

Citomegalovírus. A doença no homem e as dificuldades de diagnóstico laboratorial

Rosely Locatelli¹

Resumo

O citomegalovírus humano (HCMV) é um dos patógenos oportunistas mais importantes em pacientes imunocomprometidos, como aqueles com AIDS, fetos e receptores de transplante de órgão. Reativação do vírus latente é a maior consequência nos imunocomprometidos. A disponibilidade da terapia eficiente aumenta a necessidade de um método rápido e sensível para detecção do CMV. Na última década, vários grupos de investigadores começaram a usar a cobaia para investigar a patogênese, o diagnóstico e a prevenção da infecção por citomegalovírus humano. O método para testar amostras de soro por ELISA em placa não estabelece se o paciente tem uma infecção recente ou passada. Foi demonstrado que as células mononucleares humanas do sangue periférico (PBMC) de indivíduos com infecção ativa por CMV secretam anticorpos espontaneamente *in vitro* contra HCMV. A produção induzida de anticorpos *in vitro* anti-GPCMV (IVIAP-GPCMV) foi desenvolvida e padronizada utilizando cobaias. A técnica de ELISA e o IVIAP são específicos, sensíveis e rápidos. No entanto, apenas o IVIAP pode diferenciar entre infecção passada e recente.

Palavras-chave: citomegalovírus; ELISA; AIDS; sorologia; IVIAP; anticorpos.

LOCATELLI, R. Citomegalovírus. A doença no homem e as dificuldades de diagnóstico laboratorial. *UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde*, Londrina, v. 2, n. 1, p. 123-134, out. 2000.

Principais Aspectos Epidemiológicos do Citomegalovírus

O citomegalovírus (CMV) é um vírus constituído por ácido desoxirribonucléico (DNA) de fita dupla, envelopado, pertencente à família Herpesviridae, sub-família Betaherpesvirinae. Pode infectar vários animais, inclusive o homem; são espécie-específicos e morfologicamente indistinguíveis dos demais membros do grupo (Stinsk, 1990).

A infecção primária pelo CMV é, em geral, benigna e frequentemente seguida por infecção latente (Pass, 1985), propriedade comum aos demais herpesvírus (Drew, 1992). O sítio exato de latência não é conhecido e o mecanismo de reativação, decorrente de diferentes estímulos, é pouco esclarecido (Yagyu *et al.*, 1993). As recorrências estão associadas ao abrigo intermitente do vírus em um único ou em múltiplos sítios, em significativa proporção de pacientes soropositivos (Balthesen *et al.*, 1993; Pollock & Virgin, 1995).

No decorrer da evolução, várias cepas diferentes emergiram, apresentando variações genômicas e antigênicas. Sabe-se que as reinfecções podem ocorrer em inúmeras pessoas, provavelmente devido às disparidades antigênicas e genômicas. Como os demais herpesvírus, o CMV é considerado um oncovírus (Alford & Willian, 1990).

¹ Docente de Microbiologia e Imunologia da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) e bioquímica do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Endereço para correspondência: Av. Paris, 675. Jardim Piza. 86041-140 Londrina, Paraná, Brasil.

O citomegalovírus é um importante patógeno para fetos (Chandler *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1998), receptores de transplante (enxerto) e pacientes com imunodeficiência adquirida, sendo responsável pela alta taxa de morbidade (Boland *et al.*, 1990; Pillay & Griffiths, 1992). O CMV pode também atuar como cofator para aumentar a proporção de pacientes em que o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) leva à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Griffiths, 1993; Koval *et al.*, 1995; Lener-Tung *et al.*, 1991).

Devido à alta prevalência do CMV na população adulta no Brasil (superior a 90%), as crianças são mais expostas a esta infecção. Nos recém-natos, no entanto, a presença de anticorpos maternos pode produzir efeitos na incidência e gravidade da infecção pelo CMV, protegendo a criança. As crianças com idade superior a 5 meses perdem estas imunoglobulinas maternas, ficando mais expostas à infecção pelo CMV (Fowler, Stagno & Pass, 1993; Fukushima *et al.*, 1993).

A transmissão ocorre por contato direto ou indireto entre as pessoas. As fontes de infecção conhecidas incluem urina, fezes, lágrima, sangue, secreções de orofaringe, cérvix, vagina, esperma e leite materno. A excreção do vírus persiste por anos após a infecção (Alford & William, 1990).

O impacto clínico da infecção por CMV pode diferir de acordo com a idade e estado imunológico do hospedeiro, podendo a infecção ocorrer em qualquer fase da vida. Fora do período neonatal, a infecção, na maioria dos pacientes (90%), é assintomática. Caso ocorram manifestações clínicas, de forma geral a doença cursa como uma síndrome de mononucleose infecciosa, podendo haver aparecimento de linfócitos atípicos no sangue periférico; porém, não há geração de anticorpos heterófilos (Drew, 1992). A infecção por citomegalovírus pode causar uma imunodepressão transitória, porém profunda, no indivíduo imunocompetente (Michelson, 1994).

A infecção por CMV ocorre de forma endêmica e tem distribuição universal, não havendo predominância particular quanto a sexo, idade, raça ou distribuição sazonal. No entanto, os fatores sócio-econômicos contribuem para seu aumento (Krech, 1973). Assim, em países subdesenvolvidos, as taxas são elevadas nos primeiros anos de vida, podendo atingir de 90 a 100% nos seis primeiros anos (Alford & William, 1990). O CMV infecta entre 40 e 100% de adultos no mundo, dependendo dos fatores sócio-econômicos. A falta de higiene e a intimidade do contato dentro da população de baixa renda são de grande importância para as elevadas taxas de infecção. No Brasil, as taxas de soroprevalência são elevadas em adultos (superiores a 90%) (Linhares *et al.*, 1993).

