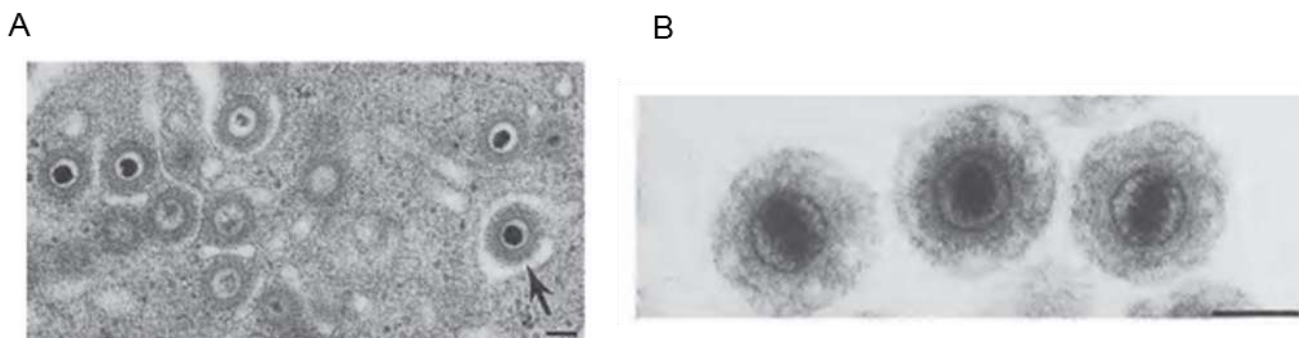


Figura 1.5 Características ultraestruturais de HHV-6 e HHV-7 cultivadas em sangue de cordão umbilical humano. A: Nucleocapsídeos de HHV-6 revestidos com tegumento dentro do citoplasma e aparentemente brotando de cisternas do aparelho de Golgi (seta). B: Virions extracelulares de HHV-7. (Adaptado – Fields, 2013).

1.5.3 Organização do Genoma

Os genomas dos *Roseolovírus* são compostos de um segmento central única (L) suportado por um par de estruturas de repetições diretas, DRL e DRR (Dominguez *et al.*, 1999). Comparado com outros Herpesvírus, os *Roseolovírus* tem relativamente baixo conteúdo G + C. (Deng e Dewhurst, 1998). O DNA viral foi mapeado para o nível da sequência, o genoma do vírus é integrado no cromossomo do hospedeiro e até agora oito cromossomos foram identificados como alvos para integração do HHV-6 (Morissette e Flamand, 2010). Embora o HHV-7 também tenha sequências semelhantes ao do HHV-6, não se observou sua integração aos cromossomos do hospedeiro.

O genoma do HHV-7 é mais compacto do que o do HHV-6, com um complemento genético semelhante a ser codificado em um segmento de U que é de 12 kb, mais curto do que para o HHV-6. Além das matrizes de repetição, duas regiões do genoma não têm capacidade de codificação de proteína: a região entre U41 e U42 que abriga a origem lítica de replicação do DNA e a região entre U77 e U79. Um agrupamento de genes de Betaherpesvírus-específico está localizado à esquerda dos genes essenciais. Nos domínios conservados, os *Roseolovírus* são geneticamente similares com o HCMV. Entre o HHV-6, HHV-7, identidades de sequência de aminoácidos variam de 22% a 75%, a maioria sendo de aproximadamente 50%. O HHV-6A e HHV-6B tem identidade de sequência total de nucleotídeos de 90%; as porções dos genomas que se estendem para U32 e U77 são altamente conservadas (95% de identidade), enquanto o segmento que abrange a U86 e U100 é de apenas 72% (Yamanishi *et al.*, 1988).

1.5.4 Transmissão e Manifestações Clínicas

O HHV-6B e HHV-7 são vírus ubíquos, onde a infecção horizontal ocorre comumente durante a infância. O DNA do HHV-6 foi detectado na saliva, esfregaços da garganta, e de mucosa nasal crianças e suas mães, bem como outros adultos saudáveis, sugerindo infecção horizontal através da saliva e secreções nasais. O HHV-6 também é detectável no trato genital feminino e no colo do útero de mulheres grávidas nos estágios finais de sua gravidez, sugerindo a possibilidade de transmissão de neonatos durante parto vaginal. Não foi encontrada diferença na prevalência de infecção HHV-6 entre aleitamento materno e crianças alimentadas com mamadeira ou entre bebês nascidos por cesariana e parto vaginal. Surtos de ES locais ou sazonais são raros, mas foram observados em instituições pediátricas. Outras vias de transmissões horizontais tem sido

relatadas, tais como através de transplante de órgãos (Sedlak *et al.*, 2014). Uma provável transmissão de HHV-7 partir dos avós para os pais e para as crianças através de contato próximo dentro um agregado familiar foi detectada usando técnica epidemiológica molecular. Especula-se que o aleitamento materno pode ser também uma rota para a transmissão do HHV-7 (Fujisaki *et al.*, 1998). Assim, a transmissão HHV-7 pode seguir caminhos semelhantes do HHV-6B, exceto ao de infecções de HHV-7 congênitas.

A aquisição do HHV-6 é frequentemente sintomática na infância, resultando em febre alta, diarreia, prurido e exantema súbito (ES) (vulgarmente conhecido como roséola). Embora rara esta infecção inicial também pode causar convulsões febris, encefalite ou convulsões (Ablashi *et al.*, 2014). No ES, ocorre febre alta nos primeiros 3 a 4 dias. Após o declínio da febre aparecem manchas cutâneas que iniciam no tronco ou pescoço e disseminam para as extremidades. Metade das crianças cursa com temperatura acima de 40°C, que é uma das principais causas de convulsão febril. O tempo médio dos sintomas é de 9 dias, podendo causar uma síndrome parecida com a mononucleose infecciosa causada pelo EBV. Em alguns casos, ocorre infecção congênita, geralmente assintomática e sem complicações para a criança. Após transplante de células tronco, de órgãos sólidos ou imunossupressão por outras causas, é comum reativação, que apesar de ser assintomático na maioria dos casos, pode também causar encefalite ou doença grave em outros órgãos (Clark, 2002).

O HHV-7 tem algumas características em comum com o Vírus de Imundeficiência Humana (HIV), o fato de, para ambos, a molécula CD4⁺ ser um componente essencial para funcionar como receptor. Deste modo, o HHV-7, ao entrar no sistema imunológico de um determinado indivíduo, infecta os linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e a linha de linfócitos T imaturos, com uma eficiência variável, dependendo da imunocompetência do indivíduo infectado. Assim, indivíduos infectados com o HIV, e conseqüentemente imunossuprimidos, têm uma maior frequência de detecção e um aumento significativo de carga viral de HHV-7 (24).



Figura 1.6 Roséola infantum. Criança com máculas eritematosas no tronco e membros superiores, que é uma manifestação clínica característica desta doença. Retirado- www.kidscenter.org/thread/Roseola-Infantum.html - 13/10/2016

1.5.5 Diagnóstico

Cultura celular

O HHV-6 é facilmente isolado a partir de PBMC de doentes com ES durante a fase aguda (Yamanishi *et al.*, 1988). O CPE desenvolve dentro de 7 a 10 dias. As células gigantes geralmente contêm um ou dois núcleos; após o CPE desenvolver, as células degeneram-se. (Asano *et al.*, 1989). O HHV-7 é, por vezes, isolado a partir de sangue periférico de pacientes com ES, e pode ser facilmente isolado a partir da saliva, utilizando métodos como descrito anteriormente para HHV-6. O isolamento do HHV-6, a partir da saliva é raro, embora o seu DNA seja frequentemente detectável (Yamanishi *et al.*, 1988).

Sorologia

Numerosos ensaios sorológicos de HHV-6 e HHV-7 têm sido descritos, incluindo IFA, ensaio imunoenzimático (ELISA), neutralização (NT), radioimunoprecipitação e imunotransferência. Para a detecção, o teste de IgM não é adequado para diagnóstico clínicos (De Bolle *et al.*, 2004). Em uma comparação de ensaios de immunoblot, de IFA e ELISA para detecção de anticorpos anti-HHV-7, o ELISA foi o mais sensível. Respostas primárias a HHV-6A e HHV-6B não podem ser discriminados pelos ensaios descritos anteriormente (Yamanishi *et al.*, 1988).

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA do HHV-6 e HHV-7 são geralmente detectados por ensaios de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) (Li *et al.*, 2009). No Brasil, o primeiro relato estudo de base populacional da prevalência de anticorpos HHV-6 foi realizada em 1991, que encontraram taxas de 76,5% para os brasileiros e 77,2% para os imigrantes japoneses. Desde então, estudos sobre o HHV-6 e a detecção do DNA e soroprevalência (Tecnologia baseada SybrGreen®) têm sido relatados em receptores de transplantes de órgãos sólido (Guardia *et al.*, 2014). O desenvolvimento de diagnóstico e métodos da imunologia para detecção do HHV-6 pode fornecer uma melhor vigilância da reativação do HHV-6 (Leibovitch *et al.*, 2014).

1.5.6 Epidemiologia

Estudos mostram que, 95% dos adultos possuem sorologia positiva para HHV-6. Aos dois anos de idade, oito em cada dez crianças já entraram em contato com o vírus, com pico de incidência entre nove e 21 meses de idade. (43) O HHV-7 apresenta bastantes homologias, genéticas e biológicas, com o HHV-6 e, também, foi considerado um agente etiológico do ES, também conhecido como *Ruseola infantum*, que ocorre principalmente em crianças e é caracterizado pela presença de febre elevada e erupções cutâneas (Figura 1.6). Na Europa e nos EUA, a taxa de prevalência deste vírus é superior a 85% (Clark, 2002), fato este que, dificulta a interpretação de dados laboratoriais na investigação da presença deste vírus num determinado indivíduo, na medida em que apenas os marcadores diretamente relacionados com a replicação viral (presença de DNA plasmático e antígenos virais nos tecidos, entre outros) permitem diagnosticar uma infecção recente. Esta taxa de prevalência é ainda mais significativa em crianças infectadas pelo HHV-6. Assim, as infecções pelo HHV-6 e HHV-7 podem ocorrer em momentos diferentes, causando ocasionalmente exantema súbito ou febre elevada sem erupção cutânea, o que permite inferir que o HHV-7 corresponde a um vírus com menor patogenicidade que o HHV-6, podendo também encontrar-se associado a infecções oportunistas (Yamanishi *et al.*, 1988).

1.5.7 Prevenção e Controle

Em pacientes imunocomprometidos, a redução da imunossupressão pode melhorar o controle imunológico da infecção por *Roseolovírus* (Razonable, 2013). A Conferência Europeia sobre Infecções em leucemia forneceu orientações para a gestão baseada na

evidência de infecções de *Roseolovírus* em doentes com neoplasias hematológicas e após o transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH). Os inibidores da replicação, Ganciclovir, fosfonoformato (Foscarnet) e cidofovir, são inibidores potentes da replicação do *Roseolovírus* in vitro, e são utilizado clinicamente para tratar estes vírus (De Bolle *et al.*, 2005).

1.6 Justificativa

A FHA se caracteriza pelo processo inflamatório hepático e pode originar-se de diversos agentes causais. Entre os vírus classificadamente hepatotrópicos, estão os vírus das hepatites que podem estar associados com casos de FHA (Al Midani *et al.*, 2011). Contudo, formas agudas e fulminantes de hepatite também podem estar associadas aos vírus da família *Herpesviridae* (Abbo *et al.*, 2007).

A infecção primária pelo HCMV e HHV-6, ocasiona geralmente hepatite leve e autolimitada em pacientes imunocompetentes, já a infecção primária em recém-nascidos e gestantes pode causar FHA sem as lesões cutâneas características (Cisneros-Herreros e Herrero-Romero, 2006). O mau prognóstico da evolução para hepatite nos casos de herpes está associado ao diagnóstico tardio e ao atraso no tratamento específico com terapia antiviral. Uma das razões para diagnóstico tardio é a falta de sintomas específicos, em metade dos pacientes que evoluem para FHA ocorre à ausência de lesões mucocutânea típica (Abbo *et al.*, 2007); (Riediger *et al.*, 2009). Portanto, a necessidade de diagnóstico precoce para dar início à terapia é evidente. O diagnóstico de infecção pode ser realizado diretamente, através do isolamento do vírus ou detecção da expressão de antígeno nas amostras, ou indiretamente, através da demonstração de uma soro conversão e/ou através da detecção de anticorpos IgM específica. O principal problema é que não existe acordo sobre os critérios diagnósticos, infecção e doença ativa (Morales-Sánchez *et al.*, 2014).

Atualmente, existem vários protocolos para diagnóstico do genoma dos Herpesvírus, contudo é necessário realizar mais de uma PCR para identificar os Betaherpesvírus. Nos últimos anos, houve aumento da utilização de procedimentos de PCR em tempo real a fim de simplificar e reduzir o tempo de emissão de resultados, e para quantificação de vírus em uma amostra. A técnica PCR multiplex tem a vantagem facilitar o diagnóstico de infecção. A qPCR multiplex pode ser uma alternativa para detecção do HCMV, HHV-6 e HHV-7 em uma mesma reação. São poucos os grupos de pesquisa no país que estudam casos de FHA, principalmente sob a óptica multidisciplinar onde a

clínica, patologia e biologia molecular somadas resultam em uma visão mais completa do processo. Diante deste contexto, é fundamental que técnicas moleculares sensíveis e específicas sejam utilizadas para esclarecer os diagnósticos de FHA sem etiologia conhecida. O diagnóstico laboratorial preciso pode auxiliar para uma terapêutica farmacológica adequada, poupando o paciente do transplante e o sistema de saúde dos custos a este relacionado (Riediger *et al.*, 2009; Paula *et al.*, 2014). Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi otimizar a técnica de qPCR multiplex, para a detecção dos vírus da subfamília *Betaherpesvirinae*, para diagnóstico do HCMV, HHV-6 e HHV-7 em pacientes com FHA sem etiologia definida.

Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Otimizar a técnica de PCR multiplex em tempo real para detecção e quantificação dos vírus da subfamília *Betaherpesvirinae*.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer uma curva sintética para quantificação e detecção vírus da subfamília *Betaherpesvirinae*.
- Investigar a infecção dos vírus HCMV, HHV-6 e HHV-7 em pacientes com falência hepática aguda sem etiologia definida.
- Confirmar a presença dos Betaherpesvírus em amostras de falência hepática aguda por PCR convencional e sequenciamento.
- Comparar os níveis das enzimas de Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase ALT, Fosfatase Alcalina (FA) e Gama-Glutamil Transferase (GAMA-GT) nos pacientes com falência hepática aguda e HCMV, HHV-6 e/ou HHV-7.

3. Material e Métodos

Este estudo foi descritivo e realizado no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) em colaboração com o Hospital Federal de Bonsucesso, Rio de Janeiro.

3.1 Aspectos éticos da pesquisa

O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos CAE 19786013.8.0000.5248 (Anexo 1). Todos os indivíduos participantes, ou responsáveis legais, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para formalizar a participação como voluntários consensuais no estudo.

3.2 Seleção de pacientes

O estudo retrospectivo compreendeu a utilização de amostras de sangue e/ou tecido, de 27 pacientes, armazenadas no LADTV, as quais foram coletadas no Serviço de transplante Hepático do Hospital Federal de Bonsucesso, Rio de Janeiro.

3.3 Coleta das amostras

As amostras de soro e tecido hepático (explante) utilizadas neste estudo foram provenientes de material biológico coletado e retirado antes ou durante o transplante do fígado, e parte do sangue que já seria coletada para exames de rotina, foi utilizado para a pesquisa (Tabela 3.1).

As amostras de sangue foram coletadas em procedimento operacional padrão: 5 mL de sangue periférico foi coletado por profissionais especializados por meio de punção venosa periférica, utilizando agulhas hipodérmicas e tubos estéreis do tipo vacutainer (*Becton Dickinson Company, Franklin Lakes, Estados Unidos da América*) contendo ativador de coágulo jateado na parede do tubo, que acelera o processo de coagulação, e gel separador para obtenção de soro. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm a 25°C por 10 minutos e o soro formado foi aliquoteado em tubo de poliestireno de 1,5mL devidamente identificado e estocado a -70°C.

