

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIANA CRISTINA FAGUNDES GEQUELIN

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO VÍRUS EPSTEIN-
BARR POR PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS DE PACIENTES
SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS
NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UFPR**

CURITIBA

2011

LUCIANA CRISTINA FAGUNDES GEQUELIN

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO VÍRUS EPSTEIN-
BARR POR PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS DE PACIENTES
SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS
NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UFPR**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular – Área de concentração em Biologia Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Orientador: Prof. Dr. Alexander Welker Biondo

CURITIBA

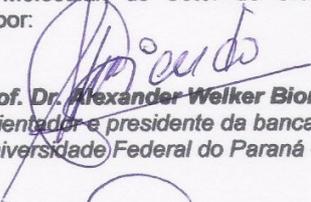
2011

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

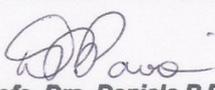
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Alexander Welker Biondo
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Sônia Mara Raboni
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Daniela P Pavoni
Instituto Carlos Chagas - ICC

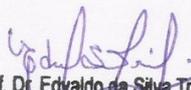
E tendo como suplente,

Profa. Dra. Andrea Rodrigues Ávila
Instituto Carlos Chagas - ICC

Após argüir a mestrando **Luciana Cristina Facundes Gequelin**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Quantificação do vírus Epstein-barr por PCR em tempo real em amostras de pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas no Hospital de Clínicas da UFPR" são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 23 de fevereiro de 2011


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

**Ao Senhor, ó Jeová, eu
agradeço do todo coração, alma, mente e força,
pelo dom da vida, saúde e orientação.**

**À minha filha, Yasmin, e ao meu esposo, Joel, pela
compreensão, paciência e generoso apoio aos meus
estudos e, sobretudo, pelo grande amor que
demonstram por mim.**

AGRADECIMENTOS

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho:

Às pessoas que colaboraram como sujeitos de pesquisa e seus familiares;

Às amigas da Seção de Biologia Molecular do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR), Claudia Zen, Deborah Bubba, Ednéia Cavalcanti, Helena Misugi. E um agradecimento especial à Irina Riediger e Sueli Nakatani, pelo apoio irrestrito, colaboração técnica, correções e muitas sugestões dadas ao longo deste projeto de Mestrado;

Aos amigos Maria Tadeu Rocha, Miriam Beltrame e Nilton França Junior pelo apoio técnico e amizade demonstrada;

A toda equipe do Serviço de TMO do Hospital de Clínicas da UFPR, em especial, ao Dr. Zanis Neto e à Dra. Carmem Bonfim. Agradeço pela confiança e suporte oferecido de maneira relevante para o desenvolvimento do projeto;

Ao Prof. Dr. Alexander Welker Biondo, orientador do projeto, pelo acompanhamento e revisão do estudo;

À direção do LACEN-PR, Marcelo Pilonetto e Célia Fagundes da Cruz, que permitiram e contribuíram para andamento da pesquisa;

À Seção de Virologia do Laboratório do Hospital de Clínicas, nas pessoas de Gislene R de Almeida Takahashi, Luine Rosele Vidal, Clyete Santos da Silveira, Bárbara Maria Cavalli, Indianara Rotta, pelo auxílio nas coletas e separação das amostras;

À Seção de Imunologia Geral (Estela Martinelli, Suely Kamei, Florise Spelling, Yatiyo Moriya, Maria José Rocha, Neide Amaral, Ieda Carvalho, Maria Lucia Muraro, Soraia Gilber, Juliana Bachim, Divandrea Mátioski) pela amizade e

apoio. Um agradecimento especial à amiga Ana Maria Brezolin Bortolotto, pelas palavras de encorajamento e incentivo;

A todos os professores, coordenadores, secretárias, pelo exemplo, ajuda e ensinamentos transmitidos;

À Virologia do LACEN-PR, nas pessoas de Marcia Prussak, Lígia Claro, Maria do Carmo D Rossa e Mayra P Giacomini, pela concessão de amostras e reagentes;

À bolsista de iniciação científica, Ana Pérola Drulla Brandão, pela colaboração na realização deste trabalho;

Ao Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR, Seção de Cultivo e Terapia Celular, nas pessoas da Alexandra Cristina Senegaglia, Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto, Samira Miguel Fadel, pela concessão de culturas EBV positivas para produção de curvas de calibração;

Aos meus pais, Angela Regina e Francisco Carlos Fagundes, pelo exemplo de amor e força. Pelas oportunidades oferecidas, apoio e carinho em todos os momentos da minha vida;

Aos meus irmãos, Luiz Fernando e Fabio Marcelo Fagundes que, mesmo de longe, torceram por mim;

A toda a minha família, pelo incentivo. Em especial à minha sogra, Irene Geuelin, pela ajuda e suporte durante as disciplinas e intermináveis horas de estudo;

A todos que não citei, contudo, estavam presentes em minha vida e contribuíram para esta conquista,

Muitíssimo obrigada.

Não tenhas medo, pois estou contigo. Não olhes em volta, pois eu sou teu Deus. Vou fortificar-te. Vou realmente ajudar-te. Vou deveras segurar-te firmemente com a minha direita de justiça. Pois eu, Jeová, teu Deus, agarro a tua direita, Aquele que te diz: ‘Não tenhas medo. Eu mesmo te ajudarei.

LIVRO BÍBLICO DE ISAÍAS cap. 41, vers. 10 e 13

RESUMO

O vírus Epstein-Barr (EBV) após primoinfecção, estabelece infecção latente em células B de memória. Além da Mononucleose Infecciosa, esse vírus pode estar ligado a linfomas de Hodgkin e não Hodgkin, doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD), linfoma de Burkitt, carcinoma de nasofaringe, carcinoma gástrico e outras neoplasias epiteliais. Diversos estudos foram realizados enfatizando a importância da quantificação da carga viral do EBV no seguimento de doenças associadas ao EBV. O objetivo do presente estudo foi melhorar o monitoramento de receptores de células progenitoras com o desenvolvimento e validação de um teste molecular baseado na técnica de PCR em tempo real. Foi realizado um estudo de coorte prospectivo em 601 amostras de plasma, obtidas de 51 pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico, durante um período aproximado de um ano. Desse total, 69 amostras foram detectáveis para o EBV. Contudo, apenas treze apresentaram carga viral acima de 1.000 cópias/ml. Esse valor é aceito como preditivo para PTLD, embora não tenha sido possível calcular um cut off na população estudada. Para validação da metodologia, contou-se também com um grupo controle saudável de 60 amostras e um grupo controle patológico com 161 amostras. Padronizou-se um ensaio com limite de detecção de 88 cópias/ml. Os resultados de precisão, especificidade e linearidade mostraram-se dentro do esperado. Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos dos prontuários médicos e analisados pelo programa EPI INFO 3.5.1. As doenças de base mais comuns foram anemia aplástica severa, anemia de Fanconi e leucemia mielóide aguda. Com relação à origem das células-tronco, 78.43% eram oriundas da medula óssea, 15.69% de cordão umbilical e 5.88% do sangue periférico. Os valores de EBV acima do cut off estimado pertenciam a cinco pacientes diferentes. Todos realizaram transplante do tipo alogênico não aparentado e quatro deles eram EBV soronegativos antes do procedimento. Isso mostra a importância do monitoramento da carga viral em indivíduos com fatores de risco significativos. O ensaio mostrou ser uma ferramenta útil, embora questões como valor de cut off preditivo e tipo de amostra ideal ainda precisem ser solucionadas em estudos posteriores.

Palavras-chave: EBV. PTLD. PCR em tempo real. TCTH alogênico. Cut off preditivo.

ABSTRACT

After primary infection, the Epstein-Barr virus (EBV) is latently maintained in memory B cells. Besides infectious mononucleosis, the virus may be linked to Hodgkin and non Hodgkin's lymphomas, post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD), Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, gastric carcinoma and others epithelial tumors. Several studies have been conducted emphasizing the importance of viral load in EBV-associated diseases. The aim of this study was to improve the monitoring of stem cell receptors with the development and validation of a molecular test based on real time PCR. We conducted a prospective cohort study in 601 plasma samples obtained from 51 patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) allogeneic during a period of approximately one year. Overall, 69 samples were detectable for EBV. However, only thirteen presented viral load above 1,000 copies/ml. This value is accepted as predictive of PTLD, although it was not possible to calculate a cut off in the population. To validate the methodology, is also told with samples of a healthy control group of 60 samples and a pathological control group with 161 specimens. It was standardized testing with low limit of detection of 88 copies/ml. The results of precision, specificity and linearity were within expectations. The patients' clinical data were obtained from medical records and analyzed using EPI INFO 3.5.1. The most common underlying diseases were severe aplastic anemia, Fanconi anemia and acute myeloid leukemia. With respect to the origin of stem cells, 78.43% were from the bone marrow, 15.69% of umbilical cord blood and 5.88% of peripheral blood. Values above the EBV DNA threshold belonged to five different patients. All patients underwent allogeneic transplantation from unrelated type and four of them were EBV seronegative before the procedure. This shows the importance of monitoring viral load in individuals with significant risk factors. The test proved a useful tool, although issues such as predictive threshold and optimal type of specimen have yet to be resolved in future studies.

Keywords: EBV. PTLD. Real-time PCR. Allogeneic HSCT. Predictive cut-off.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	ELETROMICROGRAFIA DO VIRION DO EBV.....	4
FIGURA 2 -	LINFÓCITO ATÍPICO (DOWNEY) EM ESFREGAÇO SANGUÍNEO.....	7
FIGURA 3 -	CÉLULAS DE <i>REED-STERNBERG</i> ENCONTRADAS NO LINFOMA DE <i>HODGKIN</i>	10
FIGURA 4 -	LIGAÇÃO DE TETRÂMEROS À CÉLULA T EBV ESPECÍFICA.....	15
FIGURA 5 -	REPRESENTAÇÃO DOS GENES LATENTES DO EBV.....	20
FIGURA 6 -	PERFIL SOROLÓGICO DOS DIFERENTES ANTICORPOS DIRIGIDOS CONTRA O EBV.....	27
FIGURA 7 -	CICLOS DE UMA PCR CONVENCIONAL.....	28
FIGURA 8 -	ILUSTRAÇÃO DO MECANISMO DE PCR EM TEMPO REAL POR SONDA DE HIDRÓLISE.....	32
FIGURA 9 -	COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES SISTEMAS EM TEMPO REAL.....	33
FIGURA 10 -	QUANTIDADE DO EBV PRESENTE EM TECIDO E SANGUE PERIFÉRICO.....	36
FIGURA 11 -	EXTRAÇÃO DE SANGUE TOTAL PELO KIT <i>ILLUSTRATE BLOOD</i> (GE).....	52
FIGURA 12 -	DILUIÇÃO SERIADA PARA PRODUÇÃO DE CURVA PADRÃO.....	57
FIGURA 13 -	AVALIAÇÃO DA MELHOR TEMPERATURA DE ANELAMENTO PARA OS INICIADORES.....	62
FIGURA 14 -	CURVA PADRÃO EM <i>AMPLIFICATION PLOT</i> (Ct X CONCENTRAÇÃO EM LOG) A PARTIR DE CÉLULAS EBV POSITIVAS.....	64
FIGURA 15 -	DETECÇÃO A PARTIR DA SEGUNDA PCR <i>NESTED</i> NOS CONTROLES POSITIVOS PARA EBV PELO.....	67
FIGURA 16 -	FLUXOGRAMA DE AMOSTRAS ANALISADAS PARA qPCR EBV.....	72
GRÁFICO 1 -	LINEARIDADE CALCULADA POR REGRESSÃO LINEAR.....	69
GRÁFICO 2 -	ANÁLISE DE <i>BLAND-ALTMANN</i> PARA COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODO <i>IN- HOUSE</i> E COMERCIAL	71
GRÁFICO 3 -	PROPORÇÃO DE PACIENTES DO SEXO FEMININO E MASCULINO QUE REALIZARAM TRANSPLANTE ALOGÊNICO DURANTE O ESTUDO.....	73
GRÁFICO 4 -	PROPORÇÃO DE DOENÇAS DE BASE NOS PACIENTES DO TMO INSERIDOS NO ESTUDO.....	87
GRÁFICO 5 -	PERCENTUAL DE RESULTADOS DETECTÁVEIS E NÃO DETECTÁVEIS NAS 601 AMOSTRAS ANALISADAS PELO MÉTODO <i>IN-HOUSE</i> PARA EBV.....	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	PATOLOGIAS E PORCENTAGEM DE CASOS EBV POSITIVOS.....	17
TABELA 2 -	PROTEÍNAS QUE ATUAM NA INFECÇÃO LATENTE.....	21
TABELA 3 -	EXPRESSÃO DOS GENES DE LATÊNCIA E DOENÇAS RELACIONADAS.....	22
TABELA 4 -	ANTICORPOS ANTI-EBV E SUAS PECULIARIDADES.....	26
TABELA 5 -	TIPO DE AMOSTRA INDICADA DE ACORDO COM DOENÇA RELACIONADA AO EBV NA OPINIÃO DE KIMURA E COLABORADORES.....	35
TABELA 6 -	COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES AMOSTRAS USADAS NO qPCR PARA EBV.....	39
TABELA 7 -	INTERCONVERSÃO DE UNIDADES DE MEDIDA PARA QUANTIFICAR O EBV.....	40
TABELA 8 -	COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS, TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO, VALORES DE CUT-OFF, SISTEMAS DE DETECÇÃO E AMOSTRAGENS DIFERENTES.....	42
TABELA 9 -	IDENTIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE PRIMERS E SONDA MGB.....	54
TABELA 10 -	MATRIZES DE CONCENTRAÇÃO PRIMER/PRIMER/SONDA.....	56
TABELA 11 -	CONDIÇÕES DE CICLAGENS PARA PCR EM TEMPO REAL.....	56
TABELA 12 -	CONTROLES POSITIVOS PARA OUTROS PATÓGENOS PARA AVALIAÇÃO DE REAÇÕES CRUZADAS.....	59
TABELA 13 -	CONDIÇÕES DE CICLAGEM PARA PCR NESTED.....	60
TABELA 14 -	VALORES DE Ct NAS DIFERENTES MATRIZES DE CONCENTRAÇÃO.....	63
TABELA 15 -	RESULTADO DA ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE.....	65
TABELA 16 -	RESULTADO DA ANÁLISE DA REPETIBILIDADE.....	65
TABELA 17 -	RESULTADOS DO qPCR PARA EBV EM CONTROLES POSITIVOS PARA OUTROS PATÓGENOS.....	66
TABELA 18 -	VALORES DE Ct ENCONTRADOS PARA CÁLCULO DA LINEARIDADE.....	68
TABELA 19 -	VALORES ENCONTRADOS NAS TÉCNICAS IN-HOUSE E NANOGEN.....	70
TABELA 20 -	NÚMERO DE TRANSPLANTES ALOGÊNICOS APARENTADOS E NÃO APARENTADOS EM DIFERENTES FONTES DE CÉLULAS PROGENITORAS NOS PACIENTES INSERIDOS NO ESTUDO.....	73
TABELA 21 -	DOENÇAS DE BASE ENCONTRADAS NOS PACIENTES DO ESTUDO.....	74
TABELA 22 -	SOROLOGIA PRÉ-TRANSPLANTE PARA CMV E EBV NOS 51 PACIENTES.....	74
TABELA 23 -	FATORES DE RISCO PARA REATIVAÇÃO DO EBV AVALIADOS NOS PACIENTES QUE APRESENTARAM CARGA VIRAL DETECTÁVEL.....	75
TABELA 24 -	RESULTADO PARA EBV EM AMOSTRAS DE BIÓPSIA E PLASMA DE CINCO PACIENTES DIFERENTES.....	76
TABELA 25 -	VALORES UNITÁRIOS DOS MÉTODOS PRÓPRIO, NANOGEN E QIAGEN.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS -	SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA
ATG -	GLOBULINA ANTI-TIMOCITÁRIA
BARF 1-	DO INGLÊS BAMHI A RIGHT-WARD OPEN READING FRAME 1
BART -	RNAs PEQUENOS TRANSCRITOS POR CÉLULAS B INFECTADAS POR EBV
BCRF1 -	DO INGLÊS BAMHI C RIGHT-WARD OPEN READING FRAME 1
BHRF1 -	DO INGLÊS BAMHI H RIGHT-WARD OPEN READING FRAME 1
°C -	GRAUS CELSIUS
CD21 -	GRUPO DE DIFERENCIAÇÃO 21 OU DO INGLÊS CLUSTER OF DIFFERENTIATION
CMV -	CITOMEGALOVÍRUS
Ct -	<i>CYCLE THRESHOLD</i> TAMBÉM CHAMADO Cq (<i>QUANTIFICATION CYCLE</i>)
CTL -	LINFÓCITO T CITOTÓXICO
CV -	CARGA VIRAL
DECH -	DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOSPEDEIRO
DNA -	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
dNTPs -	DESOXIRRIBUNUCLEOSÍDEOS TRIFOSFATADOS
EBNA -	PROTEÍNAS NUCLEARES DO EBV
EBV -	EPSTEIN-BARR VÍRUS
EBER -	TRANSCRITO NÃO CODIFICANTE EXPRESSO PELO EBV
EPI -	EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL
HC-UFPR -	HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
HHV-6 -	HERPESVÍRUS HUMANO TIPO 6
HSV -	HERPES SIMPLEX VÍRUS
HLA -	ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO
IgG -	IMUNOGLOBULINA G
IgM -	IMUNOGLOBULINA M
LACEN-PR -	LABORATÓRIO CENTRAL DO ESTADO DO PARANÁ
MgCl ₂ -	CLORETO DE MAGNÉSIO
MHC -	COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

MI -	MONONUCLEOSE INFECCIOSA
µg -	MICROGRAMAS
MGB -	MINOR GROOVE BINDER
NK -	CÉLULA NATURAL KILLER
nM -	NANOMOLAR
% -	PORCENTAGEM
PCR -	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE
pb -	PARES DE BASES
pM -	PICOMOLAR
qPCR -	PCR QUANTITATIVO PARA EBV
RNA -	ÁCIDO RIBONUCLÉICO
TA -	TEMPERATURA AMBIENTE
TCLE -	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
TCTH -	TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. HISTÓRICO.....	3
2.2. CLASSIFICAÇÃO E MORFOLOGIA	4
2.3. EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO	5
2.4. DOENÇAS RELACIONADAS AO EBV	7
2.4.1. Mononucleose infecciosa (MI).....	7
2.4.2. Doença crônica ativa por EBV (CAEBV)	8
2.4.3. Linfoma de Burkitt (LB).....	8
2.4.4. Linfoma de Hodgkin (LH)	9
2.4.5. Linfoma não Hodgkin	10
2.4.6. Desordem linfoproliferativa pós transplante (PTLD).....	10
2.4.7. Carcinoma de nasofaringe.....	16
2.5. PATOGÊNESE	18
2.5.1. Latência.....	19
2.6. TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH).....	22
2.7. EXAMES LABORATORIAIS MAIS USADOS PARA DETECÇÃO DO EBV	25
2.7.1. Sorologia.....	25
2.7.2. Hibridização <i>in situ</i>	27
2.7.3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	28
2.7.4. PCR em tempo real.....	29
2.8. SISTEMAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO EBV POR qPCR.....	33
2.8.1. Escolha da amostra	35
2.8.2. Unidades de medida	39
2.8.3. <i>Threshold</i> preditivo.....	40
3. JUSTIFICATIVA.....	46
4. OBJETIVOS	47
4.1. Objetivo geral	47
4.2. Objetivos específicos	47
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	48

6. RESULTADOS	62
6.1. GRADIENTE DE TEMPERATURA.....	62
6.2. MATRIZES DE TITULAÇÃO.....	63
6.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	63
6.4. SENSIBILIDADE ANALÍTICA.....	64
6.5. PRECISÃO.....	65
6.6. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA.....	66
6.7. REAÇÕES CRUZADAS.....	66
6.8. ANÁLISE DE AMOSTRAS DETECTÁVEIS PARA EBV PELO MÉTODO DE PCR NESTED CONVENCIONAL.....	66
6.9. LINEARIDADE.....	67
6.10. COMPARAÇÃO DO ENSAIO PRÓPRIO FRENTE A UM KIT PARA EBV COMERCIALMENTE DISPONÍVEL.....	69
6.11. AMOSTRAS ANALISADAS POR qPCR.....	71
6.12. ANÁLISE DOS DADOS DOS PACIENTES INSERIDOS NO ESTUDO.....	72
7. DISCUSSÃO	77
8. CONCLUSÃO	89
9. PERSPECTIVAS	90
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICES	107
ANEXOS	141

1. INTRODUÇÃO

O vírus Epstein-Barr (EBV) é o responsável pela Síndrome da Mononucleose Infecciosa. Pode-se dizer também que ele está intimamente associado a uma série de neoplasias, mais comumente observadas em indivíduos com o sistema imunológico comprometido (receptores de transplantes, pacientes com AIDS ou outras imunodeficiências).

Cumprе ressaltar que a principal complicação envolvendo EBV nesse estudo é a doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD). A importância da PTLD aumentou o interesse no desenvolvimento de instrumentos laboratoriais para melhorar o diagnóstico e prever a doença antes da evolução clínica.

A análise da carga viral (CV) do EBV pela técnica de PCR em tempo real é atualmente a melhor ferramenta para detecção e quantificação do vírus. A PTLD associada ao Epstein-Barr, geralmente, é precedida por um elevado aumento da CV antes do início dos sintomas. Não obstante, o Estado do Paraná não contava com nenhum laboratório que realizasse o teste pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Isso dificultava o diagnóstico, monitoramento dos pacientes e acesso ao tratamento.

Com o intuito de ampliar as metodologias para identificação do EBV e atender de forma mais eficaz indivíduos imunossuprimidos, a Seção de Biologia Molecular (BIOMOL) do Laboratório Central do Estado (LACEN-PR) junto com o Serviço de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) resolveram validar uma metodologia usando, como população alvo, pacientes submetidos ao transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas.

Para implantação da técnica, foi realizado um estudo prospectivo de casos abrangendo três etapas principais. A fase de planejamento, primeira etapa, consistiu na revisão da literatura, determinação da finalidade do teste, da população alvo, cálculo da amostragem, critérios de elegibilidade, tipos de amostra, coleta e manuseio, escolha de reagentes e equipamentos e obtenção de dados dos pacientes inseridos no estudo.

Na segunda etapa, ocorreu a validação analítica do ensaio pela análise do gradiente de temperatura, matrizes de titulação, sensibilidade, especificidade, precisão, linearidade. Também foram avaliadas características do teste sob avaliação e comparação frente a um método comercialmente disponível. E, para finalizar o estudo, foram verificados os resultados do teste na população estudada e fatores de risco relacionados ao aumento da carga viral.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. HISTÓRICO

Uma doença caracterizada por febre, linfadenopatia, fadiga e dor de garganta foi identificada por Emil Pfeiffer em 1889 e recebeu a designação de febre glandular. Em 1920, o nome foi alterado para Mononucleose infecciosa (MI) devido à observação de células mononucleares atípicas no sangue de pacientes pelos pesquisadores Sprunt e Evans (GRASER, 1991).

Em 1932, as pesquisas de Paul e Bunnell resultaram na descoberta de um teste para anticorpos da classe IgM, denominados heterofílicos, que aglutinavam eritrócitos de carneiro e cavalo (GUSEVA *et al.*, 1968). Com isso, ficou estabelecido o primeiro exame diagnóstico para MI, embora ainda não se conhecesse o agente etiológico da doença.

O cirurgião Denis Burkitt no ano de 1961 enviou à Michael Anthony Epstein amostras de um linfoma que acometia crianças na África em zonas endêmicas para malária. Após alguns anos, em 1964, Epstein e colaboradores identificaram partículas virais na análise da cultura celular dessas amostras por microscopia eletrônica. Tais partículas apresentavam morfologia semelhante a vírus da família *Herpesviridae* (EPSTEIN *et al.*, 1964).

Mais tarde, ficou comprovado que se tratava de um novo vírus classificado como Herpesvírus humano tipo 4 (HHV-4), conhecido como Epstein-Barr vírus (EBV) em homenagem a seus descobridores (PANNUTI, 1981).

Henle e colaboradores, em 1966, desenvolveram uma metodologia de imunofluorescência indireta (IFI) para detecção de anticorpos específicos para EBV. Dois anos depois, um incidente casual sugeriu, pela primeira vez, a ligação entre EBV e MI. Esse e outros estudos demonstraram que o EBV era o causador da MI (HENLE *et al.*, 1968).

Na década de 70, o EBV foi encontrado em tecidos de pacientes com carcinoma de nasofaringe (FRESEN *et al.*, 1977). E, nos anos 80, foi evidenciada a

relação do EBV com a desordem linfoproliferativa pós-transplante (PTLD) e com a doença de Hodgkin (WEISS *et al.*, 1989).

Em 1984, o DNA da cepa B95-8 foi totalmente sequenciado, o que facilitou grandemente o estudo no nível molecular de doenças relacionadas com o EBV (BAER *et al.*, 1984). E, em 1997, o EBV foi classificado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como oncogênico do grupo I, que causa comprovadamente neoplasias em humanos (NIEDOBITEK, 1999).

2.2. CLASSIFICAÇÃO E MORFOLOGIA

O Epstein-Barr vírus (figura 1) está classificado na família *Herpesviridae*, subfamília *Gamaherpesvirinae*, gênero *Lymphocryptovirus* e espécie *Human herpesvirus 4* (KIMURA *et al.*, 2008; ORENTAS *et al.*, 2003).

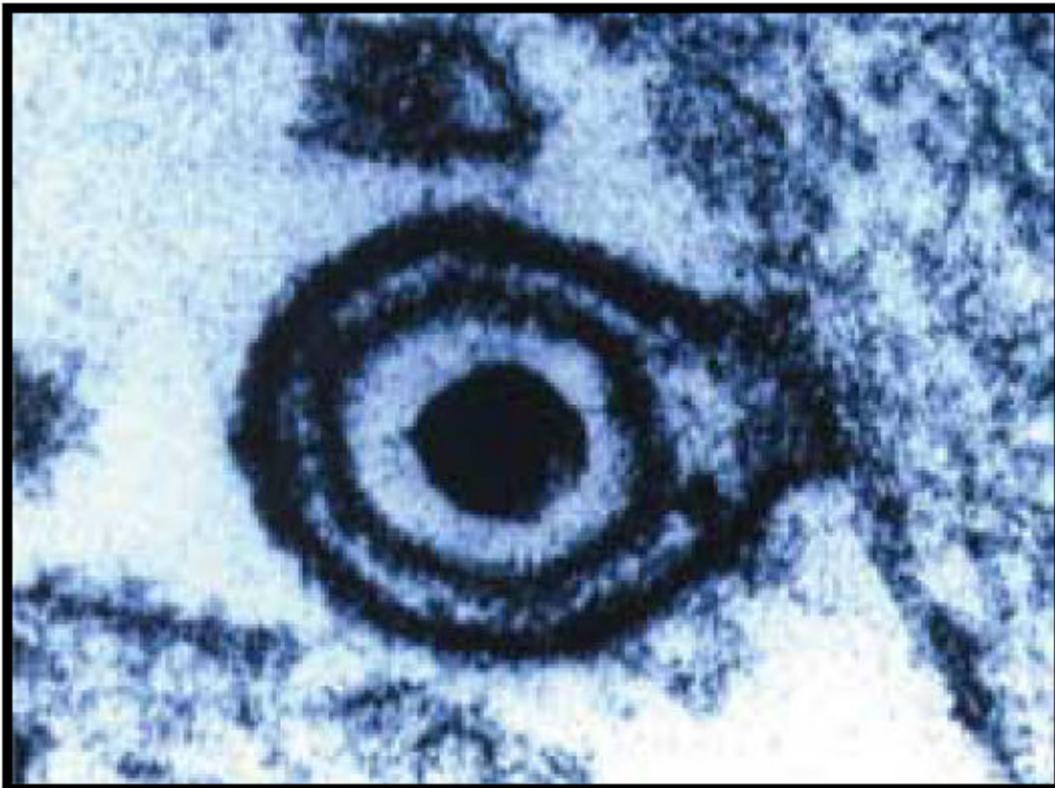


FIGURA 1 - ELETROMICROGRAFIA DO VIRION DO EBV
FONTE: Epstein-Barr vírus: 40 years on. (YOUNG & RICKINSON, 2004)

Todos os herpesvírus possuem quatro elementos principais: genoma, nucleocapsídeo icosaédrico (com 162 capsômeros protéicos), tegumento protéico (entre capsídeo e envelope) e envelope derivado da membrana celular (MIDDELDORP, 2002; BRENNAN, 2001). Sendo um gamaherpesvírus, ele tem a capacidade de se replicar e permanecer em células de linhagem linfóide (CRAWFORD, 2001). O vírus penetra na célula através de sua fusão com a membrana celular após ligar-se ao receptor celular CD21 (ou CR2), que também é o receptor do componente C3d do complemento (CALATTINI *et al.*, 2010).

Seu genoma consiste de uma molécula de DNA linear em dupla fita com aproximadamente 172×10^3 pares de bases dividido em regiões, com base na posição no mapa de restrição da endonuclease *Bam*HI. Cada região foi nomeada de acordo com o tamanho do fragmento, de A a Z, sendo o fragmento *Bam*HI A o maior deles (LIMA RABENHORST, 2006). O primeiro gene a ser expresso no ciclo lítico é o *bzlf1*, também conhecido como ZEBRA. Esse gene codifica uma proteína que apresenta função de ativador transcricional, iniciando uma cascata de eventos que determinam a expressão de antígenos precoces (EAs), BHRF1 e BCRF1 incluindo a expressão da DNA polimerase viral (LIMA RABENHORST, 2006; GULLEY & TANG, 2010).

Estudos baseados em sequenciamento revelaram a presença de dois tipos de EBV, sendo o tipo 1 mais prevalente em doenças relacionadas ao EBV e mais eficiente na transformação de células B (YAO *et al.*, 1998). Podem ser assim classificados de acordo com polimorfismo alélico de antígenos nucleares 2, 3a, 3b e 3c (YAO *et al.*, 1998). O EBV tipo 1 é mais encontrado em populações asiáticas e caucasianas, enquanto o tipo 2 é predominante na África e Nova Guiné (VAN BAARLE *et al.*, 2000).

2.3. EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

Epstein-Barr é um vírus ubiquitário, ou seja, extremamente comum de ampla prevalência. Estima-se que mais de 90% da população já tenha sido infectada (STYCZYNSKI *et al.*, 2009a; WILLIAMS CRAWFORD, 2006; HESLOP, 2005; GROSS *et al.*, 2010). Segundo o Centers for Disease Control and Prevention

(Atlanta/USA), 95% da população norte americana adulta entre 35 e 40 anos é portadora do EBV (Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis, 2010). No Brasil, poucos estudos são conduzidos para elucidar a epidemiologia desse vírus. Sabe-se que a prevalência varia conforme a localização geográfica, condições sanitárias, idade, etc. Em estudo realizado com crianças e jovens saudáveis na cidade de Vitória (Espírito Santo - Brasil), a soropositividade foi de 71%, sendo predominante em crianças e adolescentes de baixa renda e de menor nível de instrução materna (FIGUEIRA-SILVA PEREIRA, 2004).

A transmissão do EBV ocorre principalmente por contato com secreções de orofaringe contendo o vírus (YOUNG & RICKINSON, 2004). O contágio pode ser direto, através de um beijo ou indireto, via perdigotos ou objetos contaminados (NEWCOM, 2001). No entanto, pode acontecer também por transfusão de sangue e derivados e transplante de órgãos e tecidos (COHEN *et al.*, 2009). O leite materno também pode conter o vírus, mas esta é uma rota incomum de transmissão vertical (PERERA *et al.*). Além disso, o EBV está presente em secreções do trato genital (CRAWFORD, 2001). Então, supostamente, é possível o contágio por relação sexual (HALVORSEN *et al.*, 2006).

Em países em desenvolvimento, a infecção primária por EBV normalmente ocorre na infância e se expressa de forma assintomática ou clinicamente inespecífica (PANNUTI, 1981). Porém, em países desenvolvidos, é mais comum acontecer a primoinfecção na adolescência ou fase adulta, podendo resultar no aparecimento dos sintomas clássicos da MI: febre, fadiga, linfadenopatia e faringite (CRAWFORD, 2001).

Estudos sugerem que uma explicação para esse fato pode estar relacionada à quantidade de vírus introduzida no organismo. A dose viral ingerida por crianças na sucção de objetos contaminados é muito menor do que a dose ingerida por um beijo entre jovens (KIMURA *et al.*, 2008).

2.4. DOENÇAS RELACIONADAS AO EBV

2.4.1. Mononucleose infecciosa (MI)

A infecção primária por EBV caracterizada como MI apresenta sintomas clássicos de febre, linfadenopatia, fadiga e faringite. Acontece geralmente na adolescência ou fase adulta, mas ocasionalmente pode ocorrer em crianças e idosos (WILLIAMS & CRAWFORD, 2006).

Normalmente a MI, também conhecida como doença do beijo (MACSWEEN & CRAWFORD, 2003), é autolimitada, ou seja, evolui para cura sem tratamento específico. Em 80% dos casos, há o aparecimento de anticorpos heterofílicos (YOUNG & RICKINSON, 2004). E, no hemograma, é possível visualizar leucocitose com linfocitose acentuada e presença de linfócitos de Downey ou atípicos (figura 2). Esses linfócitos apresentam citoplasma aumentado e núcleo condensado. São primariamente células T atuando na eliminação das células B infectadas pelo EBV (COHEN, 2000).

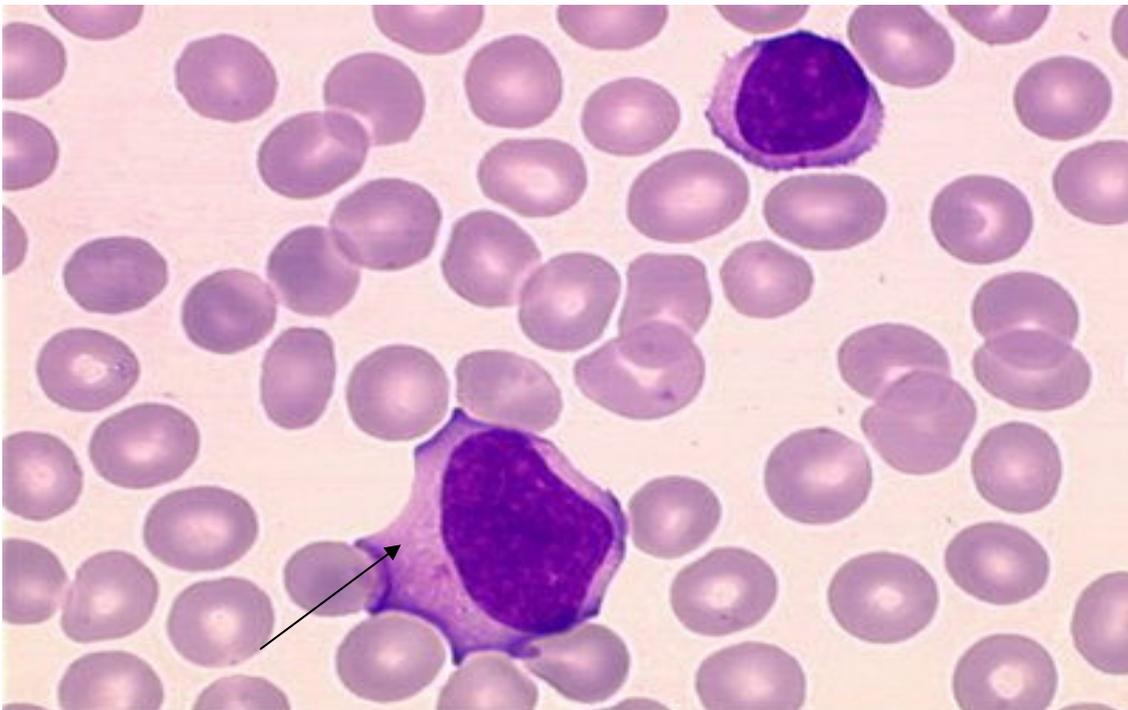


FIGURA 2 - LINFÓCITO ATÍPICO (DOWNEY) EM ESFREGAÇO SANGUÍNEO
FONTE: <http://citologiaclinica.com>

2.4.2. Doença crônica ativa por EBV (CAEBV)

Segundo Iwata e colaboradores, CAEBV é uma desordem sistêmica caracterizada por persistentes ou recorrentes sintomas de MI em pacientes sem imunodeficiência conhecida (IWATA *et al.*, 2010). Acomete principalmente indivíduos do leste da Ásia e América Central (KIMURA, 2006). Sua patogênese detalhada permanece de difícil compreensão e não há um regime de tratamento padrão. Recentemente, métodos para quantificar a expressão gênica vêm sendo usados para explicar com mais clareza a patogênese e possibilitar melhores intervenções terapêuticas (IWATA *et al.*, 2010).

2.4.3. Linfoma de Burkitt (LB)

LB é um tipo de tumor formado por pequenos linfócitos B malignos. Pode ser classificado em dois tipos: endêmico e esporádico. No LB endêmico, há três fatores que contribuem para o seu aparecimento: malária, EBV e expressão do gene c-myc. A doença acomete crianças na África equatorial e Nova Guiné (zona endêmica para malária) e o tumor, muitas vezes, começa na mandíbula. Sabe-se que a malária causa imunodeficiência de células T, reduzindo o controle da proliferação de células B infectadas por EBV. Mais de 95% dos pacientes africanos com LB teve infecção anterior por EBV (YOUNG *et al.*, 2008).

Em outras partes do mundo, ocorre o LB esporádico e, embora seja histologicamente semelhante à forma endêmica, somente 20 a 30% das células tumorais portam o genoma do EBV (KUPPERS, 2003). Também há ativação constitutiva do oncogene c-myc através de sua translocação em um dos loci de imunoglobulina. E vale frisar que na forma esporádica associada à AIDS, 30-40% dos tumores são EBV positivos (CARBONE *et al.*, 2008).

2.4.4. Linfoma de Hodgkin (LH)

HL foi primeiramente descrito por Thomas Hodgkin em 1832. Linfoma é um tipo de câncer encontrado nos linfonodos que surge quando células do sistema linfático normal se transformam em células malignas. Há uma forte associação entre HL e infecção por EBV, embora seu papel na patogênese dessa doença não esteja completamente elucidado. O vírus tem sido demonstrado em cerca de 40% dos tumores. Outro estudo aponta que o EBV é encontrado em cerca de 30-50% das células malignas Reed-Sternberg/Hodgkin dos pacientes com HL em países ocidentais (SPACEK *et al.*, 2010.). Casos em crianças e idosos estão geralmente associados ao EBV, já em adultos são mais frequentemente EBV negativos (YOUNG *et al.*, 2008).

Estranhamente, em algumas situações, as células EBV positivas são destruídas e células sem o vírus são capazes de sobreviver, mecanismo conhecido como hipótese *hit-and-run* (RYAN *et al.*, 2004; AMBINDER, 2000).

O diagnóstico histológico difere dos demais linfomas por apresentar células mononucleares de Hodgkin e suas variantes multinucleadas conhecidas como Reed Sternberge, conforme figura 3 (YOUNG *et al.*, 2008). Esses dois tipos celulares são derivados, na maioria dos casos, de células B.

A carga viral pode ser quantificada no plasma de virtualmente todos os pacientes com LH EBV positivos antes do tratamento. E a resposta à terapia foi associada com a diminuição da carga viral (SPACEK *et al.*). Estes dados sugerem que a avaliação do DNA plasmático por PCR em tempo real é excelente ferramenta para o prognóstico e acompanhamento de pacientes com LH (KIMURA *et al.*, 2008).

