

SANDRA HELENA ALVES BONON

*DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO
DA INFECÇÃO ATIVA POR CITOMEGALOVÍRUS EM
TRANSPLANTADOS ALOGÊNICOS
DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS*

CAMPINAS

2004

SANDRA HELENA ALVES BONON

**DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO
DA INFECÇÃO ATIVA POR CITOMEGALOVÍRUS EM
TRANSPLANTADOS ALOGÊNICOS
DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do Título de Doutor em Clínica Médica,
área de Ciências Básicas.*

ORIENTADORA: PROF^A. DR^A. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

CAMPINAS

2004

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

B644d Bonon, Sandra Helena Alves
“Diagnóstico e monitorização da infecção ativa por citomegalovírus em transplantados alogênicos de células progenitoras hematopoéticas”/ Sandra Helena Alves Bonon. Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Sandra Cecília Botelho Costa
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citomegalovírus. 2. Reação em cadeia da polimerase. 3. Transplante de Medula Óssea. I. Sandra Cecília Botelho Costa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Sandra Cecília Botelho Costa

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Benedito Antonio Lopez da Fonseca *Benedito Antonio Lopez da Fonseca*
2. Prof(a). Dr(a). Julio César Voltarelli *Julio Cesar Voltarelli*
3. Prof(a). Dr(a). Rogério de Jesus Pedro *Rogério de Jesus Pedro*
4. Prof(a). Dr(a). Fernando Lopes Gonçales Junior *Fernando Lopes Gonçales Junior*
5. Prof(a). Dr(a). Sandra Cecília Botelho Costa *Sandra Cecília Botelho Costa*

200419714

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/05/2004

DEDICATÓRIA

A Deus, por tudo...

Aos meus pais, Nilda e Sebastião, por serem o alicerce de todas as minhas conquistas...

Ao meu esposo Adilson, pelo companheirismo, pela paciência, pela amizade e incentivo e principalmente pelo amor...

Às minhas filhas, Fernanda e Luiza, que são minha luz, minha força, minha alegria...

À Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa, pelo direcionamento e pela confiança em meu trabalho; pelo respeito, conselhos, oportunidades, amizade e, principalmente, pelo exemplo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa e ao Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad meu especial agradecimento, pela oportunidade, pelo incentivo e pelo apôio no início da minha carreira, para sempre lhes serei grata.

Ao Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi, pelos ensinamentos, conselhos, atenção e amizade.

Ao Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza, pelo apôio incondicional a este trabalho.

Ao Dr. Afonso do STMO, pela atenção, valorização e em especial pelo interesse e apôio a este trabalho.

Aos Professores Doutores Rogério de Jesus Pedro, Júlio César Voltarelli, Benedito Antonio Lopes da Fonseca e Fernando Lopes Gonçales Júnior, pela participação na banca de defesa e que nos forneceram valiosas contribuições ao trabalho.

Ao estatístico Roberto pela análise dos dados e pela amizade e à Nicete, secretária do STMO, pela atenção, simpatia e amizade.

À Milva, Fernanda, Márcia, Daniela, Elaine e Keung, e a todas as enfermeiras do ambulatório de Quimioterapia, Transfusão e Transplante de Medula Óssea do Hemocentro, pela coleta e organização das amostras e pelo apôio.

À todos os médicos do STMO, mas especialmente para Aranha, Márcia, Alexandre, Fabíola e Kátia Eid, pela atenção e apôio.

À Luciana, Sandra, Lisandra, Andréia, Angélica, Mariuza, Eni e a todas as amigas do Laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP pela amizade e apôio;

À amiga Silvia, pelo companheirismo, e pela ajuda a este trabalho.

À amiga Silmara, pelo respeito, companheirismo, confiança e pela ajuda incondicional em todas as horas que precisei...

Aos amigos do laboratório: Juliana Manfrinato, Teka, Fabiano, Patrícia, Luis Fernando, Vagner, Marcelo, Everton, Maria Helena, Juliana Giordano, e Tathiana. Aos meus novos amigos LÍlian, Ana Maria, Bruna, Daniela, Carla, Débora, Cristiane, Juliana e Ronaldinho.

Aos ex-alunos de Iniciação Científica e agora Residentes: Nara, Leonardo, Fernanda, Murillo e em especial para Arthur, pelo apóio na leitura das pastas dos pacientes.

Às amigas do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular, Rosana, Dulcinéia, pelos ensinamentos iniciais com PCR, Gláucia, Andréia e Adriana pela atenção e convivência.

À amiga Léia e ao Prof. Eros, pelo apóio e amizade e que, para mim são muito queridos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Hematologia do LPC/HC/UNICAMP, pelo incentivo e apóio.

Ao Prof. Dr. Kleber Franchini, aos secretários da Pós-Graduação Eduardo Odoni e Renata Maia, meu especial agradecimento.

A todos os meus professores de graduação da Pontifícia Universidade Católica de Campinas e aos de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Campinas, que me estimularam a desenvolver o espírito científico.

A todos os pacientes que participaram deste estudo, transplantados, seus doadores e familiares.

Trabalho realizado no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) com a colaboração do Serviço de Transplantes de Medula Óssea do Centro de Hematologia e Hemoterapia (HEMOCENTRO/UNICAMP).

*“Não basta ensinar ao homem uma especialidade.
Porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade.
É necessário que adquira um sentimento, um senso prático
daquilo que vale a pena ser aprendido, daquilo que é belo,
do que é moralmente correto”.*

(Albert Einstein)

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver”.