Para os pacientes que realizaram transplante hepático, explantes do fígado foram colhidos por profissionais especializados no momento do transplante, utilizando lâminas de bisturi nº 24 e frascos estéreis para biópsias e enxertos. Posteriormente as amostras foram aliquotadas em tubo de poliestireno de 1,5mL devidamente identificados e estocados em nitrogênio líquido a -196°C.

Tabela 3.1. Relação das amostras de soro e tecido testadas dos pacientes com FHA

Amostra	Fígado	Soro
FHF-1	-	X
FHF-2	X	-
FHF-3	X	X
FHF-4	X	X
FHF-5	X	-
FHF-6	X	X
FHF-7	X	-
FHF-8	X	-
FHF-9	-	X
FHF-10	X	X
FHF-11	-	X
FHF-12	-	X
FHF-13	X	-
FHF-14	-	X
FHF-15	-	X
FHF-16	-	X
FHF-17	X	X
FHF-18	-	X
FHF-19	-	X
FHF-20	-	X
FHF-21	-	X
FHF-22	X	-
FHF-23	X	X
FHF-24	-	X
FHF-25	-	X
FHF-26	X	X
FHF-27	X	X

3.4 Extração do DNA dos Betaherpesvírus em amostras de soro

A extração do DNA viral das amostras de soro foi realizada segundo o protocolo do kit comercial *High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, New Jersey, EUA)*. Primeiramente, antes do início da extração de material genético viral, foi preparada a solução de trabalho (*working solution*), que consiste na proporção de 50 µL de transportador de RNA poliA (*polyA RNA carrier*) e 2,5 mL de tampão de ligação (*Binding Buffer*). AS amostras foram descongeladas e homogeneizadas no *vortex-Genie (Scientific Industries, Inc., EUA)* por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados, em tubos de poliestireno de 1,5 mL livres de nucleases e devidamente identificados, 200 µL de soro de cada amostra em seu respectivo tubo, sendo adicionados posteriormente 200 µL de solução de trabalho e 50µL da solução de proteinase K. Rapidamente as amostras foram homogeneizadas por 15 segundos e incubadas aos 72°C por 10 minutos em banho-maria (Nova Técnica, São Paulo, Brasil). Após a incubação e uma rápida centrifugação por 30 segundos na centrífuga 5415R *Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha)*, foram adicionados 100 µL de tampão de ligação (*Binding Buffer*) em cada tubo. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por 15 segundos e centrifugadas por 30 segundos. Posteriormente o conteúdo de cada tubo foi completamente transferido para coluna com filtro em tubos de coleta devidamente identificados. As amostras foram, então, centrifugadas a 8.000 x g por 1 minuto e ao fim da centrifugação, os tubos de coleta de cada amostra foram descartados e as colunas recolocadas em outros novos tubos. Após essa etapa, foram adicionados 500 µL do tampão de remoção de inibidores (*Inhibitor Removal Buffer*) em cada coluna e outra centrifugação foi realizada a 8.000 x g por 1 minuto. Ao fim desta centrifugação, novamente os tubos de coleta de cada amostra foram descartados e as colunas combinadas em outros novos tubos. Em seguida, 450 µL de tampão de lavagem (*Wash Buffer*) foram adicionados em cada coluna, seguido de centrifugação a 8.000 x g por 1 minuto e, em sequência, os tubos de coleta de cada amostra foram descartados e as colunas combinadas em outros novos tubos. Em seguida, uma segunda lavagem foi realizada como a anterior, adicionando 450 µL de tampão de lavagem (*Wash Buffer*) em cada coluna, seguido de centrifugação a 8.000 x g por 1 minuto. Posteriormente somente a solução resultante de cada amostra foi descartada, sem o descarte dos tubos de coleta, e então, estes foram novamente combinados nas suas respectivas colunas, seguido de uma centrifugação a 13.000 x g por 10 segundos. Logo após, os tubos de coleta foram descartados e as colunas foram, então, combinados em novos tubos de poliestireno de 1,5 mL livres de nucleases e devidamente identificados. Posteriormente foram adicionados 50

μ L de tampão de eluição (*Elution Buffer*) nas colunas, que sofreram uma última centrifugação a 8.000 x g por 1 minuto. Em seguida, as colunas foram descartadas e os tubos de 1,5 mL contendo o material genético viral eluído foram estocados a -70°C até o momento da análise por PCR em tempo real. Em cada extração, foi incluído amostras de água ultra pura foram incluídas como controles negativos.

3.5 Extração do DNA dos Betaherpesvírus em amostras de fígado

Primeiramente 25mg de tecido foi pesado em uma balança de precisão, cortado em pequenos fragmentos e colocado em um microtubo de 1,5mL devidamente identificado. Em seguida foi colocado 180 μ L de tampão de lise de tecido ATL e 20 μ L de Proteinase K (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América) e o mix ficou incubando a 56°C overnight. No dia seguinte, as amostras foram, então, homogeneizadas e brevemente centrifugadas e foram adicionados 200 μ L de etanol absoluto aos tubos. Foi transferido, após homogeneização e centrifugação, todo conteúdo do tubo para a coluna do kit e submetida à centrifugação a 6.000x g por 1 minuto a temperatura ambiente. Após a centrifugação, os tubos coletores da coluna foram descartados e novos tubos foram recolocados. Em seguida, foram aplicados 500 μ L do tampão de lavagem AW1 a cada coluna e posteriormente foram centrifugadas a 6.000x g por 1 minuto. O mesmo passo foi feito com o tampão de lavagem AW2 e as amostras foram centrifugadas a 20.000xG por 3 minutos. As colunas foram transferidas para um novo tubo de eluição e foram adicionados 200 μ L de tampão de eluição AE para eluir o DNA. As colunas foram, então, submetidas a centrifugação a 6.000xG por 1 minuto. A coluna foi removida e descartada e o DNA foi armazenado a -20°C.

3.6 Detecção e quantificação por PCR em tempo real

3.6.1 Validação da Curva Sintética

As curvas sintéticas utilizadas para quantificação dos Betaherpesvírus foram construídas (Tabela 3.2). Cada curva foi sintetizada pelo *Integrated DNA Technologies* (IDT) e validadas antes de seu uso para diagnóstico.

Tabela 3.2. Sequências das curvas sintéticas padrões para quantificação dos Betaherpesvírus

Vírus	Sequências das Curvas (Sentido 5'-3')	Tamanho
HCMV	TTCGTGGCCTCGTAGTGAAAATTAATGGTCGTATTTGAACAGATCGCGCACCAATA	91 bases
	CGGATGCGTTCCTGCAGACAGTAACGGCCCTGATA	
HHV-6	TTCGTGCAAGCTCATGAACATCGTACGTATACCGATCCCAGCTCACCACCATCTA	92 bases
	AATGCGTAGGTAGCGGCAATTTAGGTCTTTCTGATA	
HHV-7	TTCGTCCAATCCTTCCGAAACCGATCGTATCATGGCCAACAAGCAATCTGCGAGAT	90 bases
	GCGTTTGTCACTACTCCAGTGACTTCCGCTGATA	

A curva sintética foi reconstituída em água *ultrapure* gerando uma solução de 100pmol/μl que foi utilizada como solução estoque. Para a utilização dessa curva nos ensaios de PCR em tempo real deve ocorrer uma conversão de unidade de medida de pmol/μl para g/μl, para tal foi utilizado o cálculo da curva padrão levando-se em conta o número de Avogrado e o tamanho do ultrâmetro utilizado. A equação de conversão está demonstrada abaixo:

$$\frac{\text{Concentração (g/}\mu\text{l)}}{[\text{Tamanho do ultrâmetro (pb)}] \times 660} \times (6,022 \times 10^{23})$$

Cada curva foi constituída por sete pontos principais para o HCMV, o HHV-6 e o HHV-7, aliquotada e aplicada em placa em duplicata. Foram realizados testes para confirmação de sua estabilidade e capacidade de ser quantificada através do *Qubit® 2.0 Fluorometer - Thermo Fisher Scientific*, e assim, validada. Todas as quantificações realizadas em cópias/mL foram convertidas também para IU/mL, conforme proporção de 1 cópia/mL = 5,6 IU/mL. A curva sintética padrão de concentração conhecida passou por diluições seriadas de 1:10 para que fosse determinado o limite de detecção do teste.

3.6.2 PCR em tempo real para detecção e quantificação dos Betaherpesvírus

A quantificação dos Betaherpesvírus por qPCR foi realizada uma busca de similaridade, utilizando a ferramenta *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*, entre as regiões mais conservadas utilizadas na literatura para da cada um dos Betaherpesvírus (Tabelas 3.3-3.4-3.5). Como resultado dessa busca, as regiões mais conservadas foram utilizadas de acordo com o protocolo descrito por Sassenscheidt e colaboradores (Sassenscheidt *et al.*, 2006).

Tabela 3.3. Sequência de oligonucleotídeos para busca de similaridade das regiões do HCMV utilizadas em trabalhos anteriores

Sonda	Região / Senso	Anti-Senso	Referência	Ano	Tipo de amostras	Nº de amostras	% de Positivos
5'TGGCCCGTAGGTCATCCACACTAGG 3'	IE-1 / 5' CATGAAGGCTTTGCCCAGTAC 3'	5- GGCCAAAGTGTAGGCTACAATAG -3	Sugita et al.	2014	Fluido Ocular	100	Multiplex - 6% Real Time - 67%
5'CCGTATTGGTGC GCGATCTGTTCAA 3'	UL54 / 5' GGCCGTTACTGTCTGCAGGA 3'	5- GGCTCGTAGTGAAAATTAATGGT -3	Sassenscheidt et al.	2006	Plasma	37	90%
5'GGACTACCTCTTCAAACGCATGATTGAC 3'	gp58 / 5' GAGGACAACGAAATCCTGTTG GGC 3'	5- GTCGACGGTGGAGATACTGCTGAGG -3	Kearns et al.	2001	Sangue Tecido - Núcleo	100	51%
5'FAM-CAGCGTCGTCGCTCACTCGTGCC 3'	UL20 / 5'GGAAGTAGCGTCGGTGT TTTATG 3'	5- GCCACAACGGCATCTACGATC -3	Sahiner et, al	2014	Amídalas	56	5%
5'TGCGCCGATGCTGCTCGACATA 3'	UL54 / 5'CATGCGCGAGTGTCAAGAC 3'	5- ACTTTGAGYGCCATCTGTTCT-3	Yun et. al.	2003	Sangue	177	22,50%
5' CCCGGCGACTGCTACCGTTCCG 3'	UL141 / 5'CCGCTGTTGGACAGTGAT ACA 3'	5-TGG CGT CAC CGG TAA RAA T-3	Ziemann et. Al.	2010	Sangue	46	95%
5' GCGCCGGCGAAACGAGCTTGA 3'	UL50 / 5'TCCGAAGGCGATGACCTCGATG 3'	5- TCCCAGTAGCTGATAGATACTG -3	Preiser et, al.	2003	Plasma	138	77,50%
5' CACCGACGAGGATTCCGACAACG 3'	pp65 / 5'TCGCGCCCGAAGAGG 3'	5 -CGGCCGGATTGTGGATT-3	Piiparinen et, al.	2004	Sangue	270	43%
5'CGGCCTCTGATAACCAAGCCTG 3'	UL83 / 5' GGGTGTCTCCTGCTATGTCTTA 3'	5 -CATCACTCTGCTCACTTTCTTCC-3	Haijing Li et, al.	2003	Sangue	298	75,60%
5'CCGCAACCCGCAACCCTTCATG 3'	UL83 / 5' GTCAGCGTTCGTGTTTCCCA 3'	5-GGGACACAACCCGTAAAGC-3	Gourlain et, al.	2003	Sangue	182	33,00%
5'CCGCAACCCGCAACCCTTCATG 3'	UL83 / 5' GTCAGCGTTCGTGTTTCCCA 3'	5-GGGACACAACCCGTAAAGC-3	Soetens et al.	2008	Sangue	55	73% >130 CMV DNA copies/ 2x10 ⁵
5'ACTGGGCAAAGACCTTCATGCAGATCTC 3'	UL122 / 5' TCATCCACACTAGGAGAGCAGACT 3'	5- GCCAAGCGGCCTCTGAT -3	Mengoli et, al.	2004	Sangue	251	
5' CGCGAGACCGTGGAAGTGC 3'	UL83 / 5' GCA GCCACG GGATCG TACT 3'	5'-GGCTTTTACCTCACACGAGCATT-3'	Ghaffari et, al	2008	Sangue	451	22,40%
5' CGCGAGACCGTGGAAGTGC TAMRA 3'	UL83 / 5' GCAGCCACGGGATCGTACT 3'	5-GGCTTT TACCTCACACGAGCATT-3'	Griscelli , et al.	2001	Sangue	164	40%
5' GTCTGCGTATGGCTGTACTCC 3'	UL83 / 5' CCAGGTGTGTCGGTACTCAA 3'	5-ATTTGGGCTGCTGTGTCC -3	Pradeau , et al.	2006	Sangue	524	32,50%
5' CCCGCAACCCGCAACCCTTCATG 3'	UL83 / 5' GTCAGCGTTC GTGTTTCCCA 3'	5-GGGACACAACCCGTAAAGC-3	Gault, et al.	2001	Sangue	46	95,60%

Tabela 3.4. Sequência de oligonucleotídeos para busca de similaridade das regiões do HHV-6 utilizadas em trabalhos anteriores

Sonda	Região / Sense	Anti-Sense	Referência	Ano	Tipo de amostras	Nº de amostras	% de Positivos
5'AGCAGCTGGGCGAAAAGTGCTGTGC3'	U65-U66 / 5- GACAATCACATGCCTGGATAATG -3	5- TGTAAGCGTGTGGTAATGTACTAA-3	Sugita et al.	2014	Fluido Ocular	100	Multiplex- 1% Real Time - 100%
5' TTAGATGGTGGTGGAGCTGGGATCGGT 3'	U56 / 5- AAAGACCTAAATTGCCGCTACCT-3	5- GCAAGCTCATGAACATCGTCA -3	Sassenscheidt et al.	2006	Plasma	37	95%
5' CACCAGACGTCACACCCGAAGGAAT 3'	U67 / 5- CAAAGCCAAATTATCCAGAGCG-3	5- CGCTAGGTTGAGGATGATCGAATTCCTTCGGGTGT GACGT -3	Locatelli et al	2000	Plasma	5	-
5' CCT GTC ATG CCCACACAAATCTCTCC 3'	U65 - U66 / 5 - GACAATCACATGCCTGGA TAATG-3	5 -TGTAAGCGTGTGGTAATGGACTAA-3	Dejean, et al	2002	Sangue	31	48,40%
5' AGCAGCTGGGCGAAAAGTGCTGTGC 3'	U65-U66 / 5- GACAATCACATGCCTGGATAA-3	HHV- 6 A 5- TGGTAATGGACTAATTGTGTGTTTGA-3 HHV-6 B 5-TGGTAATGGACTAAGTGTGCGTTATTTTC	Boutolleau, et al	2006	Saliva, mucosa oral e Sangue	183	94%
5' AGCAGCTGGGCGAAAAGTGCTGTGC 3'	U65-U66 / 5- GACAATCACATGCCT GGATAATG -3	5-TGTAAGCGTGTGGTAATGGACTAA-3	Glitzbecker, et al	2005	Tecido	33	33,30%
5' TCCGAAACAACGTCTGACTGGCAAAA 3'	U67 / 5- GTTAGGATA TACCGA TGTGCGTGAT-3	5-TACAGATACGGAGGCAATAGATTTG-3	Sedlak et, al.	2014	Tecido e Soro	29	82%
5'TGGGATACATAATATCTATCTTATTAATTCCT GATCA 3'	U65 / 5- TGCCTCTCTAATCAAGAAACCT-3	5-ACACGACAAAACAATCAGCCT-3	Pradeau et, al	2006	Sangue	524	32,50%

Tabela 3.5. Sequência de oligonucleotídeos para busca de similaridade das regiões do HHV-7 utilizadas em trabalhos anteriores

Sonda	Região / Sense	Anti-Sense	Referência	Ano	Tipo de amostras	Nº de amostras	% de Positivos
5' CTCGCAGATTGCTTGTGGCCATG 3'	U37 / '5-CGGAAGTCACTGGAGTAATGACAA - 3'	'5- CCAATCCTTCGAAACCGAT-3'	Sassenscheidt et al.	2006	Plasma	37	95%
5' CTCGCAGATTGCTTGTGGCCATG 3'	U-37 / '5- CGGAAGTCACTGGAGTAATGACAA- 3'	'5- CCAATCCTTCGAAACCGAT -3'	Sugita et al.	2014	Fluido Ocular	100	Multiplex/Real Time - 0%
5' CACGGCAATAACTCTAG 3'	U100 / '5- AAGATATGTACCAATACG GTCCCACT -3'	'5-TCTAGTAGAGCTTGC GTGCAT-3'	Fernandez et, al	2002	Sangue	31	84%
5'TGGTATCGTGGAAGGA 3'	U95 / '5- AACCTCTTCGGCTCAGACA -3'	'5- TAACGCTTCCCTCAGCATT-3'	Bergallo et, al	2008	Sangue	272	42,60%

Antes das amostras dos pacientes de falência hepática aguda sem etiologia definida serem testadas para HCMV, HHV-6 e/ou HHV-7, as reações foram otimizadas individualmente. Para o HCMV foi amplificada a região UL54, referente a síntese de DNA (130bp) para HHV6 região U56, referente ao capsídeo viral (150 bp) e para o HHV7 região U37, referente ao tegumento do vírus (312 bp) (Tabela 3.6)

Foi preparado para reação em tempo real monoplex de cada um dos Betaherpesvírus, utilizando o *kit AgPath-ID PCR (Life Technologies, Carlsbad, EUA)* contendo 20 µl de *mix* que foi constituído de 12,5 µl de tampão 1x (*PCR Buffer*) para qPCR, 2,5 µl de iniciadores senso (1µM) e 2,5 µl de iniciadores anti-senso (1µM), além de 2 µl de sonda específica (0,4 µM) e 1 µl da enzima 1x para qPCR por amostra a ser testada incluindo a curva sintética padrão e controles negativos.