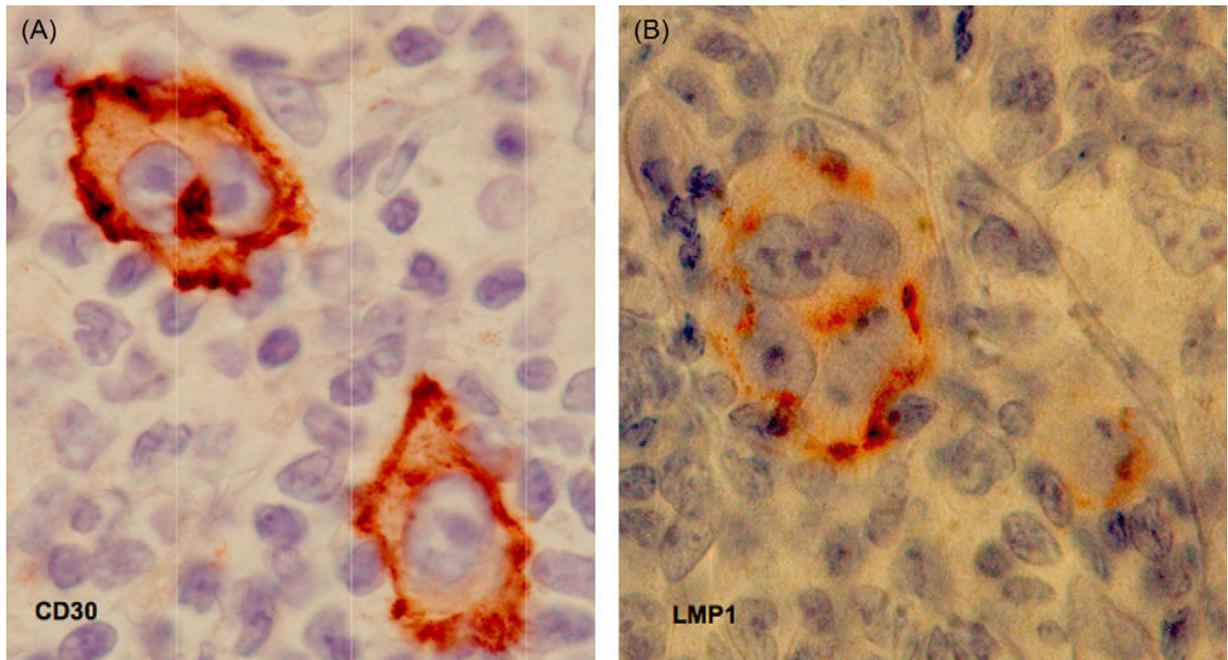


FIGURA 3 - CÉLULAS DE REED-STERNBERGE ENCONTRADAS NO LINFOMA DE HODGKIN
 FONTE: (KNECHT *et al.*)

- (A) Caso EBV negativo com células binucleada e mononucleada
- (B) Caso EBV positivo com células multinucleada e mononucleada

2.4.5. Linfoma não Hodgkin

Embora a incidência mundial seja alta, existe uma grande variedade de tipos e países onde esses linfomas ocorrem. Há mais de 20 tipos diferentes classificados em subtipos histológicos. No geral, apenas 5% dos tumores são EBV positivos. No entanto, o percentual aumenta para 40% nos casos relacionados à AIDS (GULLEY & TANG, 2008). Esse linfoma pode ter um comportamento indolente (crescimento lento) ou agressivo (crescimento rápido). Gânglios aumentados no pescoço, axilas e/ou virilha, sudorese noturna excessiva, febre, coceira na pele e perda de peso sem motivo aparente devem ser investigados pelo médico (SOUZA, 2010).

2.4.6. Desordem linfoproliferativa pós transplante (PTLD)

O tipo de linfoma conhecido como PTLD constitui um grupo heterogêneo de desordens normalmente ligadas ao EBV. Ocorre devido à supressão iatrogênica da função das células T (STYCZYNSKI *et al.*, 2009b) e é caracterizada pela

proliferação anormal de células B (HESLOP, 2005). Gulley e colaboradores citam como principais fatores de risco: a infecção primária pós-transplante, esplenectomia prévia, segundo transplante, idade do paciente, doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda ou crônica, co-infecção com Cytomegalovírus ou outras viroses, regime e intensidade da terapia imunossupressora (uso de ATG), depleção de células T (GULLEY & TANG, 2010). A incidência da doença está aumentada também em transplantes não aparentados ou aparentados com disparidade HLA (KINCH *et al.*, 2007) e quando receptor é EBV soronegativo e doador soropositivo (GROSS *et al.*).

Estudos apontam que o uso de sangue de cordão umbilical como fonte de células para transplante alogênico pode aumentar o risco de PTLD. As explicações estão associadas a uma baixa quantidade de células T em cordão, incompatibilidade e ou compatibilidade parcial HLA entre doador e receptor e uso de ATG (MEIJER CORNELISSEN, 2008).

Acredita-se que o EBV desempenhe um papel central na patogênese da PTLD. O vírus entra em células B e induz sua proliferação. Isso normalmente seria controlado por mecanismos imunes como a proliferação e atividade de linfócitos T citotóxicos. No entanto, o uso de agentes imunossupressores inibe a resposta dessas células, resultando no aumento de células B induzidas pelo EBV (HOPWOOD & CRAWFORD, 2000).

A patogênese da PTLD difere entre transplantes de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) e órgãos sólidos (TOS). Como a imunossupressão em TOS deve ser mantida ao longo da vida do paciente, o risco de PTLD é constante. A incidência varia de acordo com o órgão transplantado. Em alguns estudos, as seguintes incidências foram encontradas: intestino e múltiplos órgãos 11 a 33%, pulmão 2 a 9%, coração 2 a 6%, fígado 1 a 3%; rim 1% (KALINOVA *et al.*, 2009; KERKAR *et al.*). Uma explicação pode estar relacionada ao tipo e intensidade do regime imunossupressivo (GROSS *et al.*).

Um estudo multicêntrico com 26.901 pacientes submetidos ao TCTH sugeriu uma alta incidência de PTLD em indivíduos com mais de 50 anos e também em pacientes submetidos a um segundo transplante. Também foram levados em conta outros fatores de risco, como a depleção de células T, combinação parcial HLA,

DECH aguda ou crônica. O estudo em questão dividiu os pacientes que desenvolveram PTLD em quatro grupos e calculou-se a incidência da doença. Em indivíduos sem fatores importantes de risco, pacientes com um, dois ou mais fatores a incidência de PTLD foi de 0,2%, 1,1%, 3,6% e 8,1%, respectivamente (LANDGREN *et al.*, 2009).

A maior frequência dessa complicação ocorre em crianças e muitas vezes se apresenta durante o primeiro ano após o transplante, com incidência alta durante os primeiros seis meses. No entanto, também pode ocorrer mais tarde, mesmo até 10 anos pós-transplante (OMAR *et al.*, 2009; STYCZYNSKI *et al.*, 2009a; GULLEY & TANG, 2010). A primoinfecção pós-transplante ocorre porque grande parte das crianças ainda não foi exposta ao EBV.

Os pacientes soronegativos para o vírus podem adquirir a infecção no pós-transplante imediato (quando o vírus pode ser transmitido pelo enxerto ou por transfusões) ou a qualquer momento, pela aquisição do patógeno na comunidade (ARAUJO *et al.*, 2006). É possível acontecer também uma reinfecção com uma segunda cepa transmitida pelo doador ou reativação da infecção latente (STYCZYNSKI *et al.*, 2009a; GRATAMA *et al.*, 1992). A aquisição de uma infecção primária pós-transplante está relacionada com os níveis mais elevados de CV no sangue e frações e alta probabilidade de doença (LJUNGMAN, 2010).

Podgorny e colaboradores relatam que, em TCTH, pacientes com níveis elevados de ATG têm maior risco para PTLD (PODGORNY *et al.*). Nos estudos de Juvonen e Sundin, todos os pacientes que desenvolveram PTLD receberam profilaxia anticélulas T (SUNDIN *et al.*, 2006; JUVONEN *et al.*, 2003). Ocheni e colaboradores verificaram que, dos 26 indivíduos com carga viral para EBV, todos receberam ATG no condicionamento (OCHENI *et al.*, 2008).

Opelz e Dohler demonstraram que uso de anti-CD3 (OKT3) e surgimento de PTLD estão intimamente relacionados (OPELZ & DOHLER, 2004). Já a utilização de métodos para depleção de células B e T foi associada com baixo risco para PTLD (BARKER *et al.*, 2001). Landgren e colaboradores também chegaram a essa conclusão com o uso de alemtuzumab (LANDGREN *et al.*, 2009), embora outro estudo mostrou que o alemtuzumab eleva a carga viral: 40% dos indivíduos tinham

níveis de EBV suficientes para implementação de terapia preventiva (CARPENTER *et al.*, 2010).

Os sintomas relacionados à PTLD geralmente são inespecíficos, mas podem incluir febre, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, obstrução intestinal, outras manifestações abdominais, sintomas respiratórios, transpiração, perda de peso (COHEN *et al.*, 2007).

A doença abrange uma grande diversidade de condições patológicas, o que muitas vezes dificulta o desenvolvimento de uma classificação padrão (GROSS *et al.*). Pode haver predominância de células T e células B com padrão monomórfico ou polimórfico. Ela pode se apresentar como uma autolimitada linfoproliferação ou doença fulminante. Ser localizada ou de ampla disseminação (IMASHUKU *et al.*, 2004). Apesar das variações, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda sua classificação em quatro categorias: (a) lesões iniciais; (b) PTLD polimórfica; (c) PTLD monomórfica linfomatosa; (d) Linfoma de Hodgkin clássico tipo PTLD (KALINOVA *et al.*, 2009; HESLOP, 2005; GROSS *et al.*).

Diferentes centros optam por variadas formas de tratamento: intervenção profilática, preventiva ou no momento em que se identifica provável ou comprovada doença por EBV (STYCZYNSKI *et al.*, 2009a). A base do tratamento é a redução ou retirada da terapia imunossupressora, uso de anticorpo anti-CD20 (rituximab), antivirais e, quando necessário, terapia antineoplásica convencional (GULLEY & TANG, 2010).

Recente revisão mostrou que uma dose de rituximab foi eficaz para prevenir PTLD (STYCZYNSKI *et al.*, 2009b). Embora muitos estudos garantam a eficácia e administração segura dessa terapia (FAYE VILMER, 2005), não se pode deixar de citar que uma das limitações do anti-CD20 é a sua especificidade por células B (infectadas ou não), ocasionando uma total redução dessa população de células (HESLOP, 2005) e hipogamaglobulinemia (MASJOSTHUSMANN *et al.*, 2009). Outro problema relacionado à terapia com rituximab é a regulação da expressão do CD20 (STYCZYNSKI *et al.*, 2009a).

O uso profilático e preventivo de agentes antivirais vem sendo desencorajado devido à falta de eficácia (ZAIA *et al.*, 2009). Ganciclovir e aciclovir podem reduzir a replicação do EBV, mas não estão ativos na PTLD (STYCZYNSKI *et al.*, 2009b).

O papel da imunização passiva com anticorpo anti-CMV intravenoso permanece incerto (GROSS *et al.*). Num trabalho envolvendo pacientes de transplante renal, a utilização de anti-CMV IV foi benéfica no primeiro ano pós-transplante (OPELZ & DOHLER, 2004). Green e colaboradores também conduziram estudo de prevenção do EBV com uso de anti-CMV em receptores de TOS EBV soronegativos (GREEN *et al.*, 2006).

Um tratamento promissor vem sendo o uso de infusões de CTLs EBV específicos para prevenir e tratar PTLD (HESLOP, 2009; BALDANTI *et al.*, 2008). A transferência de CTLs EBV cultivados do próprio receptor pode ser usada em receptores de TOS, evitando rejeição do enxerto (CARBONE *et al.*, 2008; FAYE VILMER, 2005). Já, em TCTH, os CTLs são oriundos do doador (HESLOP, 2009).

Várias publicações têm mostrado correlação entre carga viral e probabilidade de desenvolvimento de PTLD (VAN ESSER *et al.*, 2002; NIESTERS *et al.*, 2000; STEVENS *et al.*, 2001). Mesmo antes do início dos sinais e sintomas, carga viral de EBV aumentada pode ser um marcador de PTLD iminente e a intervenção preventiva pode evitar ou impedir a progressão da doença (GULLEY & TANG, 2010).

A solução para acabar com infecção primária pós-transplante seria a vacinação de todos os transplantados soronegativos, levando a uma diminuição significativa na incidência de PTLD. Estudos usando vacina feita a partir de gp350 têm demonstrado bons resultados e ausência de efeitos adversos significativos. Contudo, o nível de anticorpos anti-gp350 necessária para prevenir a infecção de EBV é desconhecida (SHROFF REES, 2004).

Portanto, é fundamental a quantificação da carga viral pós-transplante, principalmente em pacientes com fatores de risco consideráveis. Conforme Zaia e colaboradores, a CV tende a aumentar em torno de três semanas antes do início da PTLD (ZAIA *et al.*, 2009). Alguns serviços de transplantes têm observado a redução da incidência e mortalidade relacionada à PTLD quando os pacientes são monitorados por um PCR quantitativo para direcionar a intervenção terapêutica

precoce (LEE *et al.*, 2005; VAN ESSER *et al.*, 2001a). Ademais, vários estudos apontam para a alta taxa de mortalidade dessa complicação (de 80 a mais de 90%) quando o tratamento não é implantado ou feito tardiamente (OMAR *et al.*, 2009).

A cada ano aumenta a procura por ensaios alternativos, além da carga viral, para avaliar o risco de PTLD. Testes que quantificam Linfócitos T específicos para EBV mostram-se promissores (HESLOP, 2005). Uma das maneiras de avaliar os CTLs é por meio de tetrâmeros de MHC (figura 4) com antígenos do EBV. A ligação desses tetrâmeros a células T EBV pode ser detectada por citometria de fluxo (YAMASHITA *et al.*, 2005) Em alguns estudos, a análise simultânea de CV de EBV e CTLs EBV específicos melhorou o gerenciamento de casos de PTLD (ANNELS *et al.*, 2006). Vale citar também o trabalho de Marshall e colaboradores, que não encontraram, até o dia 180 pós-transplante, CTLs específicos. Isso evidencia a importância da vigilância durante os primeiros três meses após TCTH (MARSHALL *et al.*, 2000).

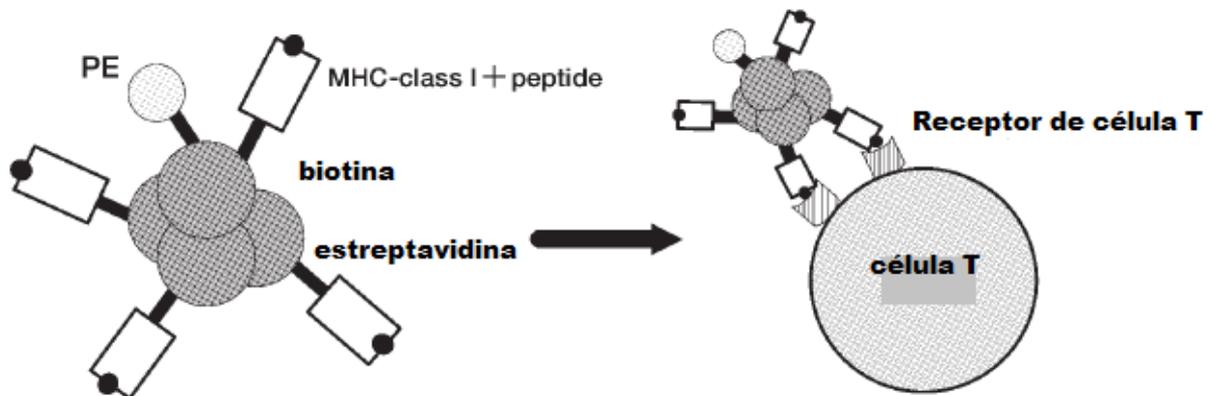


FIGURA 4 - LIGAÇÃO DE TETRÂMEROS A CÉLULAS T
 FONTE: Yamashita, 2005 (YAMASHITA *et al.*, 2005)

Não obstante, a detecção e quantificação do EBV no sangue e frações não são válidas como diagnóstico de PTLD. A confirmação da doença requer exame de biópsia e análise histológica com, no mínimo, duas características das três descritas (STYCZYNSKI *et al.*, 2009b): ruptura da arquitetura celular por procedimento linfoproliferativo; presença de células monoclonais ou oligoclonais reveladas por marcadores celulares; evidência de infecção por EBV em diversas células.

Não podemos esquecer, porém, que há casos de PTLD EBV negativos. São casos raros e normalmente acontecem tardiamente (média de 50 meses pós-transplante). As células envolvidas podem ser de linhagem T ou células NK e representam formas mais tradicionais de linfoma não Hodgkin. Nessa situação, o ensaio de carga viral para EBV não irá detectar e prevenir PTLD (NELSON *et al.*, 2000). De acordo com Muti e colaboradores, cerca de 30% dos casos de início tardio tem um padrão de linfoma EBV negativo (MUTI *et al.*, 2002).

2.4.7. Carcinoma de nasofaringe

Carcinoma de nasofaringe (CN) foi inicialmente descrito em 1973 por Wolf e colaboradores (WOLF *et al.*, 1973). A doença tem maior incidência no sul da China, onde representa cerca de 20% de todos os casos de câncer em adultos. Também é encontrada no nordeste da África e no Alaska entre os esquimós. Já na Europa e no Norte da América, a taxa de incidência é menor que 1 por 100.000 habitantes (SHAH & YOUNG, 2009).

Mais de 99% dos casos estão relacionados ao EBV e o genoma viral é encontrado em células epiteliais transformadas (STEVENS *et al.*, 2005). Exame de DNA extraído dessas células revelou que todos os casos, em áreas de alta, intermediária e baixa incidência, foram consistentemente positivos para o EBV (DESGRANGES *et al.*, 1975). Para diagnóstico e monitoramento em ensaios de PCR quantitativos, o DNA na patologia em questão pode ser melhor detectado em amostras de soro ou plasma (KIMURA *et al.*, 2008; LIMA RABENHORST, 2006).

2.4.8. Outras doenças

A leucoplasia pilosa oral, comum em pacientes HIV positivos, é uma manifestação benigna que se caracteriza como lesão branca nas bordas laterais da língua (CRAWFORD, 2001). O EBV foi detectado nessa lesão em 1985, com localização restrita às células do epitélio superficial (GREENSPAN *et al.*, 1985).

A síndrome linfoproliferativa associada ao cromossomo X afeta indivíduos do sexo masculino clinicamente saudáveis até a aquisição de infecção primária por EBV (MACSWEEN & CRAWFORD, 2003). A anormalidade genética foi identificada em 1998 (WU *et al.*, 2000). Devido à ausência do gene *sap* funcional no cromossomo X, não há a codificação de uma proteína na superfície do linfócito T, prejudicando a interação normal entre linfócitos T e B. O resultado é que tais indivíduos não são capazes de controlar a infecção por EBV (MACSWEEN CRAWFORD, 2003).

O EBV ainda está envolvido em doenças como carcinoma gástrico, pneumonite intersticial linfóide, neoplasias de musculatura lisa, carcinoma de glândula salivar, entre outras (LIMA RABENHORST, 2006). Algumas neoplasias associadas ao EBV podem ocorrer no SNC, principalmente em HIV positivos (ESPY *et al.*, 2006). Na tabela 1, são consideradas as variáveis porcentagens de casos EBV positivos em algumas patologias associadas a esse vírus.

TABELA 1 - PATOLOGIA E PORCENTAGEM DE CASOS EBV POSITIVOS

DOENÇA	PORCENTAGEM
Mononucleose infecciosa	>99%
Leucoplasia pilosa oral	>95%
Doença de Hodgkin (todos os subtipos)	40%
Doença de Hodgkin (relacionada à AIDS)	>95%
Linfoma não Hodgkin (todos os subtipos)	5%
Linfoma não Hodgkin (relacionado à AIDS)	40%
Linfoma de Burkitt (África)	>95%
Linfoma de Burkitt (América do Norte)	20%
Linfoma de Burkitt (relacionado a AIDS)	30%
Carcinoma de nasofaringe (Ásia)	>99%
Carcinoma de nasofaringe (América do Norte)	75%

FONTE: (GULLEY & TANG, 2008)

2.5. PATOGÊNESE

Para o vírus entrar na célula B, ocorre interação entre a glicoproteína viral gp350 e uma molécula de superfície do linfócito B chamada CD21. Também existem co-fatores que auxiliam na entrada do vírus nas células: moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) (LI *et al.*, 1997). Com certeza, os linfócitos B são de suma importância no ciclo de vida do EBV. Indivíduos com uma desordem genética caracterizada pela ausência de células B, chamada agamaglobulinemia de Bruton, não adquirem a infecção (GULLEY & TANG, 2008).

O EBV pode realizar dois ciclos: lítico e latente. No ciclo lítico, há produção de proteínas, de DNA e RNA virais, seguida pela montagem das partículas virais e lise da célula do hospedeiro (ABBAS, 2000). Esse ciclo ocorre com frequência em células epiteliais da orofaringe, permitindo a eliminação do vírus pela saliva (CRAWFORD, 2001). Ocasionalmente células B infectadas de memória diferenciam-se em células plasmáticas, desencadeando infecção lítica e produção de vírus (KIMURA *et al.*, 2008).

No ciclo latente não há produção de vírions. Após entrada nos linfócitos B, o genoma do vírus torna-se circular, formando um epissomo. Com isso, o EBV estabelece uma infecção permanente em células B de memória na forma epissomal (KIMURA *et al.*, 2008). *In vitro*, o EBV exerce efeitos marcantes no crescimento de linfócitos B. Ele ativa a proliferação policlonal das células B e as imortaliza, de forma que possam proliferar indefinidamente em cultura (ABBAS, 2000).

EBV também infecta células T e NK durante a primoinfecção. Isobe e colaboradores relataram infecção *in vitro* de células NK (ISOBE *et al.*, 2004). Essas células podem adquirir o receptor CD21 por transferência sináptica, permitindo a ligação EBV e NK (TABIASCO *et al.*, 2003).

Em hospedeiros imunocompetentes, linfócitos T citotóxicos (CTL) específicos e células NK controlam o avanço das células B transformadas e também sua reativação periódica pós-infecção primária (KIMURA *et al.*, 2008; CARPENTER *et al.*, 2010). Essas células B infectadas persistem em níveis baixos, aproximadamente 1 a 50 por milhão de leucócitos em portadores saudáveis e permanecerão no

organismo de um indivíduo pelo resto de sua vida (WILLIAMS & CRAWFORD, 2006).

A comprovação de que para o controle das infecções pelo EBV é necessária imunidade mediada por linfócitos T baseia-se em três evidências: indivíduos com deficiência na imunidade de CTLs podem desenvolver uma infecção por EBV incontrolável e letal; células B infectadas extraídas de um paciente com MI proliferam *in vitro* se as células T forem removidas ou inativadas; pacientes com infecção ativa ou pregressa possuem CTLs específicos para antígenos codificados pelo EBV (CALLAN *et al.*, 1998).

Com isso, verifica-se que a explicação para a patogenia de doenças relacionadas ao EBV está na deficiência da função normal das células T. A proliferação rápida e descontrolada de células B induzidas pelo EBV aumenta as possibilidades de erros incorporados durante a replicação do DNA, incluindo translocações de oncogenes. A translocação do gene *c-myc* para o *locus* da Imunoglobulina, por exemplo, resulta na expressão anormal do gene *myc* e no crescimento excessivo de clones de células neoplásicas em alguns tipos de tumores (GULLEY & TANG, 2010).

2.5.1. Latência

Somente algumas proteínas e RNAs são expressas na infecção latente: seis proteínas nucleares (EBNAs), duas proteínas de membrana (LMPs), dois RNAs pequenos (EBERs) e transcritos com múltiplos splices do gene Bam HI A (BARTs). A figura 5 representa um desenho esquemático mostrando a região de codificação das proteínas latentes (YOUNG & RICKINSON, 2004).

A expressão de EBNA-1 é visualizada em todos os tecidos neoplásicos associados ao EBV. Essa proteína liga-se ao DNA, mantendo-o na forma epissomal (MACSWEEN CRAWFORD, 2003). O EBNA-2 aumenta a expressão das proteínas LMP1 e LMP2 e também de proteínas celulares associadas ao crescimento de células B (JOHANNSEN *et al.*, 1995). O papel do EBNA 3C é essencial para a transformação neoplásica de linfócitos B (SUBRAMANIAN *et al.*, 2002). A proteína LMP1, quando expressa em camundongos, resulta em linfomas de células B

(KULWICHIT *et al.*, 1998). Já os dois RNA (EBERs) não codificam proteínas, mas têm atividade oncogênica, bloqueando a apoptose (MACSWEEN & CRAWFORD, 2003). As funções das proteínas latentes estão sucintamente descritas na tabela 2.

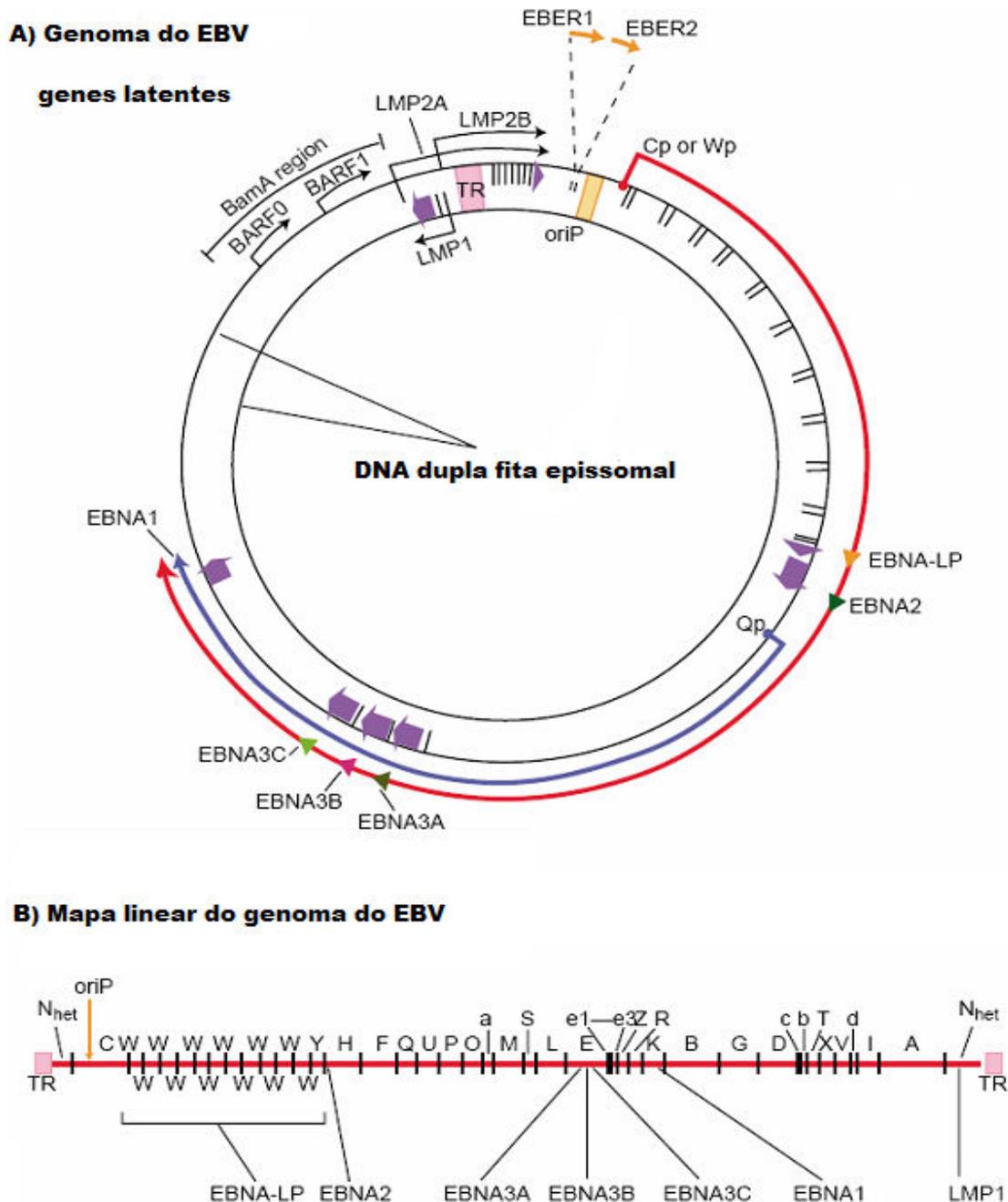


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DOS GENES LATENTES DO EBV
 FONTE: Epstein-Barr vírus: 40 years on. (YOUNG RICKINSON, 2004)

A) Genoma do EBV na forma epissomal demonstrando genes latentes;

B) Mapa linear do genoma do EBV, demonstrando regiões de leitura para a maioria das proteínas latentes.

TABELA 2 - PROTEÍNAS QUE ATUAM NA INFECÇÃO LATENTE PELO EBV

Proteína latente	Função Principal
EBNA 1	Mantém o genoma do EBV na forma episomal
EBNA 2	Aumenta a expressão de LMPs e proteínas celulares (CD21, CD23); induz transformação e proliferação de células B
EBNA 3A	Antagonista EBNA 2; interrompe ciclo celular
EBNA 3B	Antagonista EBNA 2
EBNA 3C	Antagonista EBNA 2; interrompe ciclo celular
EBNA LP (leader protein)	Potencializa a capacidade de EBNA 2 regular LMP 1; regula fatores necessários para crescimento de células B.
LMP 1	Protege da apoptose
LMP 2A,B	Ampliação da sobrevivência de células B
EBERs	Conferem resistência à apoptose
BARTs	Homólogos funcionais do receptor do fator estimulador de colônia 1 (CFS-1)

FONTE: (LIMA RABENHORST, 2006; MACSWEEN CRAWFORD, 2003; MIDDELDORP, 2002); com adaptações

Todas as neoplasias associadas ao EBV se relacionam ao ciclo latente do vírus (HESLOP, 2005). É possível classificar o estágio de latência em quatro tipos diferentes (tabela 3). Na latência 0, há expressão de EBERS (RNAs pequenos) e ocorre em portadores saudáveis. Na latência I, verifica-se a expressão de EBNA-1 e BARTs e esse perfil está relacionado com linfoma de Burkitt. Já na latência II, encontrada em doenças como linfoma de Hodgkin, carcinoma de nasofaringe, infecção crônica ativa, há a expressão de EBNA-1, LMP-1 e 2, BARTs e EBERS. E no estado de latência III, associado com PTLN, acontece a expressão de todos os genes latentes (KIMURA *et al.*, 2008).

TABELA 3 - EXPRESSÃO DOS GENES DE LATÊNCIA E DOENÇAS RELACIONADAS

Tipo	Genes de latência do EBV							Doença
	EBNA 1	EBNA 2	EBNA 3	LMP 1	LMP 2	BARTS*	EBERs*	
Latência 0	-	-	-	-	-	-	+	Portador saudável
Latência I	+	-	-	-	-	+	+	Linfoma de Burkitt
Latência II	+	-	-	+	+	+	+	Linfoma de Hodgkin Linfoma nasal de NK Infecção crônica ativa Carcinoma de nasofaringe
Latência III	+	+	+	+	+	+	+	Mononucleose PTLD Linfoma cerebral

FONTE: (KIMURA *et al.*, 2008).

⁽¹⁾ BARTs – Bam HI A rightward transcripts (região Bam HI A do genoma viral responsável pela geração de transcritos com múltiplos splices);

⁽²⁾ EBERs – RNAs não-codificantes que são expressos em abundância em células latentemente infectados pelo EBV.

É fundamental ressaltar que essa classificação foi proposta de maneira simplificada e, muitas vezes, modelos heterogêneos ocorrem em uma mesma manifestação clínica. Na MI, por exemplo, células epiteliais e células plasmáticas estão em infecção lítica enquanto células B transformadas estão em latência III (KIMURA *et al.*, 2008).

Os EBNAs, expressos na latência III, são alvos dos CTLs CD8+. Por isso, essa latência é mantida somente em imunodeprimidos (pós-transplante ou AIDS). Um número menor de genes é expresso nas latências I e II, deixando as células infectadas menos expostas ao ataque do sistema imune (KIMURA *et al.*, 2008).

2.6. TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (TCTH)

Inicialmente desenvolvido como um tratamento para a doença da imunodeficiência combinada severa, anemia aplástica e leucemia aguda, o TCTH, hoje, é um procedimento proposto para diversas patologias, incluindo doenças onco-hematológicas e do sistema imune (LU *et al.*, 1996).

Essa modalidade terapêutica consiste na substituição de uma medula óssea doente, ou deficitária, por células normais de medula óssea, com o objetivo de reconstituição de uma nova medula saudável (ALAEZ *et al.*, 2005). Antes do transplante, o paciente recebe um condicionamento para eliminar células doentes, promover imunossupressão e criar espaço físico para nova medula se desenvolver normalmente. O transplante pode ser autólogo (quando a medula vem do próprio paciente) ou alogênico, quando a medula provém de um doador (SOUZA, 2010).

No TCTH alogênico, a procura por um doador primeiramente acontece dentro da família do receptor (TCTH aparentado). Se não houver doador compatível, a solução é fazer uma busca nos registros de doadores voluntários, tanto no REDOME (Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea) como nos bancos de medula óssea do exterior. Cumpre ressaltar que a miscigenação no Brasil dificulta a localização de doadores compatíveis. Mas, hoje, já existem mais de 12 milhões de doadores em todo o mundo. E no Brasil, o REDOME tem mais de um milhão e 400 mil doadores (SOUZA, 2010).

A introdução nos últimos anos de novos métodos para a tipagem de alta resolução e definição dos alelos HLA teve um impacto profundo na capacidade de identificar e interpretar os vários polimorfismos de sequências de nucleotídeos que codificam os antígenos HLA. Critérios para a seleção de um doador de medula baseiam-se na combinação dos antígenos HLA de classe I A, B, C e também de classe II DRB1 e DQB1 (NIEWERTH *et al.*). A correspondência nos cinco locos (10/10) diminui os riscos associados a DECH e a mortalidade dos pacientes (PETERSDORF *et al.*, 2004). A recomendação atual é a realização de tipagem de alta resolução e seleção de doador com compatibilidade alélica 8/8 de HLA A, B, C e DRB1 (UBER *et al.*, 2007). Quando apenas doadores incompatíveis estão disponíveis, a incompatibilidade de melhor prognóstico é a relacionada ao HLA DQB1. A incompatibilidade DRB1 está associada com maior risco de DECH aguda e de mortalidade (PETERSDORF, 2008).

O termo transplante de medula óssea (TMO) vem sendo substituído por TCTH ou TCPH (transplante de células progenitoras hematopoiéticas). Esse nome reflete melhor o procedimento e o tipo de células usadas no transplante, que podem

ser oriundas da medula óssea, sangue periférico ou sangue de cordão umbilical e placentário (SOUZA, 2010).

Com o uso de sangue do cordão umbilical (SCU), rico em células progenitoras hematopoéticas (LU *et al.*, 1996), apesar da incompatibilidade, o risco de DECH aguda é menor e DECH crônica tem boa resposta à terapia. Uma das explicações está no baixo número e imaturidade dos linfócitos T no sangue de cordão. Mas a quantidade de células-tronco oriundas do cordão e da placenta geralmente é insuficiente para transplantar pessoas adultas (RUGGERI *et al.*, 2008).

O SCU está relacionado à maior lentidão na reconstituição imune e hematopoiética, maior necessidade de transfusões e maior período de hospitalização (RODRIGUES *et al.*, 2009). Algumas alternativas para superar as limitações da dose de células têm sido propostas, como o uso simultâneo de duas unidades de SCU para o transplante (PETERSDORF, 2008).

As complicações pós-TCTH são inúmeras. Podem ocorrer hemorragias, DECH, infecções, toxicidade a medicamentos, entre outras. As infecções (bacterianas, fúngicas, virais) acontecem devido à lenta recuperação do sistema imune (doze a dezoito meses) (SOUZA, 2010). Agentes virais são importantes causas de mortalidade, sendo as principais CMV, EBV, HHV6, adenovírus humano e poliomavírus (SCHONBERGER *et al.*, 2010).

Antes do TCTH, receptores e doadores realizam uma série de exames incluindo sorologias para hepatite A, B, C, CMV, EBV, toxoplasmose, sífilis, HIV, HTLV, chagas, entre outros. A determinação do estado imunológico ajuda na avaliação do risco de infecções primárias e reativações imunológico (GULLEY TANG, 2008). Quando possível, a escolha de doadores EBV negativos é desejável, uma vez que o EBV pode ser transmitido com o enxerto (STYCZYNSKI *et al.*, 2009b). A melhor alternativa seria imunizar pacientes antes da imunossupressão, embora ainda não esteja disponível uma vacina eficaz contra o EBV (LOCKEY *et al.*, 2008; SHROFF REES, 2004).

2.7. EXAMES LABORATORIAIS MAIS USADOS PARA DETECÇÃO DO EBV

2.7.1. Sorologia

Em 1932, o teste de anticorpos heterofílicos foi introduzido para diagnóstico de MI, baseado na descoberta de que soro ou plasma de pacientes infectados poderia aglutinar hemácias de cavalo ou ovelha. Tais anticorpos não são específicos. Constituem imunoglobulinas policlonais, na sua maioria da classe IgM, produzidas por linfócitos B imortalizados e estão presentes em 60 a 80% dos pacientes com MI (PITETTI *et al.*, 2003).

Davidson e colaboradores aperfeiçoaram a técnica de Paul e Bunnell, introduzindo uma etapa de adsorção de anticorpos não relacionados à MI. É um teste indicado para diagnóstico de infecção primária por EBV em indivíduos imunocompetentes. Porém, cabe ressaltar que um resultado negativo não descarta a infecção e a determinação de anticorpos específicos para o vírus deve ser realizada (GRASER, 1991).

Durante a fase lítica, os primeiros antígenos (Ag) do EBV a serem produzidos são Ag precoces (EA), seguidos dos Ag do capsídeo viral (VCA), expressos junto com o genoma viral. E, no ciclo latente, são sintetizados os Ag nucleares – EBNA (PITETTI *et al.*, 2003).

Numa infecção primária inicial por EBV, acontece o aparecimento precoce de anticorpos da classe IgM denominados anti-VCA IgM. Em cerca de quatro a sete dias após início dos sintomas, é possível identificar IgM anti-VCA, desaparecendo normalmente dentro de 2 a 3 meses. Em alguns pacientes, na detecção desses anticorpos podem ocorrer reações falso-positivas devido à presença de auto-anticorpos ou reações cruzadas com outros patógenos (OKAY *et al.*, 2005).

As IgG anti-VCA aumentam até atingirem um pico em alguns meses e então diminuem, mantendo títulos constantes. E as IgG anti-EBNA são produzidas mais tardiamente, porém, assim como as IgG anti-VCA, persistem por toda a vida do hospedeiro (HESS *et al.*, 2004).

A presença de anticorpos IgG e IgM anti-VCA e a ausência de IgG anti-EBNA1 correspondem a um perfil sorológico tipicamente encontrado em pacientes

com infecção primária. E, nas infecções passadas, ocorre a presença de IgG anti-VCA e IgG anti-EBNA-1, e ausência de IgM anti-VCA (HESS *et al.*, 2004). E, em reativações ou doenças relacionadas ao EBV, os anticorpos EA e VCA IgM podem reaparecer (GULLEY & TANG, 2008). A tabela 4 refere-se a algumas características dos anticorpos dirigidos aos antígenos do EBV.

TABELA 4 - ANTICORPOS ANTI-EBV E SUAS PECULIARIDADES

Anticorpo (Ac)	Aparecimento	Persistência	Porcentagem de pacientes com MI que apresentam o Ac
Heterofílicos	Fase aguda	Até 6 meses	60 a 80%
EA	Semanas após infecção	3-6 meses	70% a 80%
VCA IgM	Fase aguda	1-2 meses	100%
VCA IgG	Fase aguda	Toda a vida	100%
EBNA	3-6 semanas após infecção	Toda a vida	100%

FONTE: (PITETTI *et al.*, 2003)

Pode-se empregar como método sorológico a imunofluorescência indireta (IFI), Western blot ou ELISA - enzima imunoensaio (HESS *et al.*, 2004). Os atuais testes imunoenzimáticos são mais objetivos, sensíveis e práticos quando comparados à IFI e western blot. A figura 6 demonstra o aparecimento dos Acs específicos, títulos encontrados e tempo de permanência no organismo (GULLEY & TANG, 2008).