(Martin Luther King)

“De tudo ficam três coisas:

*A certeza de que estamos começando,
A certeza de que é preciso continuar e*

*A certeza de que podemos
Ser interrompidos antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo,*

*Fazer da queda um passo de dança,
Do medo uma escola,
Do sonho uma ponte,
Da procura um encontro,
E assim, terá valido a pena existir!”*

(Fernando Sabino)

	<i>Pag.</i>
RESUMO	<i>xlix</i>
ABSTRACT	<i>liii</i>
1-INTRODUÇÃO	57
1.1-HISTÓRICO.....	59
1.2-CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO HCMV.....	60
1.2.1-Classificação.....	60
1.2.2-Estrutura Viral.....	61
1.2.3-Fisiopatologia.....	62
1.2.4-Ciclo de Replicação e regulação gênica do HCMV.....	62
1.2.5-Características físico-químicas.....	65
1.3-EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO.....	66
1.4-PATOGÊNESE.....	68
1.5-MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA POR HCMV.....	68
1.6-DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INFECÇÃO ATIVA PELO HCMV.....	71
1.6.1-Microscopia eletrônica.....	71
1.6.2-Exames Histopatológicos e Citológicos.....	71
1.6.3-Isolamento Viral por Cultura Clássica.....	72
1.6.4-Métodos Sorológicos.....	72
1.6.5-Técnica da “shell vial” ou cultura com isolamento rápido.....	73
1.6.6-Detecção do antígeno <i>pp65</i> do CMV em sangue periférico (antigenemia)....	74
1.6.7-Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	75
1.7-FATORES DE RISCO DE INFECÇÃO ATIVA E DOENÇA POR HCMV EM TRANSPLANTADOS DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS.....	77
1.8-AGENTES ANTIVIRAIS COM ATIVIDADE CONTRA O HCMV.....	79
1.8.1-Imunoglobulina endovenosa.....	79
1.8.2-Ganciclovir.....	80
1.8.3-Foscarnet.....	81

1.8.4-Cidofovir	82
1.9-ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA PREVENÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA PELO HCMV.....	82
1.10-HISTÓRICO DOS TRANSPLANTES DE MEDULA ÓSSEA NO HEMOCENTRO/UNICAMP E A MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA POR CITOMEGALOVÍRUS.....	84
2-OBJETIVOS.....	87
3-CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	91
3.1-CASUÍSTICA.....	93
3.1.1-Critérios utilizados para a inclusão dos pacientes no estudo.....	93
3.1.2-Protocolo de acompanhamento para a realização das coletas.....	93
3.1.3-Protocolo de administração do ganciclovir como profilaxia universal em pacientes transplantados de células progenitoras hematopoéticas.....	95
3.1.4-Protocolo de tratamento precoce de infecção ativa pelo HCMV guiado pela positivação dos testes de monitorização.....	95
3.1.5-Protocolo de tratamento de doença por HCMV.....	95
3.1.6-Protocolo de condicionamento para o preparo do transplante.....	96
3.1.7-Protocolo de profilaxia GVHD.....	96
3.1.8-Gravidade da doença do enxerto contra o hospedeiro (graft <i>versus</i> host disease – GVHD) aguda	96
3.2-MÉTODOS.....	98
3.2.1-Antigenemia – detecção do antígeno <i>pp65</i> do HCMV em neutrófilos do sangue periférico.....	99
3.2.1.1-Extração de leucócitos polimorfonucleares do sangue periférico....	99
3.2.1.2-Preparação das lâminas.....	99
3.2.1.3-Coloração das lâminas.....	100
3.2.1.4-Leitura e interpretação das lâminas.....	101
3.2.2-Reação em Cadeia da Polimerase tipo “Nested-PCR”	102
3.2.2.1-Extração de DNA.....	102
3.2.2.2-Lise de Leucócitos.....	102

3.2.2.3-Precipitação do DNA.....	102
3.2.2.4-Amplificação Gênica do HCMV pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	103
3.2.2.4.1-Condições da Reação.....	103
3.2.2.4.2-Iniciadores (“primers”) externos.....	103
3.2.2.4.3-Reamplificação do genoma do HCMV pela “Nested-PCR”.....	104
3.2.2.4.4-Detecção do fragmento amplificado.....	105
3.2.2.5-Amplificação gênica de um fragmento do gene da beta-globina humana pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	105
3.2.2.5.1-Condições da Reação.....	106
3.2.2.5.2-Iniciadores (“primers”) externos que flanqueiam o gene da β -Globina Humana, para a primeira amplificação.....	106
3.2.2.5.3-Reamplificação do genoma da β -Globina pela “Nested PCR”.....	106
3.2.3-Cuidados especiais para se evitar contaminação das amostras durante a reação da PCR.....	108
3.2.4-Determinação de anticorpos IgM e IgG anti-HCMV utilizando o método ELISA.....	109
3.2.5-Critérios utilizados para definição de infecção ativa por HCMV.....	111
3.2.6-Critérios utilizados para definição de doença por HCMV.....	111
3.2.7-Critérios utilizados para definição de recorrência de infecção ativa por HCMV.....	112
3.2.8-Critérios utilizados para definição de infecção ativa e/ou doença tardia por HCMV.....	113
3.2.9-Metodologia estatística utilizada.....	113
4-RESULTADOS.....	115
4.1-Total de exames realizados durante a monitorização.....	117
4.2-Características dos doadores incluídos no estudo.....	117