Para a realização da reação em tempo real multiplex foi utilizado os mesmo kit *AgPath-ID PCR (Life Technologies, Carlsbad, EUA)* e preparado 20 µl de *mix* que foi constituído de 12,5 µl de tampão 1x (*PCR Buffer*) para qPCR, 0,4 µl de iniciadores senso (3 µM) e 0,4 µl de iniciadores anti-senso (3 µM) (HCMV/HHV-6/HHV-7) simultaneamente, além de 0,4 µl de sonda específica para cada um dos vírus e 1 µl da enzima 25x para qPCR por amostra a ser testada incluindo a curva sintética padrão e controles negativos.

A seguir, a mistura foi aplicada à placa específica de 96 poços (*Falcon®/Labware, Franklin Lakes, USA*) para o equipamento a ser utilizado para realização do PCR em tempo real. O equipamento utilizado foi o 7500 Real Time PCR System (*Life Technologies, Carlsbad, EUA*) e método utilizado foi o de sonda de hidrólise, sistema Taqman, termociclagem evidenciada na tabela 3.7. Para detecção das sondas utilizadas programou-se o equipamento para reconhecer no filtro as sondas FAM para HCMV, VIC para HHV-6 e NED para HHV-7 que correspondem aos sinais emitidos durante a reação. As sequências de iniciadores foram as mesmas utilizadas na PCR em tempo real monoplex. Para análise dos resultados obtidos utilizou-se o 7500 *Software v2.0.6*.

Tabela 3.6. Sequências de iniciadores, sondas utilizados na PCR em tempo real para detecção e quantificação dos Betaherpesvírus descritos por Sassenscheidt *et al.*

	HCMV Sequencia (5'-3')	HHV-6 Sequencia (5'-3')	HHV-7 Sequencia (5'-3')
Sonda	FAM- CCGTATTGGTGCGGATCTGTTCAA	VIC- TTAGATGGTGGTGAGCTGGGATCGGT	NED - CTCGCAGATTGCTTGTGGCCATG
Oligonucleotídeos (Senso)	GGCCGTTACTGTCTGCAGGA	AAAGACCTAAATTGCCGCTACCT	CGGAAGTCACTGGAGTAATGACAA
Oligonucleotídeos (Anti-senso)	GGCCTCGTAGTGAAAATTAATGGT	GCAAGCTCATGAACATCGTCA	CCAATCCTCCGAAACCGAT

Tabela 3.7. Termociclagem referente à PCR em tempo real para detecção e quantificação dos Betaherpesvírus

Atividade	Temperatura	Tempo	
Ativação da UNG*	50°C	2 minutos	
Desnaturação e Ativação da enzima	95°C	10 minutos	
Desnaturação	95°C	15 segundos	} 40 ciclos
Hibridização e Extensão	60°C	1 minuto	

*UNG: Uracil-N-glicosilase

3.7 Controle interno de referência Ribonuclease P (RNase P)

O kit TaqMan RNase P Reagentes Controle, *Applied Biosystems* foi utilizado como um controle endógeno interno para a análise de amostras clínicas humanas. Para garantir a qualidade do teste, excluindo a possibilidade de falsos negativos, devido à presença de eventuais inibidores ou a qualidade e integridade de amostras de DNA. As sondas TaqMan foram marcadas com 5' com fluoróforo VIC e 3' MGB.

O *mix* do controle RNase P foi realizado contendo 6µL de água DNase/RNase free, 1µL de 25X *mix* de enzima de qPCR, 12,5µL de 2X tampão de qPCR (incluindo referência passiva ROX) e 1µL de *mix* RNase P (contendo os oligonucleotídeos e tampões específicos para essa região (*Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos da América*) e aplicado em placas de 96 poços. Além desses reagentes, 5µL de DNA extraído foi aplicado posteriormente ao *mix* na placa. O kit da reação em tempo real e as condições de corrida foram os mesmos utilizados na qPCR para detecção dos Betaherpesvírus (Tabela 3.1).

3.8 Pan PCR convencional para detecção dos Betaherpesvírus

As amostras positivas no PCR em tempo real também foram testadas no PCR convencional para confirmar o diagnóstico. Para detecção simultânea dos Betaherpesvírus foi utilizado a técnica Pan-Herpesvírus baseada na amplificação, por PCR *Nested* (Pan-PCR), do gene Dpol, uma região altamente conservada do genoma dos Herpesvírus, e na identificação da espécie destes através de sequenciamento do genoma viral (Ehlers *et al.*, 1999).

Na primeira etapa de amplificação foi realizada, para cada reação, uma mistura composta por 8,0 µL de água RNase/DNase free (*Gibco, NI, EUA*), 2,5 µL de tampão 10x PCR Buffer I (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), 0,4 mM de concentração de dNTP (100 mM-*Invitrogen, CA, EUA*), 5% de DMSO a 100x (*Life Technologies, Califórnia, EUA*), 1 µM de concentração de cada oligonucleotídeo, 2 mM de concentração MgCl₂ (*Promega, EUA*), e 1,5 U/µL de *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) de acordo com o protocolo desta enzima. Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados e sintetizados para a detecção dos Herpesvírus como descrito por Ehlers e colaboradores (Ehlers *et al.*, 1999). Na tabela 3.8 estão demonstradas as sequências dos iniciadores desta primeira etapa.

Tabela 3.8. Sequências de iniciadores utilizados na primeira etapa da PCR *Nested* descritos por Ehlers *et al*

Iniciadores	Sequência (5'- 3')*	Orientação	Localização**
285sDFA	GAYTTYGC[N/I]AGYYT[N/I]TAYCC	senso	DNA Pol.
285sILK	TCCTGGACAAGCAGCAR[N/I]YSGC[N/I]MT[N/I]AA	senso	DNA Pol.
285-asKG1	GTCTTGCTCACCAG[N/I]TC[N/I]AC[N/I]CCYTT	anti-senso	DNA Pol.

*Código IUPAC para indicar as posições degeneradas: I: inosina, R: purina (A/G), Y: pirimidina (C/T), M: A/C, S: C/G, N: base indefinida (A/T/C/G).

** DNA Pol.: gene que codifica a enzima DNA polimerase viral (DPOL)

Posteriormente a solução foi homogeneizada no *vortex-Genie* (*Scientific Industries, Inc., EUA*) e homogeneizada por 30 segundos na centrífuga 5415R *Eppendorf* (*Eppendorf, Hamburgo, Alemanha*). Após isso, foram adicionados 22,5 µL da mistura em cada tubo de poliestireno de 0,5 mL devidamente identificados e 2,5 µL da respectiva amostra de DNA viral extraído anteriormente e novamente as soluções foram homogeneizadas e centrifugadas por 30 segundos. Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador *Master CyclerEppendorf* (*Eppendorf, Hamburgo,*

Alemanha) para amplificar a região DPOL dos Herpesvírus e foram submetidas ao seguinte ciclo de temperaturas apresentado na tabela 3.9. Ao final dos ciclos, os materiais foram armazenados em a -20°C para a segunda etapa da PCR *Nested*.

Tabela 3.9. Termociclagem referente à primeira etapa da PCR *Nested* descritos por Ehlers et al.

Atividade	Temperatura	Tempo	
Desnaturação inicial	95°C	12 minutos	
Desnaturação	95°C	20 segundos	} 45 ciclos
Hibridização	46°C	30 segundos	
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão final	72°C	10 minutos	

Na segunda etapa de amplificação foi realizada, para cada reação, uma mistura que foi composta por 12,0 µL de água RNase/DNase free (*Gibco, NI, EUA*), 2,5 µL de tampão 10x PCR Buffer I (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), 0,4 mM de concentração de dNTP (100 mM-*Invitrogen, CA, EUA*), 5% DMSO a 100x (*Life Technologies, Califórnia, EUA*), 1 µM de concentração de cada oligonucleotídeo, 2 mM de concentração MgCl₂ (*Promega, EUA*), e 1,5 U/µL de *AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)* de acordo com o protocolo desta enzima.

Os oligonucleotídeos específicos foram desenhados e sintetizados para a detecção dos Herpesvírus como descrito por Ehlers e colaboradores (Ehlers *et al.*, 1999). Na tabela 3.10 estão demonstradas as sequências dos iniciadores desta segunda etapa.

Tabela 3.10. Sequências dos iniciadores referentes à segunda etapa da PCR *Nested*

Iniciadores	Sequência (5'- 3') *	Orientação	Localização**
286sTGV	TGTAACCTCGGTGTAYGG[N/I]TTYAC[N/I]GG[N/I]GT	senso	DNA Pol.
286-asIYG	CACAGAGTCCGTRTC[N/I]CCRTA[N/I]AT	anti-senso	DNA Pol.

*Código IUPAC para indicar as posições degeneradas: I: inosina, R: purina (A/G), Y: pirimidina (C/T), N: base indefinida(A/T/C/G).

** DNA Pol.: gene que codifica a enzima DNA polimerase viral (DPOL)

Posteriormente a solução foi homogeneizada no *vortex-Genie (Scientific Industries, Inc., EUA)* e sofreu uma rápida centrifugação de 30 segundos na centrífuga

5415R *Eppendorf* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha). Em seguida, foram adicionados 24,0 µL da mistura em cada tubo de poliestireno de 0,5 mL devidamente identificados e 1,0 µL do respectivo amplicon obtido na etapa anterior (primeira etapa), e novamente as soluções foram homogeneizadas e centrifugadas por 30 segundos. Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador *Master CyclerEppendorf* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha) para amplificar a região Dpol dos Herpesvírus, e foram submetidas ao seguinte ciclo de temperaturas apresentado na tabela 3.11. Ao final dos ciclos, os materiais foram armazenados a -20°C para a eletroforese.

Tabela 3.11. Termociclagem referente à segunda etapa da PCR *Nested*

Atividade	Temperatura	Tempo	
Desnaturação inicial	95°C	12 minutos	
Desnaturação	95°C	20 segundos	} 35 ciclos
Hibridização	46°C	30 segundos	
Extensão	72°C	30 segundos	
Extensão final	72°C	10 minutos	

Para a visualização e análises dos resultados da amplificação da segunda etapa da PCR *Nested*, os fragmentos de DNA formados foram separados por eletroforese em gel de agarose à concentração de 1,5% contendo tampão Tris/Acetato/EDTA (TAE) 1x (50x – 242 g de Tris base/ 57,1 mL de ácido acético glacial/100 mL de EDTA 0,5 M pH: 8,0), agarose (*Gibco*, EUA) e 0,5% de brometo de etídio a 0,5 µg/ml (*Invitrogen*, EUA). Posterior à formação dos poços no gel de agarose, foi aplicado nestes a homogeneização de 8 µL de cada produto da segunda etapa da PCR *Nested* com 2,0 µL de tampão de amostra (50% de glicerol, 0,4% de azul de bromofenol, 0,4% de xileno cianol). Foi utilizado 6 µL do padrão de peso molecular 100 pares de bases (*Norgen Biotek Corporation*, Ontario, Canadá). Após a aplicação do peso molecular e de todas as amostras, foi realizada a corrida e a separação dos fragmentos de DNA por eletroforese com voltagem de 85 volts na fonte por 30 minutos (*Hoefler, Inc.*, Massachusetts, EUA). Posterior a corrida, o produto amplificado da região DPOL dos Herpesvírus de 160-181 pares de bases foi visualizado em luz ultravioleta no foto-documentador *Kodak Gel Logic 2200* (*Hyland Scientific*, Washington, USA) e os resultados gerados foram analisados possibilitando a confirmação das amostras que foram reagentes para algum dos Betaherpesvírus.

3.9 Sequenciamento do genoma dos Herpesvírus humanos e análise filogenética

Após a eletroforese e análises dos resultados da amplificação por PCR *nested*, as amostras que foram reagentes para Betaherpesvírus, ou seja, que amplificaram a região Dpol, foram sequenciadas para confirmar o Betaherpesvírus humano que foi detectado. Para isso, foi realizada a preparação da reação de sequenciamento de DNA, em tubos de poliestireno de 1,5 mL livres de nucleases e devidamente identificados, onde cada reação foi composta por 5,5 µL de água RNase/DNase *free* (Gibco, NI, EUA), 1,0 µL de oligonucleotídeos da segunda etapa da PCR *Nested* a 3,2 pmol (Quadro 3.3) e 1,0 µL do respectivo amplicon obtido nesta etapa da PCR *Nested* realizada anteriormente. O sequenciamento foi realizado em ambas as direções (senso e anti-senso), utilizando, assim, duas reações de sequenciamento de DNA para cada amostra amplificada na segunda etapa da PCR *Nested*, contendo, então, um único oligonucleotídeo desta etapa (senso ou antisenso) em cada reação. Essas reações foram entregues à plataforma de sequenciamento de DNA do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde/PDTIS (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil), onde o sequenciamento foi realizado utilizando o kit *BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, USA) no termociclador *Gen Amp PCR system 9700* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e o sequenciador *ABI3730xl -96 capilares* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). As sequências nucleotídicas obtidas pela plataforma foram analisados no programa *BioEdit 7.2.5* e foram comparadas a outras sequências depositadas no *GenBank* com a utilização da ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) para a identificação da espécie de Betaherpesvírus que foi detectado na PCR *Nested*.

As sequências recuperadas neste trabalho foram alinhadas com sequências referência do HCMV, HHV-6 e HHV-7 utilizando a ferramenta de alinhamento *ClustalW* inclusa no programa MEGA 7.0 (Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). A análise filogenética foi realizada utilizando o método de Neighbor-Joining usando o programa MEGA v7.0 (Kumar et al., 2016). Foi utilizado o modelo de substituição kimura-2 parâmetros. Os valores nos nós internos da árvores indicam a porcentagem de 1500 *bootstraps* que suportam o grupo.