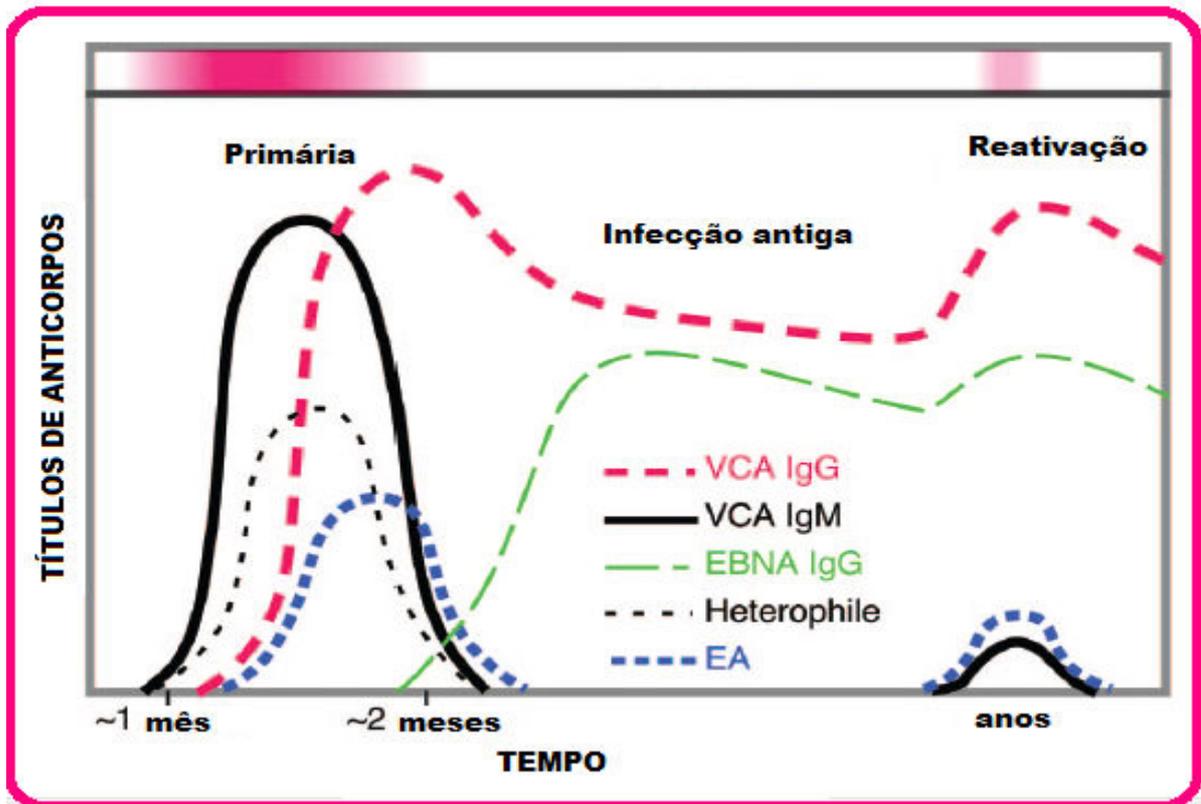


FIGURA 6 - PERFIL SOROLÓGICO DOS DIFERENTES ANTICORPOS DIRIGIDOS CONTRA O EBV
 FONTE: (GULLEY & TANG, 2008)

2.7.2. Hibridização *in situ*

Essa metodologia possui uma sonda que hibridiza ao DNA ou RNA no corte histológico, de modo a demonstrar a localização do alvo pesquisado no tecido. Tal técnica combina a vantagem de avaliação morfológica e detecção molecular (YIN JONES, 2006). EBER é o transcrito mais abundante, presente virtualmente em todas as células infectadas e expresso em altos níveis - aproximadamente 1 milhão de cópias/célula infectada (GULLEY & TANG, 2008). Estudos têm utilizado hibridização *in situ* com uma sonda EBER-1 para detectar EBV em amostras de tecido suspeito (KIMURA *et al.*, 1999). Contudo, o exame avalia apenas células infectadas, sem detectar a presença de vírus livres (KIMURA *et al.*, 2008).

Não se deve deixar de citar que a análise de proteínas e/ou ácidos nucleicos também podem ser realizadas por métodos de imunohistoquímica, Western blot e Southern blot (YIN JONES, 2006).

2.7.3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

O desenvolvimento da PCR, descrito por Kary Mullis e colaboradores, permitiu que, essencialmente, qualquer sequência de ácidos nucleicos presente numa amostra biológica pudesse ser amplificada num processo cíclico para gerar um grande número de cópias idênticas, que podem ser imediatamente analisadas (MULLIS FALOONA, 1987; SAIKI *et al.*, 1986).

Para reação de PCR são necessários iniciadores complementares a sequência-alvo, *template*, dNTPs, uma polimerase termoestável, íons de magnésio e tampão adequado. A reação é realizada em diferentes ciclos de temperatura (KUBISTA *et al.*, 2006). Primeiramente, a temperatura é elevada a 95 °C, para abrir a molécula de DNA. Em seguida, é reduzida para anelamento dos iniciadores e, por fim, a temperatura é ajustada em 72 °C para permitir que a polimerase estenda os primers (figura 7).

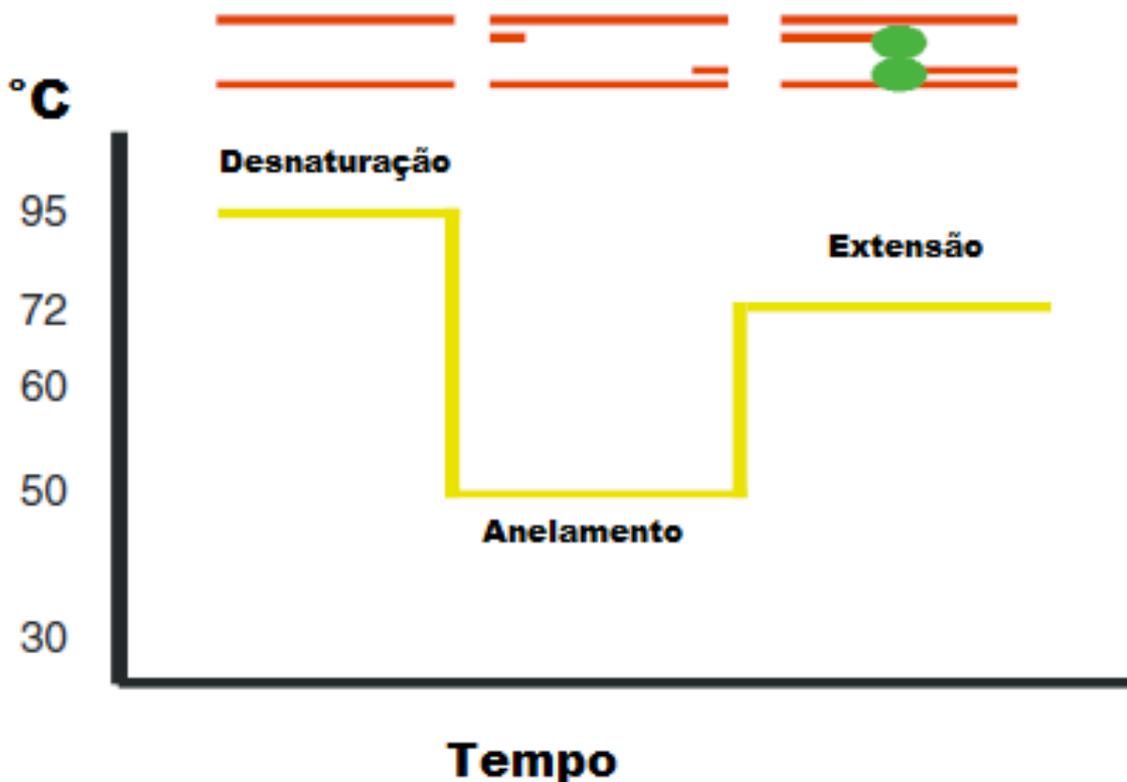


FIGURA 7 - CICLOS DE UMA PCR CONVENCIONAL
 FONTE: (KUBISTA *et al.*, 2006)

2.7.4. PCR em tempo real

As metodologias de PCR qualitativa e quantitativa realizam um diagnóstico preciso, altamente sensível e específico. Porém, apenas detectar o EBV não é suficiente para o diagnóstico de doenças associadas (KIMURA *et al.*, 2008). A implementação da técnica de PCR em tempo real quantitativo para esse vírus vem sendo uma ferramenta imprescindível para identificar infecção ativa em pacientes imunossuprimidos e prever reativações virais (KIMURA *et al.*, 1999).

Com o desenvolvimento da PCR em tempo real por Higuchi e colaboradores (HIGUCHI *et al.*, 1993; HIGUCHI *et al.*, 1992), foi possível monitorar em tempo real a quantidade de produto formado durante o curso da reação de PCR. A primeira PCR em tempo real foi realizada por simples adição de brometo de etídio na mistura para PCR e acompanhamento da amplificação através das propriedades fluorescentes (HIGUCHI *et al.*, 1993). Para aumentar a sensibilidade, brometo de etídio foi posteriormente substituído pelo corante SYBR Green (SCHNEEBERGER *et al.*, 1995). A técnica foi implementada com o desenvolvimento de um equipamento que, num único compartimento, apresenta termociclador, sistema ótico e câmera CCD (*Charged Coupled Device*).

Em tempo real, há vários sistemas para detecção de sequências-alvo, tais como, sistemas de corante inespecífico (*SYBR Green*, *EVA Green*, *SYTO 9*), tecnologias baseadas em primers (primer LUX, AmpliFluor, Plexor) e sistemas de sondas FRET (sondas *TaqMan* ou sondas de hidrólise, *molecular beacons*, *Scorpions*, sondas de hibridização FRET), entre outros.

O sistema *SYBR Green*[®] utiliza um corante que se liga a todo DNA dupla-fita presente na amostra. No decorrer da PCR, a amplificação da sequência-alvo gerará *amplicons* e o corante se ligará a essas cópias de DNA, resultando no aumento da intensidade de fluorescência. Esse sistema é útil para verificar a amplificação de qualquer sequência de DNA dupla-fita e não necessita de uma sonda, o que reduz a configuração do ensaio e os custos.

Porém, tem como principal desvantagem a inespecificidade, uma vez que a molécula do corante pode se ligar em qualquer sequência de DNA dupla-fita formado. Com isso, pode ocorrer também a detecção de *primer dimers* ou *amplicons*

não específicos. Possui ainda outras desvantagens, como a baixa afinidade de ligação ao DNA de fita simples e a dificuldade para interpretação das curvas de dissociação de DNA (BUH GASPARIC *et al.*, 2010).

O sistema SYBR *Green*[®] não pode ser usado em ensaios *multiplex*, mas é adequado para a detecção qualitativa e quantitativa, desde que haja projeto cuidadoso e otimização adequada para obtenção de uma boa análise. É uma excelente ferramenta quando usado para triagem inicial de diversos experimentos, antes de passar por ensaios mais específicos com sondas (BUH GASPARIC *et al.*, 2010).

Na metodologia primer LUX (*Light Upon eXtention*), um dos primers (em uma estrutura em forma de *hairpin*) contém um fluoróforo na extremidade 3'. À medida que é estendido, o fluoróforo produz sinal mais intenso e esse aumento de fluorescência está diretamente ligado à formação do produto de PCR (BUH GASPARIC *et al.*, 2010).

Para melhorar a especificidade do ensaio, é possível usar um terceiro oligonucleotídeo, uma sonda fluorescente, que é complementar a uma sequência alvo situada entre os iniciadores. Cada sonda tem um corante repórter (fluorescente) covalentemente anexado a uma extremidade e um supressor (*quencher* e silenciador) ligado à outra extremidade ou até à outra sonda. Se ambos os corantes estão próximos, o sinal fluorescente não é emitido, sendo liberado apenas quando os corantes estão fisicamente separados (BUH GASPARIC *et al.*, 2010; MORRISON, 2010).

Os sistemas que empregam sondas estruturais são *Scorpions* e *Molecular Beacons*. Consistem em uma específica sonda em forma de *loop*. Quando não anelada ao DNA, a sonda mantém o repórter e supressor próximos, não havendo emissão de fluorescência. Se a sequência-alvo estiver presente, a sonda se liga ao seu complemento dentro do produto da PCR. A hibridização abre o *loop*, distanciando *repórter* e *quencher* e, conseqüentemente, aumentando o sinal fluorescente (THELWELL *et al.*, 2000).

Os métodos que usam sondas lineares de hibridização FRET se baseiam na transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) entre dois corantes adjacentes (ESPY *et al.*, 2006). Nessa técnica, uma sonda doadora é

marcada com um fluoróforo na extremidade 3' e uma segunda sonda (adjacente) é marcada com um fluoróforo receptor. Quando os dois estão próximos (1-5 nucleotídeos de distância), a luz emitida pelo doador vai excitar o receptor (FRET). Após cada ciclo de PCR, mais sondas de hibridização podem ligar-se, resultando em aumento do sinal fluorescente (VAN DER VELDEN *et al.*, 2003).

O sistema *TaqMan*[®] ou ensaio para nuclease 5' fluorescente utiliza uma sonda fluorescente para possibilitar a detecção de um produto específico de PCR conforme esse se acumula ao longo dos ciclos da reação. A sonda contém um corante repórter na extremidade 5' e um corante supressor na extremidade 3'. A proximidade do supressor reduz drasticamente a fluorescência emitida pela repórter, resultando em um substrato não fluorescente (MORRISON, 2010).

As sondas *TaqMan*[®] (sondas de hidrólise) são oligonucleotídeos desenhados para hibridizar em uma região interna do produto da PCR. Se a sequência-alvo estiver presente, a sonda se anela logo após um dos primers e é clivada pela atividade exonucleásica 5'-3' da *Taq* DNA polimerase enquanto o primer é estendido. A clivagem separa o *repórter* do *quencher*, removendo a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão continue (figura 8). As sondas clivadas a cada ciclo resultam no acúmulo de *repórter* livre e refletem a quantidade de produto formado (KUBISTA *et al.*, 2006). A fluorescência é captada na fase de extensão e esse sistema tem como grande vantagem a alta especificidade (THELWELL *et al.*, 2000).

A sonda deve ser desenhada de modo a localizar-se de uma a cinco bases do *primer Forward*. Sua temperatura de anelamento deve ser 10°C maior que a dos *primers*. Isso garante que, quando a enzima começar a estender, a sonda já estará anelada. As sondas usadas no experimento são conhecidas comercialmente como sondas *TaqMan MGB*. Possuem um quencher não fluorescente na extremidade 3' e uma molécula *minor groove binder (MGB)*, que aumenta em 10°C a temperatura de melting da sonda. As sondas podem ser marcadas com diferentes corantes, permitindo o desenvolvimento de ensaios *multiplex* (*TaqMan*[®] Universal PCR Master Mix Protocol, 2010).

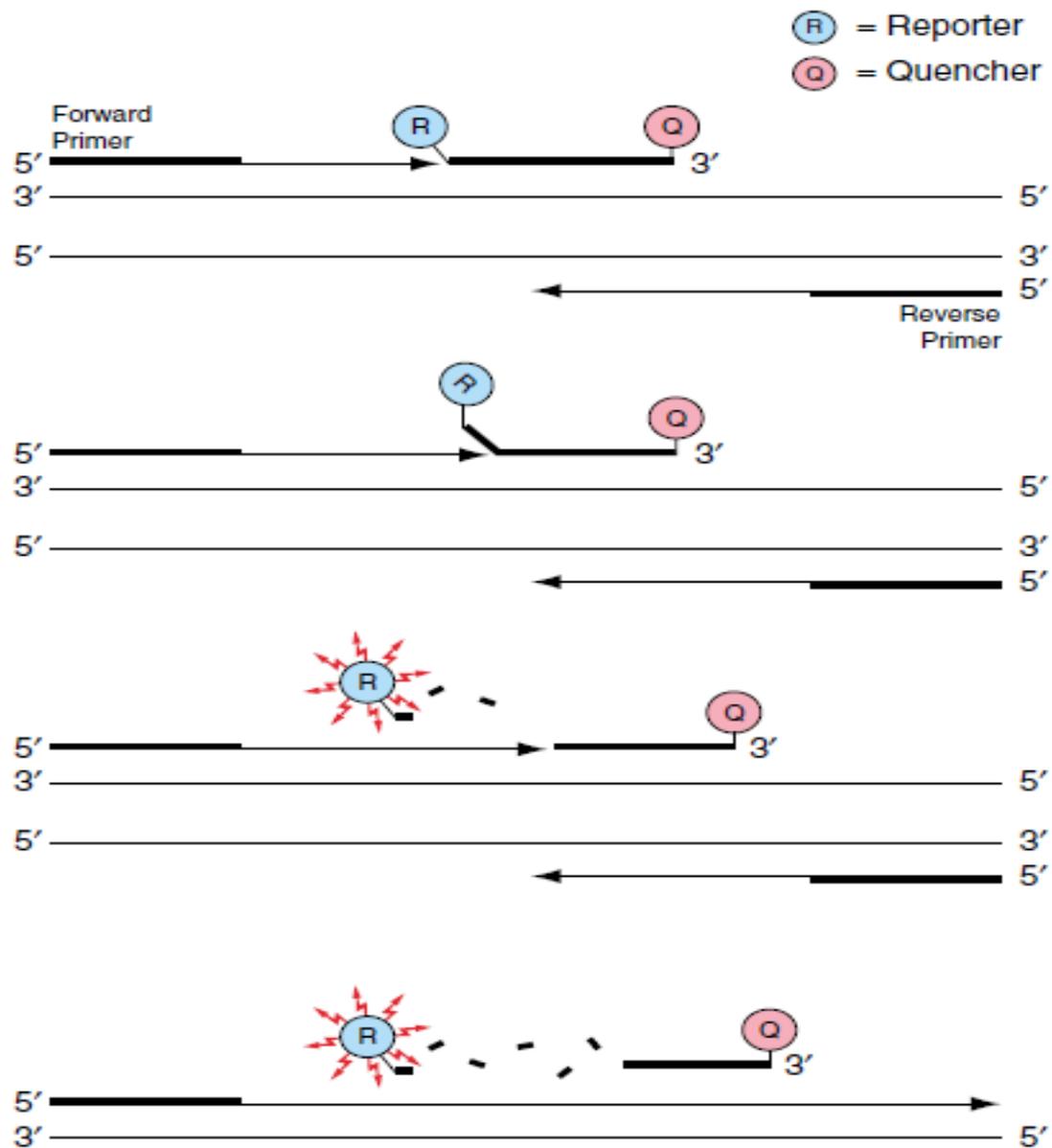


FIGURA 8 - ILUSTRAÇÃO DO MECANISMO DE PCR EM TEMPO REAL POR SONDA DE HIDRÓLISE

FONTE: (TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol, 2010)

Em estudo comparativo desenvolvido por Thelwell e colaboradores (figura 9), o sistema *TaqMan*[®] teve performance semelhante ao *Scorpion* em condições normais de ciclagem, enquanto o método molecular beacons apresentou emissão de fluorescência muito menor (THELWELL *et al.*, 2000).

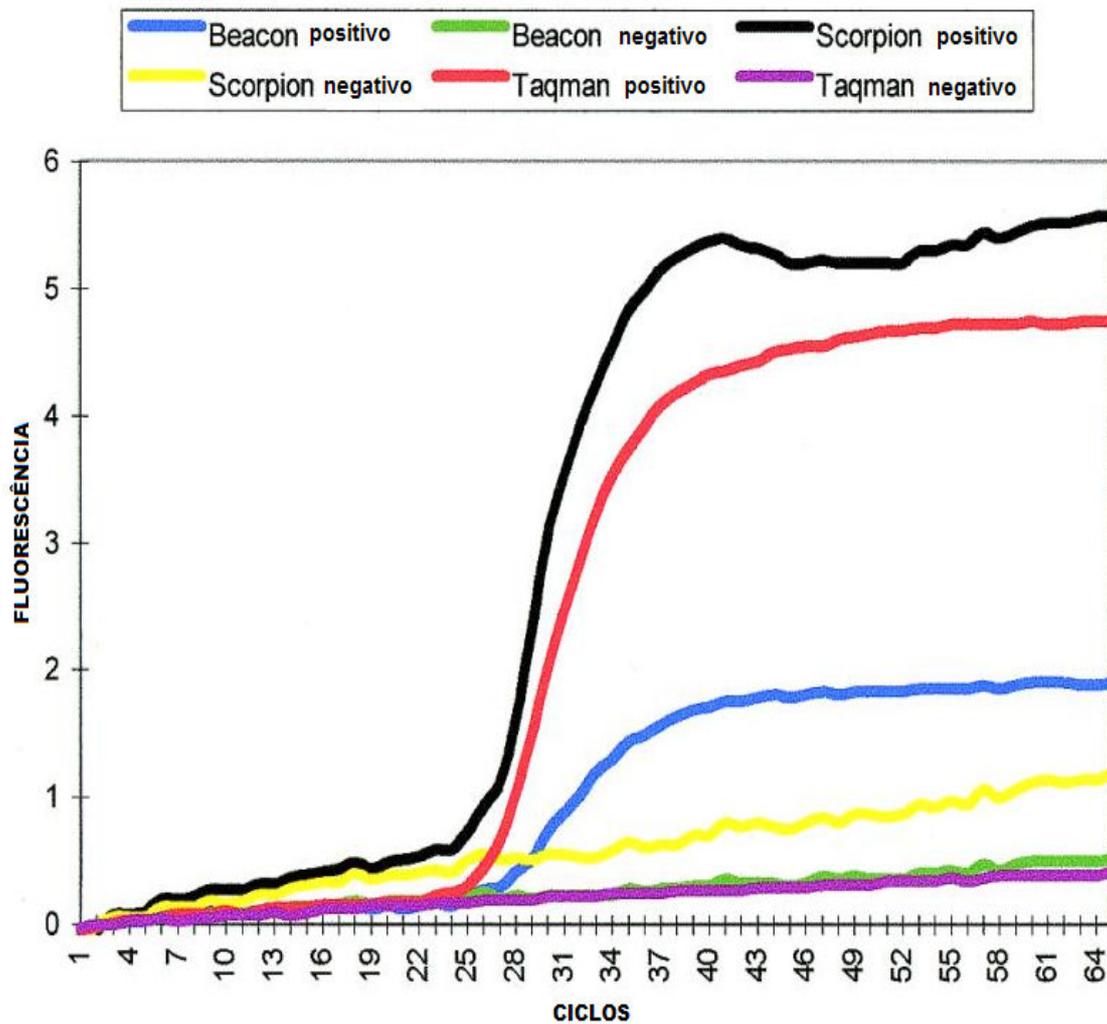


FIGURA 9 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES SISTEMAS EM TEMPO REAL
 FONTE: (THELWELL *et al.*, 2000)

2.8. SISTEMAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO EBV POR qPCR

Em 1999, pelo fato de os métodos qualitativos não distinguirem infecção ativa e latente (MEERBACH *et al.*, 2008), foram desenvolvidos os primeiros ensaios de qPCR para EBV (KIMURA *et al.*, 1999) (GALLAGHER *et al.*, 1999). A análise da carga viral para EBV vem se tornando parte integrante de protocolos de monitoramento de pacientes transplantados e como um parâmetro preditivo para PTLD (LEUNG *et al.*, 2002). Não obstante, a correlação entre o aumento da carga viral e PTLD ainda não está completamente elucidada (ORENTAS *et al.*, 2003).

Em pacientes de alto risco submetidos a TCTH e a TOS, é recomendada a quantificação do EBV uma vez por semana durante, pelo menos, três meses após o transplante. Depois desse período, sugere-se o acompanhamento apenas de pacientes com reativação ou doença relacionada ao EBV (STYCZYNSKI *et al.*, 2009a).

Não existe um consenso sobre qual o tipo de amostra, método de extração, gene alvo do vírus, plataformas e instrumentos de qPCR e unidades de medida seriam melhores para avaliação de complicação relacionadas ao EBV. Na verdade, ainda não há um método (comercial ou *in-house*) padronizado para detecção do EBV (STYCZYNSKI *et al.*, 2009a).

Perandin e colaboradores compararam um ensaio *in-house* com um sistema de detecção comercial para EBV (qEBV PCR, Amplimedical) e verificaram que ambos os ensaios são apropriados para uso clínico e produziram resultados quantitativos similares (PERANDIN *et al.*, 2007).

Hayden e colaboradores haviam encontrado uma enorme variabilidade na quantificação do EBV em diferentes laboratórios, apesar de todos os locais utilizarem o mesmo método de extração. Os valores de carga viral se aproximaram quando os laboratórios participantes no estudo usaram uma mesma curva de calibração para seus ensaios (HAYDEN *et al.*, 2008).

Em outro estudo de comparação interlaboratorial realizado por Preiksaitis e colaboradores (PREIKSAITIS *et al.*, 2009), apenas 47% de todos os resultados ficaram dentro dos valores aceitáveis de variação (resultado esperados $\pm 0,5$ log). Os pesquisadores concluíram que a falta de um padrão internacionalmente aceito para EBV torna difícil a comparação de resultados.

A variabilidade gera impacto na qualidade dos programas associados à prevenção, diagnóstico e monitoramento da PTLD. Preocupados com essa situação, o grupo de *Standardisation of Genomic Amplification Techniques* (SOGAT) em conjunto com a Organização Mundial de Saúde (OMS) assumiram a responsabilidade de desenvolver padrões internacionais de referência tanto para EBV como para CMV (FRYER MINOR, 2009). Devido à falta de procedimentos padrões para desenvolvimento de qPCR, Bustin e colaboradores descreveram um

guia com as informações mínimas necessárias para a avaliação de tais experimentos (BUSTIN *et al.*, 2009).

2.8.1. Escolha da amostra

Pesquisadores utilizam como amostras para qPCR EBV sangue total (ST), células mononucleares de sangue periférico (PBMC), plasma ou soro. Kimura e colaboradores encontraram, conforme figura 10, que o DNA do EBV ora está mais ligado a células ora está livre na circulação, variando de acordo com o tipo de doença pesquisada (KIMURA *et al.*, 2008).

Segundo Kimura e colaboradores, na MI, há vírions e fragmentos de DNA livres. Já na PTLT, o EBV está mais associado a células e DNA livre encontra-se em menor quantidade. Na tabela 5, foi avaliada a amostra mais apropriada para mensurar a CV em cada tipo de doença relacionada ao EBV. O trabalho concluiu que o sangue total é a melhor opção para monitorar PTLT, embora compreenda que mais estudos são necessários para solucionar a questão (KIMURA *et al.*, 2008).

TABELA 5 - TIPO DE AMOSTRA INDICADA DE ACORDO COM A DOENÇA RELACIONADA AO EBV NA OPINIÃO DE KIMURA E COLABORADORES

Doença	Amostra
Mononucleose	Plasma
PTLT	Sangue total
Linfoma de Hodgkin	Plasma
CAEBV	Plasma
Carcinoma de nasofaringe (CN)	Plasma

FONTE: (KIMURA *et al.*, 2008)

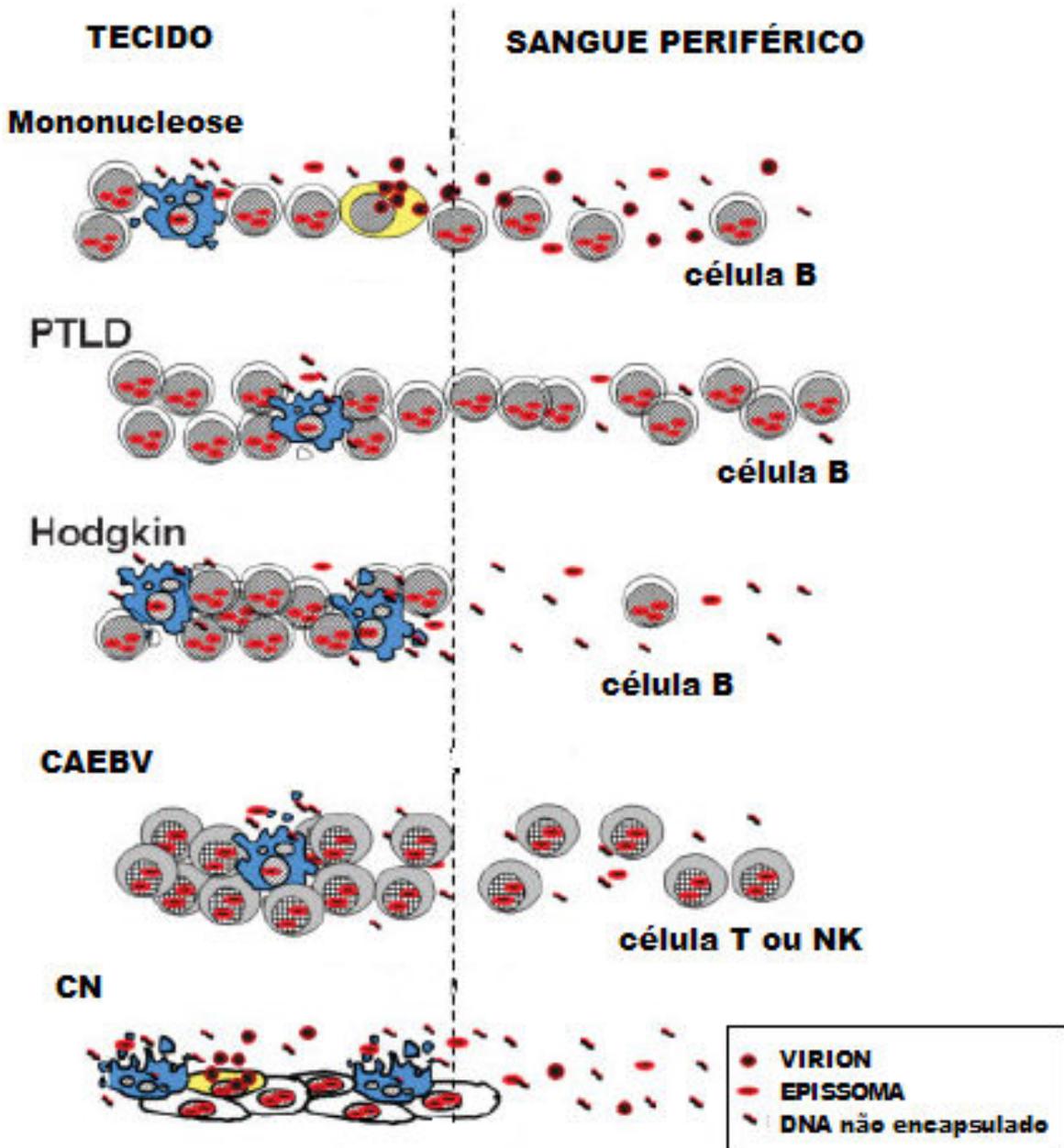


FIGURA 10 - QUANTIDADE DO EBV PRESENTE EM TECIDO E SANGUE PERIFÉRICO
 FONTE: (KIMURA *et al.*, 2008)

Hakim e colaboradores compararam a quantificação da carga viral do EBV em ST, PBMC e plasma e usaram duas diferentes unidades de medida (cópias/ml e cópias/ug de DNA). A sensibilidade do qPCR foi semelhante para ST e PBMC e menor para plasma. E houve uma estreita relação entre as unidades cópias/ml e cópias/ug de DNA. Seus resultados, portanto, apoiam o uso de amostras de ST com a unidade cópias/ml (HAKIM *et al.*, 2007).

Outros estudos sugerem que, quando se analisa o plasma, o DNA associado a células não é quantificado (KIMURA *et al.*, 2008). E Stevens e colaboradores, num trabalho com receptores de transplante pulmonar e PTLD tardia, (STEVENS *et al.*, 2002) informaram que o aumento do EBV na PTLD está restrito ao compartimento celular.

Baldanti e colaboradores encontraram uma correlação significativa entre amostras de ST e PBMC (BALDANTI *et al.*, 2008). Hayden e colaboradores, em uma comparação multicêntrica, escolheram o ST, baseados em estudos que demonstraram uma melhor sensibilidade nessa amostra (HAKIM *et al.*, 2007; WADOWSKY *et al.*, 2003). E também porque o ST era mais comumente usado para o qPCR EBV entre os laboratórios participantes (HAYDEN *et al.*, 2008).

Styczynski e colaboradores explicam que, embora não existam dados para definir a amostra ideal, o sangue total é a escolha mais aceita na maioria dos laboratórios (STYCZYNSKI *et al.*, 2009b).

Não obstante, Gulley e Tang argumentam que não é apropriado dizer que para PTLD a amostra de sangue total é mais informativa que o plasma. PTLD é uma neoplasia complexa. Alguns casos podem ter relativamente poucas células circulantes. Em outras situações, há expressão de fatores antiapoptóticos que tornam as células mais resistentes à morte celular. E, em outros casos, pode até ocorrer produção de vírions. Isso, sem dúvida, leva a diferentes concentrações do EBV nas frações celulares e no plasma (GULLEY & TANG, 2010). Outros autores relatam valores elevados de carga viral no soro de pacientes com PTLD e sugerem presença também de ciclo lítico durante a doença (AALTO *et al.*, 2003). E Weinstock e colaboradores também afirmam que, embora a latência tipo III predomine, podem ocorrer outros modelos de latência e replicação lítica (WEINSTOCK *et al.*, 2006).

Wagner e colaboradores publicaram estudo comparando a detecção em sangue total e plasma e encontraram maior especificidade clínica quando o plasma foi usado (WAGNER *et al.*, 2001). Em outro estudo de diagnóstico e monitoramento de PTLD, Tsai e colaboradores concluíram que o plasma foi a melhor opção quando comparado ao ST (TSAI *et al.*, 2008). E Niesters e colaboradores, em seu trabalho, verificaram que há relação entre DNA presente no plasma e doenças relacionadas ao EBV (NIESTERS *et al.*, 2000).

Alguns pesquisadores preferem trabalhar com soro ou plasma, pois células mononucleares podem ser de difícil obtenção em pacientes com leucopenia nos primeiros meses pós-transplante (AALTO *et al.*, 2007; LJUNGMAN, 2010). Ademais, em pacientes que receberam rituximab, Styczynski e colaboradores afirmaram que a destruição de células B pode afetar o número de cópias em linfócitos periféricos (STYCZYNSKI *et al.*, 2009b).

Uma questão levantada foi se a presença de EBV no plasma estava relacionada à lise celular. Para distinguir viremia de ruptura de linfócitos B, foi estudada a estabilidade dependente do tempo de armazenamento. Amostras de sangue total em EDTA sem nenhum processamento foram mantidas a 4°C durante zero, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. PBMCs foram isoladas, o plasma separado e a carga viral quantificada. Um período de tempo de 6 horas entre coleta e processamento do sangue foi seguro para distinguir partícula viral e DNA de células B destruídas (MAURMANN *et al.*, 2003). Deve-se ter em mente que o DNA do EBV quantificado nas frações do sangue livres de células pode ser encapsulado, não encapsulado ou fragmentado. Um ácido nucléico altamente fragmentado interfere na sensibilidade da PCR (BOOM *et al.*, 2002).

Para facilitar a comparação, a tabela 6 apresenta vantagens e desvantagens do uso dos diferentes tipos de amostras.

TABELA 6 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TIPOS DE AMOSTRAS USADAS NO qPCR PARA EBV

AMOSTRAS	Unidades mais usadas	Vantagens	Desvantagens
ST ⁽¹⁾	Cópias/ml Cópias/ug DNA Cópias/10 ⁵ PBMC	Não é necessário centrifugar. Contêm todas as frações do sangue.	O armazenamento interfere na integridade e confiabilidade da amostra.
PBMC ⁽²⁾	Cópias/ml Cópias/ug DNA Cópias/10 ⁵ PBMC	Representa a fração sanguínea onde é mais provável encontrar o EBV.	- A separação das células e isolamento dos leucócitos podem ser tarefas trabalhosas; - Em pacientes com citopenia ou tratados com anti-CD20, pode haver uma redução no número de cópias.
Plasma	Cópias/ml Cópias/100 µl UI/ml	- Armazenamento mais confiável; - Apresenta maior estabilidade após separação e centrifugação; - Fração do sangue que teoricamente, em controles saudáveis, não ocorre a presença do EBV.	Necessidade de centrifugação o mais breve possível para que lise celular não contamine o plasma.
Soro	Cópias/ml UI/ml	Idem ao plasma	- centrifugação o mais breve possível, logo após coagulação; - possível contaminação por EBV liberados das células durante a coagulação.

FONTE: (Aalto, 2007; Styczynski, 2009; Maurmann, 2003)

⁽¹⁾ Sangue total

⁽²⁾ Células mononucleares de sangue periférico

2.8.2. Unidades de medida

Há uma grande variedade de unidades para medir a CV do EBV. Conforme tabela 7, ROWE e colaboradores descreveram fatores de conversão de carga viral em diferentes unidades de medida, tornando mais fácil a comparação entre diferentes estudos (ROWE *et al.*, 2001). Tal interconversão é amplamente aceita, de maneira de Weinstock e colaboradores descrevem que 3 cópias/µg de DNA equivalem a 20 cópias/ml (WEINSTOCK *et al.*, 2006). Outros estudos também apontam para o uso desses fatores de conversão (STYCZYNSKI *et al.*, 2009a; LJUNGMAN, 2010).

TABELA 7 - INTERCONVERSÃO DE UNIDADES DE MEDIDA PARA QUANTIFICAR O EBV

Unidades	Fator de conversão
Cópias/10 ⁵ PBMCs	1
Cópias/μg DNA	3
Cópias/10 ⁶ PBMCs	10
Cópias/ml de sangue	20
Cópias/10 ⁷ células B	1000

FONTE: (ROWE *et al.*, 2001)

Claramente, é possível visualizar que um valor numérico único de cut-off não pode ser definido usando-se diferentes unidades de medida.

2.8.3. *Threshold* preditivo

Valores para intervenção preventiva da PTLD têm sido definidos em centros de transplante, conforme experiência local. Mas, vale dizer que tais níveis de corte não foram validados em estudos multicêntricos (PREIKSAITIS *et al.*, 2009). Recente revisão confirma que ainda não existe um limite indicativo para início de intervenções preventivas (LJUNGMAN, 2010).

2.8.4. Estudos publicados em tempo real para detecção do EBV

Diversos autores estabeleceram valores de cut-off usando amostras, técnicas de extração, unidades de medidas, sistemas de detecção e amostragens diferentes. Na tabela 8, estão elucidados os principais testes ditos “*in-house*” desenvolvidos para quantificação do vírus de interesse nesse estudo.

Dos 25 estudos revisados, o método de extração mais amplamente usado foi o denominado *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha) e o sistema de quantificação de escolha em tempo real foi por sondas de hidrólise. Apenas um trabalho enumerado não emprega a metodologia em tempo real (MEERBACH *et al.*, 2008).

Em oito estudos, o material de escolha foi o sangue total (LEUNG *et al.*, 2002; STEVENS *et al.*, 2002; YANCOSKI *et al.*, 2004; SCHUBERT *et al.*, 2008; FAFI-KREMER *et al.*, 2008; COPPOLETTA *et al.*, 2010; LAU *et al.*, 2010; SCHONBERGER *et al.*, 2010). PBMC foi usado por cinco trabalhos (KIMURA *et al.*, 1999; JABS *et al.*, 2001; ORENTAS *et al.*, 2003; WAGNER *et al.*, 2004; MEERBACH *et al.*, 2008) e plasma ou soro por nove (NIESTERS *et al.*, 2000; TERAMURA *et al.*, 2002; VAN ESSER *et al.*, 2001b; LANKESTER *et al.*, 2002; DOMINIETO *et al.*, 2004; WEINSTOCK *et al.*, 2006; AALTO *et al.*, 2007; MEIJER CORNELISSEN, 2008; OMAR *et al.*, 2009). Foram realizados dois estudos comparativos (WAGNER *et al.*, 2001; BALDANTI *et al.*, 2008): um deles entre PBMC e plasma - demonstrando maior sensibilidade no plasma - e o outro entre ST e PBMC, demonstrando resultados similares nos dois materiais. O último experimento descrito na tabela 8 (LAY *et al.*, 2010) utilizou plasma, ST e PBMC sem o propósito de comparar as amostras.

As amostragens são as mais variáveis possíveis: pacientes submetidos a transplantes de pulmão, coração, fígado, rim, intestino, TCTH. Alguns estudos incluíram pacientes com doenças por EBV confirmadas: MI, linfo-histiocitose hemofagocítica (HLH), PTLD, CAEBV, LB. Além disso, muitos também utilizaram controles saudáveis e indivíduos com AIDS.

Cumprе ressaltar que a população de pacientes que realizaram TCTH foi incluída em 12 trabalhos. Destes, apenas cinco usaram plasma ou soro como material de escolha (NIESTERS *et al.*, 2000; VAN ESSER *et al.*, 2001b; WEINSTOCK *et al.*, 2006; AALTO *et al.*, 2007; OMAR *et al.*, 2009).

TABELA 8 - COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS, TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO, VALORES DE CUT-OFF, SISTEMAS DE DETECÇÃO E AMOSTRAGENS DIFERENTES

continua

AUTORES	AMOSTRA	EXTRAÇÃO	CUT-OFF	MÉTODO	AMOSTRAGEM	DEMAIS CONSIDERAÇÕES
(NIESTERS <i>et al.</i> , 2000)	Plasma Soro	- Baseado no método descrito por Boom <i>et al.</i> ; - High Pure (ROCHE)	10 ³ cópias/ml	Sondas de hidrólise (TaqMan) ABI PRISM 7700	100 indivíduos saudáveis; 109 submetidos a TOS; 22 com MI (soro); 10 com PTLD (5 TCTH e 5 TOS).	O trabalho realizou uma comparação dos dois métodos de extração. EBV não foi detectado em nenhum dos controles saudáveis. Autores concluíram que há relação entre níveis de EBV no plasma e doença ativa.
(KIMURA <i>et al.</i> , 1999)	PBMC	QIAamp	10 ^{2.5} cópias/μg DNA PBMC	Sondas de hidrólise ABI PRISM 7700	04 CAEBV; 05 PTLD; 09 com MI; 10 submetidos a transplante de fígado ou TCTH sem sintomas de PTLD; 13 imunocompetentes com anti-VCAIgG positivo.	Pacientes com valores de CV superiores ao cut off apresentavam sinais de infecção ativa por EBV.
(WAGNER <i>et al.</i> , 2001)	PBMC e Plasma	QIAamp	5000 cópias/μg DNA PBMC 10 ³ cópias/100μl de plasma	Sondas de hidrólise ABI PRISM 7700	96 submetidos a tx renal; 20 ind imunocompetentes; 10 pacientes com PTLD submetidos a TOS; 13 imunossuprimidos com sorologia positiva para MI.	Amostras de PBMC e plasma foram coletadas em paralelo. Encontrada maior especificidade quando plasma foi utilizado.
(TERAMURA <i>et al.</i> , 2002)	Plasma Soro	QIAamp	10 ³ cópias/ml	Sondas de hidrólise GEN Amp 5700	38 pacientes com HLH; 15 com MI; 20 controles saudáveis.	HLH é uma doença conhecida como linfocitose linfocítica. Uso de tais amostras foi útil para detectar doença e avaliar resposta ao tratamento.
(VAN ESSER <i>et al.</i> , 2001b)	Plasma	Baseada no método descrito por Boom <i>et al.</i>	10 ³ cópias/ml	Sondas de hidrólise ABI PRISM 7700	14 pacientes submetidos a TCTH com diagnóstico de PTLD.	