As múltiplas transfusões sanguíneas aumentam o risco de infecção por CMV, principalmente de produtos enriquecidos de leucócitos (Galea & Urbaniak, 1993). A cobaia (*Cavia porcellus*) representa um sistema no qual a patogênese da infecção e doença apresentam grande analogia para as diversas síndromes humanas (Bia *et al.*, 1983; Griffith & Aquino-de-Jesus, 1991).

Os Principais Problemas da Infecção por Citomegalovírus nos Imunossuprimidos

O citomegalovírus humano é um dos patógenos oportunistas mais importantes nos pacientes imunocomprometidos, como os receptores de transplante ou pacientes com AIDS, sendo responsável por infecções que colocam em risco a vida destes pacientes (Drew, 1992; Flo *et al.*, 1993; Gallant *et al.*, 1992; GERNA *et al.*, 1992; 1994; 1995; Pollock & Virgin, 1995).

O citomegalovírus tem se tornado o patógeno mais importante após o transplante. A incidência e gravidade da infecção pelo CMV após o transplante depende de vários fatores, tais como a carga viral (Stratta *et al.*, 1992), a soropositividade do doador, os níveis iniciais de anticorpos protetores presentes no receptor, a intensidade e o tipo de imunossupressão administrada e o tipo de transplante. Esta infecção pode ser fatal em pacientes soronegativos quando o vírus é transmitido pelo órgão transplantado a partir de doador soropositivo (Conti, *et al.*, 1993; Drouet *et al.*, 1995; Fukushima *et al.*, 1993; Griffiths, 1993; Hackman *et al.*, 1994; Pass *et al.*, 1983; Pass, 1985; Lemström *et al.*, 1993; Linhares

et al., 1993; Waldman *et al.*, 1993; Speir *et al.*, 1994; Stratta *et al.*, 1992; Ustinou *et al.*, 1993; Nolte *et al.*, 1995; Reusser *et al.*, 1991; Söderberg *et al.*, 1993).

Manifestações clínicas ocorrem, em geral, 1 a 4 meses após o transplante. Terapias com anticorpos anti-linfocitários, como a globulina anti-linfocitária e OKT3, são reconhecidas como os promotores mais potentes de infecção pelo CMV nestes grupos de pacientes (Camargo, 1993). O espectro da doença constitui uma síndrome de febre, leucopenia, artralgia e mialgia. Complicações que ameaçam a vida são principalmente pneumonia, hepatites, enterites e encefalites. As infecções clinicamente significativas são mais frequentes em receptores na infecção primária por CMV, habitualmente mais severa do que a secundária (Conti *et al.*, 1993).

O tratamento da doença citomegálica consiste em terapia antiviral após a detecção precoce da infecção pelo CMV, redução da imunossupressão, otimização do suporte nutricional e metabólico, profilaxia e/ou tratamento de super infecção, uso seletivo de imunoglobulina intravenosa, e monitoramento da resposta à terapêutica através de exame laboratorial (Stratta *et al.*, 1992). Duas drogas, Ganciclovir e Foscarnet, foram aprovadas pela Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (FDA) para o tratamento de retinite causada pelo CMV (Darby, 1993; Dieterich *et al.*, 1993; Drew, 1992; Gerna *et al.*, 1995; Katlama, 1993; Saral, 1993).

Nos pacientes com AIDS as manifestações clínicas mais frequentes são as retinites e as doenças gastrointestinais, encefalites e encefalopatias. Autópsias e estudos clínicos indicam que 90% dos pacientes com AIDS desenvolvem infecção ativa por CMV durante sua doença, mais de 40% podem ir a óbito, sendo o agente mais comum entre as infecções virais (Cinque *et al.*, 1992; Conti *et al.*, 1993; Dieterich *et al.*, 1993; Drew, 1992; Katlama, 1993).

As Dificuldades no Diagnóstico da Doença Citomegálica

O diagnóstico da doença depende de uma combinação de dados virológicos e clínicos junto com a avaliação dos fatores de risco do paciente, como no caso dos fetos e dos imunocomprometidos (Legendre *et al.*, 1993; Pillay & Griffiths, 1992; van der Berg *et al.*, 1993; Yamamoto, 1998).

O diagnóstico oportuno da infecção por HCMV é considerado urgente para permitir a eficácia e especificidade do emprego das drogas antivirais. Vários métodos vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos, incluindo determinação e quantificação da viremia, técnicas com anticorpos monoclonais ("Shell Vial" e Antigenemia), detecção de DNA ou RNAm do CMV através de reação em cadeia da polimerase (PCR) ou testes de "dot blot" (George & Rinaldo, 1994; Gerna *et al.*, 1994; Storck *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 1994, Yamamoto, 1998).

Os processos de rejeição podem agravar o acometimento no paciente com infecção ativa por CMV e a sintomatologia desta infecção assemelha-se ao processo de rejeição. Assim, o diagnóstico rápido é de vital importância para a eficácia do tratamento, de forma que a imunossupressão deve ser reduzida, pois agrava a doença e a terapia antiviral deve ser instituída imediatamente (Dieterich *et al.*, 1993).

Isolamento do vírus

Para a detecção do CMV em espécimes clínicos pela multiplicação do vírus em cultura de tecidos, permanece o método clássico, com o qual os novos sistemas de detecção devem ser comparados. Citomegalovírus humano é altamente espécie-específico e se desenvolve em cultura de fibroblastos humanos. O efeito citopático característico (CPE) é discreto e consiste de pequeno arredondamento celular, permitindo a observação da produção de partículas virais completas e infecciosas que produzem um efeito citopático característico, o que usualmente se desenvolve 2 a 3 semanas após a incubação, mas podem surgir, em alguns casos, apenas após 6 semanas; isto se deve a sua multiplicação em

cultura de células ser lenta. As amostras clínicas comumente inoculadas são urina, saliva e o concentrado de componentes do sangue coletados sem heparina (Locatelli, *et al.*, 1995; Pillay & Griffiths, 1992; Söderberg *et al.*, 1993). Este método, embora eficiente, é bastante demorado, não permitindo o diagnóstico precoce da doença em recém-nascidos e nos pacientes imunocomprometidos (Locatelli & Granato, 1996; Locatelli, 1996; Yamamoto, 1998).