3.10 Análise Bioquímica das amostras

As análises bioquímicas são a determinação de transaminase pirúvica (alanina aminotransferase – ALT) e de transaminase oxaloacética (aspartato aminotransferase – AST) através de espectrofotometria por NADH (sem P-5'-P), de gama glutamil transpeptidase (Gama-GT) através de espectrofotometria por Substrato de L-Gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida, de fosfatase alcalina através de espectrofotometria por Para-nitrofenil fosfato. Esses procedimentos de espectrofotometria foram realizados no Hospital Geral de Bonsucesso através de procedimentos colorimétricos usando kits comerciais (Abbott, Illinois, Estados Unidos da América).

Para as análises dos marcadores bioquímicos, as amostras foram divididas em três grupos: amostras de FHA positivas para os Betaherpesvírus (β -Herpesvírus positivo), amostras de FHA negativas para os Betaherpesvírus (β -Herpesvírus negativo) e amostras de controles saudáveis.

3.11 Análise Estatística

Os dados obtidos referentes às variáveis analisadas e os resultados dos testes moleculares foram categorizados e armazenados em um banco de dados criado no *Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, EUA)*. Com base na análise estatística, foram utilizados o *GraphPad Prism 3.0* software para construção dos gráficos e realizado o teste T de Student (não pareado) quando analisados dois grupos de dados não paramétricos e ANOVA de fator único com pós-teste Bonferroni para mais de dois grupos de dados não paramétricos. As correlações entre as variáveis foram analisadas pelo coeficiente de Spearman, na qual um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

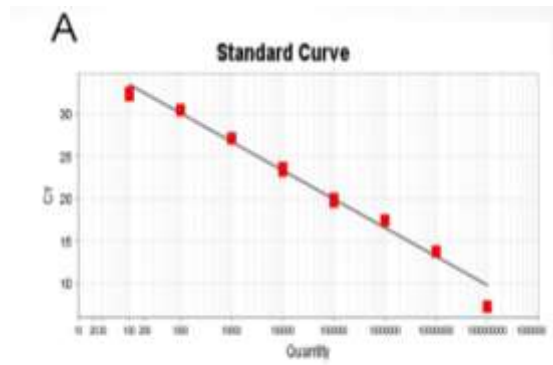
4. Resultados

4.1 Otimização das curvas sintéticas padrão

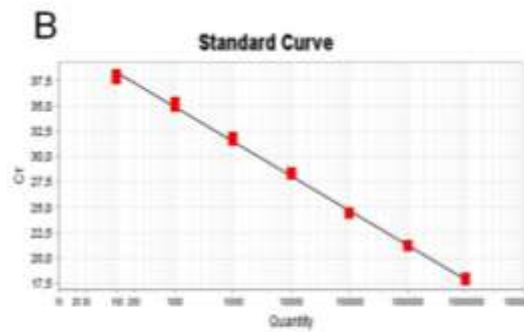
As curvas sintéticas padrões para o HCMV, HHV-6 e HHV-7 foram otimizadas para a detecção e quantificação de Betaherpesvírus. A análise de sensibilidade e eficiência foi realizada e o limite de detecção foi estabelecido por meio de diluições seriadas de 1:10 (Tabela 4.1). A quantificação dos vírus pode ser realizada utilizando a curva padrão. As diluições seriadas de 10^1 e 10^8 de cada curva padrão foram utilizadas para os ensaios de qPCR (Figura 4.1).

Tabela 4.1 Parâmetros das curvas padrões utilizadas para quantificar os *Betaherpesvírus*

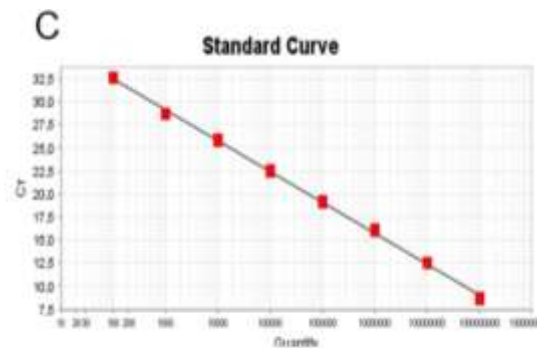
Vírus	Slope-	Y-Inter	R2	Eficiência %	Limite de detecção
HCMV	3,388	39,946	0,989	97,319	5,00E+01
HHV-6	3,399	41,445	0,995	96,889	5,00E+01
HHV-7	3,358	39,273	0,999	98,529	5,00E+01



Curva sintética Padrão – HCMV
Região UL54



Curva sintética Padrão – HHV-6
Região U56



Curva sintética Padrão – HHV-7
Região U37

Figura 4.1 – Resultado da otimização das curvas padrões. (A) Curva sintética padrão do HCMV; (B) Curva sintética padrão do HHV-6; (C) Curva sintética padrão do HHV-7.

4.2 Otimização da PCR em tempo real para detecção e quantificação dos Betaherpesvírus

Após a otimização das curvas para quantificação, a otimização da PCR em tempo real monoplex e multiplex para detecção e quantificação dos Betaherpesvírus foi realizada. Inicialmente, testou-se a amplificação individual de cada alvo, posteriormente testou-se a combinação da amplificação de dois alvos diferentes simultaneamente, para enfim testar a amplificação dos três alvos juntos. Como resultado obtido, não houve inibição e nem a interferência de ligação inespecífica de oligonucleotídeos de nenhum alvo. A figura 4.2 mostra a detecção dos três vírus nas diferentes situações de amplificação.

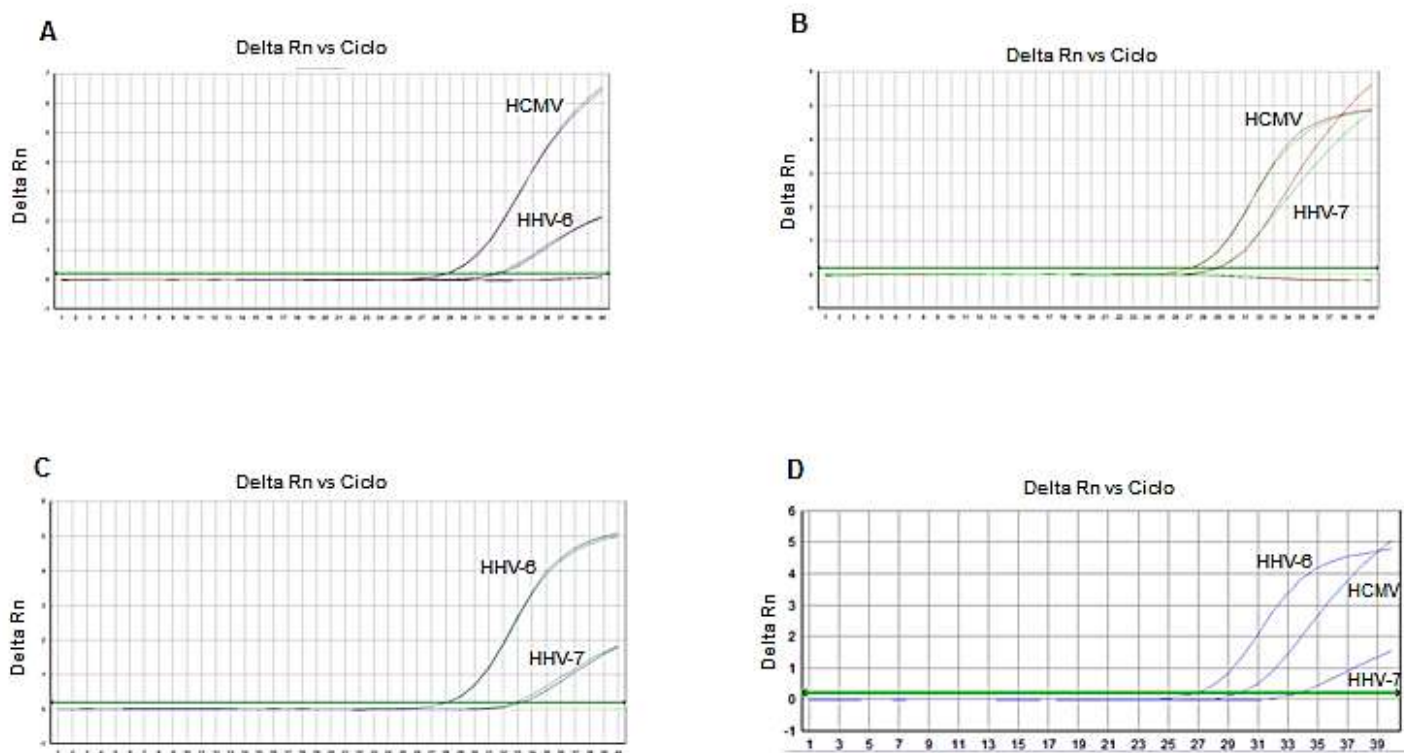


Figura 4.2 Padronização da qPCR multiplex para os Betaherpesvírus. (A) Duplex qPCR utilizando HCMV e o HHV-6 como alvos. (B) Duplex qPCR utilizando o HCMV e o HHV-7 como alvos. (C) Duplex qPCR utilizando o HHV-6 e HHV-7 como alvos. (D) Triplex utilizando o HCMV, HHV-6 e HHV-7 como alvos.

4.3 Análise de precisão, reprodutibilidade e especificidade da qPCR multiplex para os Betaherpesvírus

Para a análise de precisão e reprodutibilidade do qPCR multiplex foram testadas, para cada vírus, seis amostras positivas de quantificações distintas, durante três dias. Cada amostra foi reproduzida em triplicata e assim, foi calculado a média e o desvio padrão das três repetições e assim foi determinado o coeficiente de variação (CV%) que deve ser menor que 15% para mostrar um teste reprodutível.

Cada análise foi realizada para cada um dos Betaherpesvírus. Isso pôde demonstrar a precisão do teste qPCR para detecção e quantificação dos Betaherpesvírus (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 Média de Ct e desvio padrão e CV % da análise de sensibilidade para cada Betaherpesvírus

		Média Ct ± DP amostra 1*	CV%	Média Ct ± DP amostra 2*	CV%	Média Ct ± DP amostra 3*	CV%	Média Ct ± DP amostra 4*	CV%	Média Ct ± DP amostra 5*	CV%	Média Ct ± DP amostra 6*	CV%
HCMV	Dia 1	34,73 ± 0,12	0,35	26,53 ± 0,88	3,31	22,25 ± 0,22	0,99	18,73 ± 0,41	2,21	21,81 ± 1,76	8,06	14,06 ± 0,01	0,05
	Dia 2	38,10 ± 0,71	1,85	25,74 ± 0,58	2,27	21,69 ± 0,45	2,07	18,16 ± 0,45	2,50	21,37 ± 1,27	5,94	14,05 ± 0,03	0,23
	Dia 3	37,57 ± 0,52	1,37	25,52 ± 0,29	1,14	22,24 ± 0,17	0,75	18,62 ± 0,67	3,62	21,22 ± 0,53	2,48	14,03 ± 0,04	0,27
	Média Total	36,8 ± 0,30	0,81	25,93 ± 0,29	1,13	22,06 ± 0,15	0,68	18,50 ± 0,14	0,76	21,47 ± 0,62	2,89	14,05 ± 0,02	0,11
HHV-6	Dia 1	29,3 ± 0,27	0,91	14,07 ± 0,01	0,10	22,09 ± 0,24	1,09	18,58 ± 0,21	1,12	13,25 ± 0,03	0,26	25,36 ± 0,54	2,12
	Dia 2	28,42 ± 0,23	0,81	14,04 ± 0,03	0,19	22,24 ± 0,13	0,58	18,44 ± 0,28	1,53	13,25 ± 0,04	0,31	25,11 ± 0,36	1,42
	Dia 3	28,54 ± 0,23	0,81	14,02 ± 0,02	0,11	22,42 ± 0,12	0,51	18,65 ± 0,02	0,08	13,23 ± 0,02	0,16	25,35 ± 0,08	0,33
	Média Total	28,75 ± 0,02	0,07	14,04 ± 0,01	0,05	22,25 ± 0,07	0,31	18,56 ± 0,14	0,74	13,24 ± 0,01	0,08	25,27 ± 0,23	0,90
HHV-7	Dia 1	31,77 ± 0,35	1,12	27,01 ± 0,56	2,06	23,57 ± 0,12	0,51	19,78 ± 0,19	0,94	21,45 ± 0,40	1,88	14,75 ± 0,03	0,19
	Dia 2	31,06 ± 0,08	0,25	27,47 ± 0,31	1,11	23,49 ± 0,12	0,51	19,53 ± 0,41	2,09	21,43 ± 0,96	4,48	14,69 ± 0,07	0,50
	Dia 3	30,95 ± 0,18	0,57	27,25 ± 0,28	1,01	23,32 ± 0,77	3,31	19,81 ± 0,28	1,42	21,76 ± 0,36	1,64	14,73 ± 0,01	0,04
	Média Total	31,26 ± 0,14	0,45	27,25 ± 0,15	0,56	23,46 ± 0,38	1,60	19,71 ± 0,11	0,57	21,55 ± 0,34	1,56	14,72 ± 0,03	0,24

Para a análise de especificidade foram utilizados diferentes alvos da família *Herpesviridae*. Amostras de soro, armazenadas anteriormente no banco de amostras do LADTV, positivas para o Herpes simplex vírus 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) e para o vírus de Epstein-Barr (EBV) foram testadas pela qPCR multiplex padronizada anteriormente. Neste teste, foram utilizados os alvos dos Betaherpesvírus como controle positivo da reação. Como resultado desse teste, houve a detecção dos Betaherpesvírus, porém não houve a detecção dos demais Herpesvírus testados mostrando assim, a reação específica para os alvos dos Betaherpesvírus (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 Análise de especificidade do qPCR para detecção e quantificação dos betaherpevírus

Amostra	Cycle Threshold (Ct)
HCMV	37,65
HHV-6	31,12
HHV-7	31,46
HSV-1	ND*
HSV-2	ND*
EBV	ND*
Controles Negativos	ND*

*Não detectados

4.4 Descrição da população de estudo

Após a otimização da reação, as amostras de soro e / ou o fígado de 27 pacientes com falência hepática aguda de etiologia desconhecida foram testadas por qPCR monoplex e multiplex. A população de estudo desse trabalho foi composta por 27 pacientes com FHA e por 5 controles saudáveis. As amostras de controles saudáveis são provenientes de doadores e negativas para os Herpesvírus. Em relação ao gênero, pode-se observar uma predominância do sexo feminino tanto em pacientes com FHA quanto em pacientes saudáveis (Tabela 4.4). Em relação a faixa etária, os pacientes com FHA foram em sua maioria (n=7) de 45 a 55 anos e em relação aos controles saudáveis os pacientes foram em sua totalidade (n=5) de 28 a 36 anos. A média de idades dos pacientes com FHA foi de $26,11 \pm 17,55$ anos e de $30,8 \pm 3,42$ para os pacientes saudáveis, grupo controle.

Tabela 4.4 Descrição do gênero da população geral de estudo

	Pacientes FHA	Controles saudáveis	Total
Sexo feminino	20	3	23
Sexo masculino	7	2	9
Total	27	5	32

Em relação as amostras FHA positivas, obteve-se também maior prevalência do sexo feminino e da faixa etária em média de $23,77 \pm 19,46$. Além disso, também foi descrito o desfecho clínico e pode-se observar que 83,3% (5/6) dos pacientes HHV-6 positivos foram a óbito (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 Descrição da população β -Herpesvírus positiva

Paciente	Ano	Idade	Sexo	Desfecho Clínico	β -Herpesvírus Positivo
FHF - 3	2006	9	F	Óbito	HHV-6
FHF - 4	2008	49	F	Alta	HHV-6
FHF - 5	2012	45	M	Óbito	HHV-6/HHV-7
FHF - 6	2008	48	F	Alta	HCMV
FHF - 13	2009	31	F	Óbito	HHV-6
FHF - 14	2009	10	M	Alta	HCMV
FHF - 17	2009	1	F	Óbito	HCMV/HHV-6/HHV-7
FHF - 26	2009	7	M	Óbito	HHV-6
FHF - 27	2004	14	F	Alta	HHV-7

4.5 Detecção e quantificação dos Betaherpesvírus por qPCR multiplex

Das amostras testadas, 14 eram de fígado e 21 de soro. As amostras de FHA foram testadas em duplicata nas diferentes reações. Para HCMV 9,5% (2/21) foram positivas no soro, e 7,1% (1/14) foram positivas no fígado, para o HHV-6 4,76% (1/21) foi positivo no soro e 42,8% (6/14) foram positivos no fígado, já para o HHV-7 14,2% (2/14) foram positivas no fígado, não houve positividade para o HHV-7 nas amostras no soro. As amostras foram quantificadas em cada reação pela presença da curva padrão.