TABELA 8 - COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS, TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO, VALORES DE CUT-OFF, SISTEMAS DE DETECÇÃO E AMOSTRAGENS DIFERENTES

continuação

AUTORES	AMOSTRA	EXTRAÇÃO	CUT-OFF	MÉTODO	AMOSTRAGEM	DEMAIS CONSIDERAÇÕES
(JABS <i>et al.</i> , 2001)	PBMC	QIAamp	14.796 cópias/ μ g DNA PBMC	Sondas de hidrólise ABI PRISM 7700	114 submetidos ao transplante de coração; 10 com PTLT; 17 controles saudáveis	Normalização dos valores de CV de EBV com valores da amplificação da proteína C reativa. Segundo autores, coamplificação e posterior normalização de valores melhoraram o diagnóstico para PTLT.
(LEUNG <i>et al.</i> , 2002)	ST	Blood and cell culture (QIAGEN)	10 ² cópias/ μ g DNA PBMC	Sondas de hidrólise GEN Amp 5700	30 submetidos ao transplante renal; 11 controles saudáveis; 08 em hemodiálise; 15 pacientes com MI.	Encontraram, em 73% dos indivíduos saudáveis, CV detectável para EBV.
(STEVENS <i>et al.</i> , 2002)	ST	Baseada no método descrito por Boom <i>et al.</i>	2.000 cópias/ml	LightCycler	112 amostras de pacientes submetidos ao transplante de pulmão; 87 amostras de HIV; 21 de LB; 15 de controles saudáveis com sorologia positiva para EBV.	Estudo também realizou técnica de tempo real com sonda de hidrólise. Porém, foi observado que o método de extração utilizado não removia completamente inibidores das amostras de sangue total. Isso prejudicou o desempenho do sistema TaqMan.
(LANKESTER <i>et al.</i> , 2002)	PLASMA		10 ⁴ gEq/ml	Real time	26 amostras de seis pacientes com PTLT	
(ORENTAS <i>et al.</i> , 2003)	PBMC	QIAamp	10 ⁴ cópias/ μ g DNA PBMC	Sondas de hidrólise ABI 7000	56 pacientes submetidos ao TCTH ou TOS. Desse total, 19 foram monitorados por mais de um ano.	
(WAGNER <i>et al.</i> , 2004)	PBMC	QIAamp	4.000 cópias/ μ g DNA PBMC	Sondas de hidrólise ABI PRISM 7700	111 pacientes que realizaram TCTH, monitorados por, no mínimo, 100 dias.	Condicionamento de todos os pacientes foi feito com ATG ou alemtuzumab. PTLT foi diagnosticado em indivíduos que apresentaram CV > 4.000 cópias/ μ g DNA PBMC em duas ou mais ocasiões diferentes.
(YANCOSKI <i>et al.</i> , 2004)	ST	QIAamp	6.215 cópias/ml	Sondas de hidrólise ABI PRISM 7700	45 tx de rim; 57 tx de fígado; 08 TCTH.	Estudo identificou como baixo risco para PTLT níveis de EBV entre 6.215 e 66.800. E, como alto risco, valores superiores a 66.800 cópias/ml.

TABELA 8 - COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS, TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO, VALORES DE CUT-OFF, SISTEMAS DE DETECÇÃO E AMOSTRAGENS DIFERENTES

continuação

AUTORES	AMOSTRA	EXTRAÇÃO	CUT-OFF	MÉTODO	AMOSTRAGEM	DEMAIS CONSIDERAÇÕES
(DOMINIETO, 2004)	Plasma		10 ³ gEq/ml	Real time	77 amostras de seis pacientes com PTLD	
(WEINSTOCK <i>et al.</i> , 2006)	Plasma		10 ³ gEq/ml	Real time	112 pacientes submetidos ao TCTH	28 pacientes tiveram CV >1.000 em, pelo menos, uma ocasião. Apenas cinco desenvolveram PTLD.
(AALTO <i>et al.</i> , 2007)	Soro	Proteinase K	50.000 cópias/ml	Sondas de hidrólise ABI PRISM 7700	406 TCTH (total de 5479 amostras)	Conforme autores, níveis de CV ≥ 50.000 cópias/ml são preditivos para desenvolvimento de PTLD, não são espontaneamente reversíveis e devem ser tratados.
(MEERBACH <i>et al.</i> , 2008)	PBMC	QIAamp	10 ³ cópias/105 PBMC	PCR nested semiquantitativo	123 TCTH (total de 2.827 amostras)	
(BALDANTI <i>et al.</i> , 2008)	ST PBMC	EasyMag		Sondas de hidrólise ABI 7300	54 TCTH	Níveis de EBV foram significativamente semelhantes entre ST e PBMC. Por isso, estudo apóia o uso de ST.
(MEIJER & CORNELISSE, 2008)	Plasma		10 ³ cópias/ml			Além do valor da CV, a ausência de CTLs CD8+ específicos para EBV foi considerado preditivo para PTLD.
(SCHUBERT <i>et al.</i> , 2008)	ST		3.000 cópias/μg DNA PBMC	Sondas de hidrólise	41 pacientes submetidos ao transplante de coração (total de 260 amostras)	Estudo concluiu que o uso de Azathioprine e ATG contribuíram para aumento dos valores de CV para EBV.

TABELA 8 - COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS, TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO, VALORES DE CUT-OFF, SISTEMAS DE DETECÇÃO E AMOSTRAGENS DIFERENTES

						conclusão
AUTORES	AMOSTRA	EXTRAÇÃO	CUT-OFF	MÉTODO	AMOSTRAGEM	DEMAIS CONSIDERAÇÕES
(FAFI-KREMER <i>et al.</i> , 2008)	ST	QIAamp MagNA Pure Qiagen BioRobot	10 ³ cópias/ml	LightCycler EBV R-gene	150 amostras (42 de TCTH, 78 de TOS, 06 com MI, 17 HIV, 07 indivíduos saudáveis); 17 amostras de pacientes tratados com anti-CD20	Na comparação entre kit comercial e in house, as duas técnicas apresentaram resultados similares em ambas as plataformas de extração.
(OMAR <i>et al.</i> , 2009)	Soro	Magna Pure (Roche)	10 ⁴ cópias/ml	Sondas de hidrólise ABI 7500	131 TCTH (total de 597 amostras)	Rituximab prescrito quando carga viral ≥ 10.000 ou quando sintomas sugeriam infecção ativa por EBV (febre, linfadenopatia, achados de imagem consistentes com PTLD).
(COPPOLETTA <i>et al.</i> , 2010)	ST	QIAamp	10 ³ cópias/ 10 ⁵ PBMC	Sondas de hidrólise (Kit EBV RG PCR) Rotor GENE 3000	55 TCTH	ATG foi usado como regime de condicionamento em todos os pacientes.
(LAU <i>et al.</i> , 2010)	ST		16.000 cópias/ml	Não informado sistema de detecção por PCR em tempo real	166 pacientes submetidos ao tranplante de intestino	Quando autores usavam PCR competitivo quantitativo, o cut off era de 200 cópias/μg DNA PBMC. Porém, quando ocorreu a substituição para qPCR, o valor de corte foi alterado para 16000 cópias/ml.
(SCHONBERG ER <i>et al.</i> , 2010)	ST	EZ1 Qiagen	DNA 500 cópias/μg de DNA	Sondas de hidrólise ABI 7500	40 pacientes pediátricos submetidos ao TCTH	
(LAY <i>et al.</i> , 2010)	ST Plasma PBMC			SYBR GREEN Rotor Gene 6000	05 PTLD 07 MI 01 EBV AHS 12 HIV 218 indivíduos saudáveis	Primeiro estudo que relatou o uso do corante SYBR GREEN no Rotor Gene 6000 para quantificação de dois alvos para quantificação do EBV.

3. JUSTIFICATIVA

Estima-se que as doenças relacionadas ao EBV afetem cerca de 1% da população mundial, o que justifica o grande interesse em exames laboratoriais para detecção da infecção (GULLEY & TANG, 2008). Exames sorológicos específicos para EBV confirmam infecção primária e documentam infecção pregressa. Contudo, não são um método confiável quando há disfunção do sistema imunológico (GULLEY & TANG, 2008). É difícil distinguir infecção recente e anterior em imunocomprometidos devido à demora na reconstituição imune (OKAY *et al.*, 2005).

A presença de infecção ativa por EBV em pacientes com imunidade comprometida pode ser realizado em amostras de tecido por diversas técnicas, como: imuno-histoquímica, hibridização *in situ*, microscopia eletrônica, *Southern Blot*, isolamento em cultura. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) e suas variações (LEUNG *et al.*, 2002) são atualmente os melhores instrumentos para detecção do EBV. Técnicas de PCR podem usar amostras não invasivas, como sangue e derivados para monitoramento pós-transplante. Não obstante, o uso apenas de uma técnica de PCR qualitativa em sangue e frações não oferece ao clínico uma visão do real estado do paciente (KIMURA *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de um método molecular *in-house* quantitativo para EBV no LACEN-PR seria um teste útil para manejo clínico dos pacientes atendidos por serviços de TCTH e disponibilizado a todos os usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) no Estado do Paraná. E também uma ferramenta mais barata quando comparada aos testes comerciais disponíveis.

A técnica em tempo real com quantificação absoluta, utilizando sistema TaqMan, permitiria monitorar pacientes submetidos ao TCTH alogênico com fatores de risco importantes para o desenvolvimento de doenças relacionadas ao EBV, como a PTLT. Ademais, poderia ser incluído no protocolo de centros de transplante de órgãos sólidos e também utilizado em pacientes imunodeprimidos com suspeita de infecção ativa por EBV.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Ampliar os recursos diagnósticos para o EBV disponíveis no LACEN-PR através do desenvolvimento e validação de um teste molecular quantitativo baseado na técnica de PCR em tempo real.

4.2. Objetivos específicos

- Validar o ensaio por meio de análise de sensibilidade, especificidade, precisão e linearidade;
- Avaliar o desempenho do teste frente a outros métodos moleculares;
- Analisar o método diante de amostras clínicas;
- Disponibilizar uma ferramenta de qualidade para acompanhamento pós-transplante.

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1. DESENHO DO ESTUDO

O trabalho foi desenhado com a proposta de um estudo de coorte prospectivo. Os pacientes submetidos ao transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas tiveram suas amostras analisadas semanalmente ou a cada duas semanas num período de aproximadamente 100 dias, tempo em que permaneceram em Curitiba para acompanhamento médico. As coletas foram realizadas no HC-UFPR de julho de 2009 a julho de 2010. E os ensaios foram executados no LACEN-PR.

5.2. PACIENTES

Os casos incluídos no grupo de pacientes do TMO foram captados pela equipe multidisciplinar do próprio Serviço de TMO do HC-UFPR. Para avaliação dos dados obtidos foram usados os seguintes critérios de inclusão:

- Pacientes que realizaram TCTH durante o estudo;
- Transplante do tipo alogênico aparentado ou não aparentado;
- Disponibilidade da amostra.

O critério de exclusão consistiu nos casos de indivíduos que realizaram transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas. Não foram levados em consideração critérios de vulnerabilidade, como sexo, idade, doença de base, etc.

Nesse estudo, foram incluídos 51 pacientes e um total de 601 amostras, o que corresponde a uma média de 11 amostras por pacientes. As amostras foram coletadas em intervalos de uma ou duas semanas. Os dados dos indivíduos que realizaram TCTH foram coletados em um formulário (APÊNDICE 1) elaborado pela

Seção de Biologia Molecular do LACEN-PR, em conjunto com o Serviço de TMO do HC-UFPR.

5.3. GRUPOS CONTROLE

Foram recrutados dois grupos controles: controle-sadio e controle patológico. Para o grupo controle sadio, o estudo contou com 60 amostras de plasma obtidas de indivíduos que se apresentaram voluntariamente para doação no banco de sangue do HC-UFPR em Curitiba e assinaram o TCLE apresentado ao Comitê de Ética pelo projeto “Desenvolvimento de teste baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da leptospirose humana e estudo molecular de isolados clínicos de *Leptospira*”. Na aprovação desse projeto, foi prevista a formação de uma soroteca controle, armazenada no LACEN-PR, que poderia ser utilizada em outros estudos conduzidos na Instituição.

Os critérios de inclusão desse grupo foram resultados de bateria sorológica negativa (HIV 1 e 2, HTLV 1 e 2, HbsAg, anti-HBc, anti-HCV, chagas, VDRL) e sem histórico de doença febril nos últimos trinta dias.

O grupo controle patológico foi dividido em três: (1) grupo positivo no PCR Nested para EBV, (2) grupo positivo para outros patógenos e (3) grupo para análise do desempenho do teste *in-house*. Foram usadas amostras captadas no próprio LACEN/PR, das rotinas da Seção de Virologia, Imunologia e Biologia Molecular. No primeiro grupo, foram incluídas 40 amostras de plasma. Para o grupo dois, contou-se com 67 amostras (plasma ou soro) que atendiam os seguintes critérios de inclusão:

- Amostras detectáveis em testes moleculares para outros vírus da família *Herpesviridae*, toxoplasmose, hepatite A, hepatite B;
- Ou amostras com resultados sorológicos reagentes para infecção aguda (IgM reagente e/ou avidéz fraca);
- Disponibilidade da amostra.

O grupo três possuía 54 amostras de sangue total, escolhidas aleatoriamente, da rotina da Biologia Molecular para avaliação comparativa entre ensaios comercial e *in-house*.

5.4. COMITÊ DE ÉTICA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínica da UFPR em 2009, CAAE 0229.0.208.000-09, CEP num. 313.EXT.019/2009-09 (ANEXO 1).

Houve dispensa de obtenção do TCLE para os pacientes do TMO e controles patológicos. Todas as amostras necessárias para esse estudo foram coletadas para acompanhamento pós-transplante, conforme protocolo definido pelo TMO, sem prejuízo ao paciente, independentemente da inclusão no estudo. A identificação de todas as amostras e seus respectivos dados clínico-epidemiológicos foi codificada, de modo a evitar que qualquer dado ou informação possa ter sido rastreado até identidade dos sujeitos por terceiros, acatando as diretrizes de confidencialidade e ética que regem a pesquisa científica.

5.5. CONFIDENCIALIDADE DOS SUJEITOS DA PESQUISA

A identificação das amostras foi codificada para evitar o acesso de informações a terceiros não autorizados. Os formulários originais (APÊNDICE 1) contendo dados dos pacientes estão guardados em local restrito para assegurar o caráter anônimo dos pacientes. Tais medidas atendem aos aspectos das Resoluções CNS 196/96 e demais, sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa do Ministério da Saúde envolvendo seres humanos.

5.6. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Comitê de Ética permitiu a dispensa de obtenção do TCLE para os pacientes e controles patológicos. Para o grupo controle sadio, a equipe do LACEN/PR aplicou o TCLE (ANEXO 2) contido no projeto de validação de teste baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da leptospirose humana (CEP-HC num 300.EXT.006/2009).

5.7. COLETAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS

As amostras dos pacientes em estudo foram coletadas pela equipe do TMO do HC-UFPR em tubo contendo EDTA como anticoagulante e capacidade para 5 ml de material. Posteriormente foram enviadas à Seção de Virologia do Laboratório do HC-UFPR e separadas por centrifugação. O plasma foi transferido para microtubos e encaminhado para o LACEN-PR.

Para o grupo controle sadio, amostras colhidas em tubos com EDTA foram identificadas, separadas e armazenadas em freezer a -70°C para uso em pesquisa conforme esclarecia o TCLE preenchido por doadores voluntários de sangue.

5.8. EXTRAÇÃO DO DNA DE AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL E PLASMA

5.8.1. Extração de DNA em sangue total

Para extração de DNA em sangue total, utilizou-se o kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). O DNA foi extraído a partir de 200 μl de sangue total e eluído em 200 μl de tampão de eluição, conforme representação esquemática descrita na figura 11.



FIGURA 11 - EXTRAÇÃO DE SANGUE TOTAL PELO KIT ILUSTRA BLOOD (GE)
 FONTE: o autor (2010)

- (1) ST - sangue total
 (2) TA - temperatura ambiente

5.8.2. Extração dos ácidos nucleicos de plasma e padrões

Para extração de amostras de plasma e de padrões, utilizou-se a plataforma automatizada *Nuclisens EasyMag*[®] (Biomerieux, Boxtel, Netherlands), baseada no método de Boom (BOOM *et al.*, 1999).

Após pipetagem manual de 200 µl de amostra, o equipamento programado adicionou 2 ml de tampão de lise (tiocianato de guanidina 5mol/l, triton X-100, tris HCl, Ph 7.4) e incubou a temperatura ambiente por 10 min. Manualmente, adicionou-se 100 µl de sílica magnetizada (diluição 1:2) e o aparelho iniciou um processo que dura cerca de 40 min. Esse processo começa com uma incubação de 10 min (amostra+tampão de lise+sílica); em seguida, *EasyMag*[®] realiza procedimento de purificação com 400 µl de tampão de lavagem um (tiocianato de guanidina) e depois 500 µl de tampão de lavagem 2 (tampão orgânico, solução biocida). Cada tampão é usado duas vezes. As amostras foram, então, lavadas com tampão três (tampão inorgânico) e eluídas com 60 µl no mesmo tampão.

Por fim, o eluído foi separado da sílica pelo equipamento. Os materiais extraídos foram manualmente acondicionados em microtubos previamente identificados. E o DNA extraído, quando não usado imediatamente, foi armazenado em freezer -70°C.

5.9. PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DA PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

Para evitar contaminação, todos os procedimentos foram realizados em salas separadas. Os conjuntos de pipetas automáticas são exclusivos e não saem de suas capelas. A manipulação de reagentes e amostras é realizada com luvas descartáveis sem talco e EPIs. É interessante frisar que a pipetagem dos reagentes ocorreu na sala 1. Já a extração e pipetagem do DNA nas placas óticas aconteceram na sala 2. E, finalmente, a amplificação e detecção foram realizadas na sala 3.

5.10. DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO DE PCR EM TEMPO REAL PARA EBV

5.10.1. Desenho dos primers e sonda

A sequência da cepa B95-8 foi encontrada no *GeneBank* (*National Library of Medicine, National Institute of Health, Bethesda, MD*, num. de acesso V01555 para o genoma do EBV).

Com auxílio do software *Primer Express*[®] (Applied Biosystems, Foster, CA USA), foram desenhados primers e sonda dentro de uma região conservada do gene EBNA-2 do EBV. Foram desenhados iniciadores com Tm de 60°C e uma probe com Tm de 70°C.

TABELA 9 - IDENTIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DOS PRIMERS E SONDA MGB

Nome primer / sonda	Sequência (5'-3')
Forward EBNA-2	CTA TCT TGC GTT ACA TGG GGG AC
Reverse EBNA-2	TGA Y ⁽¹⁾ AG TTG TTC CTG GTA RGG ATT
Probe EBNA-2	FAM ⁽²⁾ TGG AAA CCC GTC ACT CT MGB ⁽³⁾ NFQ ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Y: significa que naquela posição, em metade dos primers, haverá a citosina e na outra metade, a guanina

⁽²⁾ FAM: fluoresceína na extremidade 5'

⁽³⁾ MGB: molécula conhecida como "Minor groove binder"

⁽⁴⁾ NFQ: quencher não fluorescente

5.10.3. Gradiente de temperatura

Foram preparados 12 tubinhos, cada um contendo volume final de 50 μ l, sendo 5 μ l de buffer 10x (*INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA*), 4 μ l de dNTPs (diluição 2,5 mM), 2 μ l de MgCl₂ 50 mM (*INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA*), 1 μ l de cada primer, 0,25 μ l de Taq DNA polimerase *high fidelitty* 5 U/ μ l (*INVITROGEN, Life Technologies, Carlsbad, CA*), 31,75 μ l de água ultrapura e 5 μ l DNA previamente extraído de uma mesma amostra positiva.

No termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), cada um dos 12 tubos foi submetido a uma temperatura de anelamento diferente, variando de 55 a 65°C (Δ 55-65°C). As condições de ciclagem foram as seguintes: 1 ciclo de 95°C por 15 minutos, 25 ciclos (94°C 1min, Δ 55-65°C 1 min, 72°C 1min), 1 ciclo de 72°C por 10 minutos e *hold* final a 10°C. Após reação, avaliou-se a detecção.

5.10.4. Detecção e análise dos produtos de PCR na reação de gradiente de temperatura

A detecção dos produtos de PCR foi feita através de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. A solução foi aquecida em microondas até completa solubilização. Após leve resfriamento, foi adicionado 10µl de brometo de etídio. Em seguida, a solução foi depositada em placa específica e dois pentes com 24 orifícios foram aplicados para marcar os poços de aplicação. Passados 15 min, o gel foi colocado em cuba de eletroforese com quantidade de TBE 1x suficiente para cobrir o gel.

A eletroforese foi realizada a 150 volts por 45 minutos. Após corrida eletroforética, as bandas foram visualizadas junto a um marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb (Invitrogen, São Paulo, Brasil) em um transiluminador ultravioleta (Uniscience Brasil). A fotodocumentação foi feita através de câmera digital (Kodak Digital Science – *Electrophoresis Documentation and Analysis System 120*, Rochester, NY USA).

5.10.5. Matrizes de titulação

A partir de três amostras positivas, foi realizada a matriz com diferentes concentrações de primers e sonda. Cada primer foi testado nas concentrações finais de 200, 300, 500, 700 e 900 nM. E para sonda, foram utilizadas as concentrações finais de 100 e 200 nM.

TABELA 10 - MATRIZES DE CONCENTRAÇÃO PRIMER/PRIMER/SONDA

Concentrações de Primers Forward e Reverse (nM)					
Concentração de sonda (nM)	200/200	300/300	500/500	700/700	900/900
100	200/200/100	300/300/100	500/500/100	-	-
200	200/200/200	300/300/200	500/500/200	700/700/200	900/900/200

5.10.6. Reação de PCR em tempo real para EBV

A reação foi realizada com os reagentes e insumos alistados no apêndice 2 e anexo 3 e processada no equipamento *7500 Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) disponível na Seção de Biologia Molecular do LACEN-PR, de acordo com as condições de ciclagens descritas na tabela 11.

TABELA 11 - CONDIÇÕES DE CICLAGENS PARA PCR EM TEMPO REAL NO EQUIPAMENTO ABI 7500

CICLAGEM (num. de ciclos)	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
01	50	2 min
01	95	10 min
45	95	15 s
	60	1 min

5.10.7. Curva de calibração

A curva EBV DNA *OptiQuant*[®] (Acrometrix, Benicia, CA, USA) adquirida para padronização do ensaio possuía quatro pontos nas seguintes concentrações de partículas: 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 cópias/ml.

Para obter uma quantidade razoável da curva, validar método e testar as amostras, a partir do ponto de maior concentração (10^6) foram feitas diluições seriadas com plasma humano normal. As diluições (10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2) foram extraídas no *EasyMag*[®] e testadas na plataforma em tempo real.

Posteriormente, para dar segmento ao trabalho, uma curva padrão foi produzida a partir de uma cultura de células infectadas por EBV e quantificada através da curva de calibração *OptiQuanti*[®]. O preparo dessa curva foi feito através de uma diluição seriada com plasma humano normal, conforme esquema mostrado na figura 12.

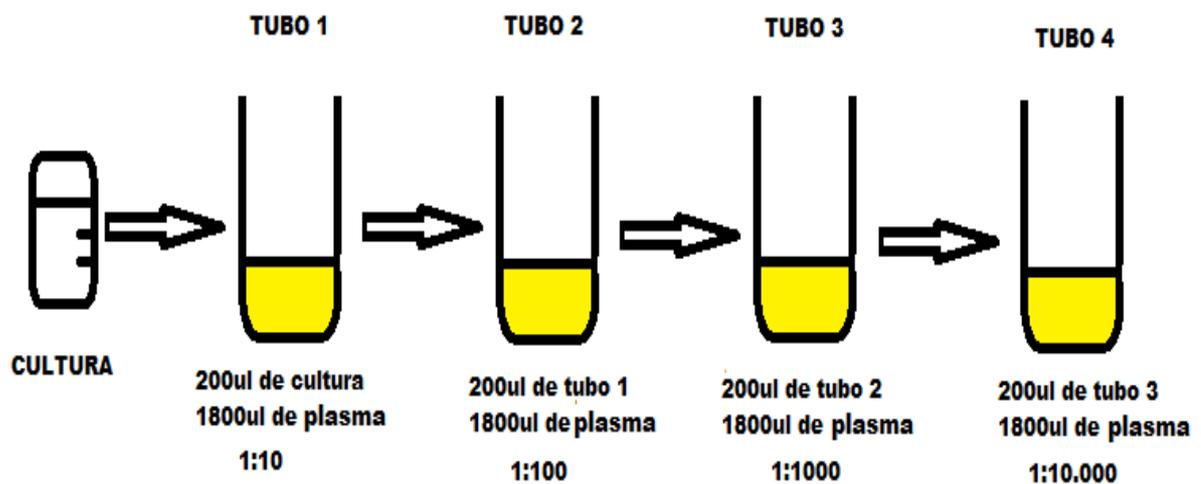


FIGURA 12 - DILUIÇÃO SERIADA PARA PRODUÇÃO DE CURVA PADRÃO
 FONTE: o autor (2010)

É essencial dizer que o cultivo do EBV foi feito através da linhagem celular EBV B95-8 obtida de *Marmosets* (sagüis), em meio de crescimento RPMI com 1% de antibiótico, em estufa umidificada, com 5% de CO₂ a 37°C. As etapas de expansão da linhagem e produção do sobrenadante foram realizados no Laboratório de Imunogenética, Seção de Cultivo e Terapia Celular do HC-UFPR.

5.11. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO TESTE DE qPCR

5.11.1. Sensibilidade analítica (LLOD)

Foram realizadas oito diluições em plasma humano normal a partir de uma amostra de cultura positiva para EBV. Cada diluição foi extraída duas vezes no equipamento *EasyMag*® para obtenção de DNA suficiente para pipetagem de 12 replicatas de cada diluição. O resultado das oito concentrações diferentes em 12 replicatas foi avaliado por análise *probit*.

5.11.2. Precisão

A repetibilidade foi analisada usando quatro diluições diferentes, em duplicata, de uma mesma amostra dentro de uma única corrida de PCR em tempo real. E a reprodutibilidade (variação interlaboratorial) foi avaliada também em quatro diluições extraídas em quatro dias diferentes e amplificadas em triplicatas. Vale lembrar também que, em algumas vezes, houve variação de lotes de reagentes.

5.11.3. Determinação da especificidade analítica

Para calcular esse parâmetro foram usadas amostras obtidas do grupo controle saudável. Foram analisadas amostras coletadas de indivíduos doadores de banco de sangue com sorologia negativa. Utilizaram-se 60 amostras de plasma em duplicata.

5.11.4. Reações cruzadas

Foram testadas também amostras positivas para outros vírus, não devendo haver reação cruzada quando realizada o PCR em tempo real para EBV. A quantidade de amostras e exames realizados foi informada na tabela 12.

TABELA 12 - CONTROLES POSITIVOS PARA OUTROS PATÓGENOS PARA AVALIAÇÃO DE REAÇÕES CRUZADAS

EXAME REAGENTE	QUANTIDADE DE AMOSTRAS	EXAME REAGENTE	QUANTIDADE DE AMOSTRAS
Antigenemia para CMV ⁽¹⁾	10	PCR para VZV ⁽⁴⁾	02
PCR para CMV	15	Sorologia para VZV	04
PCR para HSV ⁽²⁾	02	Sorologia para toxoplasmose	05
Sorologia para HSV 1 e 2	04	PCR para hepatite B	10
PCR para HHV-6 ⁽³⁾	05	PCR para hepatite A	10

(1) *Citomegalovirus*; (2) *Herpes simplex virus*; (3) *Herpesvirus humano 6*; (4) *Varicella zoster*.

5.11.5. Análise de amostras detectáveis para EBV pelo método de PCR *Nested* convencional

Para tal análise, foram testadas em tempo real para EBV 40 amostras com resultados positivos em uma reação de PCR *Nested in-house*. De 40 amostras, 07 possuíam resultado confirmado para MI. A técnica de PCR convencional possuía como alvo o gene EBNA-2 e consistia na realização de duas PCRs e posterior detecção em gel de agarose 1%.

Os reagentes necessários foram tampão PCR 2X, água ultrapura, dNTPs (2,5mM), MgCl₂ (50mM), *primers forward* EP e AP (100µM), *primers reverse* EP e AP

(100 μ M), *Taq* DNA polimerase e amostra extraída. E, na tabela 12, foram descritas as condições de ciclagem em termociclador 9600 (Applied Biosystems).

A detecção das bandas, após corrida eletroforética, foi feita junto a um marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb (Invitrogen) em um transiluminador ultravioleta (Uniscience Brasil). E a fotodocumentação foi realizada com uma câmera digital (*Kodak Digital Science – Eletrophoresis Documentation and Analysis System 120, Rochester, NY USA*).

TABELA 13 - CONDIÇÕES DE CICLAGEM PARA PCR *NESTED*

CICLAGEM (num. de ciclos)	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
01	94	5 min
30	94	1,5 min
	60	1 min
	72	2 min
01	72	7 min
01	10	indefinidamente

5.11.6. Linearidade da técnica

A determinação da faixa linear de quantificação foi calculada pela análise de uma diluição seriada de uma amostra positiva em duplicata - diluições de 10 vezes com, pelo menos, com quatro concentrações diferentes, em cinco dias alternados. Os limites foram calculados através da análise de regressão linear.

5.11.7. Comparação do ensaio próprio frente a um kit para EBV comercialmente disponível

O kit EBV Q-PCR *Alert AmpliMIX*[®] (*Nanogen Advanced Diagnostics*, Torino, Itália) foi adquirido com o intuito de comparar o desempenho do método desenvolvido neste trabalho. O ensaio comercial detecta o gene que codifica a EBNA-1 do EBV e utiliza amostras de sangue total. Por essa razão, foram avaliadas 54 amostras de sangue total da rotina da Seção de Biologia Molecular do LACEN-PR por coeficiente *kappa* e análise de *Bland-Altman*.

5.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise do LLOD por *probit* foi realizada no programa *IBM SPSS Statistics* 18.0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA). A linearidade foi calculada por regressão linear no *GraphPad Prism versão 5.03* para Windows (*GraphPad Software Inc*, San Diego, Califórnia, USA). Para comparação entre metodologias *in-house* e comercial, foram usados coeficiente *kappa* e *Bland-Altman*. Os ensaios de precisão foram analisados usando a análise Anova (fator único) em uma planilha do *Microsoft Office Excel 2007*. Os dados encontrados nos prontuários dos pacientes foram avaliados pelo programa *Epi Info 3.5.1* (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, Geórgia, USA). Os fatores de risco para reativação do EBV foram verificados pelos testes exato de *fischer* ou q-quadrado no software *GraphPad Prism versão 5.03*. Em todas as análises, um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1. GRADIENTE DE TEMPERATURA

O produto da PCR consistia de um fragmento de 74 pb. Usando a mesma amostra extraída, observaram-se bandas mais nítidas nas temperaturas de anelamento entre 59.1 e 62.9°C. O gradiente realizado pelo método de PCR convencional corroborou para o uso de uma temperatura de hibridização de 60°C na plataforma em tempo real.

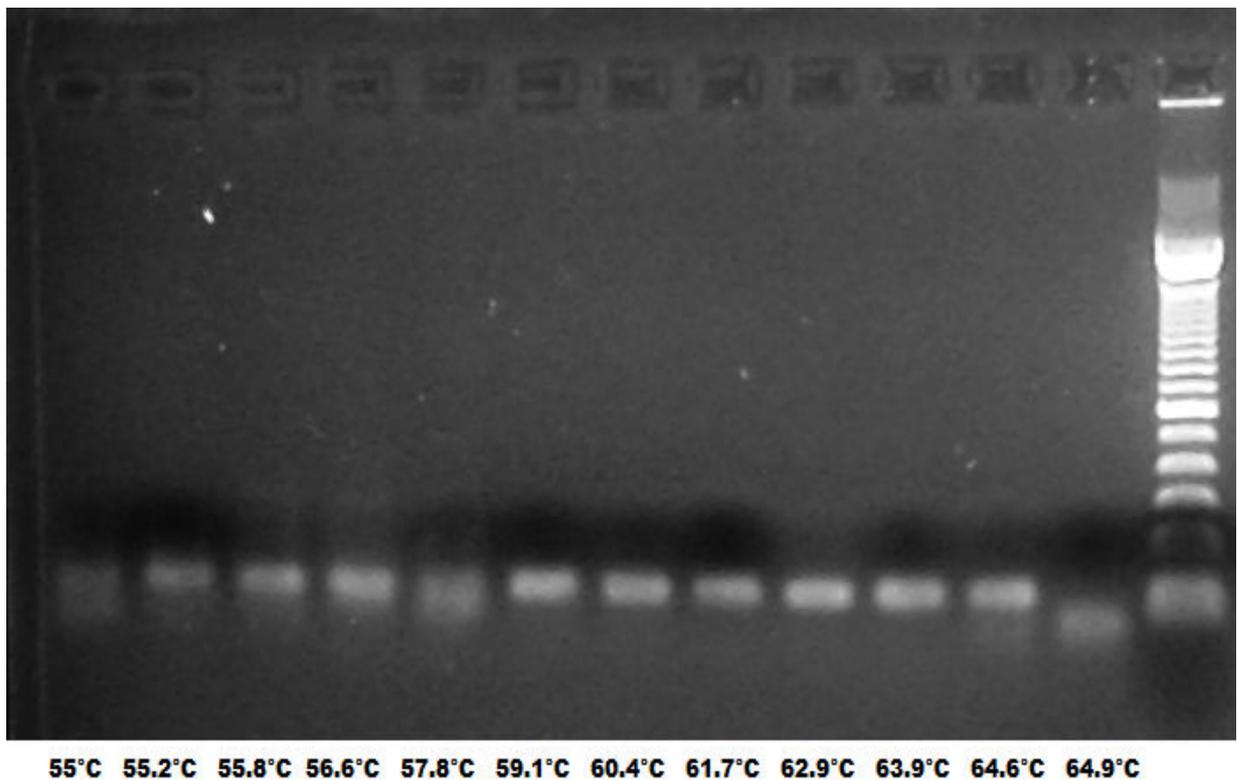


FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DA MELHOR TEMPERATURA DE ANELAMENTO PARA OS INICIADORES

FONTE: Fotodocumentação feita através de câmera digital (*Kodak Digital Science – Electrophoresis Documentation and Analysis System 120, Rochester, NY USA*).

6.2. MATRIZES DE TITULAÇÃO

Foram usadas três diferentes amostras para avaliar como as matrizes funcionariam em concentrações maiores e menores. A amostra 3 (menos concentrada) apresentou os maiores valores de Ct. As concentrações escolhidas foram as que apresentaram os menores Cts (300 nM para ambos os primers e de 200 nM para a sonda) conforme resultados descritos na tabela 14.

TABELA 14 - VALORES DE Ct NAS DIFERENTES MATRIZES DE CONCENTRAÇÃO

Amostra	Sonda 100 Nm			Sonda 200 nM				
	200/200	300/300	500/500	200/200	300/300	500/500	700/700	900/900
1	32,37	32,08	33,21	31,11	31,68	31,41	32,9	32,16
2	-	-	-	34,28	33,75	34	-	-
3	-	-	-	39,3	37,68	39,12	-	-

NOTA: Onde foi colocado um hífen (-), a reação não foi realizada naquelas concentrações.

6.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO

Na curva *OptiQuant*[®] para EBV, produzida a partir de diluições seriadas do ponto de maior concentração (10^6), o valor estimado do slope foi de 3,22, do R_2 de 0,997 e da eficiência de 1,04, conforme a fórmula “eficiência= $10^{(-1/slope)} - 1$ ”.

Quando foi confeccionada nova curva a partir de cultura de células infectadas pelo EBV, os valores encontrados para as quatro diluições realizadas foram, respectivamente $4,46 \times 10^5$, $4,46 \times 10^4$, $4,46 \times 10^3$ e $4,46 \times 10^2$ cópias/ml. Essas diluições devem ser incluídas em cada corrida de testes. O software do equipamento gera uma curva padrão relacionando fluorescência e número de ciclos em que o produto de interesse da PCR passou a ser detectado. A figura 14 representa a curva produzida analisada no programa 7500 SDS (*Applied Biosystems*).

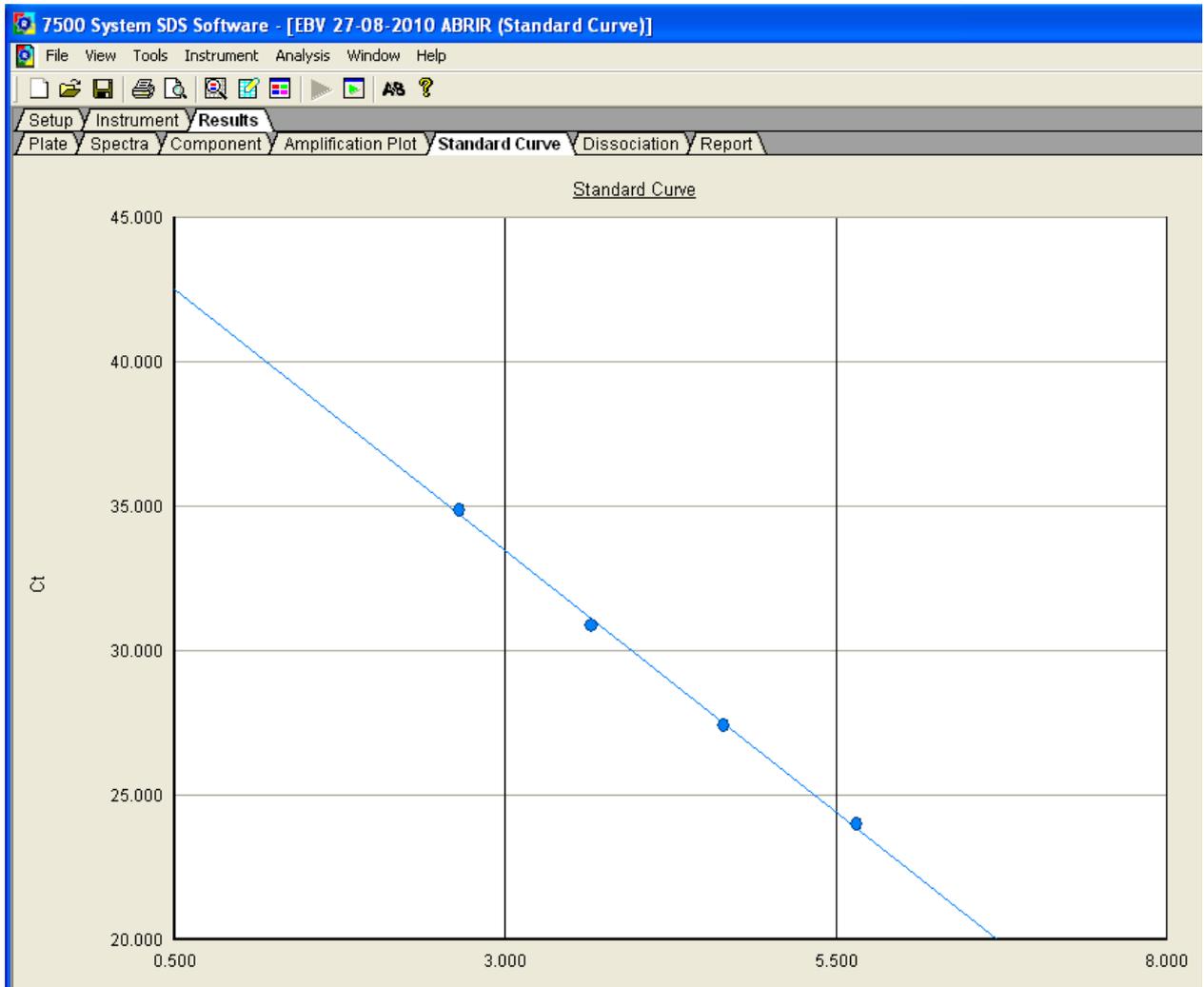


FIGURA 14 - CURVA EM AMPLIFICATION PLOT (Ct x CONCENTRAÇÃO EM LOG) A PARTIR DE CÉLULAS EBV POSITIVAS
 FONTE: SOFTWARE 7500 SYSTEM SDS

6.4. SENSIBILIDADE ANALÍTICA

A análise por *probit*, realizada no programa SPSS 18.0, apresentou um resultado de 88 cópias/ml, com valores entre 58 e 430 cópias/ml dentro do intervalo de confiança de 95%. Essa sensibilidade também é conhecida como limite mínimo de detecção (LLOD). O número de cópias que o ensaio é capaz de detectar por reação, fazendo as correções de volume, é de duas cópias por reação.