Sorologia

A detecção rápida de anticorpos contra o citomegalovírus humano em soro de pacientes é importante em certas ocasiões, como nas triagens realizadas em bancos de sangue, nos testes de doadores e receptores de órgãos antes do transplante, e para estabelecer o diagnóstico da infecção em mulheres antes e durante a gestação. O diagnóstico sorológico e de infecção viral normalmente depende da detecção de soroconversão, ou do aumento igual ou superior a 4 vezes o título de anticorpos já existentes (Locatelli & Granato, 1996-c; Vornhagen *et al.*, 1994), ou a presença de IgM específica (Vornhagen *et al.*, 1994), empregando métodos sensíveis para a detecção de anticorpos IgG e IgM anti-CMV (Boland *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1994). Existem testes comerciais que servem para detectar IgM anti-HCMV; porém, os resultados variam amplamente e a relação com os resultados obtidos com os diferentes “kits” é insatisfatória (Weber *et al.*, 1994).

O paciente imunocomprometido é caracterizado pela inabilidade de resposta imune normal, especialmente para a reativação de infecção latente (como ocorre muitas vezes com CMV), dificultando a utilização da sorologia como método de escolha para o diagnóstico nestes pacientes (Bale *et al.*, 1993; Pillay & Griffiths, 1992).

Técnicas com anticorpos monoclonais

O diagnóstico laboratorial avançou com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais para o CMV. Dois métodos distintos que empregam esses anticorpos são “Shell Vial” e Antigenemia. O método denominado “Shell Vial” baseia-se no cultivo da amostra para pesquisa de antígenos precoces produzidos pelo vírus ao multiplicar-se na célula, os quais são detectados por imunofluorescência realizada sobre as células do cultivo, fornecendo resultados em 24 a 72 horas (Storck *et al.*, 1994), sendo altamente específico; porém, a sensibilidade do teste falha (Bennion, Carlquist & Wright, 1995), principalmente quando a viremia é baixa (George & Rinaldo, 1994; Moore, Shepherd & Hoskins, 1990).

A Antigenemia consiste na detecção, por coloração imunofluorescente, de antígenos em polimorfonucleares e mononucleares do sangue periférico, sendo a proteína pp65 o principal antígeno reconhecido (van der Bij *et al.*, 1988; Grefte *et al.*, 1994). Fornece resultados em 5 horas. Pode apresentar resultado positivo dias antes do início da sintomatologia ou poucos dias após (Boland *et al.*, 1990; Gerna *et al.*, 1992; Landry & Ferguson, 1993; Mazzulli *et al.*, 1993; Schmolke *et al.*, 1995). Estudos mostram que a Antigenemia é mais sensível do que o “Shell Vial” (Boeckh *et al.*, 1992; Mazzulli *et al.*, 1993). A Antigenemia é um teste rápido, sendo um método quantitativo que tem se mostrado útil no monitoramento da infecção pelo CMV e no tratamento antiviral em pacientes imunocomprometidos (Mastroianni *et al.*, 1994; The *et al.*, 1992). No entanto, a Antigenemia quantitativa requer o processamento da amostra logo após a coleta (Niubò *et al.*, 1994; Landry, 1995) e nem sempre está relacionada à doença clínica no paciente (Landry & Ferguson, 1993).

Técnicas moleculares

As técnicas moleculares de hibridação utilizam sondas apropriadas, buscando regiões altamente conservadas do genoma viral. Podem ser realizadas sem amplificação (Bettinger *et al.*, 1994; Hackman *et al.*, 1994) ou após amplificação do material genético, sendo que, no segundo caso, é feita por meio

da reação em cadeia da polimerase (PCR). As duas técnicas podem ser empregadas diretamente sobre o material clínico após adequada purificação. As vantagens do PCR, quando comparado aos demais métodos, têm sido descritas por vários autores. Pode ser realizado utilizando o sangue periférico, urina, líquido cefalorraquidiano e biópsia gastrointestinal (Bale *et al.*, 1993; Bitsch *et al.*, 1993; Chain, *et al.*, 1994; Cinque *et al.*, 1992; Cotte *et al.*, 1993; Gerna *et al.*, 1992; Hsia *et al.*, 1989; Lipson *et al.*, 1995; Nolte *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1998).

Devido às características da infecção por CMV, o PCR, para amplificação do DNA do CMV, tem, como maior inconveniente, a possibilidade de detectar vírus no estado latente, não necessariamente demonstrando infecção viral ativa (Shäfer *et al.*, 1993). A opção de amplificar o RNA mensageiro (RNAm), utilizando a enzima transcriptase reversa, apresenta promissores avanços na solução deste problema, devido ao fato do gene da DNA polimerase não ser transcrito durante o período de latência do vírus. A presença do DNA correspondente a este indicaria infecção ativa (Bitsch *et al.*, 1993; Morre, *et al.*, 1990; Rowley *et al.*, 1991). Essa reação tem sido utilizada para amplificar seqüências de DNA que flanqueiam uma região conhecida, sendo a fita dupla do DNA complementar sintetizada a partir do RNAm amplificado através de adaptadores (“primers”) gene específicos. Este método é bastante minucioso e complexo (Bitsch *et al.*, 1993).