4.3-Características dos receptores incluídos no estudo.....	119
4.4-Infecção ativa pelo Citomegalovírus Humano.....	123
4.5-Análise de infecção ativa pelo HCMV pelo status sorológico.....	126
4.6-Tempos de início de detecção de infecção ativa pelo HCMV.....	127
4.7-Comparação entre PCR e antigenemia no diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV nos grupos estudados.....	128
4.7.1-Curva de Probabilidade de Infecção Ativa por HCMV detectada por PCR versus AGM nos pacientes do Grupo ^a	130
4.7.2-Curva de Probabilidade de Infecção Ativa por HCMV detectada por PCR versus AGM nos pacientes do Grupo B.....	131
4.7.3-Curva de Probabilidade de infecção ativa pelo HCMV nos grupos estudados utilizando a PCR como teste diagnóstico.....	132
4.7.4-Curva de Probabilidade de infecção ativa pelo HCMV nos grupos estudados utilizando a AGM como teste diagnóstico.....	133
4.8-Comparação entre GVHD aguda e infecção ativa pelo HCMV.....	134
4.9-Incidência de doença pelo HCMV.....	135
4.9.1-Curva de probabilidade de doença por HCMV nos grupos estudados.....	140
4.10-Causa dos óbitos ocorridos durante o seguimento nos pacientes estudados.....	140
4.11-Curvas de Sobrevida.....	141
4.12-Fatores de risco para infecção ativa pelo HCMV nos grupos estudados.....	143
4.13-Fatores de risco para doença pelo HCMV	144
4.14-Medidas de Acurácia para os testes de “Nested PCR”, antigenemia, IgM-HCMV e aumento dos títulos de IgG-HCMV no diagnóstico de infecção ativa e doença por HCMV.....	144
4.15-avaliação do teste de antigenemia no diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV nos pacientes estudados.....	148
4.16-Avaliação da performance da antigenemia considerando infecção ativa, valores acima de 10 células positivas.....	150
5-DISCUSSÃO.....	151
6-CONCLUSÕES.....	165

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	169
8-ANEXOS	191
A-Aprovação deste protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética da FCM/UNICAMP.....	193
9-APÊNDICES.....	195
A-Consentimento Pós-Informação.....	197
B-Características dos doadores relacionados ao estudo e resultados dos testes de sorologia IgM/IgG – HCMV, antigenemia e “Nested PCR” realizados no pré-transplante.....	199
C-Características detalhadas dos 69 pacientes incluídos no estudo.....	203
D-Resultados dos testes de detecção de infecção ativa pelo HCMV nos pacientes estudados e manifestações clínicas.....	207
E-Resultados dos testes sorológicos IgM e IgG por ELISA nos pacientes relacionados ao estudo.....	213
F-Modelos de Riscos Proporcionais de Cox.....	217
G-Artigo aceito para publicação em Revista de Circulação Internacional.....	219

LISTA DE ABREVIATURAS

β	Beta
α	Alfa
γ	Gamma
°C	Graus Celsius
μM	Micromol
5' → 3'	Sentido da transcrição
A	Base nucleotídica adenina
AA	Anemia Aplástica
AD169	Linhagem de cepa de HCMV isolada em laboratório
AEC	Amino-ethyl-carbazol
AGM	Antigenemia
AIDS ou SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
C	Base nucleotídica citosina
CMV	Citomegalovírus
CPP	Célula Periférica Primordial
CR	Coriorretinite
D-	Doador HCMV - soronegativo
D/R	Doador/Receptor
D+	Doador HCMV - soropositivo
dATP	Desoxirribonucleotídeo adenina trifosfato
dCTP	Desoxirribonucleotídeo citosina trifosfato
DEAFF	Técnica da Cultura de Centrifugação ou <i>Shell Vial</i> (“ <i>Detection of early antigen fluorescent foci</i> ”)
DECH ou GVHD	Doença do enxerto contra hospedeiro ou graft <i>versus</i> host disease
dGTP	Desoxirribonucleotídeo guanina trifosfato
DHPG	Dihidroxipropoximetil guanina
DMSO	Dimethyl-sulfoxide

DNA	Ácido desoxirribonucléico ou ADN
DO	Densidade Óptica
dTTP	Desoxirribonucleotídeo timina trifosfato
E	<i>Early</i> (Fase precoce do ciclo de replicação do HCMV)
EA	Antígenos precoces (“Early antigens”)
EBV	Epstein-Barr Virus
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay ou Ensaio Imunoenzimático
EV	Endovenoso
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FDA	US Food and Drug Administration
G	Base nucleotídica guanina
g	Gramas
g/cm³	Gramas por centímetro cúbico
g/l	Gramas por litro
G-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos
GVHD ou DECH	Graft <i>versus</i> host disease ou doença do enxerto contra o hospedeiro
Gy	Gray, unidade de absorção de radiação, equivalente a 100 rads
h	horas
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HCMV	Citomegalovírus Humano
HCMV-IGIV	Imunoglobulina endovenosa específica contra o HCMV
HCMV-IgIV	Imunoglobulina endovenosa genérica
HEMOCENTRO	Centro de Hematologia e Hemoterapia
HHV-5	Herpesvírus Humano tipo 5
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano

HPMPC	([S]-1-[3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl] cytosine) - Cidofovir
IE	<i>Immediately Early</i> (Fase imediatamente precoce do ciclo de replicação do HCMV)
IE	<i>Immediate-Early Antigen</i> (Antígeno Imediatamente Precoce)
IEA	<i>Immediately early antigens</i> (Antígenos imediatamente precoce)
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IRL/IRS	Seqüências invertidas repetidas do genoma do HCMV ("Inverted Repeats")
Kb	Quilobases
kDa	Quilodaltons
Kg	Quilogramas
L	Fase tardia do ciclo de replicação do HCMV
LA	<i>Late antigens</i> (Antígenos Tardios)
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
M	Molar
mg	Miligramas
MIE	<i>Major Immediate-Early Antigen</i> (Principal Antígeno Imediatamente precoce)
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mm³	Milímetro cúbico
MO	Medula Óssea
MoAb	Anticorpo monoclonal