Após a detecção e a quantificação dos Betaherpesvírus nas amostras de FHA sem etiologia definida, foi realizado as análises estatísticas e a comparação entre a detecção e a quantificação dos Betaherpesvírus através da qPCR monoplex e multiplex, visto nas tabelas 4.6 e 4.7. Através da comparação entre as duas reações viu-se que todas as amostras positivas na qPCR monoplex também foram positivas na qPCR multiplex, além disso, o Ct e a carga viral da quantificação apresentaram resultados similares em ambas.

Tabela 4.6 Comparação da detecção dos Betaherpesvírus (Ct) das amostras de falência hepática aguda de soro e fígado no qPCR monoplex e multiplex.

Amostras Fígado	HCMV				HHV-6				HHV-7			
	CT- Monoplex	± SD	CT- Multiplex	± SD	CT- Monoplex	± SD	CT- Multiplex	± SD	CT- Monoplex	± SD	CT- Multiplex	± SD
FHF-3	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.	33,06	0,26	32,9	1,08	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.
FHF-5	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.	35,19	0,53	37,02	0,33	36,07	0,38	38,84	0,18
FHF-13	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.	30,78	0,29	30,54	0,15	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.
FHF-17	36,87	0,20	36,83	0,11	32,26	0,36	32,06	0,21	32,53	0,13	32,38	0,14
FHF-26	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.	34,46	0,60	35,08	0,48	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.
FHF-27	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.	36,55	1,11	38,25	1,85	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.
Amostras Soro												
FHF-4	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.	37,08	0,69	37,09	1,46	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.
FHF-6	33,52	0,14	34,1	0,42	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.
FHF-14	37,54	0,46	38,5	0,08	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.

Tabela 4.7 Comparação da quantificação (Carga viral – cópias/mL) dos Betaherpesvírus (Ct) das amostras de falência hepática aguda de soro e fígado no qPCR monoplex e multiplex.

Amostras Fígado	HCMV*		HHV-6*		HHV-7*	
	Cópias/mL - Monoplex	Cópias/mL - Multiplex	Cópias/mL - Monoplex	Cópias/mL - Multiplex	Cópias/mL - Monoplex	Cópias/mL - Multiplex
FHF-3	Indet.	Indet.	3,24E+05	3,70E+05	Indet.	Indet.
FHF-5	Indet.	Indet.	5,06E+04	2,54E+03	1,24E+04	2,18E+03
FHF-13	Indet.	Indet.	1,97E+06	2,36E+06	Indet.	Indet.
FHF-17	4,15E+03	4,31E+03	4,65E+05	7,30E+05	1,18E+05	1,29E+05
FHF-26	Indet.	Indet.	9,78E+04	5,60E+04	Indet.	Indet.
FHF-27	Indet.	Indet.	1,37E+04	2,27E+03	Indet.	Indet.
Amostras Soro						
FHF-4	Indet.	Indet.	8,02E+03	7,94E+03	Indet.	Indet.
FHF-6	7,81E+04	4,79E+04	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.
FHF-14	4,79E+04	1,48E+04	Indet.	Indet.	Indet.	Indet.

No total, 25,7% (9/35) das amostras de FHA sem etiologia definida foram positivas para pelo menos um dos Betaherpesvírus, seis foram positivos para o fígado e três para o soro. Duas amostras foram positivas para mais de um Betaherpesvírus. Comparando a presença dos Betaherpesvírus nas amostras positivas, viu-se que o HHV-6 foi o mais encontrado com 66,6% (6/9), já o HCMV obteve 33,3% (3/9) e o HHV-7 22,2% (2/9) (Gráfico 4.1).

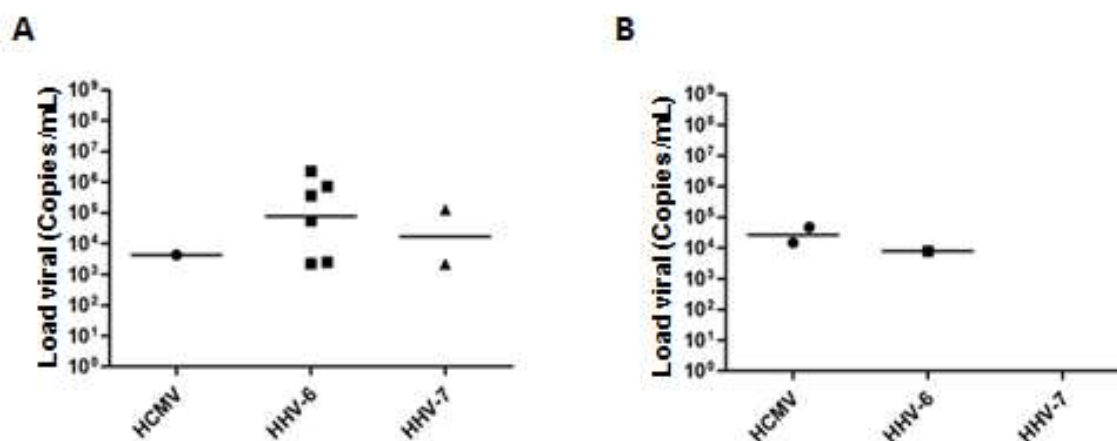


Gráfico 4.1 Comparação das amostras de FHA de soro e fígado positivas para o HCMV, HHV-6 e HHV-7. (A) Carga viral (cópias / ml) de amostras de fígado positivas para os Betaherpesvírus. (B) Carga viral (cópias / ml) de amostras de soro positivas para os Betaherpesvírus.

4.6 Controle endógeno interno (RNase P)

A RNase P foi utilizada como controle endógeno interno. A qPCR multiplex foi realizada e adicionada RNaseP às amostras negativas e às amostras controles de pacientes saudáveis. Com a presença da RNase P pode-se observar que os valores de Ct para o gene de RNase P permaneceu bastante constante, tanto nas amostras de falência hepática aguda, quanto para as amostras controles de pacientes saudáveis, eliminando a possibilidade de resultados falsos negativos (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 Avaliação do gene de RNase P humano como um controle interno endógeno de amplificação no TaqMan qPCR multiplex para Betaherpesvírus.

RNase P (Amostras FHA)	±DP	RNase P (Controles Saudáveis)	±DP
29,93	0,07	27,55	0,01
25,81	0,11	28,47	0,2
27,06	0	28,46	0,12
22,84	0,33	29,03	0,32

DP= Desvio Padrão

4.7 Detecção de Betaherpesvírus por PCR Convencional (Pan-Herpesvírus)

A detecção dos Betaherpesvírus das nove amostras positivas pelo qPCR foi realizada através do Pan- Herpesvírus: PCR *Nested* e sequenciamento do genoma. Verificou-se que, na PCR *Nested*, utilizando oligonucleotídeos para amplificar a região Dpol dos Herpesvírus, todas as amostras que foram positivas anteriormente no qPCR monoplex e multiplex foram positivas também através do Pan-Herpesvírus.

4.8 Sequenciamento e Análise Filogenética

O sequenciamento foi realizado como descrito no item (3.9) a partir das amostras positivas para o Pan-Herpesvírus utilizando a região Dpol. A árvore filogenética foi construída e as sequências das amostras positivas foram incluídas, porém somente 5 amostras de fígado positivas para o HHV-6 conseguiram ser sequenciadas. A partir da árvore construída podemos observar que todas as amostras que foram sequenciadas encontram-se no mesmo clado que o HHV-6B, mostrando assim pertencerem a essa espécie (Figura 4.3).

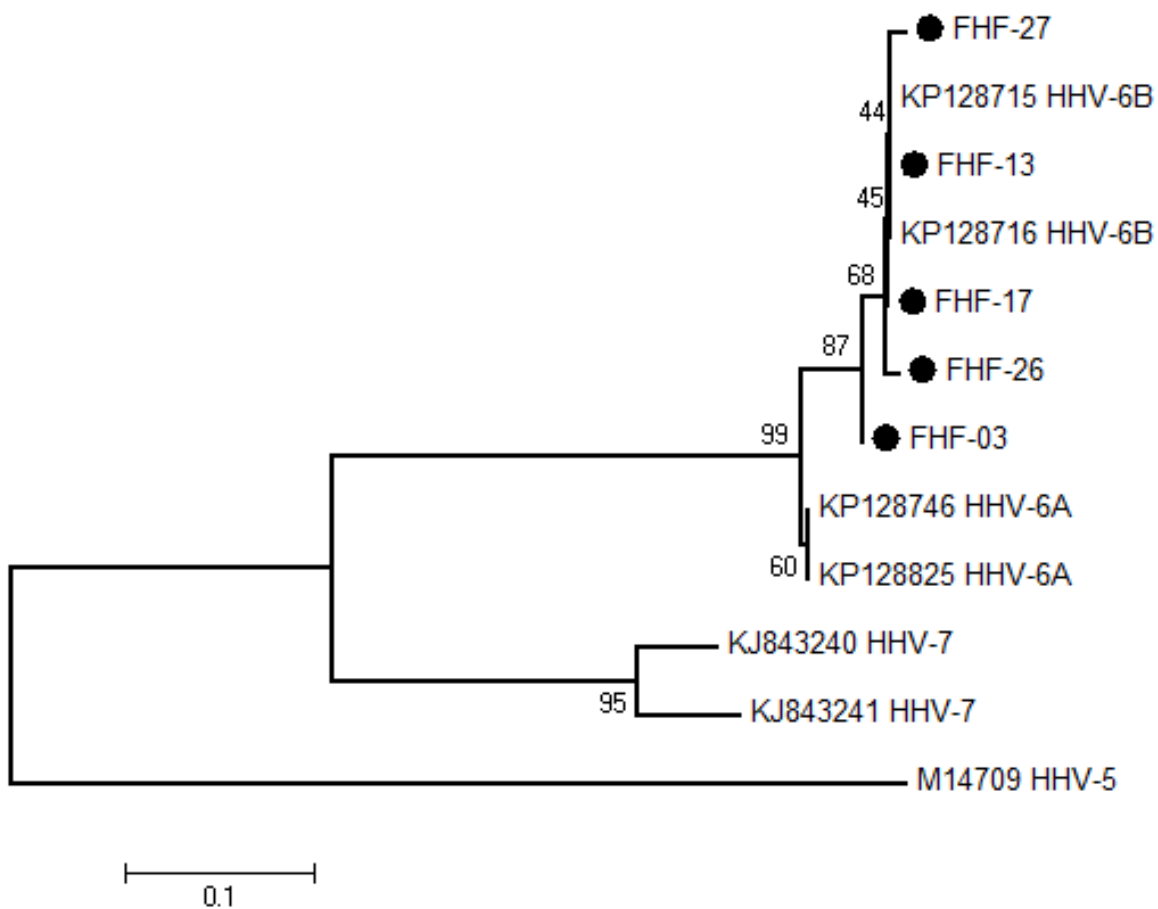


Figura 4.3. Árvore Filogenética da região genômica Dpol (120 nt) inferida usando o método de Neighbor-Joining. Os valores nos nós internos da árvores indicam a porcentagem de 1500 bootstraps que suportam o grupo. As sequências referência estão indicadas por seu número de acesso. As sequências obtidas neste estudo estão indicadas por esferas pretas.

4.9 Avaliação de Aspartato aminotransferase (AST)

A comparação para a avaliação de aspartato aminotransferase foi realizada entre os pacientes saudáveis, pacientes com FHA positivos e negativos para β -Herpesvírus e pode-se observar níveis maiores no grupo de amostras de falência hepática aguda positivas para os Betaherpesvírus (Gráfico 4.2).

Apesar da elevação da AST nos pacientes positivo para Betaherpesvírus, as análises estatísticas entre os grupos foram realizadas e não houveram diferenças significativas entre nenhum dos grupos. Entre os três grupos β -Herpesvírus positivo, β -Herpesvírus negativo e Controle Saudável, foi encontrado $P=0,2664$ e $R=0,1722$. Assim como, a comparação entre os β -Herpesvírus positivo e β -Herpesvírus negativo ($P=0,4584$ e $R=0,05095$), como também, a comparação entre β -Herpesvírus positivo e Controle Saudável ($P=0,1150$ e $R=0,2809$) e entre β -Herpesvírus negativo e Controle Saudável ($P=0,2809$ e $R=0,0254$).

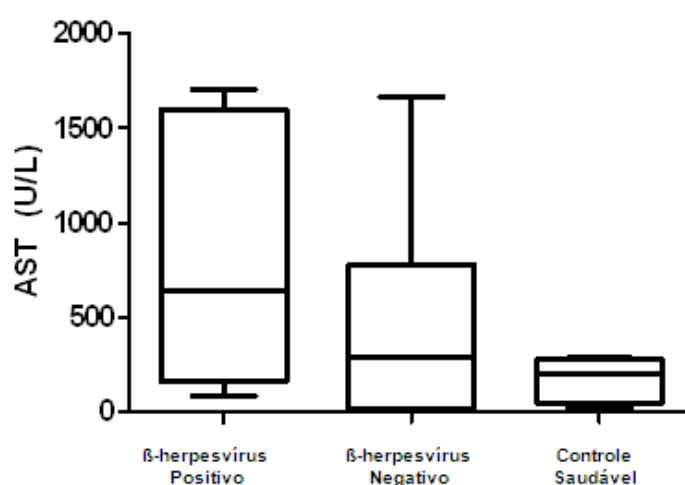


Gráfico 4.2 Comparação dos níveis de AST entre as populações de estudo.

4.10 Avaliação de Alanina aminotransferase (ALT)

A comparação foi realizada entre os três grupos da população de estudo para a avaliação de alanina aminotransferase e pode-se observar níveis maiores no grupo de amostras de falência hepática aguda positivas para os Betaherpesvírus (Gráfico 4.3).

Entre os três grupos β -Herpesvírus positivo, β -Herpesvírus negativo e Controle Saudável, não houveram diferenças significativas ($P= 0,3535$ e $R= 0,1380$). Assim como, a comparação entre os β -Herpesvírus positivo e β -Herpesvírus negativo ($P=0,3640$ e $R=0,07537$), como também, a comparação entre β -Herpesvírus positivo e Controle Saudável ($P= 0,2873$ e $R= 0,1397$) e entre β -Herpesvírus negativo e Controle Saudável ($P= 0,2369$ e $R=0,1514$) também não houveram diferenças significativas.

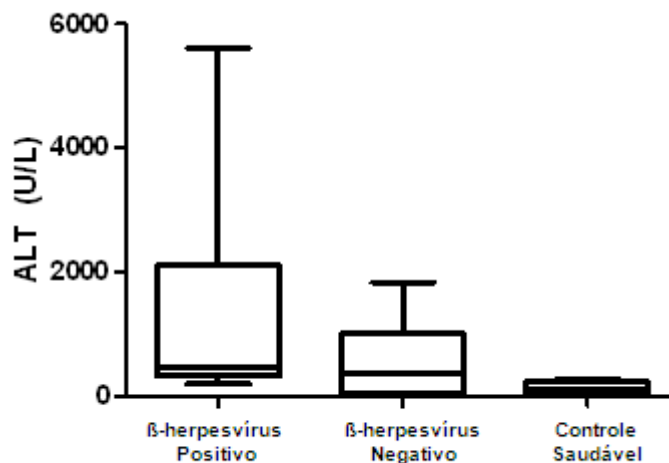


Gráfico 4.3 Comparação dos níveis de ALT entre as populações de estudo.