Produção espontânea de anticorpos *in vitro* (IVAP)

A secreção espontânea de anticorpos tem sido detectada em sobrenadante de cultivo de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtidas de pacientes recentemente imunizados com antígenos como o toxoíde tetânico, toxoíde diftérico, poliovírus, *Salmonella typhimurium*, polissacarídeo pneumocócico, ou hemocianina “Keyhole-limpet”, durante o curso de infecção bacteriana, na infecção por HIV, na infecção por *Toxoplasma gondii* (Vendrell *et al.*, 1991b; 1992; 1993) e na infecção por CMV (Vendrell *et al.*, 1991a). Essa secreção de anticorpos é descrita como espontânea porque é independente da adição de mitógenos ou antígenos na cultura; ativa porque é independente de tratamento com cicloheximida, e transitória porque é detectada em sobrenadante de cultura de células do paciente receptor de transplante 5 a 30 dias após o estímulo antigênico (Vendrell *et al.*, 1991a, 1993).

Resultados semelhantes aos obtidos com HIV através da IVAP são descritos para o CMV (Vendrell *et al.*, 1991a). O CMV causa uma infecção aguda seguida de latência viral que possibilita recorrências em pacientes imunocomprometidos. A secreção específica de anticorpos anti-CMV pode ser observada em pacientes com infecção aguda ou persistente por CMV (Vendrell *et al.*, 1991a; Segondy *et al.*, 1993). A análise do IVAP durante o curso da infecção por CMV pode refletir o estímulo *in vivo* pelo antígeno CMV. Esse fenômeno é observado em pacientes com infecção e provavelmente com reativação. Este teste pode ser valioso para o diagnóstico da infecção aguda ou reativação do CMV (Vendrell *et al.*, 1991a).

Produção induzida de anticorpos *in vitro* (IVIAP)

Caterino-de-Araujo (1992) elaborou um teste laboratorial, alternativo, para o diagnóstico de infecção pelo HIV-1 em crianças, denominado produção induzida de anticorpos anti-HIV-1 *in vitro*, denominada IVIAP (*in vitro* induced antibody production). Essa metodologia foi desenvolvida após o conhecimento de trabalhos descritos na literatura, a respeito da ativação de células B em pacientes infectados pelo HIV. Estas células são responsáveis pela secreção espontânea de imunoglobulinas *in vitro*, e se traduz por uma hipergamaglobulinemia *in vivo* (Amadori *et al.*, 1988; 1990; 1991; Vendrell *et al.*, 1989).

A IVIAP, acima referida, utiliza placas de um “kit” comercial que contém antígeno bruto do HIV como base para induzir a produção de anticorpos anti-HIV-1 *in vitro*, por células mononucleares (CM) do sangue periférico de indivíduos infectados. Essas mesmas placas são usadas na detecção dos

anticorpos produzidos *in vitro* através de técnica imunoenzimática, empregando os reagentes do próprio “kit” e as instruções do fabricante. Isso facilita e agiliza a execução da técnica, reduzindo seu custo ao de um teste sorológico convencional (Caterino-de-Araujo, 1993).

A técnica de IVIAP adaptada ao diagnóstico da doença pelo CMV forneceu resultados animadores, podendo ser um método eficaz de diagnóstico de infecção ativa por CMV no homem. Para isto, cobaias foram utilizadas como modelo da doença citomegálica. Aproveitando as semelhanças entre o GPCMV (citomegalovírus que infecta cobaias) e o HCMV, a indução de doença no laboratório permitiu a padronização do IVIAP para diagnóstico da infecção pelo GPCMV, permitindo a provável aplicação dos resultados, posteriormente, em humanos. A IVIAP para CMV permite diferenciar a infecção latente de infecção ativa por CMV, sendo útil principalmente para pacientes imunocomprometidos, cujos níveis de anticorpos séricos nem sempre estão relacionados com a doença (Locatelli & Granato, 1996a; Locatelli, 1996).

As células mononucleares (CM) do sangue periférico de pacientes com infecção ativa por citomegalovírus são capazes de secretar espontaneamente anticorpos anti-CMV *in vitro* (IVAP), em um período de sete dias e, de forma mais induzida (IVIAP), em um período de 24 horas. Há necessidade de se fazer o tratamento prévio para evitar resultados falso positivos, retirando-se os anticorpos citofílicos que possam estar aderidos às CM; 6×10^6 CM/ml é o número ideal para produzir a reação de IVIAP-GPCMV positiva em 24 horas de cultivo a 37°C e 5% de tensão de CO₂. A técnica de IVIAP-GPCMV padronizada é sensível, específica, rápida, prática e eficiente para diagnosticar infecção ativa por citomegalovírus (Locatelli, 1996; Locatelli & Granato, 1996c).

Referências Bibliográficas

- ALFORD, C. A.; WILLIAM, J. B. Cytomegalovirus. In: FIELDS, B. N. ; KNIPE, D. M. (Ed.). *Virology*. 2. ed. New York : Raven Press, 1990. p. 1981-2001.
- AMADORI, A.; DE ROSSI, A.; FAULKNER-VALLE, G. P.; CHIECO-BIANCHI, L. Spontaneous *in vitro* production of virus-specific antibody by lymphocytes from HIV-infected subjects. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v. 46, p. 342-51, 1988.
- AMADORI, A.; DE ROSSI, A.; CHIECO-BIANCHI, L.; GIAQUINTO, C.; DE MARIA, A.; ADES, AE. Diagnosis of human immunodeficiency virus 1 infection in infants: *in vitro* production of virus-specific antibody in lymphocytes. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v. 9, p. 26-30, 1990.
- AMADORI, A.; ZAMARCHI, R.; VERONESE, M. L.; PANOZZO, M.; BARELLI, A.; SIRONI, M.; COLOTTA, F.; MANTOVANI, A.; CHIECO-BIANCHI, L. B cell activation during HIV-1 infection. II. Cell-to cell interactions and cytokine requirement. *J. Immunol.*, v. 146, p. 57-62, 1991.
- BALE Jr, J. F.; O'NEIL, M. E.; FOWLER, S. S.; MURPH, J. R. Analysis of acquired human Cytomegalovirus infections by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, p. 2433-8, 1993.
- BALTHESSEN, M.; MESSERLE, M.; REDDEHASE, M. J. Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *J. Virol.*, v. 67, p. 5360-6, 1993.
- BENNION, D. W.; CARLQUIST, J.; WRIGHT, L. J. Specimen type as a source of variability in the reproducibility and timing of cytomegalovirus identification by culture. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 21, p. 203-7, 1995.
- BETTINGER, D.; MOUGIN, C.; LAB, M. Rapid detection of active cytomegalovirus infection by *in situ* polymerase chain reaction on MRC5 cells inoculated with blood specimens. *J. Virol. Methods.*, v. 49, p. 59-66, 1994.