6.5. PRECISÃO

Os testes de reprodutibilidade, realizados em triplicatas em quatro dias diferentes, estão descritos na tabela 15 junto com os valores da média, desvio padrão e coeficientes de variação (%CV). Os valores absolutos foram convertidos em valores logaritmos para facilitar a análise. Não houve variação estatisticamente significativa (valor-P = 0,9987) nos quatro diferentes dias analisados para reprodutibilidade. Os valores ficaram dentro de dois desvios padrão e nenhum valor apresentou variação maior que 0,5 log.

TABELA 15 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE REPRODUTIBILIDADE

Amostras	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Média	Desvio p	%CV
1	5,97	5,87	5,94	5,93	5,927	0,0419	0,707
2	4,87	4,75	4,77	4,81	4,800	0,0529	1,102
3	3,28	3,21	3,27	3,41	3,292	0,0842	2,557
4	2,85	2,67	2,72	2,97	2,802	0,135	4,817

A repetibilidade, analisada em uma mesma corrida, apresentou os resultados detalhados na tabela 16, convertidos em valores logaritmos. Pela análise *Anova*, não ocorreu diferença estatisticamente significativa (valor-P>0,05) entre as seis replicatas nas quatro amostras diferentes.

TABELA 16 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE REPETIBILIDADE

Amostras	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Média	Desvio P	%CV
1b	5,71	5,35	5,71	5,72	5,73	5,62	5,640	0,147	2,615
2b	4,67	4,61	4,64	4,6	4,72	4,59	4,638	0,049	1,068
3b	3,7	3,57	3,65	3,56	3,6	3,67	3,625	0,056	1,567
4b	2,77	2,52	2,46	2,68	2,82	2,7	2,658	0,140	5,301

NOTA: Desvio P = desvio padrão; %CV = coeficiente de variação.

6.6. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Nenhuma amostra do grupo controle sadio apresentou-se detectável para EBV.

6.7. REAÇÕES CRUZADAS

A falta de reatividade cruzada também é um aspecto da especificidade. Todas as amostras selecionadas tiveram resultados indetectáveis para o EBV frente ao teste quantitativo (qPCR) padronizado nesse estudo, conforme resultados descritos na tabela 17.

TABELA 17 - CONTROLES POSITIVOS PARA OUTROS PATÓGENOS

QUANTIDADE DE AMOSTRAS	EXAME REAGENTE	RESULTADO PARA EBV qPCR
10	Antigenemia para CMV	Todas não detectáveis
15	PCR para CMV	Todas não detectáveis
02	PCR para HSV	Todas não detectáveis
04	Sorologia para HSV 1 e 2	Todas não detectáveis
05	PCR para HHV-6	Todas não detectáveis
02	PCR para VZV	Todas não detectáveis
04	Sorologia para VZV	Todas não detectáveis
05	Sorologia para toxoplasmose	Todas não detectáveis
10	PCR para hepatite B	Todas não detectáveis
10	PCR para hepatite A	Todas não detectáveis

6.8. ANÁLISE DE AMOSTRAS DETECTÁVEIS PARA EBV PELO MÉTODO DE PCR NESTED CONVENCIONAL

Todas as 40 amostras detectáveis testadas no PCR convencional também foram detectáveis no método em tempo real. O fragmento produzido na segunda PCR Nested apresenta tamanho de 496 pb (figura 15).

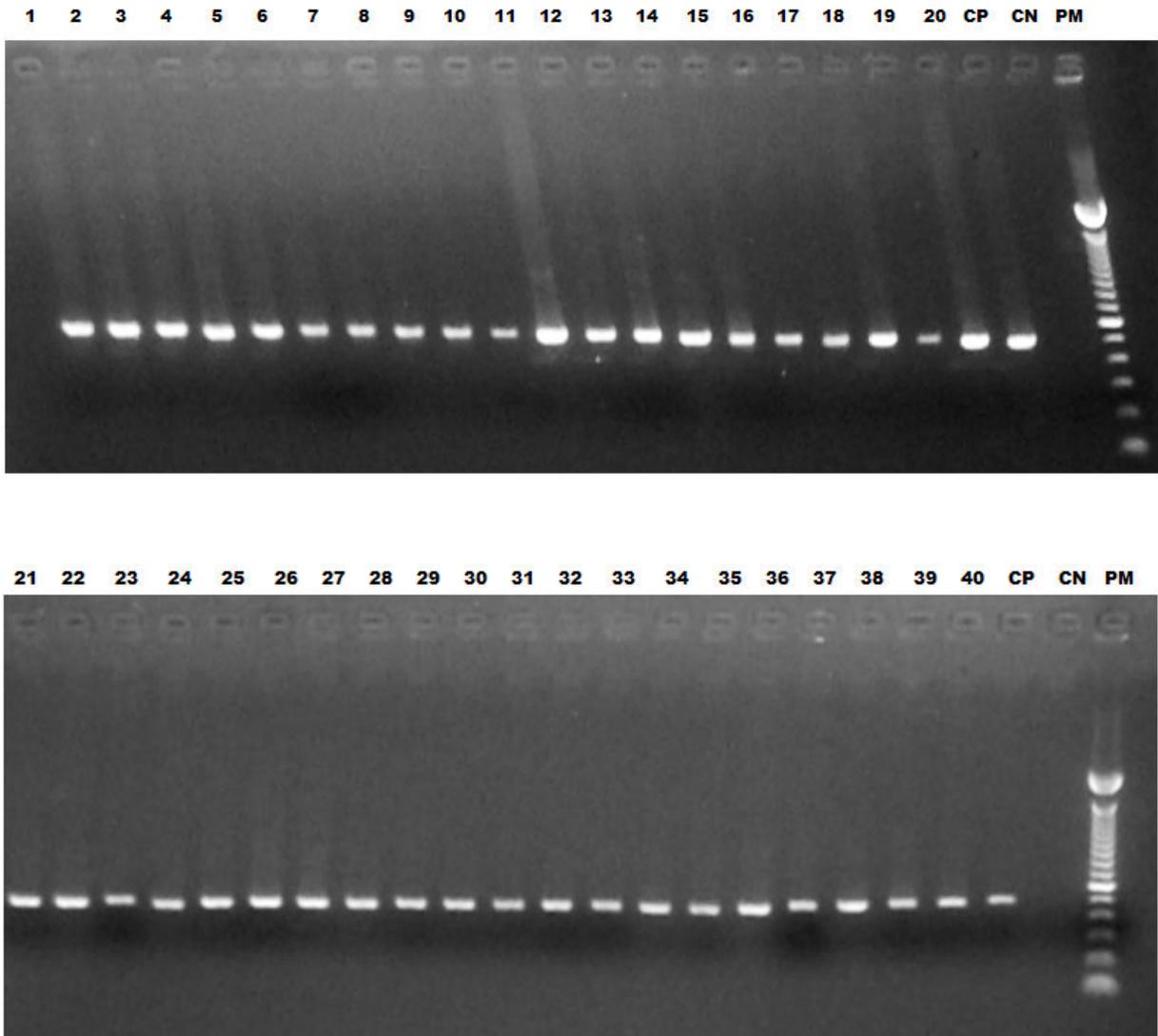


FIGURA 15 - DETECÇÃO DA SEGUNDA PCR NESTED NOS CONTROLES POSITIVOS PARA O EBV
 (1-40) Amostras EBV-positivas
 (CP) Controle positivo; (CN) Controle negativo; (PM) peso molecular

6.9. LINEARIDADE

A linearidade foi calculada por regressão linear (programa *GraphPad Prism*) de acordo com os resultados descritos na tabela 18, usando quatro diluições 1:10 (em duplicata), em cinco dias diferentes. O limite de detecção da técnica ficou entre os valores de 88 a 446.000 cópias/ml.

TABELA 18 - VALORES DE CT ENCONTRADOS PARA CÁLCULO DA LINEARIDADE

concentração (log)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	5,649335	23,95	24,02	24,25	24,49	24,65
4,649335	27,56	27,54	28,61	28,25	27,84	28,01
3,649335	31,34	31,2	32,14	31,77	31,47	31,65
2,649335	34,55	34,66	34,88	35,09	34,58	34,51

concentração (log)	Dia 4		Dia 5	
	5,649335	24,14	24,21	24,4
4,649335	27,8	27,74	28,34	28,19
3,649335	31,19	31,18	31,62	31,89
2,649335	35,19	35,39	34,63	35,03

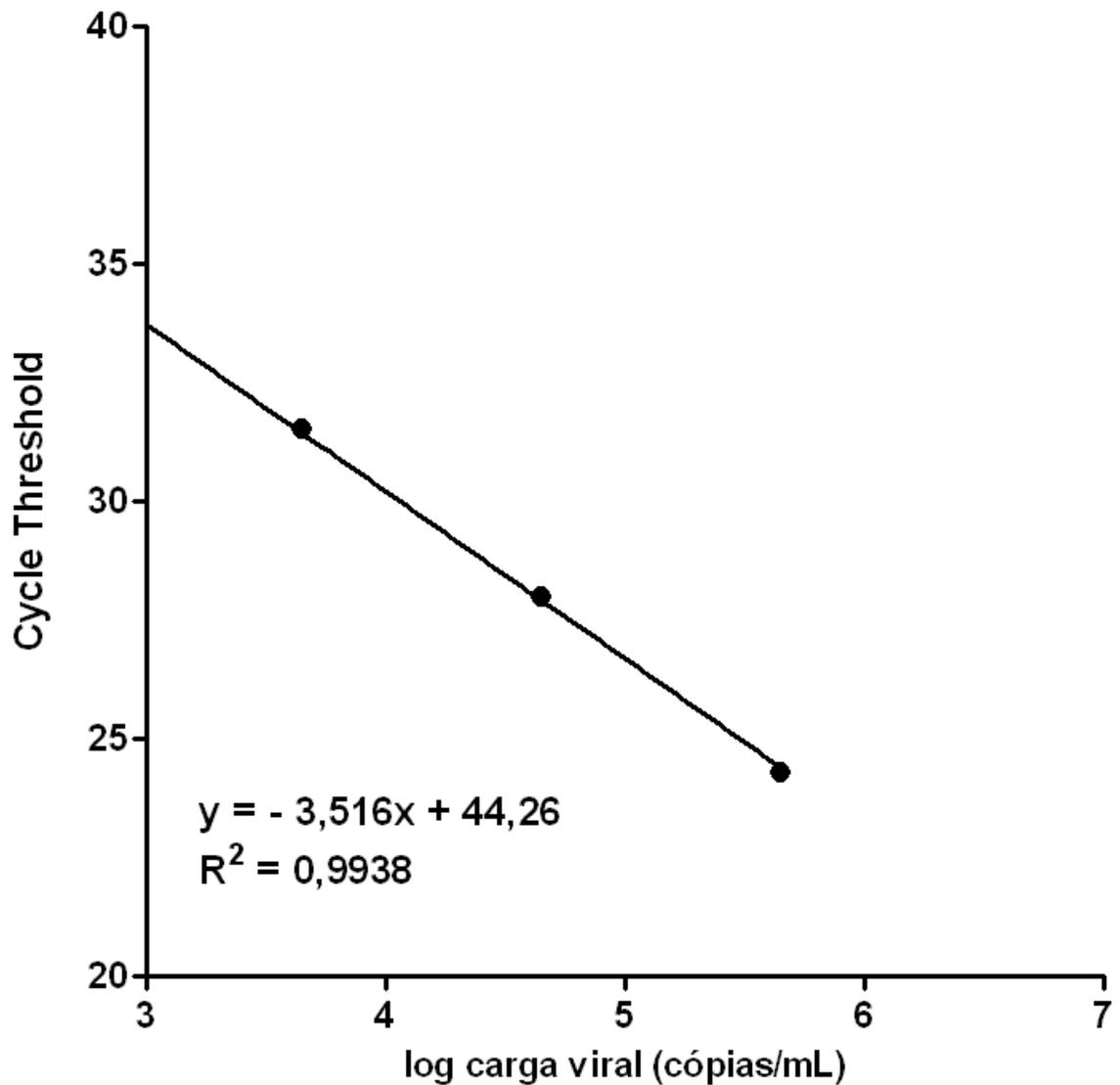


GRÁFICO 1 - LINEARIDADE CALCULADA POR REGRESSÃO LINEAR
FONTE: *GraphPad Prism*

6.10. COMPARAÇÃO DO ENSAIO PRÓPRIO FRENTE A UM KIT PARA EBV COMERCIALMENTE DISPONÍVEL

Foram analisadas 54 amostras de sangue total em paralelo nos métodos *in-house* e *Nanogen*. (33 indetectáveis e 21 detectáveis no kit comercial). No método sob avaliação, das indetectáveis, 32 foram negativas e 01 positiva. E das detectáveis, 21 foram positivas e 01 negativa.

Na análise quantitativa, foram encontrados os valores em log, descritos na tabela 19, para ambas as metodologias. Para se avaliar a correlação entre as cargas virais estimadas nas duas técnicas, o índice de concordância *Kappa* calculado foi de 0,91.

TABELA 19 - VALORES EM LOG ENCONTRADOS NAS TÉCNICAS *IN-HOUSE* E NANOGEN

Amostras	Log Nanogen	Log <i>in-house</i>
1	2,687172	3,52763
2	3,190444	3,33646
3	3,078747	3,305351
4	2,077004	2,623249
5	2,711638	2,746634
6	3,017701	3,332438
7	2,790144	2,938019
8	3,005009	3,193125
9	3,202543	3,860937
10	1,838849	2,371068
11	1,644439	2,474216
12	1,548267	1,812913
13	1,545307	1,929419
14	2,477121	2,832509
15	2,329601	2,255272
16	2,100371	2,103804
17	2,836197	2,577492
18	3,571383	3,697229
19	4,090984	4,294466
20	3,878177	4,545307

Na análise de *Bland-Altman* (gráfico 2), foi observado que os valores do método sob avaliação foram mais elevados que os encontrados pelo ensaio comercial. Porém, esta variação mostrou-se dentro de 0,5 log em 15 das 20 amostras avaliadas.

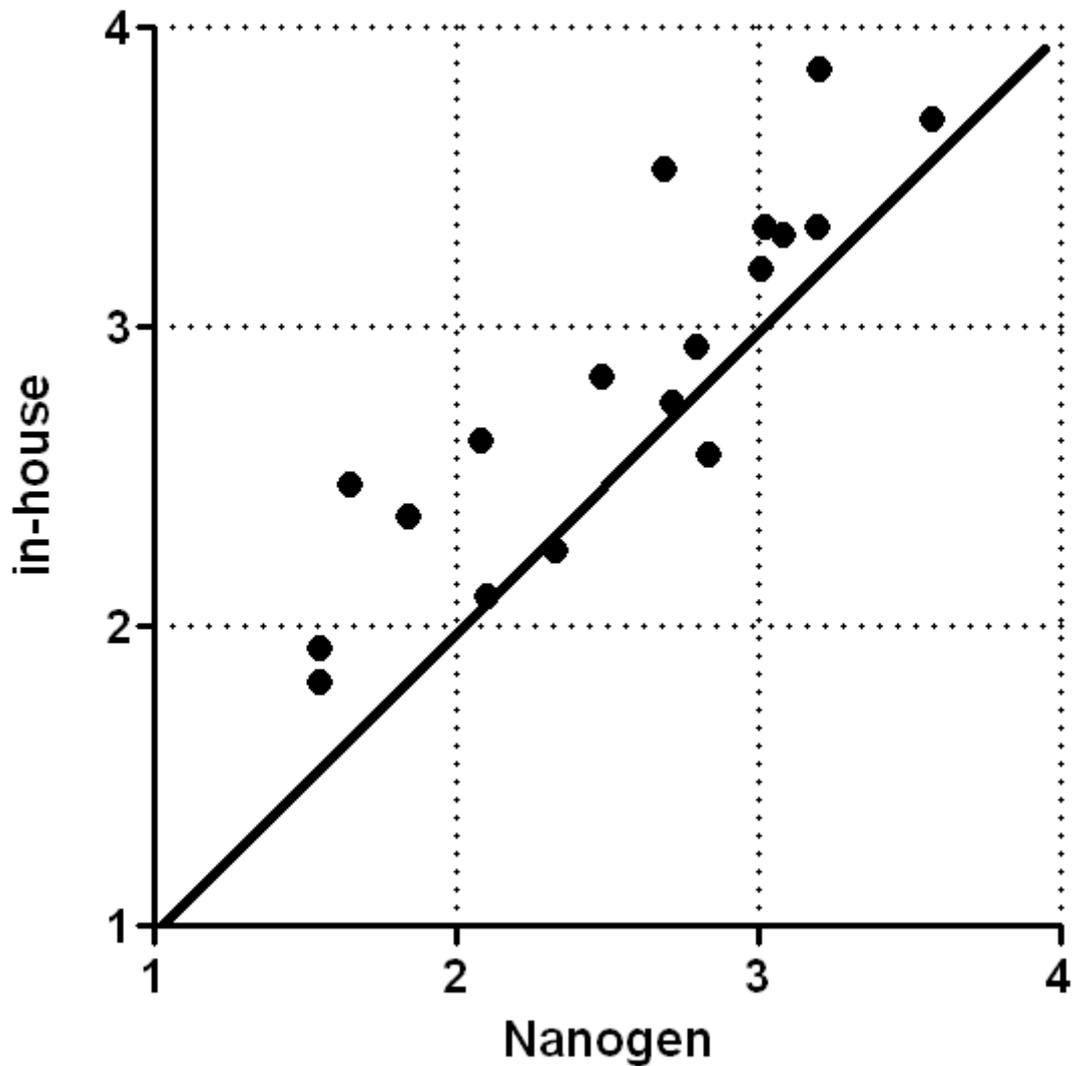


GRÁFICO 2 - ANÁLISE DE *BLAND-ALTMANN* PARA COMPARAÇÃO QUANTITATIVA ENTRE MÉTODO *IN-HOUSE* E COMERCIAL
 FONTE: GraphPad Prism

6.11. AMOSTRAS ANALISADAS POR qPCR

De acordo com os critérios de elegibilidade, foram incluídos no estudo 51 pacientes e o total de amostras foi de 601 (média aproximada de 11 coletas por paciente). Destas, 532 tiveram resultado indetectável e 69 foram detectáveis (em 15 pacientes diferentes). A figura 16 representa um fluxograma geral de tudo que foi analisado para validação do método de qPCR para EBV.

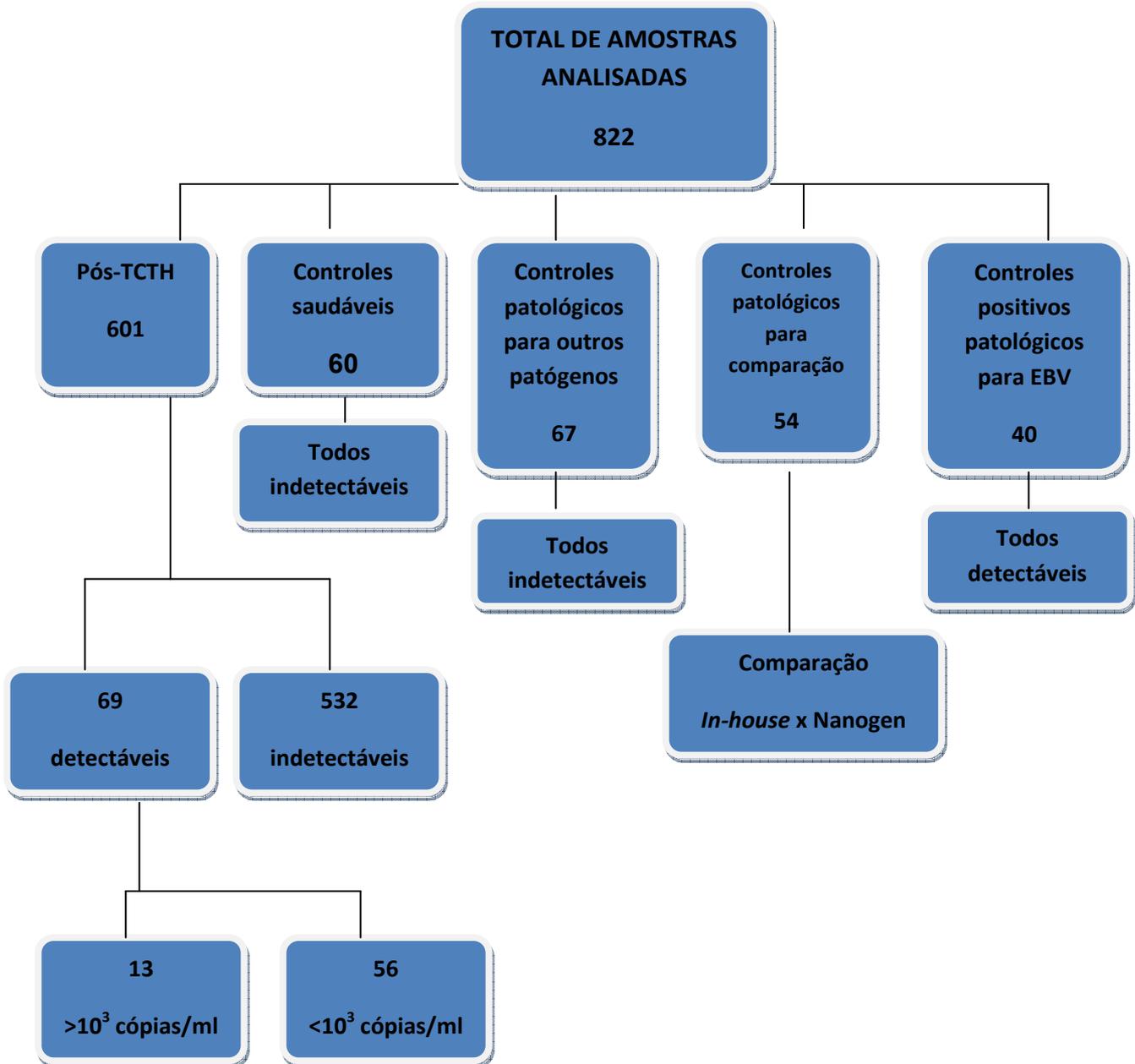


FIGURA 16 - FLUXOGRAMA DE AMOSTRAS ANALISADAS POR qPCR PARA EBV

6.12. ANÁLISE DOS DADOS DOS PACIENTES INSERIDOS NO ESTUDO

A população estudada apresentou um número de 32 indivíduos do sexo masculino e 19 do sexo feminino (gráfico 3). No item tipo de transplante, 51% dos pacientes realizam TCTH alogênico aparentado e 49% não aparentado. E foi prevalente o uso de medula óssea como fonte de células-tronco hematopoiéticas (tabela 20).

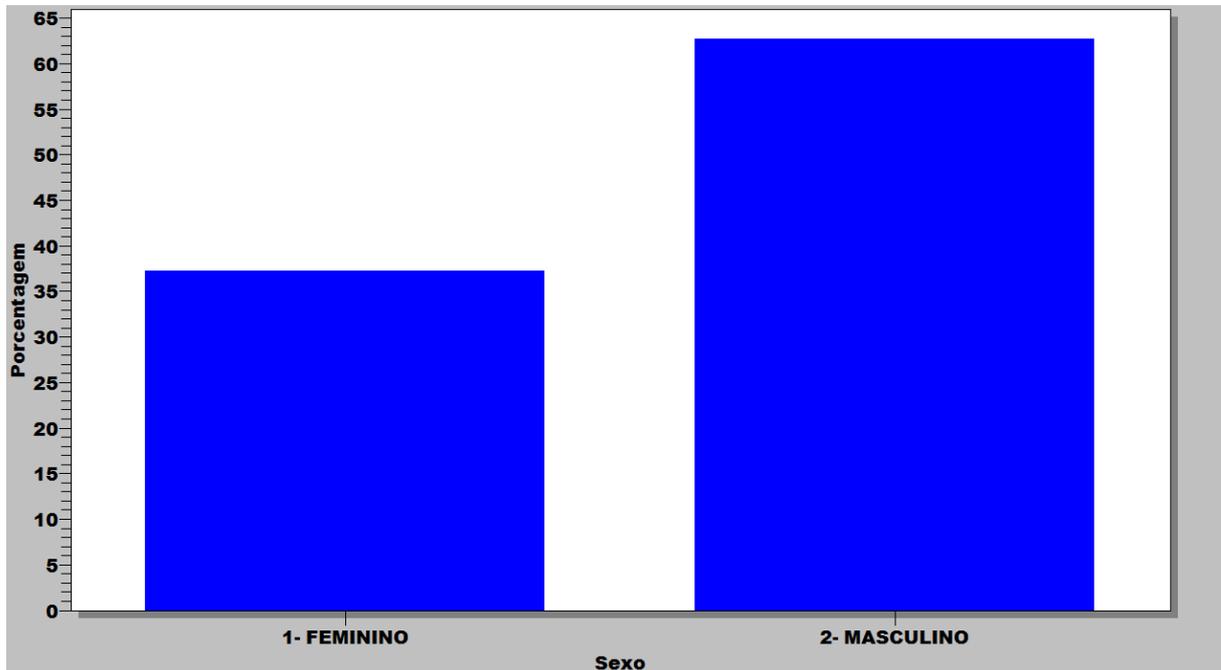


GRÁFICO 3 - PROPORÇÃO DE PACIENTES DO SEXO FEMININO E MASCULINO QUE REALIZARAM TRANSPLANTE ALOGÊNICO DURANTE O ESTUDO

FONTE: Epi Info 3.5.1

TABELA 20 - NÚMERO DE TRANSPLANTES ALOGÊNICOS APARENTADOS E NÃO APARENTADOS E DIFERENTES FONTES DE CÉLULAS PROGENITORAS NOS PACIENTES INSERIDOS NESSE ESTUDO

TIPO DE TRANSPLANTE	FONTE DE CÉLULAS PROGENITORAS			TOTAL
	MEDULA ÓSSEA	CORDÃO UMBILICAL	SANGUE PERIFÉRICO	
ALOGÊNICO APARENTADO	22	01	03	26
ALOGÊNICO NÃO APARENTADO	18	07	00	25
TOTAL	40	08	03	51

As doenças de base mais prevalentes foram anemia aplástica severa, anemia de Fanconi, leucemia mielóide aguda e crônica (tabela 21). Dos 51 pacientes, 12 foram a óbito por razões não identificadas no estudo. A média de idade dos

pacientes foi de 18 anos. E as sorologias de CMV e EBV pré-transplante estão descritas na tabela 22.

TABELA 21 - DOENÇAS DE BASE ENCONTRADAS NOS PACIENTES INSERIDOS NO ESTUDO

DOENÇA DE BASE	FREQUÊNCIA	PORCENTAGEM
Adrenoleucodistrofia	2	3,9%
Anemia aplástica severa	10	19,6%
Anemia de fanconi	9	17,6%
Anemia falciforme	1	2,0%
Imunodeficiência combinada grave	1	2,0%
Leucemia linfóide aguda	5	9,8%
Leucemia mielóide aguda	8	15,7%
Leucemia mielóide crônica	7	13,7%
Linfoma de manto	1	2,0%
Mucopolissacaridose	1	2,0%
Síndrome de chediak higashi	2	3,9%
Síndrome de wiskott aldrich	4	7,8%
Total	51	100,0%

TABELA 22 - SOROLOGIA PRÉ TRANSPLANTE PARA CMV E EBV NOS 51 PACIENTES

Resultado	Sorologia para CMV IgG	Sorologia para EBV IgG
Não reagente	13	09
Reagente	32	26
Inconclusivo	02	-
Não realizado	04	16

Com relação aos fatores de risco para reativação do EBV, a análise multivariada teve os resultados descritos na tabela 23.

TABELA 23 - FATORES DE RISCO PARA REATIVAÇÃO DO EBV AVALIADOS NOS 15 PACIENTES QUE APRESENTARAM CARGA VIRAL DETECTÁVEL

FATOR DE RISCO		Carga viral para EBV Detectável (n= 15 pacientes)	Carga viral para EBV Não Detectável (n= 36 pacientes)	P*
Sexo	Masculino	10	22	0,7
	Feminino	5	14	
DOENÇAS	ALD	01	01	0,5
	AAS	02	08	0,7
	AF	01	08	0,2
	LLA	03	02	0,1
	LMA	02	06	1,0
	LMC	02	05	1,0
	SCH	01	01	0,5
	SWA	03	01	0,07
	Outro	00	04	-
Reativação do CMV		07	09	0,2
TCTH aparentado		02	23	0,002
TCTH não aparentado		13	13	
Fonte de células progenitoras	MO	13	27	0,5
	SCUP	2	6	1,0
	CTP	0	3	-

NOTA: ALD: Adrenoleucodistrofia, ASS: Anemia aplástica severa, AF: Anemia de fanconi, LLA: leucemia linfóide aguda, LMA: leucemia mielóide aguda, LMC: leucemia mielóide crônica, SCH: Síndrome de Chediak Higashi, SWA: síndrome de Wiskott Aldrich, CMV: Citomegalovírus, TCTH: Transplante de células tronco-hematopoiéticas, MO: medula óssea, SCUP: sangue de cordão umbilical e placentário, CTP: células tronco periféricas.

*P: Calculado com o Teste exato de Fisher ou Q-quadrado, com um intervalo de confiança de 95%.

Nas amostras de biópsia, foram observados 14 resultados detectáveis para EBV em cinco pacientes diferentes e 26 não detectáveis em sete pacientes. Os cinco pacientes com biópsia detectável também apresentaram níveis de EBV no plasma, conforme tabela 24.

TABELA 24 - RESULTADOS PARA EBV EM AMOSTRAS DE BIÓPSIAS E PLASMA DE CINCO PACIENTES DIFERENTES

Pacientes	Resultado da biópsia	EBV detectável no plasma
1	Detectável	09 amostras
2	Detectável	03 amostras
3	Detectável	06 amostras
4	Detectável	05 amostras
5	Detectável	17 amostras

7. DISCUSSÃO

A infecção primária por EBV é frequentemente subclínica, porém, em alguns casos, manifesta-se como mononucleose infecciosa. Após infecção inicial, o vírus permanece latente em células B, normalmente sem representar riscos para os indivíduos imunocompetentes (KULLBERG-LINDH *et al.*, 2008).

No entanto, em pacientes com imunidade comprometida, tanto a primoinfecção como a reativação ou reinfecção podem gerar graves complicações. Após TCTH, a PTLT apresenta sintomas inespecíficos que se confundem com DECH ou sepsis. E a doença pode evoluir de forma tão rápida que o diagnóstico muitas vezes só é realizado *post mortem* por autópsia (KULLBERG-LINDH *et al.*, 2008).

A hibridização *in situ*, utilizando um ou ambos os EBERs, é o teste padrão ouro para diagnóstico de PTLT e associação ao EBV. Todavia, a análise da carga viral em receptores de transplante nas amostras de sangue total e frações representa um modelo apropriado e método não invasivo para acompanhamento de pacientes com risco para desenvolvimento de PTLT (GULLEY & TANG, 2008).

Num estudo com pacientes submetidos ao transplante de fígado, foi realizada uma comparação do curso clínico e apresentação histológica da PTLT em duas populações que realizaram o transplante antes e depois da implantação da técnica de PCR para EBV. Na população mais recente, o diagnóstico da PTLT foi feito em estágio precoce e ofereceu aos pacientes envolvidos um menor risco de morte. Isso foi possível devido à melhora nas opções de tratamento da PTLT e também ao uso do teste de quantificação do EBV na rotina pós-transplante (KERKAR *et al.*, 2010).

Os pacientes com PTLT associada ao EBV têm carga viral elevada tanto no sangue total como em frações livres de células (soro ou plasma). Valores de DNA do EBV, muitas vezes aumentam antes do aparecimento de uma lesão ou dos sintomas se tornarem evidentes, justificando o monitoramento de pacientes de alto risco. E esse alerta precoce permite intervenção preventiva para reverter a progressão da doença (GULLEY & TANG, 2008).

Pensando em melhorar o monitoramento de pacientes submetidos a transplantes, o estudo em questão escolheu como população alvo indivíduos que realizaram TCTH do tipo alogênico aparentado ou não. Até início de 2009, a equipe do TMO do HC-UFPR não contava com nenhum laboratório que realizasse rotineiramente o ensaio quantitativo para EBV por biologia molecular.

A população escolhida possui fatores de risco importantes para desenvolvimento da PTLD, tais como uso de ATG no condicionamento, incompatibilidades HLA, uso de células de cordão umbilical, presença de doadores EBV positivos e receptores com sorologia pré-transplante negativa para EBV, co-infecção por CMV, depleção de células T. O acompanhamento iniciou-se após pega do enxerto e persistiu por todo o período de internamento e tempo em que os pacientes permaneciam em Curitiba.

Para implantação da técnica, foi realizado um estudo de coorte prospectivo. Na revisão da literatura inicial, alguns trabalhos (GULLEY & TANG, 2008; WEINSTOCK *et al.*, 2006; VAN ESSER *et al.*, 2001b; WAGNER *et al.*, 2001; NIESTERS *et al.*, 2000) levaram à conclusão de que a melhor amostra para análise seria o plasma. A partir de julho de 2009, o material começou a ser coletado pela equipe do TMO e separado por profissionais da Seção de Virologia do laboratório do HC-UFPR. As amostras de sangue total colhidas com EDTA eram enviadas inicialmente para antigenemia de CMV e posteriormente centrifugadas e separadas para uso no estudo. Isso evitou a realização de coletas excessivas e desnecessárias em uma população fragilizada e exposta a tantos riscos.

Após revisão mais aprofundada, percebeu-se que não existia ainda um consenso em centros de transplantes sobre qual seria a melhor amostra para monitoramento da PTLD (STYCZYNSKI *et al.*, 2009a; KIMURA *et al.*, 2008; GULLEY & TANG, 2010; LJUNGMAN, 2010). Praticamente, todas as amostras desse estudo já haviam sido coletadas, impossibilitando a análise pareada de plasma e sangue total.

Não obstante, vale dizer que o plasma é amplamente aceito como amostra de escolha. Uma razão é que a PTLD pode, em indivíduos EBV soronegativos, começar como uma primoinfecção com replicação lítica e produção de vírions livres detectados no plasma (KULLBERG-LINDH *et al.*, 2008). Outro estudo também

afirma que, nessa neoplasia complexa, pode haver poucas células circulantes e liberação de vírions em algumas situações. Isso, sem dúvida, leva a diferentes concentrações do vírus em sangue total e frações (GULLEY & TANG, 2010). Nos primeiros meses pós-transplante, é preferível quantificar amostras livres de células devido à leucopenia e variações nas contagens de linfócitos (KULLBERG-LINDH *et al.*, 2008; LJUNGMAN, 2010). Ademais, em pacientes que receberam tratamento com anti-CD20, a amostra de escolha é o plasma, pois a destruição de células B pode afetar a carga viral em sangue total e PBMC (STYCZYNSKI *et al.*, 2009a; WEINSTOCK *et al.*, 2006).

Além disso, níveis de EBV em sangue total são frequentemente detectados em pacientes imunossuprimidos sem doença por EBV e também podem ser encontrados em controles saudáveis. O que leva a crer que o valor prognóstico para prevenir PTLD em sangue total deva ser maior que em frações livres de células (KULLBERG-LINDH *et al.*, 2008).

Receia-se que prolongado armazenamento de sangue total pode resultar na liberação do EBV do compartimento intracelular para o plasma, potencialmente causando resultados falso-positivos ou superestimados (GULLEY & TANG, 2008). Pensando em minimizar esse problema, as amostras foram separadas em até 6 horas após a coleta.

Devido à variedade de metodologias empregadas em cada instituição, é difícil recomendar um valor universal de carga viral preditivo para PTLD. O ideal seria realizar um estudo multicêntrico para padronização de uma técnica de qPCR e estabelecer um valor preditivo único (COHEN *et al.*, 2009; COHEN, 2000).

Somente a mudança de unidade de medida pode alterar significativamente o valor de corte no ensaio de qPCR para EBV. Por exemplo, um experimento que use como *cut-off* 1.000 cópias/ml se utilizasse a unidade cópias/ μ g de DNA, teria seu valor de corte igual a 150 cópias/ μ g. Essa conversão foi proposta por Rowe e colaboradores e é referenciada em revisões recentes (STYCZYNSKI *et al.*, 2009a; LJUNGMAN, 2010).

O Serviço de TMO costuma usar como *threshold* preditivo o valor de 1.000 cópias/ml para intervenção com rituximab, com base em muitos trabalhos publicados (FAFI-KREMER *et al.*, 2008; MEIJER CORNELISSEN, 2008; WEINSTOCK *et al.*,

2006; VAN ESSER *et al.*, 2001a; NIESTERS *et al.*, 2000; COPPOLETTA *et al.*, 2010). Esse é o valor de corte mais aceito, embora Zaia não recomende nenhum *cut-off* universal para início de tratamento (ZAIA *et al.*, 2009). No presente estudo, também, não foi possível calcular nenhum *cut-off* para a população estudada, pois não há casos confirmados de PTLD. Existem, pelo menos, duas explicações para a ausência dessa doença no Serviço de TMO: tratamento preventivo antes da instalação da PTLD ou não notificação dos casos. Os pacientes recebem uma dose de rituximab nos primeiros 30 dias após TCTH como tratamento profilático.

É importante lembrar, ainda, no que se refere a valor de *cut-off*, que cada paciente pode ter o seu ponto de ajuste individual. Ou seja, o nível de carga viral que leva à infecção sintomática pode variar de uma pessoa pra outra (ESPY *et al.*, 2006).

O ensaio quantitativo para EBV sozinho é válido para prever infecção ativa. Contudo, alguns laboratórios já vêm utilizando outros testes para melhorar o valor preditivo da PTLD: contagem absoluta de linfócitos CD8 ou CD4, quantificação de células T EBV específicas, quantificação de citocinas e padrão de expressão de vários genes virais por PCR em tempo real (GULLEY & TANG, 2008). No presente trabalho, nenhum método, além da quantificação da carga viral, foi utilizado.

Hopwood e colaboradores observaram que pacientes transplantados podem apresentar CV aumentada, semelhante aos valores mostrados em pacientes com PTLD. Isso confirma que uma única análise de carga viral não é indicativa de doença (HOPWOOD & CRAWFORD, 2000). Em TOS, alguns pacientes obtiveram resultados elevados e permaneceram estáveis sem desenvolver PTLD (KIMURA *et al.*, 2008). Portanto, a cinética da carga viral, ao invés de uma única quantificação, tem melhor correlação com a doença (PREIKSAITIS *et al.*, 2009; FUNK *et al.*, 2007). E variações entre duas coletas menores que 0,5 log não devem ser consideradas significativas (PREIKSAITIS *et al.*, 2009).

Ademais, é necessário entender a incerteza associada aos valores de CV em cada instituição. Um método pode ser bem aceito em um centro de transplante. Mas, para comparação interinstitucional direta dos dados, é preciso ter cautela (PREIKSAITIS *et al.*, 2009).

Embora a CV seja um instrumento útil de orientação para intervenção clínica, a decisão final de quando intervir deve ser sempre de responsabilidade médica (GULLEY & TANG, 2010).

Num laboratório de biologia molecular, a extração dos ácidos nucleicos é fundamental para a qualidade e confiabilidade de qualquer ensaio. A extração manual é mais trabalhosa e exige total atenção do profissional. Passa por várias etapas de manuseio e centrifugação. Já a extração automatizada promove a uniformização das etapas do processo, minimizando variações de rendimento ou de pureza decorrentes do processo manual. É reproduzível e mantém a manipulação da amostra em níveis mínimos, reduzindo o risco de contaminação cruzada. E não exige atenção constante, o que permite ao profissional executar outras tarefas.

A técnica de escolha para extração do DNA do EBV foi a realizada no equipamento *EasyMag*[®] (*BioMerieux*). Nele ocorre a adsorção seletiva dos ácidos nucleicos às partículas de sílica magnética, as quais servem como fase sólida e tem como característica elevada concentração de sal.