4.11 Avaliação de Fosfatase Alcalina (FA)

Após a comparação entre os três grupos da população de estudo para a avaliação de fosfatase alcalina, observou-se níveis maiores no grupo de amostras de falência hepática aguda positivas para os Betaherpesvírus (Gráfico 4.4).

Como resultado das análises estatísticas entre os três grupos β -Herpesvírus positivo, β -Herpesvírus negativo e Controle Saudável, não houve diferenças significativas ($P=0,1764$ e $R=0,1459$). Assim como, a comparação entre os β -Herpesvírus positivo e β -Herpesvírus negativo ($P=0,2573$ e $R=0,06367$), como também, a comparação entre β -Herpesvírus positivo e Controle Saudável ($P=0,2050$ e $R=0,2181$) e entre β -Herpesvírus negativo e Controle Saudável ($P=0,1111$ e $R=0,1425$) também não houve diferenças significativas.

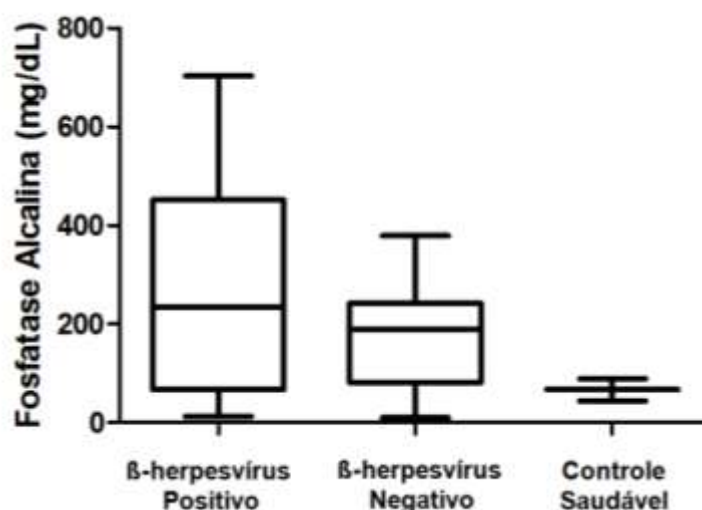


Gráfico 4.4 Comparação dos níveis de FA entre as populações de estudo.

4.12 Avaliação de Gama-Glutamil Transferase (GAMA-GT)

Para a avaliação de Gama-Glutamil Transferase, a comparação foi realizada entre os três grupos da população de estudo e pode-se observar níveis maiores no grupo de amostras de falência hepática aguda positivas para os Betaherpesvírus (Gráfico 4.5).

Entre os três grupos β -Herpesvírus positivo, β -Herpesvírus negativo e Controle Saudável, não houveram diferenças significativas ($P= 0,5081$ e $R= 0,3112$). Assim como, a comparação entre os β -Herpesvírus positivo e β -Herpesvírus negativo ($P=0,4536$ e $R=0,02837$), como também, a comparação entre β -Herpesvírus positivo e Controle Saudável ($P= 0,085$ e $R= 0,5553$) e entre β -Herpesvírus negativo e Controle Saudável ($P= 0,049$ e $R= 0,3472$) também não houveram diferenças significativas.

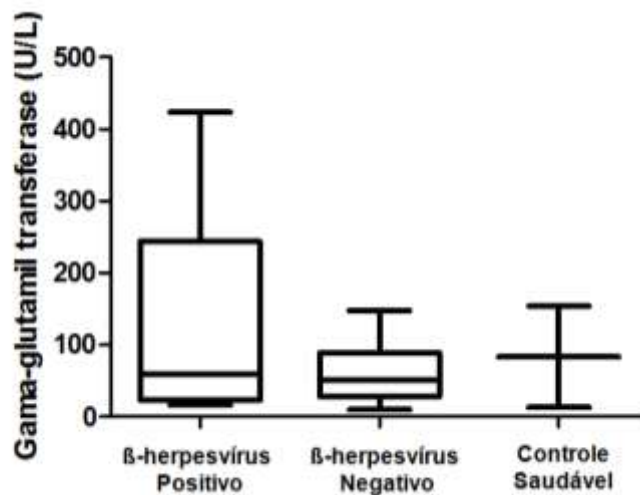


Gráfico 4.5 Comparação dos níveis de GAMA-GT entre as populações de estudo.

5. Discussão

A FHA é uma condição em que, anteriormente o fígado saudável se deteriora rapidamente, resultando em icterícia, encefalopatia e coagulopatia. Há cerca de 2.000 casos por ano de falência hepática nos Estados Unidos (Lee *et al.*, 2008), com média de aproximadamente 1 a 6 casos por milhão por ano em todo o mundo. No Brasil, sabe-se que 2% dos transplantes de fígado são por falência hepática (Squires *et al.*, 2006). A etiologia de casos de FHA muitas vezes é desconhecida, sendo alguns desses casos não positivos para os vírus hepatotrópicos (Vírus da Hepatite A-E)(Wei *et al.*, 2007). Sem a determinada etiologia da doença, muitos casos possuem tratamento tardio, e assim provocando a ocorrência de óbitos. Por conta disso, um estudo foi realizado, a fim de encontrar o agente etiológico da falência hepática aguda viral em casos sem etiologia definida, onde foram testadas amostras de FHA sem etiologia para supostos agentes virais, tais como os Vírus da Hepatite (A, B, C e E) e os Herpesvírus (EBV e HSV) (Jayakumar *et al.*, 2013). Neste estudo, Jayakumar afirma que embora os Vírus da Hepatite sejam a causa mais comum de FHA, os Herpesvírus também se mostraram fortemente relacionados à causa da doença. Em estudos anteriores, outros vírus da família *Herpesviridae* também foram encontrados relacionados a casos de FHA como os Betaherpesvírus (Ishikawa *et al.*, 2002; Abbo *et al.*, 2007).

Os Betaherpesvírus (HCMV, HHV-6 e HHV-7) são comuns em todo o mundo. O HCMV tem uma prevalência de 70-80% em adultos (Cisneros-Herreros e Herrero-Romero, 2006). O HHV-6 e HHV-7 possuem prevalência em média de 90% em adultos (Razonable, 2013). Em pacientes imunocomprometidos, a infecção por HCMV provoca aumento da morbidade, especialmente em casos de transplante de órgãos (Cisneros-Herreros e Herrero-Romero, 2006). Num estudo de 15 casos em amostras de fígado com hepatite, o HHV-6 foi encontrada em 12 (80%) delas (Harma *et al.*, 2006) e relatado também a relação de casos de FHA ao HHV-6 (Paula *et al.*, 2014). O HHV-7 corresponde a um vírus menos patogênico que o HHV-6 podendo também ser encontrado associada com a infecção oportunista (De Vlaminck *et al.*, 2015).

Devido a falta de ferramentas de detecção e quantificação para os Betaherpesvírus e carência de dados no Brasil sobre os casos de FHA sem etiologia, este estudo visou desenvolver um qPCR multiplex, de modo a detectar e quantificar simultaneamente aos vírus da subfamília *Betaherpesvirinae* em amostras de pacientes com FHA de etiologia desconhecida.

A PCR em tempo real, além dos oligonucleotídeos, utiliza sondas marcadas e amplifica um fragmento pequeno, o que torna o diagnóstico mais específico que a PCR convencional. Nos últimos anos, tem havido um crescente uso de procedimentos da PCR em tempo real, a fim de simplificar e reduzir o tempo de execução e para quantificação de vírus numa amostra. A qPCR tem a vantagem de facilitar o diagnóstico de infecção por detectar e quantificar simultaneamente alvos específicos em uma determinada amostra (Bustin *et al.*, 2009). Assim, qPCR multiplex pode ser uma alternativa para a detecção simultânea de HCMV, HHV-6 e HHV-7 em casos de FHA sem etiologia definida.

Os resultados deste trabalho demonstraram que a qPCR multiplex foi capaz de detectar e quantificar os Betaherpesvírus. Antes de testarmos as amostras de FHA sem etiologia definida, os ensaios da qPCR para os Betaherpesvírus foram otimizados. Na etapa de otimização foi realizada a diluição de uma curva sintética específica para cada vírus para calibração e determinação do limite de detecção, como já descrito (Bustin *et al.*, 2009). Além disso, a eficiência dos ensaios foi sustentada por valores de R^2 e *Slope*. Inicialmente, os primeiros ensaios da qPCR ocorreram a fim de demonstrar a capacidade de amplificar os alvos para as sondas específicas individuais e também simultaneamente; e como visto nos resultados (Figura 4.2), os alvos determinados para HCMV, HHV-6 e HHV-7 amplificaram nas situações da reação, demonstrando assim, que não houve inibição e nem pareamento de iniciadores inespecíficos, assim, confirmando a conservação das regiões utilizadas (Sassenscheidt *et al.*, 2006). Curvas sintéticas para quantificação de vírus já foram utilizadas e têm sido uma alternativa porque podem superar as limitações biológicas das curvas de plasmídeos (Holland *et al.*, 2003)

A partir disso, assim como recomendado por Bustin, análises de precisão, reprodutibilidade e especificidade foram realizadas para validação da técnica. Para análise de precisão e reprodutibilidade do nosso teste, seis amostras foram testadas durante três dias. Como resultado, da comparação dos Cts e o cálculo de desvio padrão e CV% da reprodução dessas amostras, observou-se a similaridade da detecção de Ct, baixos desvios padrão e CV% adequado. Isso pode demonstrar que mesmo com repetidas reproduções, em momentos distintos, a qPCR foi precisa. A precisão refere-se à quão bem uma determinada medição pode ser reproduzida quando um teste é aplicado repetidamente com múltiplas alíquotas de uma única amostra homogênea (Burd, 2010).

Além disso, a qPCR multiplex se mostrou específica para os Betaherpesvírus, porque não amplificou outros vírus da família *Herpesviridae*, como HSV-1, HSV-2 e EBV, que foram testados. Esse resultado confirmou novamente a especificidade das regiões utilizadas para amplificação dos Betaherpesvírus, além da exclusão de resultados falso-positivos que podem ser causados pela interferência de substâncias ou organismos que tem sequências semelhantes (Burd, 2010). A otimização da qPCR foi realizada para garantir a eficiência do ensaio. Como já descrito, é evidente que a não otimização dos testes de diagnóstico tenha um grande efeito sobre a qualidade do ensaio (Nolan *et al.*, 2006).

A detecção e quantificação dos Betaherpesvírus nas amostras de FHA sem etiologia definida foi realizada por reações monoplex e multiplex. O diagnóstico simultâneo exige a apresentação de resultados que demonstrem que a quantificação precisa dos alvos múltiplos em uma única reação não seja prejudicada, isto é, que a eficiência do ensaio e o limite de detecção sejam os mesmos dos ensaios executados de forma monoplex (Bustin *et al.*, 2009). Através da comparação entre as duas reações observou-se que todas as amostras positivas na qPCR monoplex também foram positivas na qPCR multiplex, além disso, o Ct e a carga viral da quantificação apresentaram resultados similares em ambas, demonstrando que mesmo com três alvos numa mesma reação, a eficiência das reações se manteve. Tornando assim, a qPCR multiplex útil para detecção e quantificação simultânea dos Betaherpesvírus. A qPCR foi capaz de detectar e quantificar Betaherpesvírus com títulos variando de 10^3 a 10^6 cópias por mL. Contudo, houve uma redução na quantificação nas amostras de soro quando comparadas as amostras de fígado. A redução pode ter ocorrido devido a maior carga viral presente no fígado ou também ao tempo de armazenamento das amostras. Outros trabalhos também reportaram que a degradação do ácido nucleico das amostras está relacionada ao tempo e a forma de armazenamento, que pode assim interferir na estabilidade do DNA (Holland *et al.*, 2003; Cisi/Nccls, 2005; Burd, 2010).

A RNase P é conhecida como uma ribonucleoproteína catalítica (Jarrous e Reiner, 2007). O gene que codifica a subunidade da RNase P é essencial em todos os organismos livres, além de exercer funções que se demonstram conservadas em eucariontes (Altman, 2011). Por isso o gene RNase P é também utilizado como controle endógeno de reações. A amplificação da RNase P nas amostras de FHA sem etiologia definida negativas foi comparada a amplificação da RNase P em amostras de controle de pacientes saudáveis. A partir disso, foi visto que o Ct de

amplificação tanto nas amostras negativas para os Betaherpesvírus como nas amostras controle tiveram pouca variação. Assim como utilizada anteriormente em um estudo que otimizou uma qPCR para febre amarela (Fernandes-Monteiro *et al.*, 2015), esta análise demonstrou a ausência de resultados falsos negativos relacionados com a detecção e quantificação dos Betaherpesvírus em amostras FHA sem etiologia definida, apoiando a precisão dos resultados.

De acordo com os resultados, a qPCR multiplex detectou e quantificou os Betaherpesvírus em amostras de FHA sem etiologia definida. Das amostras testadas 25,7% (9/35) foram positivas para pelo menos um dos Betaherpesvírus, seis foram positivos para o fígado e três para o soro. Essas amostras foram positivas também em Pan-PCR *Nested* e posteriormente sequenciadas. Todas as amostras, foram previamente testadas e negativas para os vírus hepatotrópicos (Hepatite A-E).

As amostras de FHA utilizadas neste estudo foram em sua maioria provenientes de pacientes do sexo feminino e com faixa etária de 45-55 anos. Das amostras positivas para os Betaherpesvírus também prevaleceu pacientes do sexo feminino. Em trabalhos anteriores, casos de FHA positivos para HHV-6 também foram relatados a prevalência do sexo feminino (Paula *et al.*, 2014; Charnot-Katsikas a 1 2016). De acordo com a comparação do desfecho clínico pode-se observar a maior positividade de HHV-6 nas amostras testadas, além de 83,3% dos pacientes positivos para HHV-6 terem ido a óbito. A maior positividade para o HHV-6 corrobora com os resultados descritos anteriormente, visto o HHV-6 em maior prevalência e patogenicidade em casos de FHA (Harma *et al.*, 2003).

Para o HCMV houve positividade no fígado e no soro de pacientes com FHA no teste qPCR multiplex. O HCMV é frequentemente encontrado em casos de transplantes de fígado e imunossupressão além de está associado à causa de hepatites (Davalos *et al.*, 2016). A associação da replicação do HCMV à FHA sugere uma condição que aumenta a ocorrência de infecção por HCMV após o transplante (Samuel e Dussaix, 1997). Um estudo prospectivo com 106 receptores de transplante mostrou que os pacientes com altos níveis de TNF- α durante o curso de FHA apresentaram maior replicação do HCMV após o transplante. Isso implica a necessidade de receptores de transplantes receberem tratamento profilático a fim de prevenir a infecção por HCMV (Mutimer *et al.*, 1997). Até o momento, nenhum trabalho mostrou que o HCMV seja a principal causa da FHA, mas sim sendo a mais comum manifestação hepática em pacientes imunocomprometidos (Qian *et al.*, 2015).

Ademais, pode-se observar uma maior presença do HHV-6 nas amostras de FHA testadas, como já visto em estudos anteriores o HHV-6 é o Herpesvírus mais encontrado em casos de FHA (Paula *et al.*, 2014; Arribas Anta *et al.*, 2016). Após relatado um caso de FHA a atribuído a infecção primária do HHV-6 em uma criança (Asano *et al.*, 1990), vários outros casos foram relatados, principalmente em crianças da primeira infância (Ishikawa *et al.*, 2002; Harma *et al.*, 2003; Charnot-Katsikas, 2016). Segundo Agut, a cronologia dos sintomas clínicos associados com o aumento do nível da viremia do HHV-6, a presença do DNA do HHV-6 no fígado, e a expressão intensa do antígeno estrutural tardio no fígado e na pele, apoiam a implicação do HHV-6 como um mais provável agente etiológico da FHA (Cacheux *et al.*, 2005; Agut *et al.*, 2015). Sabemos que o HHV-6 está fortemente atribuído a casos de FHA, porém, assim como o nosso trabalho, outros autores não puderam determinar se o HHV-6 é um agente causador da doença hepática (Ishikawa *et al.*, 2002). Com a qPCR não foi possível diferenciar o HHV-6A e HHV-6B, mas a literatura mostrou, recentemente, a presença do HHV-6B em uma paciente com FHA (Paula *et al.*, 2014).