- BIA, F. J.; GRIFFITH, P. B.; FONG, C. K. Y.; HSIUNG, G. D. Cytomegaloviral infections in the guinea pig: experimental models for human disease. *Rev. Infect. Dis.*, v. 5, p. 177-95, 1983.
- BITSCH, A.; KIRCHNER, H.; DUPKE, R.; BEIN, G. Cytomegalovirus transcripts in peripheral blood leukocytes of actively infected transplant patients detected by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.*, v. 167, p. 740-3, 1993.
- BOECKH, M.; BOWDEN, R. A.; GOODRICH, J. M.; PETTINGER, M.; MEYERST, I. D. Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. *Blood.*, v. 80, p. 1358-64, 1992.
- BOLAND, G. J.; GAST, G. C.; HENÉ, R. J.; JAMBROES, G.; DONCKERWOLCKE, R. Early detection of active Cytomegalovirus (CMV) infection after heart and kidney transplantation by testing for immediate early antigenemia and influence of cellular immunity. *J. Clin. Microbiol.*, v. 28, p. 2069-75, 1990.
- BOLAND, G. L.; HENE, R. J.; VERVERS, C.; HAAN, M. A. M.; GAST, G. C. Factors influencing the occurrence of active cytomegalovirus (CMV) infections after organ transplantation. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 94, p. 306-12, 1993.
- CAMARGO, L. F. A. *Infeção pelo citomegalovirus em pacientes submetidos a transplante renal*. 1993. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1993.
- CATERINO-DE-ARAUJO, A. C. *Produção induzida de anticorpos in vitro (IVIAP): método alternativo para o diagnóstico de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), em crianças*. 1992. Tese (Doutorado em Imunologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.
- CHAIN, A.; ZHAO, J.; KRAJDEN, M. Polymerase chain reaction kinetics when using a positive internal control target to quantitatively detect cytomegalovirus target sequences. *J. Virol. Method.*, v. 48, p. 223-6, 1994.
- CHANDLER, S. H.; ALEXANDER, E. R.; HOLMES, K. K. Epidemiology of cytomegaloviral infection in a heterogeneous population of pregnant women. *J. Infect. Dis.*, v. 152, p. 249-57, 1985.
- CINQUE, P.; VAGO, L.; BRYTTING, M.; CASTAGNA, A.; ACCORDINI, A.; SUNDQVIST, V.; ZANCHETTA, N.; MONFORTE, A. D. A.; WAHREN, B.; LAZZARIN, A.; LINDE, A. Cytomegalovirus infection of the central nervous system in patients with AIDS; Diagnosis by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *J. Infect. Dis.*, v. 166, p. 1408-11, 1992.
- CONGE, A. M.; REYNES, J.; ATOUI, N.; HUGUET, M. F.; DUCOS, J.; BONARDET, A.; SERRE, A.; VENDRELL, J. P. Spontaneous *in vitro* anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody secretion by peripheral blood mononuclear cells is related to disease progression in zidovudine-treated adults. *J. Infect. Dis.*, v. 170, p. 1376-83, 1994.
- CONTI, D. J.; FREED, B. M.; LEMPERT, N. Prophylactic Immunoglobulin therapy improves the outcome of renal transplantation in recipients at risk for primary cytomegalovirus disease. *Transplant. Proc.*, v. 25, p. 1421-2, 1993.
- COTTE, L.; DROUET, E.; BISSUEL, F.; DENOYEL, G. A.; TREPO, C. Diagnostic value of amplification of human cytomegalovirus DNA from gastrointestinal biopsies from human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, p. 2066-9, 1993.
- DARBY, G. The acyclovir legacy: Its contribution to antiviral drug discovery. *J. Med. Virol.*, Suppl. 1, p. 134-8, 1993.
- DIETERICH, D. T.; POLES, M. A.; LEW, E. A.; MENDEZ, P. E.; MURPHY, R.; ADDESSI, A.; HOLBROOK, J. T.; NAUGHTON, K.; FRIEDBERG, N. Concurrent use of ganciclovir and foscarnet to treat cytomegalovirus infection in AIDS patients. *J. Infect. Dis.*, v. 167, p. 1184-8, 1993.