NA	Não Avaliado
Nested-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase tipo “nested”
nm	Nanômetro
NS	Não Significante
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pH	Logaritmo da recíproca da concentração de íons Hidrogênio presentes em uma dada solução
PI	Pneumonite Intersticial
pp65	Proteína matricial de peso molecular 65 Kd do HCMV
pp67	Proteína matricial de peso molecular 67 Kd do HCMV
R-	Receptor HCMV – soronegativo
R+	Receptor HCMV - soropositivo
REG	Regular estado geral
RNA	Ácido ribonucléico ou ARN
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro ou ARN mensageiro
RPM	Rotações por minuto
RX	Raio-X
SAC	Superfície de área corpórea
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SST	Solução Salina com Fosfatos
STMO	Serviço de Transplantes de Medula Óssea
T	Base nucleotídica timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCPH	Transplante de Células Progenitoras Hematopoéticas
TGI	Trato Gastrointestinal

TGO	Transaminase glutâmimo-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
TKM1/TKM2	Tampões de lise celular
TMO	Transplante de Medula Óssea
TRL/TRS	Seqüências de terminações repetidas do genoma do HCMV (“Terminal Repeats”)
TW	Tween 20
UI	Unidade Internacional
UL	Seqüência única longa (“Unique Long”) do genoma do HCMV
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
US	Seqüência única curta (“Unique Short”) do genoma do HCMV
VO	Via Oral
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 -Risco de doença por HCMV após TCPH alogênico em relação ao status sorológico doador/receptor.....	78
Tabela 2 -Esquema de coletas das amostras de sangue dos pacientes e dos doadores incluídos no estudo.....	94
Tabela 3 -Graduação e estadió clínico da <i>GVHD</i>	98
Tabela 4 -Seqüência dos primers externos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HCMV, utilizados na PCR.....	104
Tabela 5 -Seqüência dos primers internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HCMV utilizados na PCR dupla.....	104
Tabela 6 -Seqüência dos primers externos que flanqueiam uma região conservada do gene da β -Globina, utilizados na PCR.....	106
Tabela 7 -Seqüência dos primers internos que flanqueiam uma região conservada do gene da β -Globina, utilizados na PCR dupla.....	107
Tabela 8 -Total de exames realizados nos pacientes monitorizados (incluindo doadores).....	117
Tabela 9 -Características dos 69 doadores estudados separados por grupos de estudo.....	118
Tabela 10 -Características dos 69 receptores incluídos no estudo.....	121
Tabela 11 -Características referentes ao transplante nos Grupos A e B estudados: status sorológico (HCMV) do doador e receptor (D/R), tipo de enxerto realizado e sexo do doador e receptor.....	122
Tabela 12 -Resultados dos testes de monitorização laboratorial nos grupos estudados.....	125
Tabela 13 -Incidência de infecção ativa pelo HCMV detectada nos receptores estudados e divididos pelo status sorológico.....	126

Tabela 14 -Índice de infecção ativa, recorrência após o tratamento com ganciclovir, doença e óbito por HCMV e presença de GVHD baseados no status sorológico IgG-HCMV do doador (D) e do receptor (R), nos grupos estudados.....	127
Tabela 15 -Tempos de início de detecção de infecção ativa pelo HCMV.....	128
Tabela 16 -Concordância entre antigenemia e PCR nas amostras coletadas dos 69 pacientes monitorizados.....	130
Tabela 17 -Casos de GVHD aguda em relação à infecção ativa pelo HCMV nos grupos estudados.....	135
Tabela 18 -Pacientes que apresentaram doença comprovada, em dias após o transplante e resultados laboratoriais.....	136
Tabela 19 -Causa dos óbitos ocorridos durante o tempo de seguimento (até 150 dias após o transplante).....	141
Tabela 20 -Comparação entre PCR e AGM em relação à infecção ativa por HCMV nos Grupos estudados.....	145
Tabela 21 -Índices obtidos pelo teste de AGM em relação à infecção ativa por HCMV nos Grupos estudados.....	145
Tabela 22 -Comparação entre PCR, AGM, IgM e aumento de IgG em relação à doença por HCMV nos pacientes do Grupo Total.....	146
Tabela 23 -Índices obtidos pelos testes diagnósticos em relação à doença por HCMV no Grupo Total estudado.....	146
Tabela 24 -Comparação entre PCR, AGM, IgM e aumento de IgG em relação à doença por HCMV no Grupo A.....	147
Tabela 25 -Índices obtidos pelos testes diagnósticos em relação à doença por HCMV em receptores do Grupo A.....	147
Tabela 26 -Comparação entre PCR, AGM, IgM e aumento de IgG em relação à doença por HCMV no Grupo B.....	148
Tabela 27 -Índices obtidos pelos testes diagnósticos em relação à doença por HCMV em receptores do Grupo B.....	148