Os efeitos indiretos potencialmente atribuídos ao HHV-7 têm sido menos caracterizados, com alguns estudos sugerindo que a reativação do HHV-7 pode aumentar o risco da infecção por HCMV (Tong *et al.*, 2000). Em nossos resultados o HHV-7 só foi positivo na presença de outros Betaherpesvírus. A amostra FHF-17 foi positiva para o HHV-7 em conjunto com o HHV-6 e o HCMV e a amostra FHF-5 foi positiva para o HHV-7 e HHV-6. A co-infecção entre os *Roseolovírus* (HHV-6 e HHV-7) já foi descrita em estudos anteriores em amostras de fígado de paciente pós transplante (Fernandez-Ruiz *et al.*, 2015), sugerindo que a infecção precursora do HHV-6 pode desencadear a infecção pelo HHV-7.

A análise filogenética foi realizada a partir do sequenciamento realizado da região Dpol dos Herpesvírus a fim de identificar a espécie que cada amostra pertencia. Uma árvore filogenética simples foi construída e as sequências recuperadas neste trabalho foram alinhadas com sequências referência do HCMV, HHV-6 e HHV-7 (Albà *et al.*, 2001). Somente cinco amostras de HHV-6 positivas puderam ser sequenciadas. Após o alinhamento dessas amostras, pode-se observar que todas se encontravam no mesmo clado do HHV-6B, demonstrando assim, pertencerem essa espécie. Em comparação ao HHV-6A, o HHV-6B é o mais encontrado em casos de hepatite. Em um estudo de caso de FHA, o HHV-6B também foi identificado em amostra de fígado (Paula *et al.*, 2014), além disso, já foi descrito que o HHV-6B possui maior patogenicidade quando comparado ao HHV-6A

(Yamanishi *et al.*, 1988). Acreditamos que a dificuldade do sequenciamento do HCMV se deu pelo fato, de que as amostras são, em sua maioria, de soro e apresentam carga viral baixa. O sequenciamento das amostras HHV-7 positivas não pode ser realizado, pois o HHV-7 só foi encontrado em conjunto com outro Betaherpesvírus, e como o sequenciamento realizado foi pelo método *Sanger* somente as sequências presentes em maior quantidade foram sequenciadas.

Além da detecção e quantificação dos Betaherpesvírus, análises bioquímicas foram realizadas. A AST e a ALT são enzimas intracelulares presentes em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos. A destruição ou lesão das células hepáticas liberam estas enzimas para a circulação (Motta, 2008). Os valores de referências normais para AST é de 5 a 34U/L e para ALT é de 6 a 37U/L. Os aumentos relacionados a lesões podem atingir até 100 vezes os limites superiores dos valores de referência em casos de FHA e valores maiores que 1000 U/L são causadas habitualmente por hepatites virais ou hepatites por drogas (Motta, 2008; Parker Zm 1 2016). De acordo, com os resultados encontrados no presente trabalho, tanto as análises para ALT como para AST obtiveram valores superiores a 1000U/L nas amostras de FHA sem etiologia definida positivas para os Betaherpesvírus. A Fosfatase alcalina (FA) é uma enzima que, no fígado está localizada na membrana celular que une a borda sinusoidal das células parenquimais aos canalículos biliares. Assim como visualizado em nossos resultados, em casos de hepatites virais, a FA apresenta pequenas elevações nos níveis séricos. (Motta, 2008). A Gama-GT está localizada nos canalículos das células hepáticas e, particularmente, nas células epiteliais que revestem os ductos biliares, assim como a FA, apresenta pequenas elevações nos seus níveis normais em casos de hepatites infecciosas (Motta, 2008) que também pôde ser visualizado em nossos resultados.

Apesar dos resultados obtidos na comparação bioquímica estarem corroborando com as análises já descritas anteriormente, e assim sendo mais um aspecto importante que relaciona os Betaherpesvírus a FHA, nenhuma análise estatística foi significativa. A não significância estatística dos resultados pode estar associada ao baixo N-amostral utilizado nesse trabalho.

A presença dos Betaherpesvírus em infecções oportunistas, como é visto na causa da FHA se dá por conta da reativação que esses vírus podem realizar por conta de uma baixa no sistema imune do hospedeiro (Ogata, 2016). Apesar de ser considerada uma causa rara de FHA, vários casos de hepatite têm sido descritos na literatura em que os Herpesvírus têm mostrado ser a causa mais provável dessa

doença (Arribas Anta *et al.*, 2016). E com os resultados encontrados nesse projeto assim como os trabalhos anteriores, sugerimos os Betaherpevírus como agentes associados a casos de FHA. Portanto, o diagnóstico deve ser feito com cautela, após a exclusão de outras causas conhecidas da doença e os Betaherpesvírus também devem ser incluídos no diagnóstico diferencial em casos de FHA, a fim de auxiliar no tratamento específico e até mesmo evitar o óbito em casos sem etiologia definida.

6. Conclusão

- As curvas padrões sintéticas foram otimizadas e foram úteis para a detecção e quantificação dos Betaherpesvírus.
- A qPCR em tempo real multiplex foi eficiente para detecção e quantificação dos Betaherpesvírus.
- As amostras que foram positivas no monoplex, também foram positivas no multiplex mostrando que é possível realizar apenas uma reação de PCR em tempo real para detectar e diferenciar os Betaherpesvírus.
- Entre as amostras de fígado dos pacientes com FHA sem etiologia definida quatro foram positivas para o HCMV, sete para o HHV-6 e duas para o HHV-7, mostrando que os Betaherpesvírus podem estar associados a casos de FHA.
- Não houve correlação entre a detecção dos Betaherpesvírus no soro e no fígado. Houve uma maior detecção dos Betaherpesvírus no fígado, mostrando que esse tipo de amostra é indispensável para a definição da etiologia da hepatite causada por herpes.
- Na avaliação dos marcadores bioquímicos, observou-se níveis superiores nas amostras de FHA positivas para os Betaherpesvírus em comparação com as amostras negativas e controles saudáveis, porém não houve diferença em nossas análises estatísticas.
- Os resultados deste estudo foram relevantes para demonstrar os Betaherpesvírus como possíveis agentes etiológicos em casos de falência hepática aguda sendo assim devem ser incluídos no diagnóstico diferencial para esses casos.

7. Referências Bibliográficas

ABBO, L. et al. Fulminant hepatitis from herpes simplex virus type 2 in an immunocompetent adult. **Transpl Infect Dis**, v. 9, n. 4, p. 323-6, Dec 2007. ISSN 1398-2273 (Print)1398-2273. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3062.2007.00207.x> >.

ABLASHI, D. et al. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. **Arch Virol**, v. 159, n. 5, p. 863-70, May 2014. ISSN 0304-8608. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-013-1902-5> >.

AGUT, H.; BONNAFOUS, P.; GAUTHERET-DEJEAN, A. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 28, n. 2, p. 313-35, Apr 2015. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00122-14> >.

AL MIDANI, A. et al. Fulminant hepatitis following primary herpes simplex virus infection. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v. 22, n. 1, p. 107-11, Jan 2011. ISSN 1319-2442 (Print)1319-2442. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ALBÀ, M. M. et al. Genomewide Function Conservation and Phylogeny in the Herpesviridae. In: (Ed.). **Genome Res**, v.11, 2001. p.43-54. ISBN 1088-9051 (Print).

ALFORD, C. A. et al. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. **Rev Infect Dis**, v. 12 Suppl 7, p. S745-53, Sep-Oct 1990. ISSN 0162-0886 (Print)0162-0886. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ALTMAN, S. Ribonuclease P. In: (Ed.). **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.366, 2011. p.2936-41. ISBN 0962-8436 (Print)1471-2970 (Electronic).

ARRIBAS ANTA, J. et al. [Fulminant hepatitis caused by herpes virus 6 in immunocompetent adults]. **Gastroenterol Hepatol**, v. 39, n. 8, p. 533-4, Oct 2016. ISSN 0210-5705 (Print)0210-5705. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.gastrohep.2015.09.003> >.

ASANO, Y. et al. Viremia and neutralizing antibody response in infants with exanthem subitum. **J Pediatr**, v. 114, n. 4 Pt 1, p. 535-9, Apr 1989. ISSN 0022-3476 (Print)0022-3476. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Fatal fulminant hepatitis in an infant with human herpesvirus-6 infection. In: (Ed.). **Lancet**. England, v.335, 1990. p.862-3. ISBN 0140-6736 (Print)0140-6736 (Linking).

BEGO, M. G.; ST JEOR, S. Human cytomegalovirus infection of cells of hematopoietic origin: HCMV-induced immunosuppression, immune evasion, and latency. **Exp Hematol**, v. 34, n. 5,

p. 555-70, May 2006. ISSN 0301-472X (Print)0301-472x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2005.11.012> >.

BROWN, H. L.; ABERNATHY, M. P. Cytomegalovirus infection. **Semin Perinatol**, v. 22, n. 4, p. 260-6, Aug 1998. ISSN 0146-0005 (Print)0146-0005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BURD, E. M. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 3, p. 550-76, Jul 2010. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00074-09> >.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, v. 55, n. 4, p. 611-22, Apr 2009. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797> >.

CACHEUX, W. et al. HHV-6-related acute liver failure in two immunocompetent adults: favourable outcome after liver transplantation and/or ganciclovir therapy. **J Intern Med**, v. 258, n. 6, p. 573-8, Dec 2005. ISSN 0954-6820 (Print)0954-6820. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2005.01567.x> >.

CARRARO, E.; GRANATO, C. F. Single human cytomegalovirus gB genotype shed in multiple sites at the time of diagnosis in renal transplant recipients. **J Med Virol**, v. 70, n. 2, p. 240-3, Jun 2003. ISSN 0146-6615 (Print)0146-6615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.10383> >.

CHARNOT-KATSIKAS A 1 , B. D., COOK L 3 , DAVID MZ 4 . **Fulminant hepatic failure attributed to infection with human herpesvirus 6 (HHV-6) in an immunocompetent woman : A case report and review of the literature.** J.Virol 2016.

CISNEROS-HERREROS, J. M.; HERRERO-ROMERO, M. [Hepatitis due to herpes group viruses]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 24, n. 6, p. 392-7; quiz 398, Jun-Jul 2006. ISSN 0213-005X (Print)0213-005x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CLARK, D. A. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7: emerging pathogens in transplant patients. **Int J Hematol**, v. 76 Suppl 2, p. 246-52, Aug 2002. ISSN 0925-5710 (Print)0925-5710. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CLSI/NCCLS. **Collection, transport, preparation, and storage of specimens for molecular methods.** Journal of

Genetics and Genome Research. GUIDELINE, A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. CLSI document MM13-A: 2378-3648 p. 2005.

CMV | Congenital CMV Infection | Cytomegalovirus | CDC. 2016. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/cmvcongenital-infection.html> >.

CONNOLLY, S. A. et al. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 369-81, May 2011. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2548> >.

COUTO, J. C. D. F. et al. Cytomegalovirus and gestation: an old problem without new solutions. 2003 2003. Disponível em: < <http://pesquisa.bvsalud.org/ses/resource/pt/lil-350650> >.

DAS, S.; PELLETT, P. E. Spatial relationships between markers for secretory and endosomal machinery in human cytomegalovirus-infected cells versus those in uninfected cells. **J Virol**, v. 85, n. 12, p. 5864-79, Jun 2011. ISSN 0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00155-11> >.

DAVALOS, F. et al. Dasatinib-Induced CMV Hepatitis in an Immunocompetent Patient: A Rare Complication of a Common Drug. **Transl Oncol**, v. 9, n. 3, p. 248-50, Jun 2016. ISSN 1936-5233. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2015.12.004> >.

DE BOLLE, L. et al. Human herpesvirus 6 infection arrests cord blood mononuclear cells in G(2) phase of the cell cycle. **FEBS Lett**, v. 560, n. 1-3, p. 25-9, Feb 27 2004. ISSN 0014-5793 (Print)0014-5793. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(04\)00035-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(04)00035-3) >.

DE BOLLE, L.; NAESENS, L.; DE CLERCQ, E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 1, p. 217-45, Jan 2005. ISSN 0893-8512 (Print)0893-8512. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.18.1.217-245.2005> >.

DE VLAMINCK, I. et al. Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 43, p. 13336-41, Oct 27 2015. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1517494112> >.

DENG, H.; DEWHURST, S. Functional identification and analysis of cis-acting sequences which mediate genome cleavage and packaging in human herpesvirus 6. **J Virol**, v. 72, n. 1, p. 320-9, Jan 1998. ISSN 0022-538X (Print)0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DOLAN, A. et al. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 5, p. 1301-12, May 2004. ISSN 0022-1317 (Print)0022-1317. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.79888-0> >.

DOMINGUEZ, G. et al. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. **J Virol**, v. 73, n. 10, p. 8040-52, Oct 1999. ISSN 0022-538X (Print)0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

EHLERS, B. et al. Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. **Virus Genes**, v.

18, n. 3, p. 211-20, 1999. ISSN 0920-8569 (Print)0920-8569. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FERNANDES-MONTEIRO, A. G. et al. New approaches for the standardization and validation of a real-time qPCR assay using TaqMan probes for quantification of yellow fever virus on clinical samples with high quality parameters. **Hum Vaccin Immunother**, v. 11, n. 7, p. 1865-71, 2015. ISSN 2164-5515. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4161/21645515.2014.990854> >.

FERNANDEZ-RUIZ, M. et al. Utility of a monitoring strategy for human herpesviruses 6 and 7 viremia after liver transplantation: a randomized clinical trial. **Transplantation**, v. 99, n. 1, p. 106-13, Jan 2015. ISSN 0041-1337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/tp.0000000000000306> >.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields' virology**. 5th ed. / editors-in-chief, David M. Knipe, Peter M. Howley ; associate editors, Diane E. Griffin ... [et al.]. Philadelphia, Pa. ; London: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2007. ISBN 9780781760607 : \$194.00

0781760607 : \$194.00.

FONSECA-NETO, O. C. L. FALÊNCIA HEPÁTICA FULMINANTE: ETIOLOGIA, MANEJO E INDICAÇÃO PARA O TRANSPLANTE DE FÍGADO. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v. 21, n. 4, p. 201-204, 2008.

FUJISAKI, H. et al. Detection of human herpesvirus 7 (HHV-7) DNA in breast milk by polymerase chain reaction and prevalence of HHV-7 antibody in breast-fed and bottle-fed children. **J Med Virol**, v. 56, n. 3, p. 275-9, Nov 1998. ISSN 0146-6615 (Print)0146-6615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GATHERER, D. et al. High-resolution human cytomegalovirus transcriptome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 49, p. 19755-60, Dec 6 2011. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1115861108> >.

GRIFFITHS, P. D. **Principles and Practice of Clinical Virology**. Published Online: 21 JUL 2004: 2004.

GUARDIA, A. C. et al. Human herpesvirus-6 and cytomegalovirus DNA in liver donor biopsies and their correlation with HLA matches and acute cellular rejection. **Braz J Infect Dis**, v. 18, n. 2, p. 220-4, Mar-Apr 2014. ISSN 1413-8670. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.07.007> >.

HARMA, M. et al. Pretransplant human herpesvirus 6 infection of patients with acute liver failure is a risk factor for posttransplant human herpesvirus 6 infection of the liver. **Transplantation**, v. 81, n. 3, p. 367-72, Feb 15 2006. ISSN 0041-1337 (Print)0041-1337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000195771.83614.0b> >.

HARMA, M.; HOCKERSTEDT, K.; LAUTENSCHLAGER, I. Human herpesvirus-6 and acute liver failure. **Transplantation**, v. 76, n. 3, p. 536-9, Aug 15 2003. ISSN 0041-1337 (Print)0041-1337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000069233.13409.df> >.

HERTEL, L. Human cytomegalovirus tropism for mucosal myeloid dendritic cells. **Rev Med Virol**, v. 24, n. 6, p. 379-95, Nov 2014. ISSN 1052-9276. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.1797> >.