- DREW, W.L. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.*, v. 14, p. 608-15, 1992.
- DROUET, E.; COLIMON, R.; MICHELSON, S.; FOURCADE, N.; NIVELEAU, A.; DUCERF, C.; BOIBIEUX, A.; CHEVALLIER, M.; DENOYEL, G. Monitoring levels of human cytomegalovirus DNA in blood after liver transplantation. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 389-94, 1995.
- EMANUEL, D.; GOLD, J.; COLACINO, J.; LOPEZ, C.; HAMMERLING, U. A human monoclonal antibody to cytomegalovirus (CMV). *J. Immunol.*, v. 133, p. 2202-5, 1984.
- FLO, R. W.; NILSEN, A.; VOLTERSVIK, P.; HAUKENES, G. Serum antibodies to viral pathogens and *Toxoplasma gondii* in HIV-infected individuals. *APMIS.*, v. 101, p. 946-52, 1993.
- FOWLER, K. B.; STAGNO, S.; PASS, R. F. Maternal age and congenital cytomegalovirus infection: screening of two diverse Newborn populations, 1980-1990. *J. Infect. Dis.*, v. 168, p. 552-6, 1993.
- FUKUSHIMA, N.; GUNDRY, S. R.; RAZZOUK, A. J.; BAILEY, L. L. Cytomegalovirus infection in pediatric heart transplantation. *Transplant. Proc.*, v. 25, p. 1423-5, 1993.
- GALEA, G.; URBANIAK, S. J. Cytomegalovirus studies on blood donors in north-east scotland and a review of UK data. *Vox. Sang.*, v. 64, p. 24-30, 1993
- GALLANT, J. E.; MOORE, R. D.; RICHMAN, D. D.; KERULY, J.; CHAISSON, R. E.; ZIDOVUDINE. Incidence and natural history of Cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. *J. Infect. Dis.*, v. 166, p. 1223-7, 1992.
- GEORGE, K. S. T.; RINALDO Jr, C. R. Effects of enhancing agents on detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 2024-7, 1994.
- GERNA, G.; FURIONE, M.; BALDANTI, F.; SARASINI, A. Comparative quantitation of human cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 2709-17, 1994.
- GERNA, G.; SARASINI, A.; PERCIVALLE, E.; ZAVATTONI, M.; BALDANTI, F.; REVELLO, M. G. Rapid screening for resistance to ganciclovir and foscarnet of primary isolates of human cytomegalovirus from culture-positive blood samples. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 738-41, 1995.
- GERNA, G.; ZIPETO, D.; PERCIVALLE, E.; PAREA, M.; RAVELLO, M. G.; MACCARIO, R.; PERI, G.; MILANESI, G. Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidency for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients. *J. Infect. Dis.*, v. 166, p. 1236-44, 1992.
- GREFTE, A.; HARMSSEN, M. C.; VAN DER GIESSEN, M.; KNOLLEMA, S.; VAN SON, W. J.; THE, T. H. Presence of human cytomegalovirus (HCMV) immediate early mRNA but not ppUL83 (lower matrix protein pp65) mRNA in polymorphonuclear and mononuclear leukocytes during active HCMV infection. *J. Gen. Virol.*, v. 75, p. 1989-98, 1994.
- GRIFFITH, B. P.; AQUINO-DE-JESUS, M. J. C. Guinea pig model of congenital cytomegalovirus infection. *Transplant. Proc.*, v. 23, p. 29-31, 1991.
- GRIFFITHS, P. D. Current management of cytomegalovirus disease. *J. Med. Virol.*, v. 1, p. 106-11, 1993.
- HACKMAN, R. C.; WOLFORD, J. L.; GLEAVES, C. A.; MYERSON, D.; BEAUCHAMP, M. D.; MEYERS, J. D.; McDONALD, G. B. Recognition and rapid diagnosis of upper gastrointestinal cytomegalovirus infection in marrow transplant recipients. *Transplantation*, v. 57, p. 231-7, 1994.
- HO, M.; SUWANSIRIKUL, S.; DOWLING, J. N.; YOUNGBLOOD, L. A.; ARMSTRONG, A. The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.*, v. 293, p. 1109-2, 1975.

- HSIA, K.; SPECTOR, D. H.; LAWRIE, J.; SPECTOR, S. A. Enzymatic amplification of human cytomegalovirus sequences by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v. 27, p. 1802-9, 1989.
- KATLAMA, C. Cytomegalovirus infection in acquired immunodeficiency syndrome. *J. Med. Virol.*, v. 1, p. 128-33, 1993.
- KRECH, U. Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of world. *Bull. WHO*, v. 49, p. 103-6, 1973.
- LANDRY, M. L.; FERGUSON, D.; COHEN, S.; HUBER, K.; WETHERILL, P. Effect of delayed specimen processing on cytomegalovirus antigenemia test results. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 257-9, 1995.
- LANDRY, M. L.; FERGUSON, D. Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, p. 2851-6, 1993.
- LEGENDRE, C.; DUCLOUX, D.; FERRONI, A.; CHKOFF, N.; GEFFRIER, C.; ROUZIQUX, C.; KREIS, H. Acyclovir in preventing cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients: a case-controlled study. *J. Med. Virol.*, Suppl. 1, p. 118-22, 1993.
- LEMSTRÖM, K.; PERSOONS, M.; BRUGGEMAN, C.; USTINOV, J.; LAUTENSCHLAGER, I.; HÄYRY, P. Cytomegalovirus infection enhances allograft arteriosclerosis in the rat. *Transplant. Proc.*, v. 25, p. 1406-7, 1993.
- LENER-TUNG, M. B.; CROUCH, J. Y.; HSIUNG, G. D. Demonstration of cytomegalovirus and retrovirus pseudotypes in cultured guinea pig cells. *Virology*, v. 180, p. 826-30, 1991.
- LINHARES, M. I. S.; EIZURU, Y.; STANFORD, W. P.; ANDRADE, G. P.; CARVALHO Jr, L. B.; MINAMISHIMA, Y. Cytomegalovirus, human herpesvirus 6 and human T cell leukemia virus infection in renal transplanted patients in the Northeast of Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 26, p. 735-9, 1993.
- LIPSON, S. M.; ASHRAF, A. B.; LEE, S.; KAPLAN, M. H.; SHEPP, D. H. Cell culture-PCR technique for detection of infectious cytomegalovirus in peripheral blood. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 1411-3, 1995.
- LOCATELLI, R. *Padronização da técnica de produção induzida de anticorpos in vitro (IVIAP), para o diagnóstico rápido de infecção pelo citomegalovírus utilizando modelo animal*. 1996. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- LOCATELLI, R.; BALTAZAR, S. G.; TOMIYAMA, H.; GRANATO, C. Obtenção de cultura primária de fibroblastos de cobaio para o cultivo de citomegalovirus (GPCMV). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18., 1995, Santos. *Anais...* Santos, 1995.
- LOCATELLI, R.; GRANATO, C. Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection by an enzyme-linked immunosorbent assay for *in vitro* induced antibodies production against GPCMV (IVIAP-GPCMV), employing an animal model. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 7., 1996.
- LOCATELLI, R.; GRANATO, C. Enzyme immunoassay for detection of antibody to cytomegalovirus guinea pig. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 7., 1996.
- MASTROIANNI, C. M.; SEBASTIANI, G.; FOLGORI, F.; AJASSA, C.; VULLO, V.; VOLPI, A. Detection of cytomegalovirus-matrix protein (pp65) in leukocytes of HIV-infected patients with painful peripheral neuropathy. *J. Med. Virol.*, v. 44, p. 172-5, 1994.
- MAZZULLI, T.; RUBIN, R. H.; FERRARO, M. J.; D'AQUILA, R. T.; DOVEIKIS, S. A.; SMITH, B. R.; THE, H.; HIRSCH, M. S. Cytomegalovirus antigenemia: clinical correlations in transplant recipients and persons with AIDS. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, p. 2824-7, 1993.