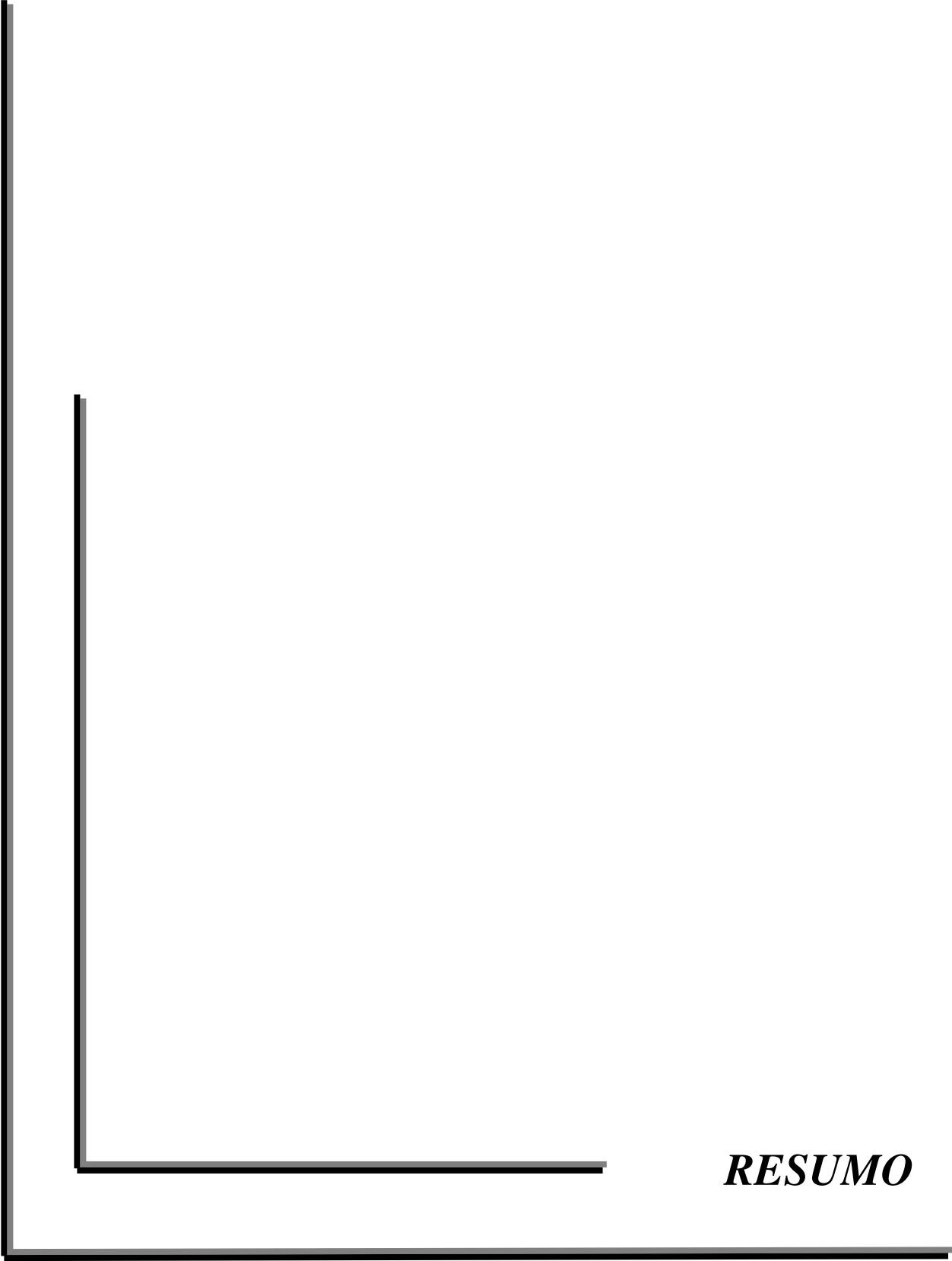
Tabela 28 -Avaliação do número de células antígeno positivas em relação à doença por HCMV nos pacientes estudados do Grupo Total.....	150
--	-----

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1 -Estrutura do Citomegalovírus Humano (HCMV).....	61
Figura 2 -Organização do genoma do Citomegalovírus Humano.....	62
Figura 3 -Mecanismo de infecção do HCMV nas células do hospedeiro.....	64
Figura 4 -Cultura com isolamento rápido, fixada e corada 16 horas após inoculação, mostrando proteínas virais no núcleo de fibroblastos humanos infectados.....	74
Figura 5 -Esquema representando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	77
Figura 6 -Estrutura Química do Ganciclovir.....	80
Figura 7 -Reação de imunoperoxidase (antigenemia).....	101
Figura 8 -Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2%.....	108