O equipamento *EasyMag*[®] permite a extração simultânea de 24 amostras. Essa técnica limita os passos manuais, reduzindo erros. Além disso, elimina as muitas etapas de centrifugação que podem ser uma fonte de contaminação cruzada (PILLET *et al.*, 2009). No momento em que foram extraídas as amostras, apenas esse aparelho estava disponível na Seção de Biologia Molecular do LACEN-PR, não sendo possível realizar comparações entre diferentes plataformas de extração automatizada.

Num estudo comparativo entre os métodos *EasyMag*[®] e *QIAamp* (*QIAGEN*), os resultados mostraram que a melhor extração em sangue total foi a automatizada (PILLET *et al.*, 2009). Perandin e colaboradores também concluíram que a extração no aparelho *EasyMag*[®] oferece um bom rendimento, eliminação de inibidores e redução de cerca de dois Cts comparados com a extração pelo método da *QIAGEN* (PERANDIN *et al.*, 2009).

Alguns estudos alegam que o material extraído deve ser processado em, no máximo, duas semanas e não deve passar por mais de quatro ciclos de congelamento e descongelamento (MALCOMSON *et al.*, 1995; LAHIRI SCHNABEL,

1993). Por isso, para evitar degradação do DNA, as amostras extraídas eram amplificadas no mesmo dia ou no dia seguinte.

Antes de realizar o desenho dos *primers* (*forward* e *reverse*) e sonda, foi preciso escolher qual seria o gene alvo do EBV. O genoma de cada organismo apresenta regiões codificadas, altamente conservadas. A seleção de uma região característica e conservada do EBV confere à metodologia uma alta especificidade. O gene EBNA-2 já vinha sendo usado na técnica de PCR *Nested* convencional desenvolvida pelo LACEN-PR. Por isso, para o ensaio de tempo real, optou-se pelo mesmo gene. Ele é um regulador da expressão de genes virais e celulares e é fundamental para imortalização dos linfócitos B. A cepa B95-8 foi totalmente sequenciada em 1984, é amplamente conhecida, cresce bem em cultivo celular e transforma os linfócitos B humanos de maneira eficiente. Por isso, nos acessos ao *GenBank*, foi escolhida como referência. Estudos demonstram que regiões BamHI W e EBNA-1 são também boas escolhas, embora o primeiro apresente entre sete e onze repetições por genoma. Tornando o ensaio mais sensível, porém, superestimado (RYAN *et al.*, 2004; LAY *et al.*).

Para desenho de iniciadores com baixo potencial de formação de estruturas secundárias, contou-se com a ajuda do programa *Primer Express*[®]. Ao serem produzidos, os iniciadores devem passar por algum método de purificação cromatográfica e contar com um certificado de análise do fornecedor contendo dados da sequência, peso molecular, concentração e método de purificação. Os *primers* adquiridos para o estudo respeitaram tais critérios de fabricação. O tamanho do produto da qPCR que apresenta resultados mais consistentes deve estar no intervalo de 50-150 pb. O tamanho do fragmento do presente ensaio foi 74 pb.

Com relação aos reagentes, optou-se por trabalhar com *master mix* comercial (tampão *TaqMan*[®] Universal Master Mix - *Applied Biosystems*, Foster, CA, USA), pois apresenta concentrações padronizadas de reagentes, diminui o número de pipetagens e erros relacionados ao preparo da reação. A máster mix escolhida conta com sistema de controle de contaminação da enzima (uracil N glicosilase). O primeiro passo da PCR em tempo real é de 50°C por dois minutos, justamente para atividade da uracil N glicosilase (UNG), que quebrará amplicons contendo uracila carregados de reações anteriores. Vale lembrar que a UNG não é completamente

inativada durante incubação a 95°C. Portanto, é essencial manter todo o processo a temperaturas superiores a 55°C (TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol, 2010).

Para calcular a quantidade de DNA do EBV presente nas amostras, optou-se pela quantificação absoluta a partir de uma curva padrão. A confecção dessa curva pode ser realizada através do uso de vetores específicos tipo plasmídeo, diluição de amostra com carga viral elevada ou uso de culturas positivas para EBV. Independente do método escolhido para produção da curva, é necessário certificar-se de que os valores desta serão quantificados de forma precisa e confiável. A utilização de plasmídeo em laboratório de diagnóstico apresenta algumas desvantagens: contaminação do ambiente, degradação mais acentuada e não utilização da matriz biológica que, nesse estudo, corresponde ao plasma.

As amostras biológicas são complexas e podem conter substâncias inibidoras que não estão presentes em padrões e plasmídeos e isso pode reduzir a eficiência da PCR. Exemplos de inibidores da PCR comuns são heme, heparina, IgG e lipídios (AL-SOUD *et al.*, 2000; AKANE *et al.*, 1994; IZRAELI *et al.*, 1991).

Uso de uma amostra altamente positiva ou cultura de EBV diluídas em plasma humano normal reflete melhor o que acontece com as amostras dos pacientes. No entanto, amostras clínicas com carga viral elevada são de difícil obtenção. Por essa razão, optou-se pelo uso de culturas de EBV. Os valores das diluições realizadas foram quantificados através de um painel Internacional com concentrações previamente conhecidas.

Painéis comerciais de várias marcas para quantificação do DNA genômico do EBV estão disponíveis como, por exemplo, *Advanced Biotechnologies* (Columbia, MD), *OptiQuant*® (Accrometrix, Benicia, CA, USA), *Bromma*® [Affigene, Suécia], NAMALWA (Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). No presente estudo, optou-se pelo painel *OptiQuant*® devido a experiências anteriores na padronização de outros ensaios. No futuro, espera-se que um padrão de referência aprovado pelo FDA facilite a padronização de procedimentos em laboratórios (FRYER MINOR, 2009; STYCZYNSKI *et al.*, 2009b).

Uma curva de calibração deve conter, no mínimo, três pontos de diferentes concentrações e, para cada ponto, a qPCR deve ser realizada em duplicata. Com base nos valores conhecidos da curva, o software dos equipamentos de tempo real calcula os valores para cada amostra.

Antes da implementação de qualquer ensaio de biologia molecular, é necessário realizar testes de validação analítica para demonstrar sensibilidade, especificidade, precisão e linearidade. Também é importante assegurar a validade clínica, que se refere à confiabilidade para o diagnóstico e monitoramento de doenças na população em que o teste será utilizado (GULLEY & TANG, 2010).

Para otimização da técnica de qPCR para EBV, foi inicialmente realizado o gradiente de temperatura para verificar se os iniciadores estariam anelando na temperatura de 60°C. Posteriormente, foram realizadas matrizes de titulação de primers e sonda. A finalidade dessa titulação é encontrar as concentrações que gerem menor Ct (maior sensibilidade) e maior ΔRn (maior emissão de fluorescência), ou seja, que apresentem a melhor eficiência. Para o experimento foram usadas três amostras em diferentes concentrações. Interessante notar que a amostra de menor concentração teve variação de Ct de até 1,62 nas diferentes matrizes de concentração.

A sensibilidade analítica ou limite mínimo de detecção (LLOD) é definida como o número mínimo de cópias que pode ser medida em um ensaio. Dentro de um grupo de uma amostra em oito concentrações diferentes, cada concentração testada em 12 replicatas, o limite mínimo de detecção (LLOD) foi de 88 cópias/ml. O ensaio teve também resultados satisfatórios de precisão, não ocorrendo variações maiores que 0,5 log entre as replicatas (PREIKSAITIS *et al.*, 2009). E, nos testes de reações cruzadas frente a outros patógenos, todas as amostras tiveram resultados indetectáveis. Vale ressaltar que, na análise de 40 amostras detectáveis para EBV pelo método de PCR *Nested* convencional, todas se mostraram detectáveis no ensaio de qPCR para EBV.

Na ausência de um método padrão para quantificação da carga viral (*gold standard*), um kit aprovado pela Anvisa chamado EBV Q-PCR *Alert AmpliMIX*[®] (*Nanogen Advanced Diagnostics*) foi adquirido com o intuito de comparar o desempenho do método “*in-house*”. Esse kit detecta o gene que codifica a EBNA-1

do EBV e utiliza amostras de sangue total. Por isso, 54 amostras de sangue total da rotina da Seção de Biologia Molecular do LACEN-PR foram usadas para o estudo comparativo. E o desempenho do ensaio *in-house* mostrou-se satisfatório, apresentando índice Kappa de 0,91.

Os ensaios de PCR convencionais, além de não serem confiáveis quantitativamente, precisam passar por padronização mais meticulosa. Também possuem tempo maior de execução e não são automatizados. Os géis de Agarose apresentam precisão ruim, baixa sensibilidade e baixa resolução. E as chances de contaminação do ambiente são maiores.

Ao contrário do método convencional, a PCR em tempo real é capaz de monitorar a reação a cada ciclo, ou seja, em tempo real. Quanto maior o número de cópias iniciais do ácido nucléico alvo, mais rápido será observado o aumento significativo na fluorescência (TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol, 2010).

Quando comparado à PCR convencional, a PCR em tempo real exige muito menos tempo, é mais simples de se executar e permite a liberação mais rápida dos resultados. Outra vantagem do método em tempo real é a não necessidade de manipulação do produto de PCR. Por causa dessa característica, o sistema é dito fechado ou homogêneo. Isso reduz o risco de contaminação do meio e de outras análises (ESPY *et al.*, 2006).

Na tecnologia em tempo real, a detecção ocorre de forma automatizada com fluoróforos específicos ligados a oligonucleotídeos alvo-específicos. Um software monitora a amplificação a cada ciclo, eliminando a etapa de detecção pós-PCR do produto total amplificado (baixo risco de contaminação). Ademais, a quantificação é confiável e qualidade muito superior a método de PCRs convencionais e as ciclagens podem ir de 30 min a 2 horas, com a grande vantagem de não ser tão mais caro do que o PCR convencional, (excetuando-se o custo do equipamento).

A combinação de uma excelente sensibilidade e especificidade, baixo risco de contaminação, facilidade de desempenho e velocidade de reação, fez do qPCR uma ótima alternativa para diagnóstico de doenças relacionadas ao EBV (ESPY *et al.*, 2006).

Muitas plataformas de instrumentos estão, hoje, disponíveis para PCR quantitativa em tempo real. As principais diferenças entre eles são os comprimentos de onda de excitação e de emissão, a velocidade e o número de reações que podem ser executados em paralelo (KUBISTA *et al.*, 2004). Recipientes de reação também são diferentes, sendo as placas com 96 orifícios as mais populares.

O instrumento utilizado no experimento, *ABI Prism* série 7500, possui capacidade de reação simultânea de 96 poços, podendo ser utilizado com placas ou tubos. Tem flexibilidade para uso de químicas de outras marcas. Apresenta um termobloco com 96 orifícios, sistema óptico (composto de lâmpada halógena, lentes e filtros de emissão) e sistema de leitura *multiplex* eletrônico (câmera CCD) capaz de traduzir a intensidade de fluorescência gerada durante cada ciclo. Um software monitora a amplificação por PCR a cada ciclo, eliminando processos pós-PCR, como a utilização de detecção por eletroforese.

Uma amostra é interpretada como positiva para EBV quando a curva de amplificação exponencial cruza o “*threshold*” num ciclo inferior a 40 ($Ct < 40$). Valores de Ct acima de 40 são suspeitos por causa da baixa eficiência de reação nessa etapa e normalmente não devem ser informados. Também é preciso levar em conta outros critérios: curva de calibração dentro dos Ct s esperados; controle negativo indetectável (NTC – *no template control*); perfis de sinais emitidos pelos fluoróforos e referência passiva (ROX) de acordo com parâmetros dos multicomponentes.

É essencial argumentar que o sistema *TaqMan*[®] foi escolhido para o ensaio por várias razões: alta sensibilidade e especificidade, metodologia mais usada para EBV, experiência local para padronização da técnica.

Uma das grandes vantagens do desenvolvimento de um método próprio é o preço. O ensaio quantitativo em duplicata apresentou um custo total de R\$ 16,18; incluindo primers, sonda, *master mix*, placa e adesivo ópticos. Preço bem menor quando comparado a dois métodos comerciais *Alert AmpliMIX*[®] (*Nanogen Advanced Diagnostics*, Torino, Itália) e *Artus*[®] (*QIAGEN*, Hilden, Alemanha) com valores unitários respectivos de R\$ 96,00 e R\$108,95 (tabela).

TABELA 25 - VALORES UNITÁRIOS DOS MÉTODOS PRÓPRIO, ALERT qPCR E ARTUS

<i>In-house</i>		<i>Alert qPCR (Nanogen)</i>	<i>Artus (QIAGEN)</i>
Reagentes ou insumos	Valor (R\$)	R\$ 96,00	R\$ 108,95
Iniciadores	0,20		
Sonda	0,85		
<i>Master mix</i>	5,94		
Placa	0,45		
Adesivo	0,65		
Preço total	R\$ 8,09	R\$ 96,00	R\$ 108,95

Na análise de dados dos pacientes submetidos ao TCTH, foram levados em consideração a doença de base (gráfico 4), tipo de transplante, fonte de células tronco, idade, sexo, sorologia pré-tranplante para CMV, EBV e toxoplasmose. As doenças mais encontradas foram anemia de fanconi e anemia aplástica severa, seguida da leucemia mielóide aguda.

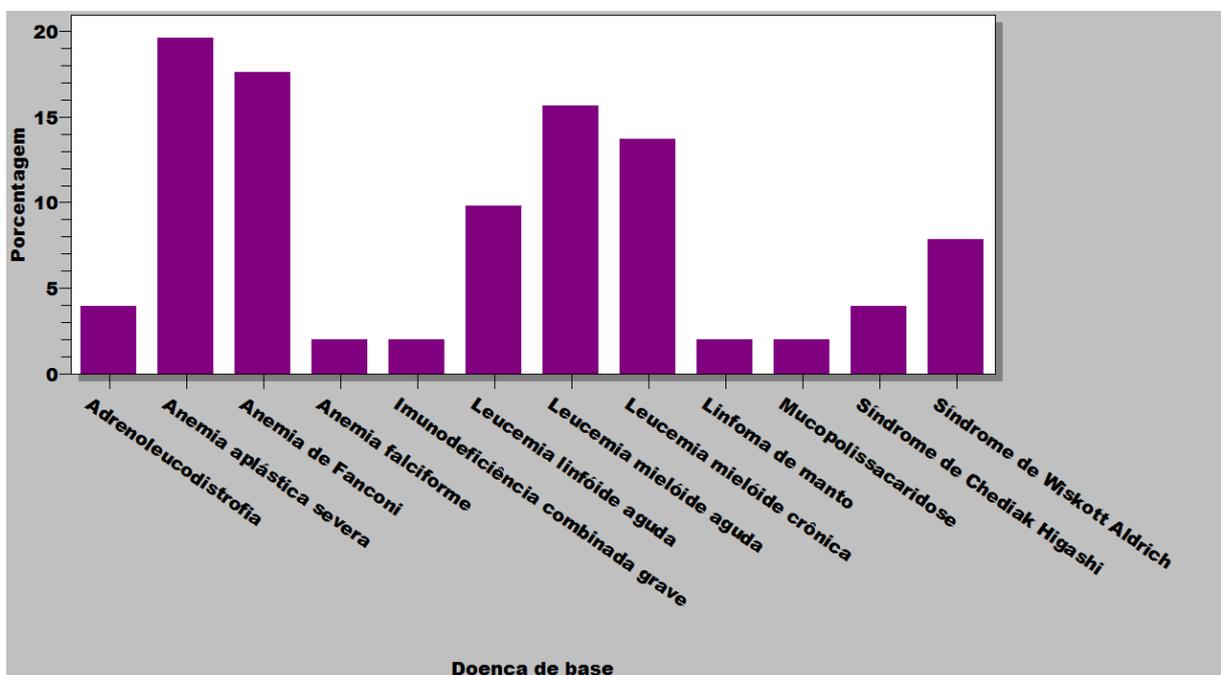


GRÁFICO 4 - PROPORÇÃO DE DOENÇAS DE BASE NOS PACIENTES DO TMO INSERIDOS NO ESTUDO

FONTE: Epi Info

O percentual de resultados detectáveis para EBV foi de 11,5% e não detectáveis de 88,5% (gráfico 5). As 13 amostras com carga viral acima de 1.000 cópias/ml pertenciam a cinco pacientes diferentes. Interessante notar que todos eles foram submetidos ao TCTH não aparentado, quatro eram menores de 17 anos e possuíam sorologia pré-transplante negativa para EBV. Confirmando que altas cargas virais são encontradas com mais frequência em pacientes jovens, submetidos ao transplante alogênico não aparentado e com infecção primária para EBV pós-transplante.

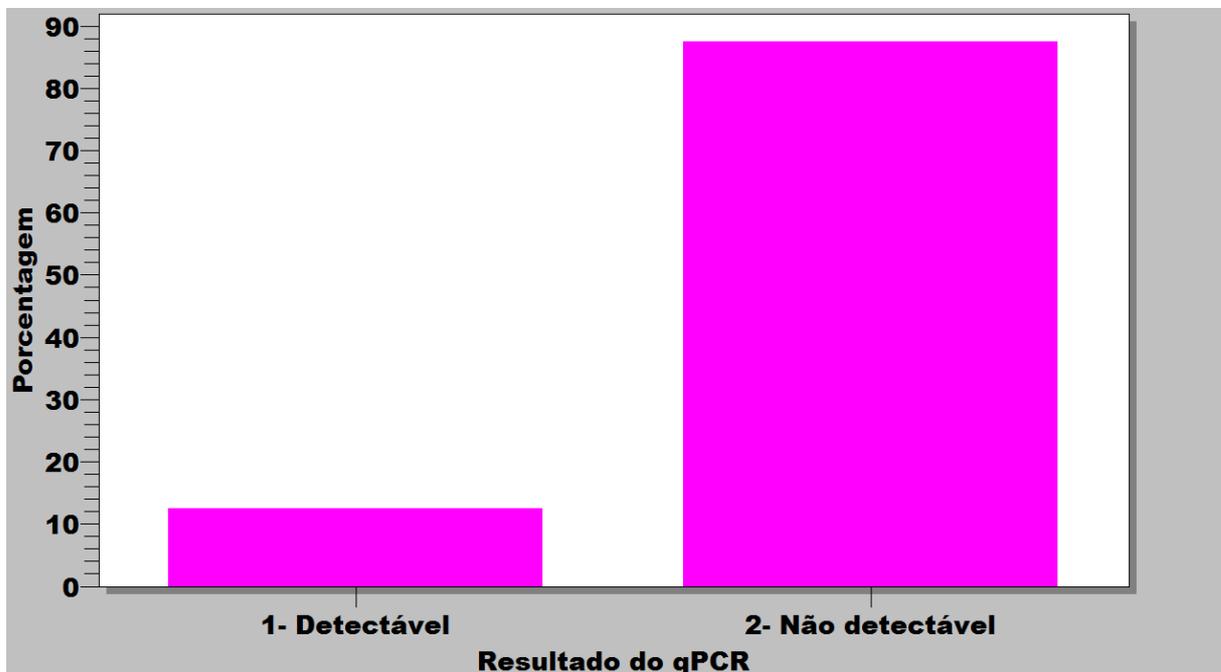


GRÁFICO 5 - PERCENTUAL DE RESULTADOS DETECTÁVEIS E NÃO DETECTÁVEIS NAS 601 AMOSTRAS ANALISADAS PELO MÉTODO *IN-HOUSE* PARA EBV

FONTE: Epi Info 3.5.1

Já os 56 resultados abaixo de 1.000 cópias/ml representam 10 pacientes, o que evidencia que reativações pós-transplante podem ocorrer, muitas vezes sem qualquer dano ao paciente.

Embora alguns pacientes apresentassem análise de biópsia detectável para EBV, nenhum caso foi confirmado histologicamente para PTLN. E, com relação aos fatores de risco para reativação do EBV, apenas o tipo de transplante foi estatisticamente significativo na análise multivariada.

8. CONCLUSÃO

- O método padronizado de PCR em tempo real para quantificar o EBV apresentou:
 - Limite mínimo de detecção de 88 cópias/ml;
 - Especificidade analítica de 100%;
 - Excelente precisão, não havendo resultados com variação estatisticamente significativa;
 - Linearidade dentro dos valores esperados.
- Todas as amostras detectáveis no PCR *Nested* convencional para EBV também obtiveram resultado detectável no método desenvolvido em tempo real;
- O ensaio *in-house* e comercial apresentaram índice de concordância Kappa de 0,91;
- Com relação ao desempenho do método frente a amostras clínicas, o ensaio mostrou ser uma ferramenta útil para acompanhamento de pacientes submetidos ao TCTH alogênico.

9. PERSPECTIVAS

- A padronização de um controle interno para acompanhamento das etapas de extração e amplificação, aumentando ainda mais a qualidade do ensaio;
- Realização de estudo com amostras pareadas de sangue total e plasma para melhor definir o tipo de material biológico para população estudada;
- Validação da técnica em outras populações, como pacientes submetidos ao transplante de órgãos sólidos;
- Há um grande interesse por parte de vários centros de transplante para que um painel único de referência internacional seja produzido para calibração de todos os ensaios *in-house* quantitativos para EBV. Isso melhoraria a padronização dos ensaios e facilitaria a comparação interlaboratorial das metodologias.

REFERÊNCIAS

AALTO, S. M. *et al.* Epstein-Barr viral load and disease prediction in a large cohort of allogeneic stem cell transplant recipients. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, 45, n. 10, p. 1305-9, 2007.

_____. Lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation--pre-emptive diagnosis by quantification of Epstein-Barr virus DNA in serum. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, 28, n. 3, p. 275-83, 2003.

ABBAS, A. K. *Imunologia Celular e Molecular*. 3 edição. ed. São Paulo, 2000. (Imunidade contra Tumores).

AKANE, A. *et al.* Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. **Journal Forensic Science**, Hoboken, 39, n. 2, p. 362-72, 1994.

AL-SOUD, W. A. *et al.* Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, 38, n. 1, p. 345-50, 2000.

ALAEZ, C. *et al.* Mediterranean and Amerindian MHC class II alleles are associated with multiple sclerosis in Mexicans. **Acta Neurology Scand**, 112, n. 5, p. 317-22, 2005.

AMBINDER, R. F. Gammaherpesviruses and "Hit-and-Run" oncogenesis. **American Journal of Pathology**, New York, 156, n. 1, p. 1-3, 2000.

ANNELS, N. E. *et al.* Management of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation after allogeneic stem cell transplantation by simultaneous analysis of EBV DNA load and EBV-specific T cell reconstitution. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, 42, n. 12, p. 1743-8, 2006.

ARAUJO, I. *et al.* The high frequency of EBV infection in pediatric Hodgkin lymphoma is related to the classical type in Bahia, Brazil. **Virchows Archive**, 449, n. 3, p. 315-9, 2006.

BAER, R. *et al.* DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. **Nature**, London, 310, n. 5974, p. 207-11, 1984.

BALDANTI, F. *et al.* Kinetics of Epstein-Barr virus DNA load in different blood compartments of pediatric recipients of T-cell-depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, 46, n. 11, p. 3672-7, 2008.

BANOO, S. *et al.* Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. **Nature Review Microbiology**, London, v.4, n. 12 Suppl, p. S20-32, 2006.

BARKER, J. N. *et al.* Low incidence of Epstein-Barr virus-associated posttransplantation lymphoproliferative disorders in 272 unrelated-donor umbilical cord blood transplant recipients. **Biology Blood Marrow Transplantation**, New York, v.7, n. 7, p. 395-9, 2001.

BOOM, R. *et al.* Improved silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha-casein to silica particles. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, 37, n. 3, p. 615-9, 1999.

_____. Human cytomegalovirus DNA in plasma and serum specimens of renal transplant recipients is highly fragmented. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, n. 11, p. 4105-13, 2002.

BRENNAN, P. Signalling events regulating lymphoid growth and survival. **Seminars in Cancer Biology**, 11, n. 6, p. 415-21, 2001.

BUH GASPARIC, M. *et al.* Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin, v.396, n. 6, p. 2023-9, 2010.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, 55, n. 4, p. 611-22, 2009.

CALATTINI, S. *et al.* Detection of EBV genomes in plasmablasts/plasma cells and non-B cells in the blood of most patients with EBV lymphoproliferative disorders by using Immuno-FISH. **Blood**, Washington, 116, n. 22, p. 4546-59, 2010.

CALLAN, M. F. *et al.* Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *In vivo*. **Journal of Experimental Medicine**, 187, n. 9, p. 1395-402, 1998.

CARBONE, A. *et al.* EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. **The Oncologist**, 13, n. 5, p. 577-85, 2008.

CARPENTER, B. *et al.* Incidence and dynamics of Epstein-Barr virus reactivation after alemtuzumab-based conditioning for allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. **Transplantation**, Baltimore, v.90, n. 5, p. 564-70, 2010.

COHEN, J. I. Epstein-Barr virus infection. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.343, n. 7, p. 481-92, 2000.

COHEN, J. I. *et al.* Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: a status report and summary of an international meeting, 8-9 September 2008. **Annals of Oncology**, 20, n. 9, p. 1472-82, 2009.

COHEN, J. I.; LEKSTROM, K. Epstein-Barr virus BARF1 protein is dispensable for B-cell transformation and inhibits alpha interferon secretion from mononuclear cells. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, n. 9, p. 7627-32, 1999.

COHEN, J. M. *et al.* EBV-related disease following haematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning. **Leukemia and Lymphoma**, 48, n. 2, p. 256-69, 2007.

COPPOLETTA, S. *et al.* Rituximab Treatment for Epstein-Barr Virus DNAemia after Alternative-Donor Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Biology Blood Marrow Transplantation**, New York, 2010.

CRAWFORD, D. H. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 356, n. 1408, p. 461-73, 2001.

DESGRANGES, C. *et al.* Further studies on the detection of the Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma biopsies from different parts of the world. **IARC Staff Scientific Publications**, 11 Pt 2, p. 191-3, 1975.

Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis. n. 07/26/2010. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2010.

EPSTEIN, M. A. *et al.* Virus Particles In Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma. **Lancet**, London, v.1, n. 7335, p. 702-3, 1964.

ESPY, M. J. *et al.* Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.19, n. 1, p. 165-256, 2006.

FAFI-KREMER, S. *et al.* Evaluation of the Epstein-Barr virus R-gene quantification kit in whole blood with different extraction methods and PCR platforms. **Journal of Molecular Diagnostics**, 10, n. 1, p. 78-84, 2008.

FAYE, A.; VILMER, E. Post-transplant lymphoproliferative disorder in children: incidence, prognosis, and treatment options. **Paediatr Drugs**, 7, n. 1, p. 55-65, 2005.

FIGUEIRA-SILVA, C. M.; PEREIRA, F. E. Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitoria, State of Espirito Santo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.37, n. 5, p. 409-12, 2004.

FRESEN, K. O. *et al.* Heterogeneity of Epstein-Barr virus originating from P3HR-1 cells. I. Studies on EBNA induction. **International Journal of Cancer**, 19, n. 3, p. 317-23, 1977.

FRYER, J. F.; MINOR, P. D. Standardisation of nucleic acid amplification assays used in clinical diagnostics: a report of the first meeting of the SoGAT Clinical Diagnostics Working Group. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 103-5, 2009.

FUNK, G. A. *et al.* Viral dynamics in transplant patients: implications for disease. **The Lancet Infectious Diseases**, London, 7, n. 7, p. 460-72, 2007.

GALLAGHER, A. *et al.* Detection of Epstein-Barr virus (EBV) genomes in the serum of patients with EBV-associated Hodgkin's disease. **International Journal of Cancer**, 84, n. 4, p. 442-8, 1999.

GRASER, F. [100 years of Pfeiffer's glandular fever]. **Klinische Padiatrie**, 203, n. 3, p. 187-90, 1991.

GRATAMA, J. W. *et al.* Detection of multiple Epstein-Barr viral strains in allogeneic bone marrow transplant recipients. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 37, n. 1, p. 39-47, 1992.

GREEN, M. *et al.* CMV-IVIG for prevention of Epstein Barr virus disease and posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplant recipients. **American Journal of Transplantation**, v.6, n. 8, p. 1906-12, 2006.

GREENHALGH, T. How to read a paper. Statistics for the non-statistician. II: "Significant" relations and their pitfalls. **British Medical Journal**, 315, n. 7105, p. 422-5, 1997.

GREENSPAN, J. S. *et al.* Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. **New England Journal of Medicine**, 313, n. 25, p. 1564-71, 1985.

GROSS, T. G. *et al.* Posttransplant lymphoproliferative diseases. **Pediatric Clinics of North America**, 57, n. 2, p. 481-503, table of contents,

GULLEY, M. L.; TANG, W. Using Epstein-Barr viral load assays to diagnose, monitor, and prevent posttransplant lymphoproliferative disorder. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 23, n. 2, p. 350-66,

_____. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. **Journal of Molecular Diagnostics**, 10, n. 4, p. 279-92, 2008.

GUSEVA, L. N. *et al.* [Paul-Bunnell-Davidson reaction in the diagnosis of infectious mononucleosis in children]. **Voprosy okhrany materinstva i detstva**, 13, n. 4, p. 31-5, 1968.

HAKIM, H. *et al.* Comparison of various blood compartments and reporting units for the detection and quantification of Epstein-Barr virus in peripheral blood. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, 45, n. 7, p. 2151-5, 2007.

HALVORSEN, J. A. *et al.* Genital ulcers as initial manifestation of Epstein-Barr virus infection: two new cases and a review of the literature. **Acta Dermato-Venereologica**, 86, n. 5, p. 439-42, 2006.

HAYDEN, R. T. *et al.* Multicenter comparison of different real-time PCR assays for quantitative detection of Epstein-Barr virus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, 46, n. 1, p. 157-63, 2008.

HENLE, G. *et al.* Relation of Burkitt's tumor-associated herpes- γ virus to infectious mononucleosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, 59, n. 1, p. 94-101, 1968.

HESLOP, H. E. Biology and treatment of Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin lymphomas. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, 260-6, 2005.

_____. How I treat EBV lymphoproliferation. **Blood**, Washington, v.114, n. 19, p. 4002-8, 2009.

HESS, C. *et al.* IL-8 responsiveness defines a subset of CD8 T cells poised to kill. **Blood**, Washington, v.104, n. 12, p. 3463-71, 2004.

HIGUCHI, R. *et al.* Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology (N Y)**, 10, n. 4, p. 413-7, 1992.

_____. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (N Y)**, 11, n. 9, p. 1026-30, 1993.

HOPWOOD, P.; CRAWFORD, D. H. The role of EBV in post-transplant malignancies: a review. **Journal of Clinical Pathology**, 53, n. 4, p. 248-54, 2000.

IMASHUKU, S. *et al.* Treatment of Epstein-Barr virus-associated peripheral T-cell lymphoma. **British Journal of Dermatology** 150, n. 5, p. 1038-40, 2004.

ISOBE, Y. *et al.* Epstein-Barr virus infection of human natural killer cell lines and peripheral blood natural killer cells. **Cancer Research**, 64, n. 6, p. 2167-74, 2004.

IWAKIRI, D.; TAKADA, K. Role of EBERs in the pathogenesis of EBV infection. **Advances in Cancer Research**, 107, n. 119-36, 2010.

IWATA, S. *et al.* Quantitative analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-related gene expression in patients with chronic active EBV infection. **Journal of General Virology**, 91, n. Pt 1, p. 42-50, 2010.

IZRAELI, S. *et al.* Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. **Nucleic Acids Res**, 19, n. 21, p. 6051, 1991.

JABS, W. J. *et al.* Normalized quantification by real-time PCR of Epstein-Barr virus load in patients at risk for posttransplant lymphoproliferative disorders. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n. 2, p. 564-9, 2001.

JOHANNSEN, E. *et al.* Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. **Journal of Virology**, 69, n. 1, p. 253-62, 1995.

JUVONEN, E. *et al.* High incidence of PTLD after non-T-cell-depleted allogeneic haematopoietic stem cell transplantation as a consequence of intensive immunosuppressive treatment. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, 32, n. 1, p. 97-102, 2003.

KALINOVA, L. *et al.* Post-transplant lymphoproliferative disorder. **Biomedical Papers Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, 153, n. 4, p. 251-7, 2009.

KERKAR, N. *et al.* The changing face of post-transplant lymphoproliferative disease in the era of molecular EBV monitoring. **Pediatric Transplantation**, 14, n. 4, p. 504-11, 2010.

KIMURA, H. [Chronic active EBV infection]. **Nippon Rinsho**, 64 Suppl 3, n. 630-4, 2006.

KIMURA, H. *et al.* Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. **Reviews in Medical Virology**, 18, n. 5, p. 305-19, 2008.

_____. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 1, p. 132-6, 1999.

KINCH, A. *et al.* Post-transplant lymphoproliferative disease and other Epstein-Barr virus diseases in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation after introduction of monitoring of viral load by polymerase chain reaction. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, 39, n. 3, p. 235-44, 2007.

KNECHT, H. *et al.* 3D structural and functional characterization of the transition from Hodgkin to Reed-Sternberg cells. **Annals of Anatomy** 192, n. 5, p. 302-8, 2010.

KUBISTA, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

_____. Determination of protolytic constants by trilinear fluorescence spectroscopy. **J Fluoresc**, 14, n. 2, p. 139-44, 2004.

KULLBERG-LINDH, C. *et al.* Comparison of serum and whole blood levels of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA. **Transplant Infectious Disease**, 10, n. 5, p. 308-15, 2008.

KULWICHIT, W. *et al.* Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, 95, n. 20, p. 11963-8, 1998.

KUPPERS, R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. **Nature Reviews Immunology**, 3, n. 10, p. 801-12, 2003.

LAHIRI, D. K.; SCHNABEL, B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. **Biochemical Genetics**, 31, n. 7-8, p. 321-8, 1993.

LANDGREN, O. *et al.* Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Blood**, Washington, v.113, n. 20, p. 4992-5001, 2009.

LANKESTER, A. C. *et al.* Epstein-Barr virus (EBV)-DNA quantification in pediatric allogeneic stem cell recipients: prediction of EBV-associated lymphoproliferative disease. **Blood**, Washington, v.99, n. 7, p. 2630-1, 2002.

LAU, A. H. *et al.* Chronic high Epstein-Barr viral load carriage in pediatric small bowel transplant recipients. **Pediatric Transplantation**, 14, n. 4, p. 549-53, 2010.

LAY, M. L. *et al.* Measurement of Epstein-Barr virus DNA load using a novel quantification standard containing two EBV DNA targets and SYBR Green I dye. **Virology Journal**, 7, n. 252,

LEE, T. C. *et al.* Quantitative EBV viral loads and immunosuppression alterations can decrease PTLD incidence in pediatric liver transplant recipients. **American Journal of Transplantation**, 5, n. 9, p. 2222-8, 2005.

LEUNG, E. *et al.* Use of real-time PCR to measure Epstein-Barr virus genomes in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, 270, n. 2, p. 259-67, 2002.

LI, B. M. *et al.* Epstein-Barr virus in synergy with tumor-promoter-induced malignant transformation of immortalized human epithelial cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 123, n. 8, p. 441-6, 1997.

LIMA, M. A. P.; RABENHORST, S. H. B. Association of Epstein-Barr virus (EBV) with Solid Tumors. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 52, n. 87-96, 2006.

LJUNGMAN, P. Molecular monitoring of viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. **International Journal of Hematology**, 91, n. 4, p. 596-601, 2010.

LOCKEY, T. D. *et al.* Epstein-Barr virus vaccine development: a lytic and latent protein cocktail. **Front Biosci**, 13, n. 5916-27, 2008.

LU, L. *et al.* Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, 22, n. 2, p. 61-78, 1996.

MACSWEEN, K. F.; CRAWFORD, D. H. Epstein-Barr virus-recent advances. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v.3, n. 3, p. 131-40, 2003.

MALCOMSON, R. D. *et al.* The scope of quantitative polymerase chain reaction assays in clinical molecular pathology. **Clinical Molecular Pathology**, 48, n. 4, p. M178-83, 1995.

MARSHALL, N. A. *et al.* Rapid reconstitution of Epstein-Barr virus-specific T lymphocytes following allogeneic stem cell transplantation. **Blood**, Washington, v.96, n. 8, p. 2814-21, 2000.

MASJOSTHUSMANN, K. *et al.* Delay in B-lymphocyte recovery and function following rituximab for EBV-associated lymphoproliferative disease early post-allogeneic hematopoietic SCT. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v.43, n. 9, p. 679-84, 2009.

MAURMANN, S. *et al.* Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein-Barr virus reactivation in healthy carriers. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, 41, n. 12, p. 5419-28, 2003.

MEERBACH, A. *et al.* Monitoring of Epstein-Barr virus load after hematopoietic stem cell transplantation for early intervention in post-transplant lymphoproliferative disease. **Journal of Medical Virology**, New York, v.80, n. 3, p. 441-54, 2008.

MEIJER, E.; CORNELISSEN, J. J. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: molecular monitoring and early treatment of high-risk patients. **Current Opinion in Hematology**, 15, n. 6, p. 576-85, 2008.

MIDDELDORP, J. M. Molecular diagnosis of viral infections in renal transplant recipients. **Current Opinion in Nephrology & Hypertension**, 11, n. 6, p. 665-72, 2002.

MORRISON, L. E. Basic principles of fluorescence and energy transfer applied to real-time PCR. **Molecular Biotechnology**, 44, n. 2, p. 168-76,

MUHLPOINTNER, M. D. Reação em Cadeia da Polimerase PCR. *Introdução ao Diagnóstico por PCR*. São Paulo: ROCHE, 1998.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, 155, n. 335-50, 1987.

MUTI, G. *et al.* Post-transplant lymphoproliferative disorders: improved outcome after clinico-pathologically tailored treatment. **Haematologica**, 87, n. 1, p. 67-77, 2002.

NELSON, B. P. *et al.* Epstein-Barr virus-negative post-transplant lymphoproliferative disorders: a distinct entity? **American Journal of Surgical Pathology**, 24, n. 3, p. 375-85, 2000.

NEWCOM, K. D. Infectious mononucleosis. A clinical review. **Advanced Nursing Practice**, 9, n. 9, p. 36-8, 41, 2001.

NIEDOBITEK, G. The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? **Virchows Archive**, 435, n. 2, p. 79-86, 1999.

NIESTERS, H. G. *et al.* Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 8, n. 2, p. 712-5, 2000.

NIEWERTH, D. *et al.* A review on allogeneic stem cell transplantation for newly diagnosed pediatric acute myeloid leukemia. **Blood**, Washington, v.116, n. 13, p. 2205-14,

OCHENI, S. *et al.* EBV reactivation and post transplant lymphoproliferative disorders following allogeneic SCT. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v.42, n. 3, p. 181-6, 2008.

OKAY, T. S. *et al.* Detection of EBV-DNA in serum samples of an immunosuppressed child during a three years follow-up: association of clinical and PCR data with active infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.47, n. 2, p. 99-102, 2005.

OMAR, H. *et al.* Targeted monitoring of patients at high risk of post-transplant lymphoproliferative disease by quantitative Epstein-Barr virus polymerase chain reaction. **Transplant Infectious Disease**, 11, n. 5, p. 393-9, 2009.

OPELZ, G.; DOHLER, B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. **American Journal of Transplantation**, 4, n. 2, p. 222-30, 2004.

ORENTAS, R. J. *et al.* Monitoring and modulation of Epstein-Barr virus loads in pediatric transplant patients. **Pediatric Transplantation**, 7, n. 4, p. 305-14, 2003.

PANNUTI, C. S. [Seroepidemiology of Epstein-Barr virus]. **Revista de Saude Publica**, 15, n. 1, p. 93-100, 1981.

PERANDIN, F. *et al.* Comparison of commercial and in-house Real-time PCR assays for quantification of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in plasma. **BMC Microbiology**, 7, n. 22, 2007.

_____. Performance evaluation of the automated NucliSens easyMAG nucleic acid extraction platform in comparison with QIAamp Mini kit from clinical specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 64, n. 2, p. 158-65, 2009.

PERERA, R. A. *et al.* Shedding dynamics of Epstein-Barr virus: A type 1 carcinogen. **Archives of Oral Biology**

PETERSDORF, E. W. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation. **Current Opinion in Immunology**, 20, n. 5, p. 588-93, 2008.

PETERSDORF, E. W. *et al.* Limits of HLA mismatching in unrelated hematopoietic cell transplantation. **Blood**, Washington, v.104, n. 9, p. 2976-80, 2004.

PILLET, S. *et al.* Comparative evaluation of a commercially available automated system for extraction of viral DNA from whole blood: application to monitoring of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus load. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, 47, n. 11, p. 3753-5, 2009.

PITETTI, R. D. *et al.* Clinical evaluation of a quantitative real time polymerase chain reaction assay for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v.22, n. 8, p. 736-9, 2003.