- MICHELSON, S. Human cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor b1. *J. Virol.*, v. 68, p. 5730-7, 1994.
- MORRE, R. E.; SHEPHERD, J. W.; HOSKINS, J. Design of PCR primers that detect only mRNA in the presence of DNA. *Nucleic Acids Research.*, v. 18, p. 1921-22, 1990.
- NIUBÒ, J.; PÉREZ, J. L.; CARVAJAL, A.; ARDANUY, C.; MARTÍN, R. Effect of delayed processing of blood samples on performance of cytomegalovirus antigenemia assay. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 1119-20, 1994.
- NOLTE, F. S.; EMMENS, R. K.; THURMOND, C.; MITCHELL, P. S.; PASCUZZI, C.; DEVINE, S. M.; SARAL, R.; WINGARD, J. R. Early detection of human cytomegalovirus viremia in bone marrow transplant recipients by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 1263-6, 1995.
- PASS, R. F.; GRIFFITHS, P. D.; AUGUST, A. M. Antibody response to cytomegalovirus after renal transplantation: comparison of patients with primary and recurrent infections. *J. Infect. Dis.*, v. 147, p. 40-6, 1983.
- PASS, R. F. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.*, v. 152, p. 243-246, 1985.
- PILLAY, D.; GRIFFITHS, P. D. Diagnosis of cytomegalovirus infection: a review. *Genitourin. Med.*, v. 68, p. 183-8, 1992.
- POLLOCK, J. L.; VIRGIN IV, H. W. Latency, without persistence, of murine cytomegalovirus in the spleen and kidney. *J. Virol.*, v. 69, p. 1762-8, 1995.
- REUSSER, P.; RIDDELL, S. R.; MEYERS, J. D.; GREENBERG, P. D. Cytotoxic T-Lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: Pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood*, v. 78, p. 1373-80, 1991.
- ROWLEY, A. L.; WOLINSKY, S. M.; SAMBOL, S. P.; BARKHOLT, L.; EHRNST, A.; ANDERSON, J. P. Rapid detection of cytomegalovirus DNA and RNA in blood of renal transplant patients by *in vitro* enzymatic amplification. *Transplantation*, v. 51, p. 1028-32, 1991.
- SARAL, R. Acyclovir influence on graft versus host disease. *J. Med. Virol.*, v. 1, p. 112-7, 1993.
- SCHÄFER, P.; BRAUN, R. W.; MÖHRING, K.; HENCO, K.; KANG, J.; WENDLAND, T.; KÜHN, J. E. Quantitative determination of human cytomegalovirus target sequences in peripheral blood leukocytes by nested polymerase chain reaction and temperature gradient gel electrophoresis. *J. General Virology*, v. 74, p. 2699-707, 1993.
- SCHMOLKE, S.; DRESCHER, P.; JAHN, G.; PLACHTER, B. Nuclear targeting of the tegument protein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus: an unusual bipartite nuclear localization signal functions with other portions of the protein to mediate its efficient nuclear transport. *J. Virology*, v. 69, p. 1071-8, 1995.
- SEGONDY, M.; BARAT, L.; MOURAD, G.; HUGUET, M. F.; SERRE, A.; VENDRELL, J. P. Cytomegalovirus-specific *in vitro* antibody production by peripheral blood lymphocytes from renal transplant recipients with CMV infection. *J. Med. Virol.*, v. 40, p. 200-3, 1993.
- SÖDERBERG, C.; LARSSON, S.; BERGSTEDT-LINDQVIST, S.; MÖLLER, E. Identification of blood mononuclear cells permissive of cytomegalovirus infection *in vitro*. *Transplant. Proc.*, v. 25, p. 1416-8, 1993.
- SPEIR, E.; MODALI, R.; HUANG, E. S.; LEON, M. B.; SHAWL, F.; FINKEL, T.; EPSTEIN, S. E. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science*, v. 265, p. 391-4, 1994.

STINSKI, M. F. Cytomegalovirus and its replication. In: FIELDS, B. N. *Virology*. 2nd ed. New York : [s. n.], 1990. p. 1959-78.

STORCH, G. A.; BULLER, R. S.; BAILEY, T. C.; ETTINGER, N. A.; LANGLOIS, T.; KEENER-GAUDREAULT, M.; WELBY, P. L. Comparison of PCR and pp65 antigenemia assay with quantitative shell vial culture for detection of cytomegalovirus in blood leukocytes from solid-organ transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 997-1003, 1994.

STRATTA, R. J.; SHAEFFER, M. S.; MARKIN, R. S.; WOOD, R. P.; LANGANS, A. N.; REED, E. C.; DONAVAN, J. P.; WOODS, G. L.; BRADSHAW, K. A.; PILLEN, T. J.; SHAW, B. W. Cytomegalovirus infection and disease after liver transplantation (an overview). *Digest Dis Scienc.*, v. 37, p. 673-88, 1992.