LISTA DE GRÁFICOS

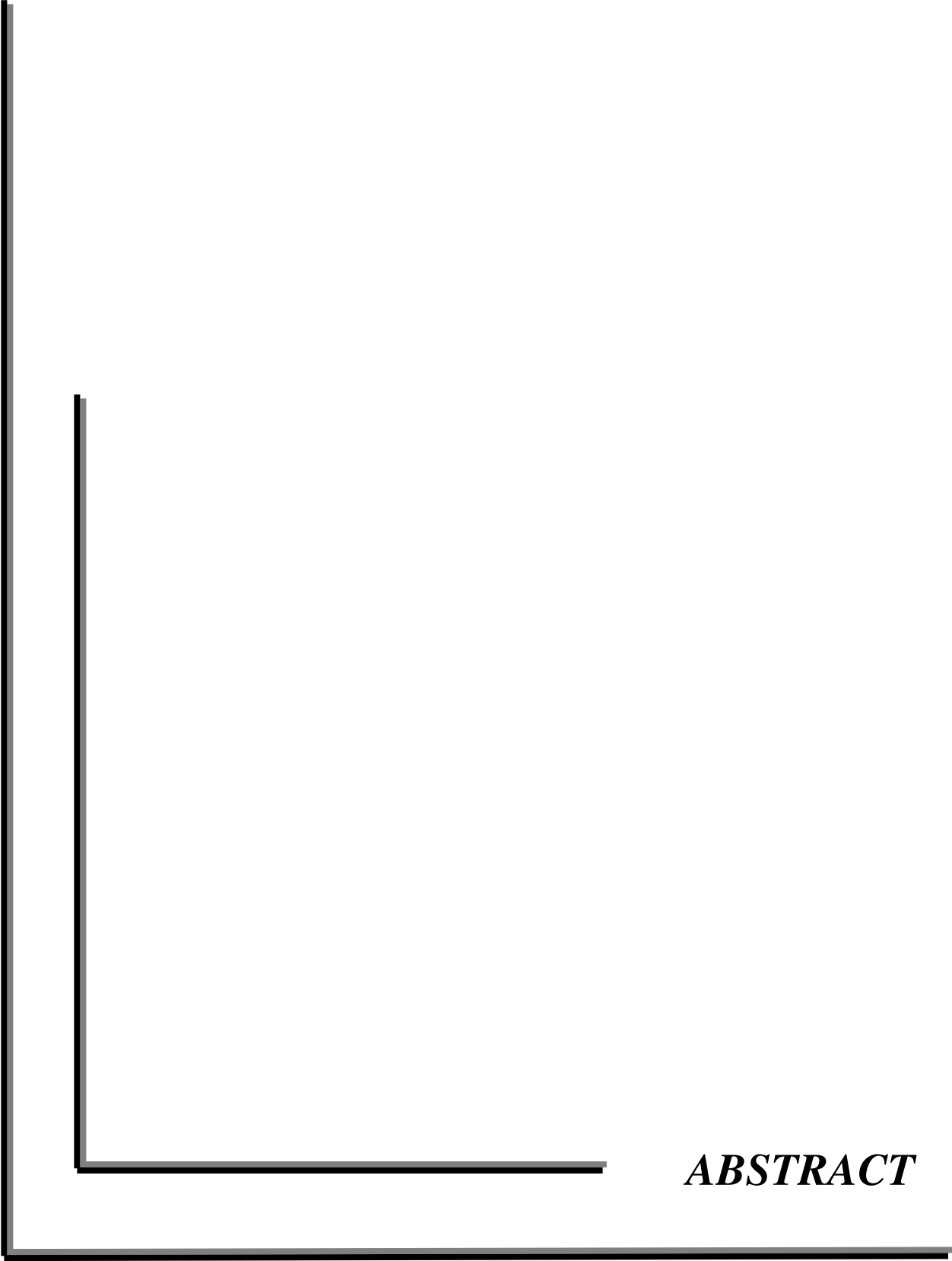
	<i>Pág.</i>
Gráfico 1 -Características dos doadores em relação ao sexo e à sorologia IgG-HCMV.....	119
Gráfico 2 -Status sorológico em relação ao HCMV do doador e receptor (D/R).....	123
Gráfico 3 -Resultados dos testes de monitorização laboratorial nos grupos estudados.....	128
Gráfico 4 -Curvas de Probabilidade acumulada de ocorrência de infecção ativa pelo HCMV pelo teste de PCR <i>versus</i> antigenemia (Grupo A).....	131
Gráfico 5 -Curvas de Probabilidade acumulada de ocorrência de infecção ativa pelo HCMV pelo teste de PCR <i>versus</i> antigenemia (Grupo B).....	132
Gráfico 6 -Curvas de Probabilidade acumulada de ocorrência de infecção ativa pelo HCMV pelo teste de PCR nos Grupos A e B estudados.....	133
Gráfico 7 -Curvas de Probabilidade acumulada de ocorrência de infecção ativa pelo HCMV pelo teste de AGM nos Grupos A e B estudados.....	134
Gráfico 8 -Curva de Probabilidade de doença pelo HCMV nos Grupos estudados.....	140
Gráfico 9 -Curva de Sobrevida até 150 dias pós-transplante dos pacientes referentes ao Grupo A e Grupo B estudados.....	142
Gráfico 10 -Curva de Sobrevida Global (até 1.152 dias após o transplante) dos pacientes referentes ao Grupo A e Grupo B estudados.....	143
Gráfico 11 -Variação entre a quantidade de células positivas reveladas pelo teste de antigenemia no Grupo Total estudado.....	149