PODGORNY, P. J. *et al.* High rabbit-antihuman thymocyte globulin levels are associated with low likelihood of graft-vs-host disease and high likelihood of posttransplant lymphoproliferative disorder. **Biology Blood Marrow Transplantation**, New York, v.16, n. 7, p. 915-26, 2010.

PREIKSAITIS, J. K. *et al.* Interlaboratory comparison of Epstein-Barr virus viral load assays. **American Journal of Transplantation**, 9, n. 2, p. 269-79, 2009.

RODRIGUES, C. A. *et al.* Analysis of risk factors for outcomes after unrelated cord blood transplantation in adults with lymphoid malignancies: a study by the Eurocord-Netcord and lymphoma working party of the European group for blood and marrow transplantation. **Journal of Clinical Oncology**, 27, n. 2, p. 256-63, 2009.

ROWE, D. T. *et al.* Epstein-Barr virus load monitoring: its role in the prevention and management of post-transplant lymphoproliferative disease. **Transplant Infectious Disease**, 3, n. 2, p. 79-87, 2001.

RUGGERI, A. *et al.* Double cord blood transplantation in patients with high risk bone marrow failure syndromes. **British Journal of Haematology**, 143, n. 3, p. 404-8, 2008.

RYAN, J. L. *et al.* Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. **Journal of Molecular Diagnostics**, 6, n. 4, p. 378-85, 2004.

SAIKI, R. K. *et al.* Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. **Nature**, 324, n. 6093, p. 163-6, 1986.

SCHNEEBERGER, C. *et al.* Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. **PCR Methods Appl**, 4, n. 4, p. 234-8, 1995.

SCHONBERGER, S. *et al.* Prospective, comprehensive, and effective viral monitoring in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Biology Blood Marrow Transplantation**, New York, v.16, n. 10, p. 1428-35, 2010.

SCHUBERT, S. *et al.* Relationship of immunosuppression to Epstein-Barr viral load and lymphoproliferative disease in pediatric heart transplant patients. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, St. Louis, v.27, n. 1, p. 100-5, 2008.

SHAH, K. M.; YOUNG, L. S. Epstein-Barr virus and carcinogenesis: beyond Burkitt's lymphoma. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 15, n. 11, p. 982-8, 2009.

SHROFF, R.; REES, L. The post-transplant lymphoproliferative disorder-a literature review. **Pediatric Nephrology** 19, n. 4, p. 369-77, 2004.

SOUZA, C. A. Transplante de Medula Óssea (transplante de células tronco hematopoéticas). Comitê Científico ABRALE, 2010.

SPACEK, M. *et al.* Plasma EBV-DNA monitoring in Epstein-Barr virus-positive Hodgkin lymphoma patients. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica**, 119, n. 1, p. 10-6, 2010.

STEVENS, S. J. *et al.* Diagnostic value of measuring Epstein-Barr virus (EBV) DNA load and carcinoma-specific viral mRNA in relation to anti-EBV immunoglobulin A (IgA) and IgG antibody levels in blood of nasopharyngeal carcinoma patients from Indonesia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n. 7, p. 3066-73, 2005.

_____. Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of posttransplant lymphoproliferative disease in high-risk patients. **Blood**, Washington, v.97, n. 5, p. 1165-71, 2001.

_____. Role of Epstein-Barr virus DNA load monitoring in prevention and early detection of post-transplant lymphoproliferative disease. **Leukemia and Lymphoma**, 43, n. 4, p. 831-40, 2002.

STYCZYNSKI, J. *et al.* Outcome of treatment of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in hematopoietic stem cell recipients: a comprehensive review of reported cases. **Transplant Infectious Disease**, 11, n. 5, p. 383-92, 2009a.

_____. Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological malignancies and after SCT: guidelines from the Second European Conference on Infections in Leukemia. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v.43, n. 10, p. 757-70, 2009b.

SUBRAMANIAN, C. *et al.* The Epstein Barr nuclear antigen EBNA3C regulates transcription, cell transformation and cell migration. **Frontiers in Bioscience**, 7, n. d704-16, 2002.

SUNDIN, M. *et al.* The role of HLA mismatch, splenectomy and recipient Epstein-Barr virus seronegativity as risk factors in post-transplant lymphoproliferative disorder following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Haematologica**, 91, n. 8, p. 1059-67, 2006.

TABIASCO, J. *et al.* Acquisition of viral receptor by NK cells through immunological synapse. **Journal of Immunology**, 170, n. 12, p. 5993-8, 2003.

TaqMan® Universal PCR Master Mix Protocol. n. Part Number 4304449. Foster City: Applied Biosystems, 2010

TERAMURA, T. *et al.* Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus genome copy number in patients with EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Leukemia and Lymphoma**, 43, n. 1, p. 173-9, 2002.

THELWELL, N. *et al.* Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. **Nucleic Acids Research**, 28, n. 19, p. 3752-61, 2000.

TSAI, D. E. *et al.* EBV PCR in the diagnosis and monitoring of posttransplant lymphoproliferative disorder: results of a two-arm prospective trial. **American Journal of Transplantation**, 8, n. 5, p. 1016-24, 2008.

UBER, W. E. *et al.* Acute antibody-mediated rejection following heart transplantation. **American Journal of Transplantation**, 7, n. 9, p. 2064-74, 2007.

VAN BAARLE, D. *et al.* High prevalence of Epstein-Barr virus type 2 among homosexual men is caused by sexual transmission. **Journal of Infectious Diseases**, 181, n. 6, p. 2045-9, 2000.

VAN DER VELDEN, V. H. *et al.* Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. **Leukemia**, 17, n. 6, p. 1013-34, 2003.

VAN ESSER, J. W. *et al.* Molecular quantification of viral load in plasma allows for fast and accurate prediction of response to therapy of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation. **British Journal of Haematology**, 113, n. 3, p. 814-21, 2001a.

_____. Prevention of Epstein-Barr virus-lymphoproliferative disease by molecular monitoring and preemptive rituximab in high-risk patients after allogeneic stem cell transplantation. **Blood**, Washington, v.99, n. 12, p. 4364-9, 2002.

_____. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation (SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell--depleted SCT. **Blood**, Washington, v.98, n. 4, p. 972-8, 2001b.

WADOWSKY, R. M. *et al.* Measurement of Epstein-Barr virus DNA loads in whole blood and plasma by TaqMan PCR and in peripheral blood lymphocytes by competitive PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n. 11, p. 5245-9, 2003.

WAGNER, H. J. *et al.* Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. **Blood**, 103, n. 10, p. 3979-81, 2004.

_____. Patients at risk for development of posttransplant lymphoproliferative disorder: plasma versus peripheral blood mononuclear cells as material for quantification of Epstein-Barr viral load by using real-time quantitative polymerase chain reaction. **Transplantation**, Baltimore, v.72, n. 6, p. 1012-9, 2001.

WEINSTOCK, D. M. *et al.* Preemptive diagnosis and treatment of Epstein-Barr virus-associated post transplant lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant: an approach in development. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v.37, n. 6, p. 539-46, 2006.

WEISS, L. M. *et al.* Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. **New England Journal of Medicine**, 320, n. 8, p. 502-6, 1989.

WILLIAMS, H.; CRAWFORD, D. H. Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice. **Blood**, Washington, v.107, n. 3, p. 862-9, 2006.

WOLF, H. *et al.* EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. **Nature - New Biology**, 244, n. 138, p. 245-7, 1973.

WU, C. *et al.* Genomic organization and characterization of mouse SAP, the gene that is altered in X-linked lymphoproliferative disease. **Immunogenetics**, 51, n. 10, p. 805-15, 2000.

YAMASHITA, N. *et al.* Virological aspects of Epstein-Barr virus infections. **Acta Medica Okayama**, 59, n. 6, p. 239-46, 2005.

YANCOSKI, J. *et al.* Quantification of Epstein-Barr virus load in Argentinean transplant recipients using real-time PCR. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, 31, n. 1, p. 58-65, 2004.

YAO, Q. Y. *et al.* Epidemiology of infection with Epstein-Barr virus types 1 and 2: lessons from the study of a T-cell-immunocompromised hemophilic cohort. **Journal of Virology**, Washington, v.72, n. 5, p. 4352-63, 1998.

YIN, C. C.; JONES, D. Molecular approaches towards characterization, monitoring and targeting of viral-associated hematological malignancies. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, 6, n. 6, p. 831-41, 2006.

YOUNG, K. H. *et al.* Fulminant EBV-driven CD8 T-cell lymphoproliferative disorder following primary acute EBV infection: a unique spectrum of T-cell malignancy. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology** 1, n. 2, p. 185-97, 2008.

YOUNG, L. S.; RICKINSON, A. B. Epstein-Barr virus: 40 years on. **Nature Reviews Cancer**, 4, n. 10, p. 757-68, 2004.

ZAIA, J. *et al.* Viral disease prevention after hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v.44, n. 8, p. 471-82, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - FORMULÁRIO PARA OBTENÇÃO DOS DADOS DOS PACIENTES

APÊNDICE 2 - PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DO qPCR

APÊNDICE 3 - ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO: “Epstein-barr vírus: fatores gerais, doenças associadas e papel da quantificação da carga viral pós-transplante”

APÊNDICE 4 - ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO: “Monitoramento pa-ra vírus da família herpesviridae em pacientes submetidos ao transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas”

APÊNDICE 1 - FORMULÁRIO PARA OBTENÇÃO DOS DADOS DOS PACIENTES

	QUANTIFICAÇÃO DO EPSTEIN BARR VÍRUS (EBV)									
	SEÇÃO: BIOLOGIA MOLECULAR / LACEN-PR (Guatupê)									
DADOS DO PACIENTE										
Nome completo: _____										
Sexo: F () M () Data nascimento: ____ / ____ / ____ Idade: _____										
Nº Registro na Instituição: _____										
DADOS SOBRE O TRANSPLANTE										
Doença de base: _____										
Data do transplante: ____ / ____ / ____										
Autólogo ()										
Alogênico Aparentado () Alogênico Não aparentado ()										
Origem da Célula tronco: Medula óssea () Cordão umbilical ()										
Sangue periférico ()										
RESULTADOS DE EXAMES PRÉVIOS										
Sorologia doador:										
CMV positivo () negativo () inconclusivo ()										
EBV positivo () negativo () inconclusivo ()										
Sorologia do receptor:										
CMV positivo () negativo () inconclusivo ()										
EBV positivo () negativo () inconclusivo ()										

APÊNDICE 2 - PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DO qPCR

																													
BIOLOGIA MOLECULAR				Quantificação do vírus Epstein-Barr por PCR em tempo real (qPCR)																									
										DATA:																			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																		
A																													
B																													
C																													
D																													
E																													
F																													
G																													
H																													
Página 1																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="2">Reagentes e Amostras</th> </tr> <tr> <th>Reação 1X</th> <th>Reação X ()</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Master mix</td> <td>12,5µL</td> </tr> <tr> <td>Primer F</td> <td>0,75µL</td> </tr> <tr> <td>Primer R</td> <td>0,75µL</td> </tr> <tr> <td>Probe</td> <td>0,5µL</td> </tr> <tr> <td>Água</td> <td>5,5µL</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>20µL</td> </tr> <tr> <td>DNA</td> <td>05µL</td> </tr> </tbody> </table>												Reagentes e Amostras		Reação 1X	Reação X ()	Master mix	12,5µL	Primer F	0,75µL	Primer R	0,75µL	Probe	0,5µL	Água	5,5µL	Total	20µL	DNA	05µL
Reagentes e Amostras																													
Reação 1X	Reação X ()																												
Master mix	12,5µL																												
Primer F	0,75µL																												
Primer R	0,75µL																												
Probe	0,5µL																												
Água	5,5µL																												
Total	20µL																												
DNA	05µL																												
<p style="text-align: right;">LOTE MASTER MIX: VALIDADE: EQUIPAMENTO: RESPONSÁVEL:</p>																													

APÊNDICE 3 - ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

EPSTEIN-BARR VÍRUS: FATORES GERAIS, DOENÇAS ASSOCIADAS E PAPEL DA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL PÓS-TRANSPLANTE

GEQUELIN, L C F¹; RIEDIGER I N¹; BOMFIM C M²; BIONDO A W³.

¹Laboratório Central do Estado do Paraná, São José dos Pinhais, Brasil

²Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brasil

³Departamento de Medicina Veterinária da UFPR, Curitiba, Brasil

RESUMO

O vírus Epstein-Barr (EBV) é o responsável pela Síndrome da Mononucleose Infecciosa (MI) e também está intimamente associado a uma série de neoplasias. A principal complicação envolvendo EBV em receptores de transplante é a doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD). A importância da PTLD aumentou o interesse no desenvolvimento de instrumentos laboratoriais para melhorar o monitoramento pós-transplante e prever a doença antes da evolução clínica. A análise da carga viral (CV) do EBV pela técnica de PCR em tempo real é atualmente a melhor ferramenta para quantificação do vírus. No entanto, não há um consenso sobre qual o melhor tipo de amostra e qual o valor preditivo para intervenção terapêutica.

ABSTRACT

The Epstein-Barr virus (EBV) is responsible for the syndrome infectious mononucleosis (IM) and is also closely associated with a number of malignancies. The main complication involving EBV in transplant recipients is the post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD). The importance of PTLD has increased interest

in the development of laboratory instruments to improve monitoring after transplantation and predict the disease before the clinical outcome. The analysis of viral load (VL) of EBV by PCR in real time is currently the best tool for quantification of the virus. However, there is no consensus on what the best type of sample and that the predictive value for therapeutic intervention.

INTRODUÇÃO

O Epstein-Barr vírus (EBV) está classificado na família *Herpesviridae*, subfamília *Gamaherpesvirinae*, gênero *Lymphocryptovirus* e espécie *Human herpesvirus 4* (1, 2). Estudos baseados em sequenciamento revelaram a presença de dois tipos de EBV (3). Estima-se que esse vírus ubiquitário já tenha infectado mais de 90% da população mundial (4-7). Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (Atlanta/USA), 95% da população norte americana adulta entre 35 e 40 anos é portadora do EBV (8).

A transmissão do EBV ocorre principalmente por contato com secreções de orofaringe contendo o vírus (9, 10). No entanto, pode acontecer também por transfusão de sangue e derivados e transplante de órgãos e tecidos (11). O leite materno também pode conter o vírus, mas esta é uma rota incomum de transmissão vertical (12). Além disso, o EBV está presente em secreções do trato genital (13, 14).

Em países em desenvolvimento, a infecção primária por EBV normalmente ocorre na infância de forma assintomática ou clinicamente inespecífica (15). Porém, em países desenvolvidos, é mais comum acontecer a primoinfecção na adolescência ou fase adulta, podendo resultar no aparecimento dos sintomas clássicos da MI (13). Estudos sugerem que uma explicação para esse fato pode estar relacionada à quantidade de vírus introduzida no organismo (2).

Nesta revisão, foram avaliadas, de maneira sucinta, as principais doenças associadas ao EBV e a importância da quantificação da carga viral pós-transplante por PCR e diferenças encontradas em diversos centros de transplantes.

DOENÇAS RELACIONADAS AO EBV

MONONUCLEOSE INFECCIOSA (MI)

Acontece geralmente na adolescência ou fase adulta, mas ocasionalmente pode ocorrer em crianças e idosos (4). Também conhecida como doença do beijo (16), é normalmente uma doença autolimitada. Em 80% dos casos, há o aparecimento de anticorpos heterofílicos (9). E, no hemograma, é possível visualizar leucocitose com linfocitose acentuada e presença de linfócitos de Downey (atípicos). Esses linfócitos apresentam citoplasma aumentado e núcleo condensado. São primariamente células T atuando na eliminação das células B infectadas pelo EBV (17).

DOENÇA CRÔNICA ATIVA POR EBV (CAEBV)

Segundo Iwata e colaboradores, CAEBV é uma desordem sistêmica caracterizada por persistentes ou recorrentes sintomas de MI em pacientes sem imunodeficiência conhecida (18). Acomete principalmente indivíduos do leste da Ásia e América Central (19). Sua patogênese detalhada permanece de difícil compreensão. Recentemente, métodos para quantificar a expressão gênica vêm sendo usados para explicar com mais clareza a patogênese e possibilitar melhores intervenções terapêuticas (18).

LINFOMA DE HODGKIN (LH)

Há uma forte associação entre LH e infecção por EBV, embora seu papel na patogênese dessa doença não esteja completamente elucidado. O vírus tem sido demonstrado em cerca de 40% dos tumores (20). Casos em crianças e idosos estão

geralmente associados ao EBV, já em adultos são mais frequentemente EBV negativos (21).

O diagnóstico histológico difere dos demais linfomas por apresentar células mononucleares de Hodgkin e suas variantes multinucleadas conhecidas como *Reed-Sternberge* (21). Esses dois tipos celulares são derivados, na maioria dos casos, de células B.

A carga viral no plasma pode ser quantificada em virtualmente todos os pacientes com LH EBV positivos antes do tratamento. E a resposta à terapia foi associada à redução da carga viral (20). Estes dados sugerem que a avaliação do DNA plasmático por PCR em tempo real é excelente ferramenta para o prognóstico e acompanhamento de pacientes com LH (2).

LINFOMA NÃO HODGKIN (LNH)

Embora a incidência mundial seja alta, existe uma grande variedade de tipos e países onde esses linfomas ocorrem. No geral, apenas 5% dos tumores são EBV positivos. No entanto, o percentual aumenta para 40% nos casos relacionados à AIDS (22). Gânglios aumentados no pescoço, axilas e/ou virilha, sudorese noturna excessiva, febre, coceira na pele e perda de peso sem motivo aparente devem ser investigados pelo médico (23).

LINFOMA DE BURKITT (LB)

Atualmente representa um subgrupo dos LNH, é um tipo de tumor formado por pequenos linfócitos B malignos. Pode ser classificado em dois tipos: endêmico e esporádico. No endêmico, há três fatores que contribuem para o seu aparecimento: malária, EBV e expressão do gene *c-myc*. A doença acomete crianças na África equatorial e Nova Guiné (zona endêmica para malária) e o tumor, muitas vezes, começa na mandíbula. Sabe-se que a malária causa imunodeficiência de células T, reduzindo o controle da proliferação de células B infectadas por EBV. Mais de 95% dos pacientes africanos com LB teve infecção anterior por EBV (21).

Já no LB esporádico, embora histologicamente semelhante à forma endêmica, somente 20 a 30% das células tumorais portam o genoma do EBV (24). E vale frisar que, na forma esporádica associada à AIDS, 30-40% dos tumores são EBV positivos (25).

DESORDEM LINFOPROLIFERATIVA PÓS-TRANSPLANTE (PTLD)

Ocorre devido à supressão iatrogênica da função das células T (26) e é caracterizada pela proliferação anormal de células B (5). Os principais fatores de risco são infecção primária pós-transplante, esplenectomia prévia, segundo transplante, idade do paciente, doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda ou crônica, co-infecção com Cytomegalovírus ou outras viroses, regime e intensidade da terapia imunossupressora (uso de ATG), depleção de células T (27), transplantes com disparidade HLA (28), receptor EBV soronegativo e doador soropositivo (7).

O uso de sangue de cordão umbilical como fonte de células para transplante alogênico também aumentam o risco de PTLD. As explicações estão associadas a uma baixa quantidade de células T em cordão, incompatibilidade e ou compatibilidade parcial HLA entre doador e receptor e uso de ATG (29).

A patogênese da PTLD difere entre transplantes de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) e órgãos sólidos (TOS). Como a imunossupressão em TOS deve ser mantida ao longo da vida do paciente, o risco de PTLD é constante. A incidência varia de acordo com o órgão transplantado. São relatadas as seguintes incidências: intestino e múltiplos órgãos 11 a 33%, pulmão 2 a 9%, coração 2 a 6%, fígado 1 a 3%; rim 1% (30, 31). Uma explicação pode estar relacionada ao tipo e intensidade do regime imunossupressivo (7).

Um estudo multicêntrico com 26.901 pacientes submetidos ao TCTH sugeriu uma alta incidência de PTLD em indivíduos com mais de 50 anos e também em pacientes submetidos a um segundo transplante. Também foram levados em conta outros fatores de risco, como a depleção de células T, combinação parcial HLA, DECH aguda ou crônica. O estudo em questão dividiu os pacientes que

desenvolveram PTLD em quatro grupos e calculou-se a incidência da doença. Em indivíduos sem fatores importantes de risco, pacientes com um, dois ou mais fatores a incidência de PTLD foi de 0.2%, 1.1%, 3.6% e 8.1%, respectivamente (32).

A maior frequência dessa complicação ocorre em crianças e muitas vezes se apresenta durante o primeiro ano após o transplante, com incidência alta durante os primeiros seis meses. No entanto, também pode ocorrer mais tarde, mesmo até 10 anos pós-transplante (6, 27, 33). A doença abrange uma grande diversidade de condições patológicas, o que muitas vezes dificulta o desenvolvimento de uma classificação padrão (7). Pode haver predominância de células T e células B com padrão monomórfico ou polimórfico. Ela pode se apresentar como uma autolimitada linfoproliferação ou doença fulminante. Ser localizada ou de ampla disseminação (34). Apesar das variações, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda sua classificação em quatro categorias: (a) lesões iniciais; (b) PTLD polimórfica; (c) PTLD monomórfica linfomatosa; (d) Linfoma de Hodgkin clássico tipo PTLD (5, 7, 30).

Há variadas formas de tratamento: intervenção profilática, preventiva ou no momento em que se identifica provável ou comprovada doença por EBV (6). A base do tratamento é a redução ou retirada da terapia imunossupressora, uso de anticorpo anti-CD20 (rituximab), antivirais e, quando necessário, terapia antineoplásica convencional (27).

Recente revisão mostrou que uma dose de rituximab foi eficaz para prevenir PTLD (26). Embora muitos estudos garantam a eficácia e administração segura dessa terapia (35), não se pode deixar de citar que uma das limitações do anti-CD20 é a sua especificidade por células B (infectadas ou não), ocasionando uma total redução dessa população de células (5) e hipogamaglobulinemia (36).

O uso profilático e preventivo de agentes antivirais vem sendo desencorajado devido à falta de eficácia (37). Ganciclovir e aciclovir podem reduzir a replicação do EBV, mas não estão ativos na PTLD (26). O papel da imunização passiva com anticorpo anti-CMV intravenoso permanece incerto (7). Num trabalho envolvendo pacientes de transplante renal, a utilização de anti-CMV IV foi benéfica no primeiro ano pós-transplante (38).

Um tratamento promissor vem sendo o uso de infusões de linfócitos T citotóxicos EBV específicos para prevenir e tratar PTLD (39, 40), cultivados do próprio receptor em TOS (25, 35), e do doador em TCTH (39).

A confirmação da doença requer exame de biópsia e análise histológica (26). Não obstante, a análise da carga viral é imprescindível para monitoramento pós-tranplante. Além da quantificação do vírus, a cada ano aumenta a procura por ensaios alternativos para avaliar o risco de PTLD. Testes que quantificam Linfócitos T específicos para EBV mostram-se promissores (5).

Não se pode esquecer, porém, que há casos de PTLD EBV negativos. São casos raros e normalmente acontecem tardiamente (média de 50 meses pós-tranplante). Nessa situação, o ensaio de CV para EBV não irá detectar e prevenir PTLD (41). De acordo com Muti e colaboradores, cerca de 30% dos casos de início tardio tem um padrão de linfoma EBV negativo (42).

CARCINOMA DE NASOFARINGE

A doença tem maior incidência no sul da China, onde representa cerca de 20% de todos os casos de câncer em adultos (43). Também é encontrada no nordeste da África e no Alaska entre os esquimós. Já na Europa e no Norte da América, a taxa de incidência é menor que 1 por 100 000 habitantes (44).

Mais de 99% dos casos estão relacionados ao EBV e o genoma viral é encontrado em células epiteliais transformadas (45). Exame de DNA extraído dessas células revelou que todos os casos, em áreas de alta, intermediária e baixa incidência, foram consistentemente positivos para o EBV (46).

Na tabela 1, são consideradas as variáveis porcentagens de casos EBV positivos em algumas patologias associadas a esse vírus.

TABELA 1 – PATOLOGIA E PORCENTAGEM DE CASOS EBV POSITIVOS

DOENÇA	PORCENTAGEM
Mononucleose infecciosa	>99%
Leucoplasia pilosa oral	>95%
Doença de Hodgkin (todos os subtipos)	40%
Doença de Hodgkin (relacionada à AIDS)	>95%
Linfoma não Hodgkin (todos os subtipos)	5%
Linfoma não Hodgkin (relacionado à AIDS)	40%
Linfoma de Burkitt (África)	>95%
Linfoma de Burkitt (América do Norte)	20%
Linfoma de Burkitt (relacionado a AIDS)	30%
Carcinoma de nasofaringe (Ásia)	>99%
Carcinoma de nasofaringe (América do Norte)	75%

FONTE: Gulley, 2008 (22)

QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO EBV PÓS-TRANSPLANTE

As metodologias de PCR qualitativa e quantitativa são técnicas precisas, altamente sensíveis e específicas. Porém, apenas detectar o EBV não oferece ao clínico uma visão do real estado do paciente (2). A técnica de PCR em tempo real quantitativo para EBV vem se tornando parte integrante de protocolos de monitoramento de pacientes transplantados e como um parâmetro preditivo para PTLD (47, 48). Não obstante, a correlação entre o aumento da carga viral e PTLD ainda não está completamente elucidada (1).

Em pacientes de alto risco submetidos ao TCTH e TOS, é recomendada a quantificação do EBV uma vez por semana durante, pelo menos, três meses após o transplante. Depois desse período, sugere-se o acompanhamento apenas de pacientes com reativação ou doença relacionada ao EBV (6).

Não existe um consenso sobre qual o tipo de amostra, método de extração, gene alvo do vírus, plataformas e instrumentos de qPCR e unidades de medida seriam melhores para avaliação de complicações relacionadas ao EBV. Na

verdade, ainda não há um método (comercial ou *in-house*) padronizado para detecção do EBV (6).

Valores para intervenção preventiva da PTLD têm sido definidos em centros de transplante, conforme população estudada e experiência local. Mas, vale dizer que tais níveis de corte não foram validados em estudos multicêntricos (49). Recente revisão confirma que ainda não existe um limite indicativo para início de intervenções preventivas (50).

Kimura e colaboradores, em recente revisão, afirmaram que o sangue total (ST) é a melhor opção para monitorar PTLD, embora compreenda que mais estudos são necessários para solucionar a questão. (2). Outro estudo comparou a quantificação da carga viral do EBV em ST, células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e plasma. A sensibilidade do qPCR foi semelhante para ST e PBMC e menor para plasma (51).

Em uma comparação multicêntrica, a amostra de sangue total foi escolhida baseada em estudos que demonstraram uma melhor sensibilidade nesse material e também porque era mais comumente usada entre os laboratórios participantes (51-53).

Não obstante, Gulley e colaboradores argumentam que não é apropriado dizer que para PTLD a amostra de sangue total é mais informativa que o plasma (27). Nessa doença, pode haver relativamente poucas células circulantes e também podem ocorrer outros modelos de latência, replicação lítica e produção de vírions. Isso, sem dúvida, leva a diferentes concentrações do EBV nas frações celulares e no plasma (27, 54, 55).

Dois estudos comparando a detecção em sangue total e plasma concluíram que o plasma foi a melhor opção quando comparado ao ST (56, 57). E Niesters e colaboradores, em seu trabalho, verificaram que há relação entre DNA presente no plasma e doenças relacionadas ao EBV (58).

Alguns pesquisadores preferem trabalhar com soro ou plasma, pois células mononucleares podem ser de difícil obtenção em pacientes com leucopenia nos primeiros meses pós-transplante (50, 59). Ademais, em pacientes que receberam rituximab, a destruição de células B pode afetar o número de cópias em linfócitos periféricos (26).

De 24 estudos revisados (47, 56, 58, 60, 61, 62, 48, 63, 64, 1, 65, 66, 55, 59, 67, 29, 40, 68, 69, 33, 70, 71, 72, 73), o método de extração mais amplamente usado foi o denominado *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha) e o sistema de quantificação de escolha em tempo real foi por sondas de hidrólise (sondas *TaqMan*[®]). Apenas um trabalho enumerado não emprega a metodologia em tempo real (67).

Em oito estudos, o material de escolha foi o sangue total (48, 63, 66, 68, 69, 70, 71, 72). PBMC foi usado por cinco trabalhos (47, 62, 1, 65) e plasma ou soro por oito (58, 60, 61, 64, 55, 59, 29, 33). Foram realizados dois estudos comparativos (56, 40): um deles entre PBMC e plasma - demonstrando maior sensibilidade no plasma - e o outro entre ST e PBMC, demonstrando resultados similares nos dois materiais. Já o experimento descrito por Lay e colaboradores utilizou plasma, ST e PBMC sem o propósito de comparar as amostras (73).

Cumprе ressaltar que a população de pacientes que realizaram TCTH foi incluída em 12 trabalhos. Destes, apenas cinco usaram plasma ou soro como material de escolha (58, 61, 55, 59, 33).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda não se conhece, em pormenores, o papel do EBV em todas as doenças associadas a ele. O diagnóstico e monitoramento dessas patologias são de suma importância para o manejo clínico. E a quantificação do EBV pós-transplante é fundamental, principalmente em pacientes com fatores de risco consideráveis. A carga viral aumentada pode ser um marcador de PTLD iminente e a intervenção preventiva pode evitar ou impedir a progressão da doença.

Devido à variedade de metodologias empregadas em cada instituição, é difícil recomendar um valor universal preditivo para PTLD. O ideal seria realizar um estudo multicêntrico para padronização de uma técnica de qPCR e estabelecer um valor preditivo único (11, 17).

REFERÊNCIAS

1. Orentas RJ, Schauer DW, Jr., Ellis FW, Walczak J, Casper JT, Margolis DA. Monitoring and modulation of Epstein-Barr virus loads in pediatric transplant patients. *Pediatric Transplantation*. 2003 Aug;7(4):305-14.
2. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Reviews in Medical Virology*. 2008 Sep-Oct;18(5):305-19.
3. Yao QY, Croom-Carter DS, Tierney RJ, Habeshaw G, Wilde JT, Hill FG, et al. Epidemiology of infection with Epstein-Barr virus types 1 and 2: lessons from the study of a T-cell-immunocompromised hemophilic cohort. *Journal of Virology*. 1998 May;72(5):4352-63.
4. Williams H, Crawford DH. Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):862-9.
5. Heslop HE. Biology and treatment of Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:260-6.
6. Styczynski J, Einsele H, Gil L, Ljungman P. Outcome of treatment of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in hematopoietic stem cell recipients: a comprehensive review of reported cases. *Transplant Infectious Disease*. 2009 Oct;11(5):383-92.
7. Gross TG, Savoldo B, Punnett A. Posttransplant lymphoproliferative diseases. *Pediatric Clinics of North America*. Apr;57(2):481-503, table of contents.
8. Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2010 [updated 2010 05/16/2006 15:04:08; cited 07/26/2010]; Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/ebv.htm>.
9. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Reviews Cancer*. 2004 Oct;4(10):757-68.
10. Newcom KD. Infectious mononucleosis. A clinical review. *Advanced Nursing Practice*. 2001 Sep;9(9):36-8, 41.
11. Cohen JI, Kimura H, Nakamura S, Ko YH, Jaffe ES. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: a status report and summary of an international meeting, 8-9 September 2008. *Annals of Oncology*. 2009 Sep;20(9):1472-82.
12. Perera RA, Samaranyake LP, Tsang CS. Shedding dynamics of Epstein-Barr virus: A type 1 carcinogen. *Archives of Oral Biology* Jul 11.
13. Crawford DH. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2001 Apr 29;356(1408):461-73.
14. Halvorsen JA, Brevig T, Aas T, Skar AG, Slevolden EM, Moi H. Genital ulcers as initial manifestation of Epstein-Barr virus infection: two new cases and a review of the literature. *Acta Dermato-Venereologica*. 2006;86(5):439-42.

15. Pannuti CS. [Seroepidemiology of Epstein-Barr virus]. *Revista de Saude Publica*. 1981 Feb;15(1):93-100.
16. Macsween KF, Crawford DH. Epstein-Barr virus-recent advances. *The Lancet Infectious Diseases*. 2003 Mar;3(3):131-40.
17. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *New England Journal of Medicine*. 2000 Aug 17;343(7):481-92.
18. Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-related gene expression in patients with chronic active EBV infection. *Journal of General Virology*. Jan;91(Pt 1):42-50.
19. Kimura H. [Chronic active EBV infection]. *Nippon Rinsho*. 2006 Mar;64 Suppl 3:630-4.
20. Spacek M, Hubacek P, Markova J, Zajac M, Vernerova Z, Kamaradova K, et al. Plasma EBV-DNA monitoring in Epstein-Barr virus-positive Hodgkin lymphoma patients. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica*. Jan;119(1):10-6.
21. Young KH, Zhang D, Malik JT, Williams EC. Fulminant EBV-driven CD8 T-cell lymphoproliferative disorder following primary acute EBV infection: a unique spectrum of T-cell malignancy. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2008;1(2):185-97.
22. Gulley ML, Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2008 Jul;10(4):279-92.
23. Souza CA. Transplante de Medula Óssea (transplante de células tronco hematopoéticas). Comitê Científico ABRALÉ; 2010 [updated 2010; cited]; Available from: <http://www.abrale.org.br/doencas/transplante/>.
24. Kuppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nature Reviews Immunology*. 2003 Oct;3(10):801-12.
25. Carbone A, Gloghini A, Dotti G. EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. *The Oncologist*. 2008 May;13(5):577-85.
26. Styczynski J, Reusser P, Einsele H, de la Camara R, Cordonnier C, Ward KN, et al. Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological malignancies and after SCT: guidelines from the Second European Conference on Infections in Leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2009 May;43(10):757-70.
27. Gulley ML, Tang W. Using Epstein-Barr viral load assays to diagnose, monitor, and prevent posttransplant lymphoproliferative disorder. *Clinical Microbiology Reviews*. Apr;23(2):350-66.
28. Kinch A, Oberg G, Arvidson J, Falk KI, Linde A, Pauksens K. Post-transplant lymphoproliferative disease and other Epstein-Barr virus diseases in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation after introduction of monitoring of viral load by polymerase chain reaction. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2007;39(3):235-44.
29. Meijer E, Cornelissen JJ. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: molecular monitoring and early treatment of high-risk patients. *Current Opinion in Hematology*. 2008 Nov;15(6):576-85.

30. Kalinova L, Indrakova J, Bachleda P. Post-transplant lymphoproliferative disorder. *Biomedical Papers Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009 Dec;153(4):251-7.
31. Kerkar N, Morotti RA, Madan RP, Shneider B, Herold BC, Dugan C, et al. The changing face of post-transplant lymphoproliferative disease in the era of molecular EBV monitoring. *Pediatric Transplantation.* Jun;14(4):504-11.
32. Landgren O, Gilbert ES, Rizzo JD, Socie G, Banks PM, Sobocinski KA, et al. Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2009 May 14;113(20):4992-5001.
33. Omar H, Hagglund H, Gustafsson-Jernberg A, LeBlanc K, Mattsson J, Remberger M, et al. Targeted monitoring of patients at high risk of post-transplant lymphoproliferative disease by quantitative Epstein-Barr virus polymerase chain reaction. *Transplant Infectious Disease.* 2009 Oct;11(5):393-9.
34. Imashuku S, Teramura T, Konishi K, Kikuchi A, Tamura S, Maeda Y, et al. Treatment of Epstein-Barr virus-associated peripheral T-cell lymphoma. *British Journal of Dermatology* 2004 May;150(5):1038-40.
35. Faye A, Vilmer E. Post-transplant lymphoproliferative disorder in children: incidence, prognosis, and treatment options. *Paediatr Drugs.* 2005;7(1):55-65.
36. Masjosthusmann K, Ehlert K, Eing BR, Roth J, Koehler G, Juergens H, et al. Delay in B-lymphocyte recovery and function following rituximab for EBV-associated lymphoproliferative disease early post-allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2009 May;43(9):679-84.
37. Zaia J, Baden L, Boeckh MJ, Chakrabarti S, Einsele H, Ljungman P, et al. Viral disease prevention after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2009 Oct;44(8):471-82.
38. Opelz G, Dohler B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *American Journal of Transplantation.* 2004 Feb;4(2):222-30.
39. Heslop HE. How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood.* 2009 Nov 5;114(19):4002-8.
40. Baldanti F, Gatti M, Furione M, Paolucci S, Tinelli C, Comoli P, et al. Kinetics of Epstein-Barr virus DNA load in different blood compartments of pediatric recipients of T-cell-depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation. *Journal of Clinical Microbiology.* 2008 Nov;46(11):3672-7.
41. Nelson BP, Nalesnik MA, Bahler DW, Locker J, Fung JJ, Swerdlow SH. Epstein-Barr virus-negative post-transplant lymphoproliferative disorders: a distinct entity? *American Journal of Surgical Pathology.* 2000 Mar;24(3):375-85.
42. Muti G, Cantoni S, Oreste P, Klersy C, Gini G, Rossi V, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorders: improved outcome after clinico-pathologically tailored treatment. *Haematologica.* 2002 Jan;87(1):67-77.
43. Wolf H, zur Hausen H, Becker V. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature - New Biology.* 1973 Aug 22;244(138):245-7.
44. Shah KM, Young LS. Epstein-Barr virus and carcinogenesis: beyond Burkitt's lymphoma. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2009 Nov;15(11):982-8.

45. Stevens SJ, Verkuijlen SA, Hariwiyanto B, Harijadi, Fachiroh J, Paramita DK, et al. Diagnostic value of measuring Epstein-Barr virus (EBV) DNA load and carcinoma-specific viral mRNA in relation to anti-EBV immunoglobulin A (IgA) and IgG antibody levels in blood of nasopharyngeal carcinoma patients from Indonesia. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005 Jul;43(7):3066-73.
46. Desgranges C, de-The G, Wolf H, zur Hausen H. Further studies on the detection of the Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma biopsies from different parts of the world. *IARC Staff Scientific Publications*. 1975(11 Pt 2):191-3.
47. Kimura H, Morita M, Yabuta Y, Kuzushima K, Kato K, Kojima S, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999 Jan;37(1):132-6.
48. Leung E, Shenton BK, Jackson G, Gould FK, Yap C, Talbot D. Use of real-time PCR to measure Epstein-Barr virus genomes in whole blood. *Journal of Immunological Methods*. 2002 Dec 15;270(2):259-67.
49. Preiksaitis JK, Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Caliendo AM, Miller GG. Interlaboratory comparison of Epstein-Barr virus viral load assays. *American Journal of Transplantation*. 2009 Feb;9(2):269-79.
50. Ljungman P. Molecular monitoring of viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *International Journal of Hematology*. May;91(4):596-601.
51. Hakim H, Gibson C, Pan J, Srivastava K, Gu Z, Bankowski MJ, et al. Comparison of various blood compartments and reporting units for the detection and quantification of Epstein-Barr virus in peripheral blood. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007 Jul;45(7):2151-5.
52. Wadowsky RM, Laus S, Green M, Webber SA, Rowe D. Measurement of Epstein-Barr virus DNA loads in whole blood and plasma by TaqMan PCR and in peripheral blood lymphocytes by competitive PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003 Nov;41(11):5245-9.
53. Hayden RT, Hokanson KM, Pounds SB, Bankowski MJ, Belzer SW, Carr J, et al. Multicenter comparison of different real-time PCR assays for quantitative detection of Epstein-Barr virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008 Jan;46(1):157-63.
54. Aalto SM, Juvonen E, Tarkkanen J, Volin L, Ruutu T, Mattila PS, et al. Lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation--pre-emptive diagnosis by quantification of Epstein-Barr virus DNA in serum. *Journal of Clinical Virology*. 2003 Dec;28(3):275-83.
55. Weinstock DM, Ambrossi GG, Brennan C, Kiehn TE, Jakubowski A. Preemptive diagnosis and treatment of Epstein-Barr virus-associated post transplant lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant: an approach in development. *Bone Marrow Transplant*. 2006 Mar;37(6):539-46.
56. Wagner HJ, Wessel M, Jabs W, Smets F, Fischer L, Offner G, et al. Patients at risk for development of posttransplant lymphoproliferative disorder: plasma versus peripheral blood mononuclear cells as material for quantification of Epstein-Barr viral load by using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Transplantation*. 2001 Sep 27;72(6):1012-9.