HOLLAND, N. T. et al. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. **Mutat Res**, v. 543, n. 3, p. 217-34, Jun 2003. ISSN 0027-5107 (Print)0027-5107. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ISHIKAWA, K. et al. Prevalence of herpesviridae and hepatitis virus sequences in the livers of patients with fulminant hepatitis of unknown etiology in Japan. **J Gastroenterol**, v. 37, n. 7, p. 523-30, 2002. ISSN 0944-1174 (Print)0944-1174. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s005350200081> >.

JARROUS, N.; REINER, R. Human RNase P: a tRNA-processing enzyme and transcription factor. **Nucleic Acids Res**, v. 35, n. 11, p. 3519-24, Jun 2007. ISSN 0305-1048 (Print)1362-4962 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm071> >.

JAYAKUMAR, S. et al. Fulminant viral hepatitis. **Crit Care Clin**, v. 29, n. 3, p. 677-97, Jul 2013. ISSN 0749-0704. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2013.03.013> >.

JOHNSON, D. C.; BAINES, J. D. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 382-94, May 2011. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2559> >.

LACOSTE, V. et al. A novel homologue of Human herpesvirus 6 in chimpanzees. **J Gen Virol**, v. 86, n. Pt 8, p. 2135-40, Aug 2005. ISSN 0022-1317 (Print)0022-1317. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.81034-0> >.

LEE, W. M. et al. Acute liver failure: Summary of a workshop. **Hepatology**, v. 47, n. 4, p. 1401-15, Apr 2008. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/hep.22177> >.

LEIBOVITCH, E. C. et al. Coinfection of human herpesviruses 6A (HHV-6A) and HHV-6B as demonstrated by novel digital droplet PCR assay. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92328, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0092328> >.

LI, H. et al. Sensitive, qualitative detection of human herpesvirus-6 and simultaneous differentiation of variants A and B. **J Clin Virol**, v. 46, n. 1, p. 20-3, Sep 2009. ISSN 1386-6532. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2009.05.016> >.

M., J. J. J. **Citomegalovírus: revisão dos aspectos**

epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e de tratamento. . M., S. T. *Newlab*: 88-104 p. 2008.

MCGEOCH, D. J. et al. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. **J Mol Biol**, v. 247, n. 3, p. 443-58, Mar 31 1995. ISSN 0022-2836 (Print)0022-2836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1995.0152> >.

MOCARSKI, E. S., JR. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 7, p. 332-9, Jul 2002. ISSN 0966-842X (Print)0966-842x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MORALES-SÁNCHEZ, A. et al. EBV, HCMV, HHV6, and HHV7 Screening in Bone Marrow Samples from Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. **Biomed Res Int**, v. 2014, 2014. ISSN 2314-6133 (Print)2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2014/548097> >.

MORISSETTE, G.; FLAMAND, L. Herpesviruses and chromosomal integration. **J Virol**, v. 84, n. 23, p. 12100-9, Dec 2010. ISSN 0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01169-10> >.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações**. 5th. 2008.

MUTIMER, D. J. et al. Enhanced (cytomegalovirus) viral replication after transplantation for fulminant hepatic failure. **Liver Transpl Surg**, v. 3, n. 5, p. 506-12, Sep 1997. ISSN 1074-3022 (Print)1074-3022. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nat Protoc**, v. 1, n. 3, p. 1559-82, 2006. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.236> >.

OGATA, M. [Human herpesvirus-6-associated diseases in hematopoietic stem cell transplantation: an update]. **Rinsho Ketsueki**, v. 57, n. 3, p. 298-306, Mar 2016. ISSN 0485-1439 (Print)0485-1439. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.11406/rinketsu.57.298> >.

PALUDAN, S. R. et al. Recognition of herpesviruses by the innate immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 143-54, Feb 2011. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri2937> >.

PARKER ZM 1 , P. T., PARKER GA 3 , LEIB DA 4 . **Immune- and Nonimmune-Compartment-Specific Interferon Responses Are Critical Determinants of Herpes Simplex Virus-Induced Generalized Infections and Acute Liver Failure**. *J. Virol*, USA 2016.

PAULA, V. S. et al. Acute liver failure in an immunocompetent patient. **J Clin Virol**, v. 60, n. 1, p. 1-3, May 2014. ISSN 1386-6532. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.03.008> >.

QIAN, J. Y. et al. Cholestasis, ascites and pancytopenia in an immunocompetent adult with severe cytomegalovirus hepatitis. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 43, p. 12505-9, Nov 21 2015. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v21.i43.12505> >.

RASMUSSEN, L. et al. The genes encoding the gCIII complex of human cytomegalovirus exist in highly diverse combinations in clinical isolates. **J Virol**, v. 76, n. 21, p. 10841-8, Nov 2002. ISSN 0022-538X (Print)0022-538x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RAZONABLE, R. R. Human herpesviruses 6, 7 and 8 in solid organ transplant recipients. **Am J Transplant**, v. 13 Suppl 3, p. 67-77; quiz 77-8, Feb 2013. ISSN 1600-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/ajt.12008> >.

REVELLO, M. G.; GERNA, G. Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. **Rev Med Virol**, v. 20, n. 3, p. 136-55, May 2010. ISSN 1052-9276. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.645> >.

RIEDIGER, C. et al. Herpes simplex virus sepsis and acute liver failure. **Clin Transplant**, v. 23 Suppl 21, p. 37-41, Dec 2009. ISSN 1399-0012 (Electronic)

0902-0063 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19930315 >.

ROSS, S. et al. Diagnosis of Cytomegalovirus Infections. **Infect Disord Drug Targets**, v. 11, n. 5, p. 466-74, Oct 2011. ISSN 1871-5265 (Print)2212-3989 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SAMUEL, D.; DUSSAIX, E. Cytomegalovirus infection, fulminant hepatitis, and liver transplantation: the sides of the triangle. **Liver Transpl Surg**, v. 3, n. 5, p. 547-51, Sep 1997. ISSN 1074-3022 (Print)1074-3022. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SASSENSCHEIDT, J. et al. Detection of beta-herpesviruses in allogenic stem cell recipients by quantitative real-time PCR. **J Virol Methods**, v. 138, n. 1-2, p. 40-8, Dec 2006. ISSN 0166-0934 (Print)0166-0934. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.07.015> >.

SAÚDE, M. D. S.-S. D. V. E. **Guia de Vigilância Epidemiológica. 6ª edição.** Brasília - DF: 2007.

SEDLAK, R. H. et al. Identification of chromosomally integrated human herpesvirus 6 by droplet digital PCR. **Clin Chem**, v. 60, n. 5, p. 765-72, May 2014. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2013.217240> >.

SEEHOFER, D. et al. Prospective evaluation of the clinical utility of different methods for the detection of human cytomegalovirus disease after liver transplantation. **Am J Transplant**, v. 4, n. 8, p. 1331-7, Aug 2004. ISSN 1600-6135 (Print)1600-6135. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00510.x> >.

SHIBATA, Y. et al. Association of cytomegalovirus with infantile hepatitis. **Microbiol Immunol**, v. 49, n. 8, p. 771-7, 2005. ISSN 0385-5600 (Print)0385-5600. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SQUIRES, R. H., JR. et al. Acute liver failure in children: the first 348 patients in the pediatric acute liver failure study group. **J Pediatr**, v. 148, n. 5, p. 652-658, May 2006. ISSN 0022-3476 (Print)0022-3476. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.12.051> >.

STANTON, R. J. et al. Reconstruction of the complete human cytomegalovirus genome in a BAC reveals RL13 to be a potent inhibitor of replication. **J Clin Invest**, v. 120, n. 9, p. 3191-208, Sep 2010. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci42955> >.

STRAUSS, E. Falência Hepática Aguda. In: FARIAS, A. Q. e BITTENCOURT, P. L. (Ed.). **Falência Hepática Aguda**, 2011.

TONG, C. Y. et al. Association of human herpesvirus 7 with cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. **Transplantation**, v. 70, n. 1, p. 213-6, Jul 15 2000. ISSN 0041-1337 (Print)0041-1337. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WARD, K. N. et al. Risk of serious neurologic disease after immunization of young children in Britain and Ireland. **Pediatrics**, v. 120, n. 2, p. 314-21, Aug 2007. ISSN 0031-4005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2006-3743> >.

WEI, G. et al. Acute liver failure in Sweden: etiology and outcome. **J Intern Med**, v. 262, n. 3, p. 393-401, Sep 2007. ISSN 0954-6820 (Print)0954-6820. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01818.x> >.

YAMANISHI, K. et al. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. **Lancet**, v. 1, n. 8594, p. 1065-7, May 14 1988. ISSN 0140-6736 (Print)0140-6736. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

YOSHIKAWA, T. et al. Fatal acute myocarditis in an infant with human herpesvirus 6 infection. **J Clin Pathol**, v. 54, n. 10, p. 792-5, Oct 2001. ISSN 0021-9746 (Print)0021-9746. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

8. Anexos

Anexo 1 – Projeto submetido ao comitê de ética em pesquisa



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Hepatites de transmissão entérica (A e E) e herpes vírus associados a casos agudos e fulminantes.

Pesquisador: Vanessa Salete de Paula

Área

Temática:

Versão: 1

CAAE: 19786013.8.0000.5248

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 440.614

Data da Relatoria: 21/10/2013

Apresentação do Projeto:

As hepatites agudas se caracterizam pelo processo inflamatório hepático e podem originar-se de diversos agentes causais. Entre os vírus classicamente hepatotrópicos, estão os vírus das hepatites com via de transmissão entérica como o vírus da hepatite A (HAV) e vírus da hepatite E (HEV) que podem estar associados com casos de hepatite fulminante com falência hepática. Contudo, formas agudas e fulminantes de hepatite também podem estar associadas aos vírus da família Herpesviridae. As variações dos cursos clínicos das doenças estão relacionadas ao agente etiológico, ao genótipo viral, à idade e às características genéticas do indivíduo infectado(4-6).

Cabe ressaltar que nos casos fulminantes o diagnóstico etiológico precoce com a identificação do variante genético (subtipo, subgenótipo, genótipo) podem somar esforços para retardar a falência aguda do órgão, o que significa indiretamente ganho de tempo para captação do órgão de doadores. O Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV) do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ apresenta linhas de pesquisa nas áreas de inovação tecnológica, desenvolvimento de métodos e uso de modelos experimentais para estudos sobre virologia, imunologia, epidemiologia molecular e patologia das hepatites de transmissão entérica A e E.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 440.614

Recentemente, iniciou uma nova linha de pesquisa visando o diagnóstico e a caracterização molecular do HSV-1, HSV-2 em pacientes com falência hepática aguda ou fulminante. São poucos os grupos de pesquisa no país que estudam hepatites fulminantes, principalmente sob a ótica multidisciplinar onde a imunologia, clínica, patologia biologia molecular somadas resultam em uma visão mais completa do processo. Diante deste contexto, é fundamental que técnicas sorológicas e moleculares otimizadas com alta sensibilidade e especificidade sejam utilizadas para esclarecer o diagnóstico das hepatites entéricas e herpes vírus associadas aos casos de hepatites agudas e fulminantes, pois o diagnóstico laboratorial preciso pode auxiliar para uma terapêutica farmacológica adequada, poupando o paciente do transplante e o sistema da saúde dos custos a este relacionados.

Critério de Inclusão:

Estudo retrospectivo:

Serão utilizadas amostras de sangue e/ou tecido armazenados do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LDTV) sob a responsabilidade do Dr. Marcelo Alves Pinto. As amostras de soro e/ou tecido de pacientes com hepatite fulminante foram coletadas no Serviço de transplante Hepático do Hospital Federal de Bonsucesso, Rio de Janeiro. Para isso, 25 pacientes consentiram que amostras do tecido hepático (explante) que fossem retiradas após o transplante do fígado, e parte do sangue que já seria coletada para exames de rotina, fosse utilizados para a pesquisa. Todas estas amostras foram coletadas de pacientes voluntários após a autorização e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido previamente aprovado pelo CEP-FIOCRUZ IOC 222/03 (anexo 1).

Estudo prospectivo:

Serão convidados a participar do estudo pacientes com quadro clínico agudo de hepatite sem etiologia conhecida. Estes indivíduos deverão ter realizado previamente testes sorológicos para averiguar a presença dos marcadores para hepatites virais. Após a aprovação do comitê de ética em pesquisa, as 75 amostras dos pacientes com quadro clínico agudo para as hepatites virais serão coletadas no Ambulatório de Hepatite Virais do Instituto Oswaldo Cruz. Tais pacientes serão recrutados através do contato com profissionais de saúde destas instituições. A coleta será realizada no Ambulatório de Hepatites Virais coordenado pela Dra. Lia Laura Lewis-Ximes.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 440.614

Critério de Exclusão:

Os pacientes com hepatite causadas pelos vírus B e C, não serão incluídos neste estudo.

Objetivo da Pesquisa:**Hipótese:**

Se o diagnóstico das hepatites entéricas e de herpes virus forem otimizados, será possível levantar informações epidemiológicas e de caracterização molecular dos vírus (HAV, HEV e HSV) e, conseqüentemente, contribuir para vigilância e estratégias de prevenção, controle, e tratamento dos casos de hepatites entéricas e herpes associadas a hepatite aguda e fulminante.

Objetivo Primário:

Diagnosticar e caracterizar molecularmente as hepatites de transmissão entérica e herpes vírus associados a casos agudos e fulminantes.

Objetivo Secundário:

-Otimizar técnicas de PCR qualitativo e quantitativo para a detecção do HAV, HEV e HSVs;

-Avaliar as metodologias estabelecidas para a detecção e quantificação do HAV, HEV e HSVs no diagnóstico laboratorial utilizando amostras de soro de pacientes com hepatite aguda;

-Avaliar as metodologias estabelecidas para a detecção e quantificação do HAV, HEV e HSVs no diagnóstico laboratorial utilizando amostras de tecidos e/ou soro de pacientes com hepatite fulminante;

-Determinar a prevalência de anti-HAV IgM, anti-HEV IgM e anti-HSV1/2 IgM em pacientes com hepatites agudas e fulminantes;

-Determinar o genotipo do HAV, HEV e HSV nos pacientes com hepatites agudas e fulminantes.

-Avaliar o perfil genético dos genes de HLA e KIR na evolução clínica das hepatites virais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 440.614

O presente projeto não apresenta risco aos pacientes, exceto os relacionados a coleta de sangue. O material (soro) coletado faz parte da rotina de coleta dos pacientes que são atendidos no ambulatório de hepatites virais. As amostras de tecido/e ou soros dos pacientes com hepatite fulminante foram coletadas de 25 pacientes que consentiram que amostras do tecido hepático (explante) que fossem retiradas após o transplante do fígado, e parte do sangue que já seria coletada para exames de rotina, fosse utilizados para a pesquisa (em projeto já aprovação pelo CEP).

Benefícios:

Os pacientes serão informados sobre os resultados da pesquisa e serão informados de que podem não ter benefício direto dos resultados desta pesquisa, mas que este trabalho poderá esclarecer problemas relacionados à forma fulminante de hepatite e das hepatites sem etiologia conhecida, buscando mecanismos eficazes de tratamento no futuro e esclarecimento no diagnóstico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está suficientemente claro em seus propósitos, devidamente fundamentado, e contribuirá para o melhor entendimento das formas fulminantes de hepatite e das hepatites sem etiologia conhecida, buscando mecanismos eficazes de tratamento no futuro e esclarecimento no diagnóstico.

A pesquisa é do Grupo III, e, portanto, não necessita de submissão à CONEP antes de ser iniciado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados a folha de rosto, projeto de pesquisa, cronograma atualizado, orçamento da pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, além de todos os outros termos de apresentação obrigatória.

Recomendações:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 440.614

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, em sua 187ª Reunião Ordinária, realizada em 28.10.2013, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, manifesta-se por aprovar o estudo em tela.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

RIO DE JANEIRO, 30 de Outubro de 2013

Assinador por:
Maria Regina Reis Amendoeira
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