RESUMO

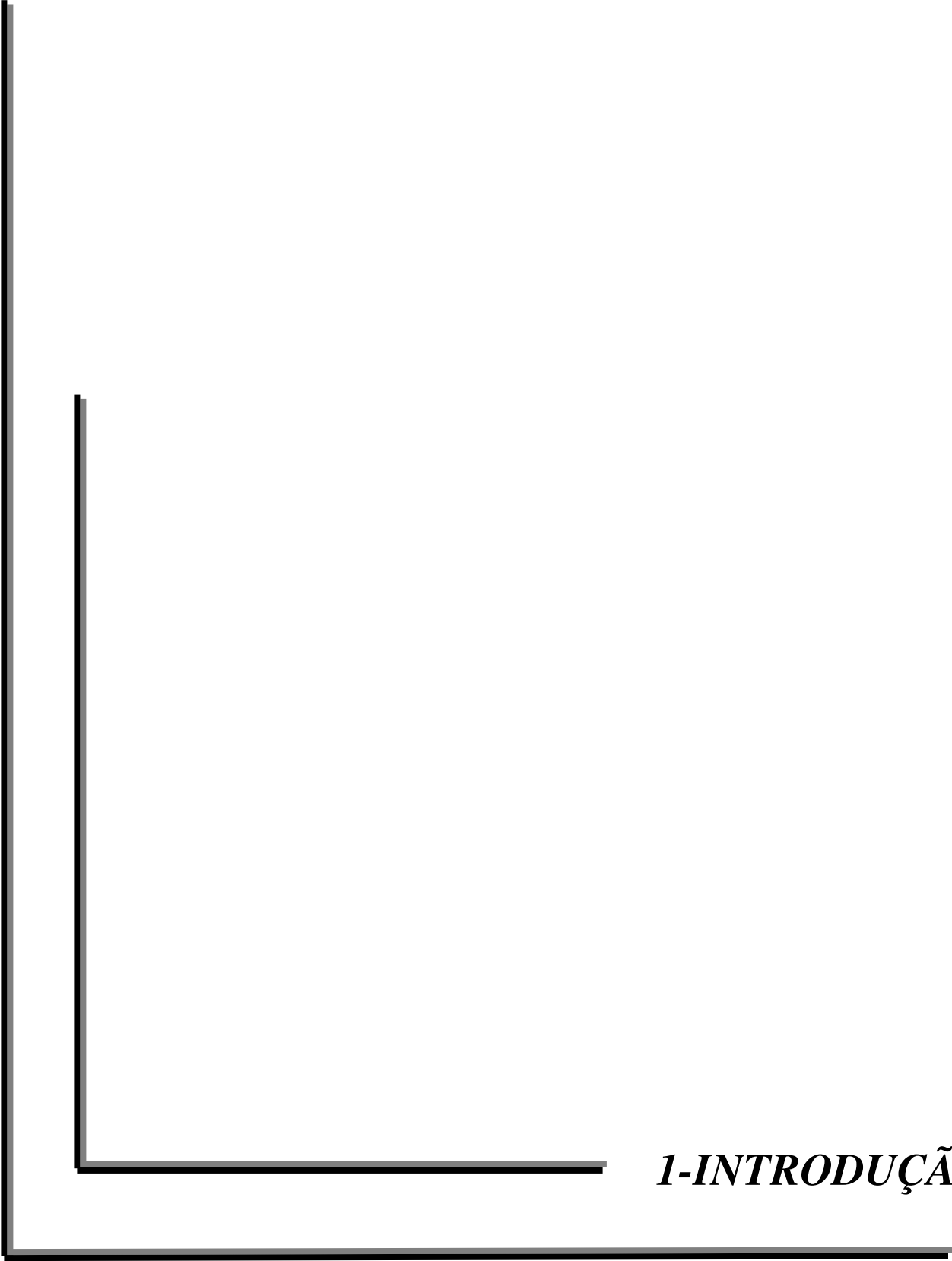
Neste estudo, monitorizamos 69 pacientes receptores de medula óssea e de células progenitoras periféricas, alogênicos, HLA idênticos, desde o pré-transplante até 150 dias após o transplante, semanalmente com as técnicas de PCR dupla e antigenemia e mensalmente com sorologia tipo ELISA (IgM e IgG) contra o HCMV, incluindo os doadores no pré-transplante. Quarenta e cinco pacientes do Grupo A, sendo 38 adultos e 7 crianças, que possuíam doenças hematológicas malignas e status sorológico de risco, receberam profilaxia universal com ganciclovir; e vinte e quatro pacientes do Grupo B, sendo 14 adultos com anemia aplástica e 10 crianças (7 com doenças hematológicas malignas e 3 com anemia aplástica) não receberam profilaxia com ganciclovir. Se a vigilância laboratorial era positiva (2 ou mais amostras de PCR positivas consecutivas ou 1 ou mais células antígeno-positivas por antigenemia), terapia precoce com ganciclovir era administrada, seguida de doses de manutenção nos pacientes de ambos os grupos. Como resultados obtidos após a monitorização, nos pacientes do Grupo A, 36/45 pacientes tiveram infecção ativa pelo HCMV detectada por AGM e/ou PCR. A probabilidade de antigenemia positiva até o dia +150 foi de 53% e por PCR foi de 71,3% ($P=0,04$). O teste de PCR não se mostrou mais precoce na detecção da infecção ativa pelo HCMV do que a antigenemia nos pacientes deste grupo (54 e 62 dias, respectivamente, $P=NS$). A sensibilidade e a especificidade da antigenemia foi de 58% e 64,3%, respectivamente, usando a PCR como padrão-ouro. Nos pacientes do Grupo B, 19/24 pacientes tiveram infecção ativa pelo HCMV detectada por AGM e/ou PCR. A probabilidade de positividade da antigenemia foi de 66,7% e da PCR dupla foi de 67,2% ($P=NS$). O teste de PCR mostrou-se mais precoce do que a antigenemia na detecção da Infecção Ativa por HCMV nos pacientes do Grupo B (24 e 34 dias, respectivamente, $P=0,03$). A sensibilidade e a especificidade da antigenemia foi de 81,2% e 62,5%, respectivamente, usando a PCR dupla como padrão-ouro. Doença por HCMV ocorreu em 2/45 pacientes (4,44%) do Grupo A (casos de gastrite), e foram tratados com sucesso pelo ganciclovir. No Grupo B, 4/24 pacientes (16,7%) tiveram doença por HCMV. Um desses pacientes teve coriorretinite, dois tiveram gastrite e um teve pneumonia intersticial. Dois óbitos por HCMV ocorreram neste grupo (50%), sendo que um por gastrite inicial e outro por pneumonia intersticial, ambos com disseminação sistêmica posterior.

Neste trabalho, o uso da profilaxia universal com ganciclovir pareceu retardar o aparecimento da infecção ativa, pois atrasou a positividade dos testes, quando comparado ao grupo que não recebeu profilaxia. Contudo, nenhum impacto favorável foi observado no grupo de pacientes que recebeu profilaxia universal com ganciclovir, em relação à infecção ativa pelo HCMV, doença e sobrevida. Outra observação foi em relação ao comportamento dos testes diagnósticos nos pacientes tratados com ganciclovir, onde a PCR dupla demonstrou-se mais precoce, porém, na maioria dos casos, a antigenemia confirmou o diagnóstico. Nossos resultados sugerem que tanto a antigenemia quanto a PCR podem ser utilizadas como marcadores precoces para a introdução da terapia antiviral específica.