57. Tsai DE, Douglas L, Andreadis C, Vogl DT, Arnoldi S, Kotloff R, et al. EBV PCR in the diagnosis and monitoring of posttransplant lymphoproliferative disorder: results of a two-arm prospective trial. *American Journal of Transplantation*. 2008 May;8(5):1016-24.
58. Niesters HG, van Esser J, Fries E, Wolthers KC, Cornelissen J, Osterhaus AD. Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000 Feb;38(2):712-5.
59. Aalto SM, Juvonen E, Tarkkanen J, Volin L, Haario H, Ruutu T, et al. Epstein-Barr viral load and disease prediction in a large cohort of allogeneic stem cell transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2007 Nov 15;45(10):1305-9.
60. Teramura T, Tabata Y, Yagi T, Morimoto A, Hibi S, Imashuku S. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus genome copy number in patients with EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Leukemia and Lymphoma*. 2002 Jan;43(1):173-9.
61. van Esser JW, van der Holt B, Meijer E, Niesters HG, Trenschele R, Thijsen SF, et al. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation (SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell-depleted SCT. *Blood*. 2001 Aug 15;98(4):972-8.
62. Jabs WJ, Hennig H, Kittel M, Pethig K, Smets F, Bucsky P, et al. Normalized quantification by real-time PCR of Epstein-Barr virus load in patients at risk for posttransplant lymphoproliferative disorders. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001 Feb;39(2):564-9.
63. Stevens SJ, Verschuuren EA, Verkuujlen SA, Van Den Brule AJ, Meijer CJ, Middeldorp JM. Role of Epstein-Barr virus DNA load monitoring in prevention and early detection of post-transplant lymphoproliferative disease. *Leukemia and Lymphoma*. 2002 Apr;43(4):831-40.
64. Lankester AC, van Tol MJ, Vossen JM, Kroes AC, Claas E. Epstein-Barr virus (EBV)-DNA quantification in pediatric allogeneic stem cell recipients: prediction of EBV-associated lymphoproliferative disease. *Blood*. 2002 Apr 1;99(7):2630-1.
65. Wagner HJ, Cheng YC, Huls MH, Gee AP, Kuehnle I, Krance RA, et al. Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. *Blood*. 2004 May 15;103(10):3979-81.
66. Yancoski J, Danielian S, Ibanez J, Turconi A, Cuarterolo M, Zelazko M, et al. Quantification of Epstein-Barr virus load in Argentinean transplant recipients using real-time PCR. *Journal of Clinical Virology*. 2004 Sep;31(1):58-65.
67. Meerbach A, Wutzler P, Hafer R, Zintl F, Gruhn B. Monitoring of Epstein-Barr virus load after hematopoietic stem cell transplantation for early intervention in post-transplant lymphoproliferative disease. *Journal of Medical Virology*. 2008 Mar;80(3):441-54.
68. Schubert S, Renner C, Hammer M, Abdul-Khaliq H, Lehmkuhl HB, Berger F, et al. Relationship of immunosuppression to Epstein-Barr viral load and lymphoproliferative disease in pediatric heart transplant patients. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2008 Jan;27(1):100-5.
69. Fafi-Kremer S, Morand P, Barranger C, Bargues G, Magro S, Bes J, et al. Evaluation of the Epstein-Barr virus R-gene quantification kit in whole blood with different extraction methods and PCR platforms. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2008 Jan;10(1):78-84.

70. Coppoletta S, Tedone E, Galano B, Soracco M, Raiola AM, Lamparelli T, et al. Rituximab Treatment for Epstein-Barr Virus DNAemia after Alternative-Donor Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology Blood Marrow Transplantation*. Oct 13.

71. Lau AH, Soltys K, Sindhi RK, Bond G, Mazariegos GV, Green M. Chronic high Epstein-Barr viral load carriage in pediatric small bowel transplant recipients. *Pediatric Transplantation*. Jun;14(4):549-53.

72. Schonberger S, Meisel R, Adams O, Pufal Y, Laws HJ, Enczmann J, et al. Prospective, comprehensive, and effective viral monitoring in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biology Blood Marrow Transplantation*. Oct;16(10):1428-35.

73. Lay ML, Lucas RM, Ratnamohan M, Taylor J, Ponsonby AL, Dwyer DE. Measurement of Epstein-Barr virus DNA load using a novel quantification standard containing two EBV DNA targets and SYBR Green I dye. *Virology Journal*.7:252.

APÊNDICE 4 - ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

**MONITORAMENTO PARA VÍRUS DA FAMÍLIA HERPESVIRIDAE EM PACIENTES
SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS**

LUCIANA C. F. GEQUELIN¹, MARIA C. D. ROSSA¹; IRINA N. RIEDIGER¹; SUELI M. NAKATANI¹; CARMEM M. BOMFIM²; LUINE R. VIDAL³; ANA P. BRANDÃO⁴; ALEXANDER W. BIONDO⁵.

¹Laboratório Central do Estado do Paraná, São José dos Pinhais, Brasil

²Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brasil

³Seção de Virologia do Hospital de Clínicas da UFPR, Curitiba, Brasil

⁴Departamento de Medicina Veterinária da UFPR, Curitiba, Brasil

⁵Departamento de Biologia Celular e Molecular da UFPR, Curitiba, Brasil

Resumo: Contexto. As infecções virais mais comuns após transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) estão relacionadas ao vírus da família *Herpesviridae* (CMV, EBV, HSV-1, VZV, HHV-6). O EBV está envolvido em complicação conhecida como desordem linfoproliferativa pós-tranplante (PTLD). O monitoramento dessas infecções por PCR em tempo real e antigenemia para CMV são atualmente as melhores ferramentas para acompanhamento dos pacientes pós-TCTH.

Métodos. Durante o período de julho de 2009 a julho de 2010, um total de 51 pacientes foram monitorados prospectivamente. O exame de PCR para EBV e a antigenemia foram realizados em 601 amostras. E também foram analisadas 93 amostras de sangue por PCR em tempo real qualitativo para CMV, HSV, VZV e HHV6.

Resultados. Quinze pacientes (29%) tiveram resultados detectáveis para o EBV em, pelo menos, uma amostra. Já para CMV, VZV e HHV-6 foram encontrados, respectivamente, 17/51 (33%), 01/31 (3,2%) e 04/15 (26,7%) pacientes com resultados detectáveis. Nenhum paciente obteve exame de PCR positivo para HSV-1 em amostras de sangue.

Conclusão. É fundamental determinar a presença de infecção ativa em pacientes imunossuprimidos para melhorar o acompanhamento e evitar complicações graves relacionadas aos patógenos pesquisados.

INTRODUÇÃO

O vírus Epstein-Barr (EBV), além da mononucleose infecciosa, está associado a linfomas de Hodgkin e não Hodgkin, desordem linfoproliferativa pós-transplante (PTLD), carcinoma de nasofaringe, carcinoma gástrico e outras neoplasias epiteliais (WILLIAMS CRAWFORD, 2006; COHEN, 2000; GULLEY TANG). A PTLD ocorre normalmente durante o primeiro ano pós-transplante. No entanto, pode também acontecer mais tarde, mesmo até 10 anos após o procedimento (OMAR *et al.*, 2009; STYCZYNSKI *et al.*, 2009a; GULLEY TANG). Um estudo multicêntrico com 26.901 pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), a incidência de PTLD foi calculada em quatro diferentes grupos. Em indivíduos sem fatores de risco, a incidência foi de 0.2%. Já pacientes com um, dois ou mais fatores, o percentual foi, respectivamente, de 1,1, 3,6 e 8,1% (LANDGREN *et al.*, 2009).

Após transplante, o citomegalovirus (CMV) pode ocasionar manifestações subclínicas ou assintomáticas com resultados detectáveis no PCR e na Antigenemia. Não obstante, podem acontecer complicações graves que interferem no funcionamento de diversos órgãos (LJUNGMAN *et al.*, 2002). Em vários estudos, foi mostrada a relação entre doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) aguda e crônica e risco de infecção por CMV (MACHADO *et al.*, 2001; OSAROGIAGBON *et al.*, 2000; MATTHES-MARTIN *et al.*, 1998; MEYERS *et al.*, 1986). Os problemas mais frequentes, em TCTH, relacionados ao CMV são pneumonia e complicações gastrointestinais (BARRON *et al.*, 2009; KULJIC-KAPULICA *et al.*). Exames sorológicos devem ser feitos apenas com o intuito de analisar o status imunológico antes do transplante (CASTAGNOLA *et al.*, 2004). A antigenemia é o padrão ouro para diagnóstico. Contudo, vale lembrar que o teste de PCR por tempo real vem ganhando destaque devido à facilidade e tempo de execução (LJUNGMAN *et al.*, 2011). Os índices de reativação no sangue variam de 30 a 70% (ASANO-MORI *et al.*, 2005; JUNGHANSS *et al.*, 2002).

A reativação por *Herpes simplex* tipo 1 (HSV1) ocorre em 80% dos casos de TCTH, quando a profilaxia antiviral não é administrada. Na ausência de tratamento, as complicações mais comuns seriam doença respiratória ou gastrointestinal grave (LJUNGMAN, 1990).

A infecção primária por *Human Herpes vírus 6* (HHV-6) acomete mais de 90% das crianças nos primeiros seis meses de vida (OKUNO *et al.*, 1989). Estudos descrevem que as reativações em imunossuprimidos estão associadas a complicações clínicas graves como a DECH (DE PAGTER *et al.*, 2008; ZERR *et al.*, 2005; WILBORN *et al.*, 1994). Um dos mecanismos possíveis é que o vírus pode aumentar dano tecidual pela resposta inflamatória gerada (DE PAGTER *et al.*, 2008). Estudos recentes o identificaram como causador da encefalite aguda límbica (LJUNGMAN, 2010). E ele pode também ocasionar um atraso na pega de plaquetas pós-TCTH (LJUNGMAN *et al.*, 2000). Cabe enfatizar que [Schönberger](#) e colaboradores encontraram uma incidência de 5% em TCTH (SCHONBERGER *et al.*).

Varicella zoster virus (VZV) é o causador das doenças conhecidas como varicela e herpes zoster (LEUNG *et al.*, 2000). Quando a infecção primária acontece após o transplante, as complicações que podem surgir são: pneumonia hemorrágica, hepatite, retinite e encefalite (BARRON *et al.*, 2009). Vandenbosch e colaboradores verificaram que a doença por VZV é mais freqüente e mais grave em receptores de sangue de cordão umbilical (VANDENBOSCH *et al.*, 2008). Em crianças, a incidência da infecção pós-transplante varia de 23 a 67% (SAUERBREI *et al.*, 1997; NAKAYAMA *et al.*, 1995; HAN *et al.*, 1994; TAKAUE *et al.*, 1994).

Pacientes submetidos ao TCTH, devido ao regime de condicionamento e imunoprofilaxia, estão mais propensos a infecções, reinfecções e reativações (DE PAGTER *et al.*, 2008). O objetivo desse trabalho foi avaliar os resultados dos ensaios quantitativos para o EBV, bem como as proporções de exames detectáveis para os patógenos CMV, HSV-1, VZV e HHV-6 nos indivíduos incluídos no estudo.

MÉTODOS

Um estudo de coorte prospectivo foi realizado com 51 pacientes submetidos ao TCTH alogênico no Serviço de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Brasil, entre julho de 2009 e junho de 2010. Cumpre enfatizar também que o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da

Universidade Federal do Paraná sob nº CAAE 0229.0.208.000-09, CEP num. 313.EXT.019/2009-09.

Ao todo, foram coletadas 601 amostras de plasma (média de 11 amostras por paciente) para a quantificação do EBV e exame de antígenoemia. Também foram realizadas 40 amostras de biópsias para EBV, pertencentes a 12 pacientes diferentes, processadas pelo PCR em tempo real.

Esses mesmos 51 pacientes ainda realizaram ensaios para avaliação de outros herpesvírus em um total de 93 amostras (plasma para CMV e sangue total para os demais vírus).

Coleta e extração das amostras

O material foi coletado em tubo com EDTA com capacidade para 5 ml. As coletas foram realizadas após pega do enxerto, durante o internamento e período em que os pacientes permaneceram em Curitiba, Brasil. Para EBV e antígenoemia, as coletas foram executadas semanalmente ou a cada duas semanas. E para os demais ensaios, foram colhidas as amostras, conforme critério médico. Em seguida, a amostra foi centrifugada e o plasma separado para os exames de PCR para CMV e EBV.

O plasma foi extraído a partir de 200 µl de material e eluído em 60 µl de tampão de eluição na plataforma automatizada do equipamento *EasyMag*[®] (Biomérieux, Boxtel, Netherlands). O DNA extraído foi processado por tempo real no mesmo dia ou no dia posterior. Para extração de sangue total, utilizou-se o kit *Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare, Little Chalfont, [Buckinghamshire](#), UK). O DNA foi extraído a partir de 200 µl de sangue total e eluído em 200 µl de tampão de eluição, conforme instruções do fabricante. O material de biópsia foi mantido em 1 ml tampão de lise (NucliSens Lysis Buffer, Bostel, Netherlands) por 24 horas e posteriormente extraído em uma plataforma off board do aparelho *EasyMag*[®].

Monitoramento da carga viral para EBV

Um fragmento do gene EBNA-2 foi escolhido como alvo para a técnica. Os primers e sonda foram desenhados no programa Primer Express[®] (Applied Biosystems, Foster, CA USA), com o primer forward (5' CTA TCT TGC GTT ACA TGG GGG AC 3'), reverse (5' TGA YAG TTG TTC CTG GTA RGG ATT 3') e probe (5' FAM TGG AAA CCC GTC ACT CT MGB NFQ 3'). A reação de qPCR foi realizada em 25 µl, sendo 12,5 µl de Máster mix universal (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), 300nM de ambos os primers, 200nM da sonda e 5 µl do DNA extraído. Cada corrida contava com um controle negativo (água) e uma curva padrão de quatro pontos quantificada por uma curva de calibração comercial chamada OptiQuant[®] (Acrometrix, Benicia, CA, USA). O ensaio foi padronizado conforme requisitos descritos pelo Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) para sensibilidade, especificidade, precisão e linearidade. A sensibilidade analítica do método foi estimada por análise probit em 88 cópias/ml (58-430) e o limite de quantificação foi de 88 a 4.46×10^5 cópias/ml.

Monitoramento por PCR em tempo real para CMV, EBV, HSV, VZV e HHV6

O qPCR para CMV utilizava os primers forward (5' CTG ACT GTT AAC CTC CTT CCT CAA C-3'), reverse (5' CGA GAC ACC CGT GAC CAA- 3') e sonda (5' 6FAM ACG TTC CTG CAG ACT AT MGB-NFQ 3'), desenhados a partir da região IEN-1. Os PCRs em tempo real qualitativos para HSV1, VZV e HHV6 foram executados com a aquisição de ensaios Alert AmpliMIX[®] (Nanogen Advanced Diagnostics, Torino, Itália), nos quais, primers e sonda foram desenhados, respectivamente, a partir das regiões da glicoproteína D, ORF 29, ORF 13R para HSV1, VZV e HHV6.

Equipamento de PCR em tempo real

Foi utilizado o equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) nas condições de ciclagem padrão (1 ciclo de 50°C por 2 min, 1 ciclo de 95°C por 10 min, 45 ciclos de 95°C por 15 s e de 60°C por 1 min).

Antigenemia para CMV

A imunofluorescência indireta foi realizada utilizando-se o conjunto de reagentes kit CMV Brite™ Turbo de acordo com as orientações do fabricante (IQ® Products, Holanda). Leucócitos polimorfonucleares foram isolados a partir de sangue total coletado com EDTA. Foi adicionado 1 mL de sangue a 14 mL de solução lise de eritrócitos a 4° C. Após 5 a 10 min de incubação a 4° C, o tubo foi centrifugado por 2 minutos a 2500 rpm. Desprezou-se o sobrenadante. Após lavagem com PBS, os leucócitos foram ressuspensos em 1 mL de PBS. Após, contagem de células e ajustou-se a concentração para 2×10^6 leucócitos/mL. Uma quantidade de 100 uL da suspensão foi aplicada a lâmina de microscópio por citocentrifugação por 3 min a 900 rpm. As lâminas foram fixadas utilizando-se o reagente B, permeabilizadas com o reagente C e armazenadas a -20 ° C antes da coloração. Após hidratação das lâminas com PBS, deu-se a incubação com uma mistura de anticorpos CMV pp65 e C10/C11 clones (IQ® Products, Holanda) por 20 min a 37 ° C. Após lavagem em PBS, foram incubadas com anticorpo conjugado a fluoresceína por 20 minutos a 37°C. Após lavagem com PBS, as lâminas foram montadas com tampão de glicerina e visualizadas ao microscópio de epifluorescência. Células com coloração nuclear foram contadas. O resultado semiquantitativo é liberado como número de células reagentes em 200.000 leucócitos.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com os Testes Exato de Fischer ou Q-quadrado do software GraphPad Prism version 5.03 for Windows (*GraphPad Software Inc, San Diego, Califórnia, USA*).

RESULTADOS

As doenças de base mais prevalentes na população em estudo foram anemia aplástica severa, anemia de Fanconi, leucemia mielóide aguda e crônica. Dos 51 pacientes, 12 foram a óbito por razões não identificadas no estudo. Havia 32 indivíduos do sexo masculino e 19 do sexo feminino. E a mediana de idade foi de 16 anos (1 a 50 anos). A tabela 1 alista o tipo de transplante realizado e a fonte de células-tronco utilizada.

TABELA 1 - NÚMERO DE TRANSPLANTES ALOGÊNICOS APARENTADOS E NÃO APARENTADOS E DIFERENTES FONTES DE CÉLULAS PROGENITORAS NOS PACIENTES INSERIDOS NESSE ESTUDO

TIPO DE TRANSPLANTE	FONTE DE CÉLULAS PROGENITORAS			TOTAL
	MEDULA ÓSSEA	CORDÃO UMBILICAL	SANGUE PERIFÉRICO	
ALOGÊNICO APARENTADO	22	01	03	26
ALOGÊNICO NÃO APARENTADO	18	07	00	25
TOTAL	40	08	03	51

Nas 601 amostras analisadas para EBV, 532 apresentaram resultado indetectável. Ademais, 69 foram detectáveis, sendo 56 com resultado abaixo de 1.000 cópias/ml e apenas 13 acima desse valor (gráfico1).

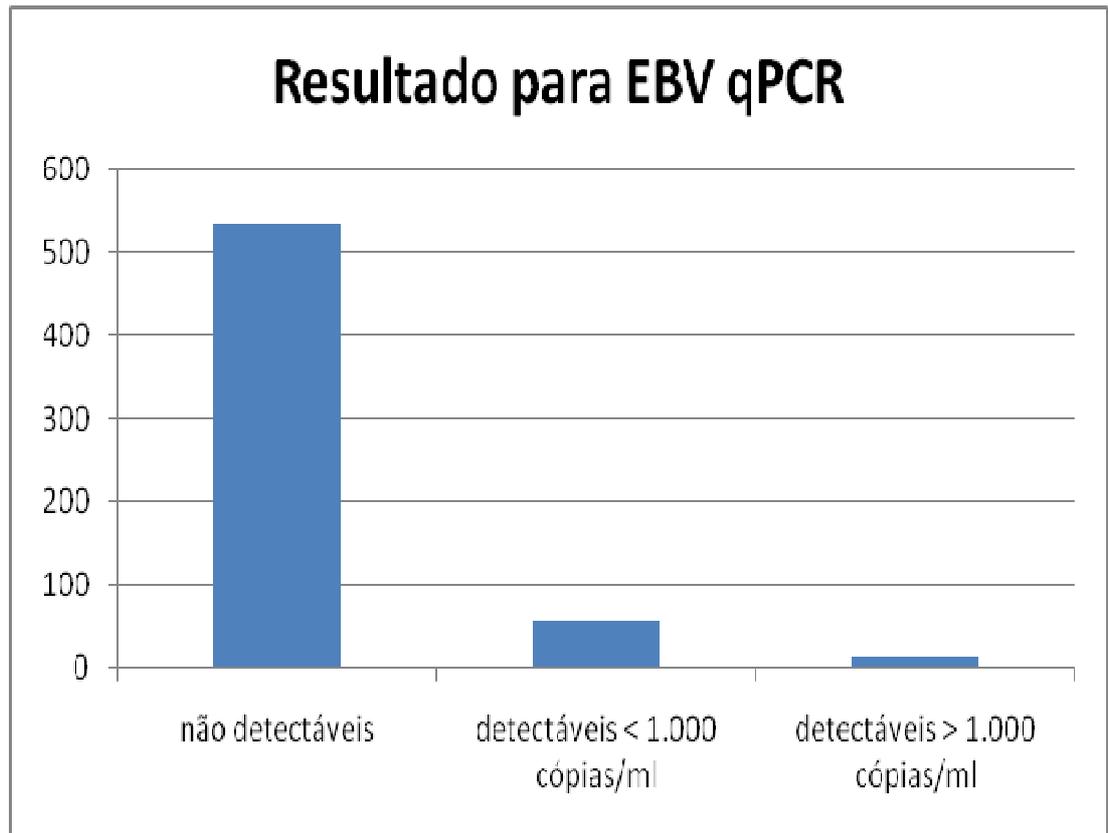


GRÁFICO 1 – RESULTADO DAS 601 AMOSTRAS ANALISADAS POR qPCR PARA EBV

Com relação aos fatores de risco para reativação do EBV e do CMV, a análise multivariada teve os resultados descritos na tabela 2.

TABELA 2 - FATORES DE RISCO PARA REATIVAÇÃO DO EBV NOS PACIENTES QUE APRESENTARAM CARGA VIRAL PARA EBV DETECTÁVEL E PARA REATIVAÇÃO DO CMV NOS PACIENTES QUE APRESENTARAM ANTIGENEMIA REAGENTE

FATOR DE RISCO		Carga viral para EBV Detectável (n= 15 pacientes)	Carga viral para EBV Não Detectável (n= 36 pacientes)	P*	Antigenemia reagente (n= 17 pacientes)	Antigenemia não reagente (n= 34 pacientes)	P*
Sexo	Masculino	10	22	0,8	9	23	0,4
	Feminino	5	14		8	11	
DOENÇAS	ALD	01	01	0,5	01	01	1,0
	AAS	02	08	0,7	04	06	0,7
	AF	01	08	0,2	04	05	0,5
	LLA	03	02	0,1	01	04	0,6
	LMA	02	06	1,0	02	06	0,7
	LMC	02	05	1,0	03	04	0,7
	SCH	01	01	0,5	01	01	1,0
	SWA	03	01	0,07	01	03	1,0
	Outro	00	04	-	00	04	-
Reativação do CMV		07	09	0,2	-	-	-
Reativação do EBV		-	-		05	09	1,0
TCTH aparentado		02	23	0,002	09	16	0,8
TCTH não aparentado		13	13		08	18	
Fonte de células progenitoras	MO	13	27	0,5	13	27	1,0
	SCUP	2	6	1,0	3	05	1,0
	CTP	0	3	-	1	2	1,0

ALD: Adrenoleucodistrofia, ASS: Anemia aplástica severa, AF: Anemia de fanconi, LLA: leucemia linfóide aguda, LMA: leucemia mielóide aguda, LMC: leucemia mielóide crônica, SCH: Síndrome de Chediak Higashi, SWA: síndrome de Wiskott Aldrich, CMV: Citomegalovírus, TCTH: Transplante de células tronco-hematopoiéticas, MO: medula óssea, SCUP: sangue de cordão umbilical e placentário, CTP: células tronco periféricas. *P: Calculado com o Teste exato de Fisher ou Q-quadrado, com um intervalo de confiança de 95%.

Nas amostras de biópsia, foram observados 14 resultados detectáveis para EBV em cinco pacientes diferentes e 26 não detectáveis em sete pacientes. Os cinco pacientes com biópsia detectável também apresentaram níveis de EBV no plasma, conforme tabela 3.

TABELA 3 - RESULTADOS PARA EBV EM AMOSTRAS DE BIÓPSIAS E PLASMA DE CINCO PACIENTES DIFERENTES

Paciente	Resultado da biópsia	EBV detectável no plasma	Tempo em que PCR permaneceu positiva para EBV no plasma
1	Detectável	09 amostras	47 dias
2	Detectável	03 amostras	05 dias
3	Detectável	06 amostras	27 dias
4	Detectável	05 amostras	24 dias
5	Detectável	17 amostras	82 dias

Na tabela 4, foram analisados o número de pacientes testados para cada exame e o percentual de indivíduos com o resultado detectável para cada um dos patógenos analisados.

TABELA 4 - RESULTADOS DOS ENSAIOS PARA EBV, CMV, HSV-1, VZV E HHV-6 NOS PACIENTES DO ESTUDO

Exame	EBV	CMV	HSV-1	VZV	HHV-6
Número de pacientes que realizaram o teste	51	51	35	31	15
Número de pacientes com resultado detectável	15	17	00	01	04
Porcentagem	29,4%	33,3%	-	3,2%	26,7%

DISCUSSÃO

O ensaio para determinar a carga viral é atualmente a melhor ferramenta para detecção e quantificação do EBV, embora a confirmação laboratorial da PTLD requiera exame de biópsia e análise histológica (STYCZYNSKI *et al.*, 2009b). Uma das grandes vantagens do desenvolvimento de um método próprio é o preço. O ensaio quantitativo em duplicata apresentou um custo total de R\$ 16,18; incluindo primers, sonda, *master mix*, placa e adesivo ópticos. Preço bem menor quando comparado a dois métodos comerciais *Alert AmpliMIX*[®] (Nanogen Advanced Diagnostics, Torino, Itália) e *Artus*[®] (QIAGEN, Hilden, Alemanha) com valores unitários respectivos de R\$ 96,00 e R\$108,95.

Na avaliação das 601 amostras para EBV, 69 tiveram resultados positivos. O percentual foi de 11,5% e 88,5% para amostras detectáveis e não detectáveis, respectivamente.

As treze coletas com carga viral acima de 1.000 cópias/ml pertenciam a cinco pacientes diferentes. Interessante notar que todos eles foram submetidos ao TCTH não aparentado, quatro eram menores de 17 anos e possuíam sorologia pré-transplante negativa para EBV, confirmando que altas cargas virais são encontradas com mais frequência em pacientes jovens, submetidos ao transplante alogênico não aparentado e com infecção primária para EBV pós-transplante (GULLEY TANG). Embora, na análise multivariada, apenas o tipo de transplante foi estatisticamente significativo ($p < 0.05$).

Houve 56 resultados quantificados para EBV abaixo de 1.000 cópias/ml. Isso evidencia que reativações pós-transplante podem ocorrer, muitas vezes sem qualquer dano ao paciente.

Embora alguns pacientes apresentassem análise de biópsia detectável para EBV, nenhum caso foi confirmado histologicamente para PTLD. Existem, pelo menos, duas explicações para a ausência dessa doença no Serviço de TMO: tratamento preventivo antes da instalação da PTLD ou não notificação dos casos.

Para antigenemia, 39 amostras foram reagentes, 551 não reagentes e onze não realizadas. Dos 51 pacientes que realizaram o teste, 17 deles (33,3%) tiveram, pelo menos, um resultado de antigenemia reagente para CMV. Han e colaboradores encontraram resultado similar, 39%, em seu estudo (HAN, 2007). Ao comparar os métodos de antigenemia e PCR em tempo real para CMV, é válido informar que 11/14 pacientes obtiveram resultados detectáveis e três indivíduos não realizaram o ensaio de PCR.

O HSV-1 não foi detectado nos pacientes analisados neste estudo. A PCR é uma adequada técnica para diagnóstico, contudo a viremia nem sempre é elevada para HSV-1.

Nos exames de PCR para VZV, somente um paciente dos 31 analisados obteve resultado detectável. A sorologia pré-transplante e a imunização, importante ressaltar, não foram avaliadas no presente estudo.

O percentual de resultados detectáveis para HHV-6 foi de 26.7%. O exame foi realizado em apenas 15 dos 51 pacientes inseridos no estudo, o que dificulta uma real avaliação da incidência de reativações causadas por esse vírus. Além disso, o ensaio qualitativo, utilizado para o experimento, não faz distinção entre infecção ativa e latente (LJUNGMAN).

Uma das limitações do estudo foi o tamanho da amostragem para análise de incidência de reativações virais para HSV, VZV e HHV-6.

Concluiu-se com esse estudo que é fundamental determinar a presença de infecção ativa em pacientes com imunidade comprometida. Com exceção do HSV-1, todos os outros ensaios apresentaram resultados detectáveis e foram observadas incidências razoavelmente altas para EBV, CMV e HHV-6. O acompanhamento pós-transplante facilita a decisão clínica de tratamento e evita complicações graves relacionadas aos patógenos pesquisados.

REFERÊNCIAS

- ASANO-MORI, Y. *et al.* High-grade cytomegalovirus antigenemia after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 36, n. 9, p. 813-9, 2005.
- BARRON, M. A. *et al.* Relationship of reconstituted adaptive and innate cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses with CMV viremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 49, n. 12, p. 1777-83, 2009.
- CASTAGNOLA, E. *et al.* Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation in children. *Hum Immunol*, 65, n. 5, p. 416-22, 2004.
- COHEN, J. I. Epstein-Barr virus infection. *New England Journal of Medicine*, 343, n. 7, p. 481-92, 2000.
- DE PAGTER, P. J. *et al.* Human herpesvirus type 6 reactivation after haematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol*, 43, n. 4, p. 361-6, 2008.
- GULLEY, M. L.; TANG, W. Using Epstein-Barr viral load assays to diagnose, monitor, and prevent posttransplant lymphoproliferative disorder. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, n. 2, p. 350-66,
- HAN, C. S. *et al.* Varicella zoster infection after bone marrow transplantation: incidence, risk factors and complications. *Bone Marrow Transplant*, 13, n. 3, p. 277-83, 1994.
- HAN, X. Y. Epidemiologic analysis of reactivated cytomegalovirus antigenemia in patients with cancer. *J Clin Microbiol*, 45, n. 4, p. 1126-32, 2007.
- JUNGHANSS, C. *et al.* Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood*, 99, n. 6, p. 1978-85, 2002.
- KULJIC-KAPULICA, N. *et al.* Monitoring of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Vojnosanit Pregl*, 67, n. 5, p. 375-8,
- LANDGREN, O. *et al.* Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 113, n. 20, p. 4992-5001, 2009.
- LEUNG, T. F. *et al.* Incidence, risk factors and outcome of varicella-zoster virus infection in children after haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 25, n. 2, p. 167-72, 2000.
- LJUNGMAN, P. Molecular monitoring of viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *International Journal of Hematology*, 91, n. 4, p. 596-601,
- LJUNGMAN, P. *et al.* Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis*, 34, n. 8, p. 1094-7, 2002.

_____. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematol Oncol Clin North Am*, 25, n. 1, p. 151-69,

_____. High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. *Br J Haematol*, 111, n. 3, p. 774-81, 2000.

MACHADO, C. M. *et al.* Extended antigenemia surveillance and late cytomegalovirus infection after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*, 28, n. 11, p. 1053-9, 2001.

MATTHES-MARTIN, S. *et al.* CMV-viraemia during allogeneic bone marrow transplantation in paediatric patients: association with survival and graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*, 21 Suppl 2, n. S53-6, 1998.

MEYERS, J. D. *et al.* Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis*, 153, n. 3, p. 478-88, 1986.

NAKAYAMA, H. *et al.* Herpes zoster in children with bone marrow transplantation: Report from a single institution. *Acta Paediatr Jpn*, 37, n. 3, p. 302-7, 1995.

OKUNO, T. *et al.* Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin Microbiol*, 27, n. 4, p. 651-3, 1989.

OMAR, H. *et al.* Targeted monitoring of patients at high risk of post-transplant lymphoproliferative disease by quantitative Epstein-Barr virus polymerase chain reaction. *Transplant Infectious Disease*, 11, n. 5, p. 393-9, 2009.

OSAROGIAGBON, R. U. *et al.* CMV antigenemia following bone marrow transplantation: risk factors and outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*, 6, n. 3, p. 280-8, 2000.

SAUERBREI, A. *et al.* Varicella vaccination in children after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 20, n. 5, p. 381-3, 1997.

SCHONBERGER, S. *et al.* Prospective, comprehensive, and effective viral monitoring in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biology Blood Marrow Transplantation*, 16, n. 10, p. 1428-35,

STYCZYNSKI, J. *et al.* Outcome of treatment of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in hematopoietic stem cell recipients: a comprehensive review of reported cases. *Transplant Infectious Disease*, 11, n. 5, p. 383-92, 2009a.

_____. Management of HSV, VZV and EBV infections in patients with hematological malignancies and after SCT: guidelines from the Second European Conference on Infections in Leukemia. *Bone Marrow Transplant*, 43, n. 10, p. 757-70, 2009b.

TAKAUE, Y. *et al.* Regeneration of immunity and varicella-zoster virus infection after high-dose chemotherapy and peripheral blood stem cell autografts in children. *Bone Marrow Transplant*, 14, n. 2, p. 219-23, 1994.

VANDENBOSCH, K. *et al.* Varicella-zoster virus disease is more frequent after cord blood than after bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14, n. 8, p. 867-71, 2008.

WILBORN, F. *et al.* Herpesvirus type 6 in patients undergoing bone marrow transplantation: serologic features and detection by polymerase chain reaction. *Blood*, 83, n. 10, p. 3052-8, 1994.

WILLIAMS, H.; CRAWFORD, D. H. Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice. *Blood*, 107, n. 3, p. 862-9, 2006.

ZERR, D. M. *et al.* Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*, 40, n. 7, p. 932-40, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO 2 – TCLE APLICADO PARA CONTROLES SADIOS

ANEXO 3 – PRINCIPAIS INSUMOS E REAGENTES NECESSÁRIOS PARA qPCR

ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA



Curitiba, 06 de outubro de 2009.

Ilmo (a) Sr. (a)
Luciana Cristina Fagundes Gequelin
Alexander Welker Biondo
Neste

Prezados Pesquisadores:

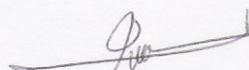
Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “QUANTIFICAÇÃO DO VÍRUS EPSTEIN-BARR PELO MÉTODO DE PCR EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS DE PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UFPR”, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 29 de setembro de 2009. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0229.0.208.000-09
CEP: 313.EXT.019/2009-09

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 06 de abril de 2010.

Atenciosamente,



Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO 2 - TCLE APLICADO PARA CONTROLES SADIOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS CONTROLES SADIOS

“Desenvolvimento de teste diagnóstico por PCR em tempo real para leptospirose humana e estudo epidemiológico molecular de isolados clínicos de pacientes do Paraná”

Investigador: Irina Nastassja Riediger

Local da Pesquisa: Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR)

Endereço: R. Sebastiana Santana Fraga, 1001, Guatupê – São José dos Pinhais. CEP: 83060-500

Telefones: (41) 3299-3266 ou 3299-3272

Nome do participante: _____ **Código:** _/_/_/_/_/_

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa coordenada por um profissional de saúde agora denominado *investigador*. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente. O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

Neste estudo, pretende-se desenvolver um novo teste para o diagnóstico da leptospirose, a doença do rato. A leptospirose é causada por uma bactéria e é transmitida pelo contato com a urina de animais contaminados, ou com água contaminada com a urina desses animais. Sabemos que durante o período inicial da doença as bactérias contaminam o sangue das pessoas. Até agora, o diagnóstico tem sido feito usando exames que mostram a reação do organismo humano à presença das bactérias (pesquisa de anticorpos). Esses exames são muito úteis, mas muitas vezes são demorados ou só conseguem dizer se o paciente tem leptospirose ou não depois que os sintomas estão instalados há pelo menos uma semana. Esse tempo pode ser muito longo se o paciente tiver uma forma grave de leptospirose. Para conseguir diagnosticar a leptospirose durante a primeira semana da doença foi desenvolvido um novo exame para diagnosticar a leptospirose, baseado na detecção do DNA da bactéria (PCR). Os exames que já são realizados são feitos numa parte do sangue chamada soro. O exame novo é feito no sangue completo (total), por isso vamos colher amostras diferentes para os dois tipos de exame. Para termos certeza de que o teste novo funciona e é seguro (verificar especificidade), precisamos testar também amostras de pessoas saudáveis; isso é, se dará resultados positivos para pacientes com leptospirose e resultados negativos para pessoas saudáveis - que não têm leptospirose.

PROPÓSITO DO ESTUDO

Queremos desenvolver a avaliar um teste novo para diagnosticar a leptospirose. Esperamos que esse teste consiga confirmar a doença antes dos testes convencionais. Assim o médico poderá tratar corretamente o paciente, que terá menos complicações por causa da doença. Para o desenvolvimento, o resultado desse teste novo será avaliado junto com o resultado dos exames que são usados normalmente, tanto para pacientes com leptospirose quanto para as pessoas saudáveis (controles sadios). O teste novo, além de confirmar o diagnóstico, vai poder dizer qual a quantidade de leptospiras nas amostras dos pacientes. Faremos também outros testes para dizer qual é a espécie e a cepa da bactéria causadora da doença. Por isso, o DNA extraído das suas amostras vai ser guardado num freezer especial (a -70°C) para que se possa testá-lo também como controle nos testes de identificação.

SELEÇÃO

Serão convidados para participar desse estudo como controles saudáveis pessoas que se inscreverem voluntariamente para a doação de hemoderivados no Banco de Sangue do HC-UFPR.

PROCEDIMENTOS

Para fazer os exames, serão necessárias amostras de sangue. A coleta de sangue será feita por punção venosa na veia do seu braço, ou seja, igual à coleta realizada para outros exames de sangue. Serão coletados dois tubos de sangue diferentes: um para separar o soro e outro para extrair o DNA. A coleta de sangue sempre será feita por um profissional capacitado, empregando a técnica de coleta padrão e usando material adequado. Como é necessário perfurar sua veia com uma agulha, em alguns casos pode ocorrer um pequeno sangramento ou desenvolvimento de uma mancha roxa no local da coleta, o que pode causar desconforto ou dor no local da picada da agulha.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir de participar, em qualquer momento do estudo. Você não precisa responder a qualquer pergunta durante a entrevista. Você pode, ainda, não permitir que colham o seu sangue, se esta for sua opção. Sua recusa em participar no estudo ou em parte do mesmo, ou sua decisão de interromper sua participação, não afetará seu cuidado futuro de nenhuma forma, nem prejudicará suas relações com Hospital de Clínicas UFPR no presente ou no futuro. Uma cópia deste formulário lhe será dada e você pode ficar com ela. Você não será responsável por nenhuma despesa associada a este estudo nem receberá nenhuma remuneração pela participação.

PERMISSÃO PARA REVISÃO E ACESSO AOS REGISTROS E CONFIDENCIALIDADE

Iremos coletar informações sobre você, que serão mantidas de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, e membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância. Em todos esses registros um código substituirá seu nome.

CONTATO PARA PERGUNTAS

Se você ou seus parentes tiver(em) alguma dúvida com relação ao estudo ou direitos do participante, você deve contatar a Bioquímica Irina Riediger pelo telefone (41) 3299-3266 ou 3299-3272. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um participante de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

AUTORIZAÇÃO PARA BANCO DE AMOSTRAS E DNA

Eu autorizo que o sangue e o DNA que sobram, após a realização dos exames para este projeto de pesquisa, sejam armazenados em um banco de amostras no LACEN-PR, para uso no futuro em outros projetos de pesquisa que ajudarão a compreender melhor a leptospirose ou ajudarão no desenvolvimento de novos testes. Nenhum soro será utilizado sem a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-UFPR e a minha identidade será sempre mantida em sigilo.

() Eu autorizo que o sangue que sobrar deste estudo seja incluído no banco de amostras do LACEN-PR.

() Eu não autorizo, o sangue que sobrar deste estudo deverá ser jogado fora.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito. Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas. Eu recebi uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

NOME DO PARTICIPANTE

ASSINATURA

DATA

NOME DO PESQUISADOR

ASSINATURA

DATA

(pessoa que tomou o TCLE)

ANEXO 3 - PRINCIPAIS INSUMOS E REAGENTES NECESSÁRIOS PARA qPCR

- *MicroAmp optical 96-well Reaction Plate*: placa com capacidade para 96 amostras de polipropileno compatível para uso nos sistemas de PCR, sistemas de PCR quantitativo em tempo real e sequenciadores automáticos de DNA ABI Prism;
- Adesivos ópticos utilizados como vedantes em placas de 96 amostras;
- PCR *Master mix* universal (Applied Biosystems, Foster, CA – USA), composto de reagentes necessários para a realização de PCR em tempo real, exceto iniciadores e sondas. Fornecido 2x concentrado. Composto por: enzima Taq DNA polimerase, enzima UNG, dNTPs com dUTP, referência passiva e tampão. Suficiente para 200 reações;
- *Taqman MGB Probe*: sonda marcada com fluorescência (5' 6FAM, VIC, TET ou NED e 3' MGB - quencher não fluorescente), utilizada nas reações de PCR para quantificação em tempo real nos sistemas *Geneamp 5700 Sequence Detection System*, ABI Prism 7700, ABI PRISM 7900, ABI PRISM 7000, 7500 e 7300 Real Time PCR. Concentração: 6.000 pmol;
- Primers purificados por método cromatográfico, contendo certificado de análise do fornecedor com dados da sequência, peso molecular, concentração e método de purificação;
- Microtubos e ponteiros com filtro (capacidade para 20, 200 e 1000 µl) descartáveis e livres de DNase e RNase;
- Pipetas automáticas com capacidade para 20, 200 e 1000 µl;
- Centrífugas para tubos de 1,5 ml e para placas ópticas.