THE, T. H.; van der PLOEG, M.; van den BERG, A. P.; VLIJGER, A. M.; van der GIESSEN, M.; van SON, W. J. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes - a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation*, v. 54, p. 193-8, 1992.

UIP, D. E. *Infecção em 100 pacientes submetidos a transplante cardíaco*. São Paulo, 1993. Tese (Doutorado) – FMUSP.

USTINOV, J.; LOGINOV, R.; BRUGGEMAN, C.; van der MEIDE, P.; HäYRY, P.; LAUTENSCHLAGER, I. Direct induction of class II antigens by cytomegalovirus in rat heart endothelial cells. *Transplantation Proceedings*, v. 25, p. 1143-4, 1993.

van den BERG, A. P.; van SON, W. J.; TEGZESS, A. M.; THE, T. H. Cellular immune activation reflects antiviral immunity and is favorable prognostic marker in patients with cytomegalovirus infection. *Transplantation Proceedings*, v. 25, p. 1419-20, 1993.

van der BIJ, W.; TORENSMA, R.; van SON, W. J.; ANEMA, J.; SCHIRM, J.; TEGZESS, A. M.; THE, T. H. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. *J. Med. Virol.*, v. 25, p. 179-88, 1988.

VENDRELL, J. P.; SEGONDY, M.; FOURNIER, A.; HUGUET, M. F.; REYNES, J.; DUCOS, J.; SERRE, A. Spontaneous *in vitro* secretion of antibody to cytomegalovirus (CMV) by human peripheral blood mononuclear cells: a new approach to studying the CMV-immune system interaction. *J. Infect. Dis.*, v. 164, p. 1-7, 1991.

VENDRELL, J. P.; SEGONDY, M.; DUCOS, J.; REYNES, J.; HUGUET, M. F.; NICOLAS, J. C.; SERRE, A. Analysis of the spontaneous *in vitro* anti-HIV-1 antibody secretion by peripheral blood mononuclear cells in HIV-1 infection. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 83, p. 197-202, 1991.

VENDRELL, J. P.; PRATLONG, F.; DECOSTER, A.; BOULOT, P.; CONGE, A. M.; DARCY, F.; SEGONDY, M.; HUGUET, M. F.; SERRE, A. Secretion of toxoplasma gondii-specific antibody *in vitro* by peripheral blood mononuclear cells as a new marker of acute toxoplasmosis. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 89, p. 126-30, 1992.

VENDRELL, J. P.; REYNES, J.; HUGUET, M. F.; NGOU, J.; MICHARD, C.; ATOUI, N.; PRATIONG, F.; SEGONDY, M.; SERRE, A. *In vitro* synthesis of antibodies to toxoplasma gondii by lymphocytes from HIV-1 infected patients. *Lancet*, v. 342, p. 22-3, 1993.

VORNHAGEN, R.; PLACHTER, B.; HINDERER, W.; THE, T. H.; van ZANTEN, J.; MATTER, L.; SCHMIDT, C. A.; SONNEBORN, H. H.; JAHN, G. Early serodiagnosis of acute human cytomegalovirus infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 981-6, 1994.

WALDMAN, W. J.; KNIGHT, D. A.; VANBUSKIRK, A.; ADAMS, P. W.; OROSZ, C. G.; SEDMAK, D. D. Endothelial HLA class II induction mediated by allogeneic T cells activated by

cytomegalovirus-infected cultured endothelial cells. *Transplantation Proceedings*, v. 25, p. 1439-40, 1993.

WEBER, B.; PROSSER, F.; MUNKWITZ, A.; DOER, H. W. Serological diagnosis of cytomegalovirus infection: comparison of 8 enzyme immunoassays for the detection of HCMV-specific IgM antibody. *Clinical and Diagnostic Virology*, v. 2, p. 245-59, 1994.

YAGYU, K.; van BREDA, V. P. J. C.; DUIJVESTIJN, A. M.; BRUGGEMAN, A. C.; STEINHOFF, G. Reactivation of cytomegalovirus with acute rejection and cytomegalovirus infection with obliterative bronchiolitis in rat lung allografts. *Transplantation Proceedings*, v. 25, p. 1152-54, 1993.

YAMAMOTO, A. Y.; AQUINO, V. H.; FIGUEIREDO, L. T. M.; MUSSI-PINHATA, M. M. Diagnosis of congenital and perinatal cytomegalovirus infection by using the polymerase chain reaction. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 31, 1998.

Cytomegalovirus. The disease in the men and the difficulties of laboratorial diagnostic

Abstract

Human cytomegalovirus (HCMV) is one of the most important opportunist pathogens in immunocompromised patients such as those with AIDS, fetus or those who have received organ transplants. Reactivation of latente virus is of most consequences in those who are immunocompromised. The availability of effective anti-HCMV therapy has increased the requirement for rapid, sensitive methods of CMV detection. During the last decade several groups of investigators began using the guinea pig (GP) to investigate the pathogenesis, diagnosis and prevention of human cytomegalovirus infection. The methods for testing sera samples for ELISA plaque assay can not established if the patients have recent or past infection. It has been demonstrated that human peripheral blood mononucleares cells (PBMC) of individuals with active citomegalovirus infection spontaneously secret antibodies *in vitro* (IVAP) against HCMV. The *in vitro* induced production of antibodies anti-GPCMV (IVIAP- GPCMV) was develop and stardadised employing guines pigs. The Elisa and the IVIAP technique are specific, sensitive and rapid. However, only IVIAP can differentiate between past and recent infection.

Key words: cytomegalovirus; ELISA; AIDS; serology; IVIAP; antibodies.

LOCATELLI, R. Cytomegalovirus. The disease in men and the difficulties of laboratorial diagnostic. *UNOPAR Cient., Ciênc. Biol. Saúde*, Londrina, v. 2, n. 1, p. 123-134, out. 2000.