ABSTRACT

Human cytomegalovirus (HCMV) remains a cause of significant morbidity and mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Different prophylactic approaches have been adopted, but these strategies remain controversial. Early detection of active HCMV infection is imperative to control and to detain HCMV disease. Ganciclovir universal prophylaxis or pre-emptive treatment based on detection of antigenemia (AGM) or a nested polymerase chain reaction (N-PCR) effectively prevents HCMV disease during the first 100 days after transplant. The aim of this study was to describe our experience in the control of active HCMV infection using ganciclovir universal prophylaxis at low doses and pre-emptive therapy with ganciclovir following hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) based on the monitoring of antigenemia (AGM) and on a nested polymerase chain reaction (N-PCR). We prospectively monitored 69 HLA identical sibling donor HSCT patients for evidence of HCMV infection and disease starting in the day of transplant until day 150 after transplant. Two groups of patients were studied: Group A: 45 recipients with malignances diseases and with risk factor for HCMV disease (D+/R+; D-/R+ and D+/R-) received ganciclovir universal prophylaxis in a dose of 5 mg/kg per day, 3 days per week and continued until day 75 after transplant; Group B: 14 adults patients, most of them with non-malignance disease and ten pediatrics patients who did not receive ganciclovir universal prophylaxis. In Group A, the incidence of positive antigenemia at day 150 was 51% in a median of 62 days after transplantation, with a positive PCR of 68.9% in a median of 54 days. In Group B, the antigenemia positivity was 66.6% and that of N-PCR was 66.7% in a median of 34 and 24 days, respectively. HCMV disease occurred in 6/55 patients (10.9%), with 2/36 (5.5%) from Group A (gastritis) and was successfully treated with ganciclovir. In Group B, 4/24 patients (16.7%) had HCMV disease (one chorioretinitis; two gastritis and one with interstitial pneumonia (IP)). Two of these patients (50%) died of HCMV disease. Our results suggest that antigenemia and N-PCR can be used as markers for assessing the introduction pre-emptive therapy. This approach could prove to be more cost-effective than ganciclovir universal prophylaxis for treating HCMV infection.



1-INTRODUÇÃO

1.1-HISTÓRICO

A citomegalovirose foi inicialmente identificada por Ribbert, que observou a presença de grandes inclusões celulares no rim de um natimorto com sífilis em 1881. Sua observação não foi registrada até 23 anos mais tarde, quando as primeiras ilustrações dessas células semelhantes a protozoários, observadas nos rins, pulmões e fígado de outro natimorto com sífilis, fossem publicadas (**RIBBERT, 1904**).

Em 1921, Goodpasture e Talbot foram os primeiros a sugerir que as alterações celulares observadas eram similares às lesões de pele causadas pela varicela e que a citomegalia poderia ser provocada pelo efeito indireto de um agente similar. Eles também observaram que as inclusões nucleares estavam algumas vezes associadas com inclusões no citoplasma (**GOODPASTURE & TALBOT, 1921**).

Lipschutz (**LIPSCHUTZ, 1921**) também descreveu em 1921, inclusões similares que foram associadas com lesões em humanos e coelhos infectados com herpes simples. Ele afirmou que as estruturas constituíam uma reação específica da célula contra algum tipo de vírus. Farber e Wolbach (**FARBER & WOLBACH, 1932**) foram os primeiros a usar o termo doença do vírus das glândulas salivares, devido à propensão do vírus de induzir inclusões nucleares características em linhagens celulares de epitélio do ducto de glândulas salivares (**HANSHAW, 1985**).

Evidências experimentais confirmando a etiologia viral da doença foram feitas por Cole e Kuttner (**COLE & KUTTNER, 1926**) em cobaias, e que essa infecção seria espécie-específica.

Farber e Wolbach em 1932, (**FARBER & WOLBACH, 1932**), em estudo retrospectivo, revisaram 183 autópsias de crianças, sendo que 22 (12%) apresentaram inclusões nas glândulas submaxilares, 2 crianças mais velhas com inclusões na parótida e glândula submandibular e duas outras com inclusões no pulmão, fígado, rins e pâncreas. Em 13 de 22 casos, sintomas de pneumonia foram observados. Os dois casos com inclusões viscerais apresentaram sintomas de doença hemorrágica e eritroblastose, respectivamente.

Smith e Vellios, em 1950 (**SMITH & VELLIOS, 1950**), analisaram 89 casos de doença de inclusão citomegálica e constataram que a maioria dos casos de infecção generalizada ocorreu durante os primeiros 2 anos de idade. Eles concluíram que a infecção poderia ocorrer no útero ou no período neonatal.

O isolamento do citomegalovírus humano (HCMV), em 1956 e 1957, ocorreu quase que simultaneamente a partir dos experimentos de três pesquisadores. Smith isolou o agente a partir de material precedente de duas crianças, tendo uma delas falecido com a Doença de Inclusão Citomegálica generalizada. Rowe e colaboradores isolaram o vírus de tecidos de adenóides, após adenoidectomia; Weller recuperou o vírus de fígado e urina de crianças com doença de inclusão citomegálica generalizada (**ROWE *et al*, 1956; SMITH, 1956; WELLER, 1957**).

Em 1960, com o progresso nos transplantes, a infecção pelo HCMV passa a ser considerada uma entidade de grande importância clínica (**RUBBIN, 1990**). Nesta mesma época, a denominação de citomegalovírus foi proposta por Weller (**WELLER *et al*, 1960**), substituindo as denominações de “vírus das glândulas salivares” ou “vírus da doença de inclusão citomegálica”, entre outras, anteriormente utilizadas. A partir desta fase, o HCMV foi pela primeira vez reconhecido como principal patógeno em hospedeiros imunossuprimidos. (**COSTA, 1999; RILEY, 1997**).

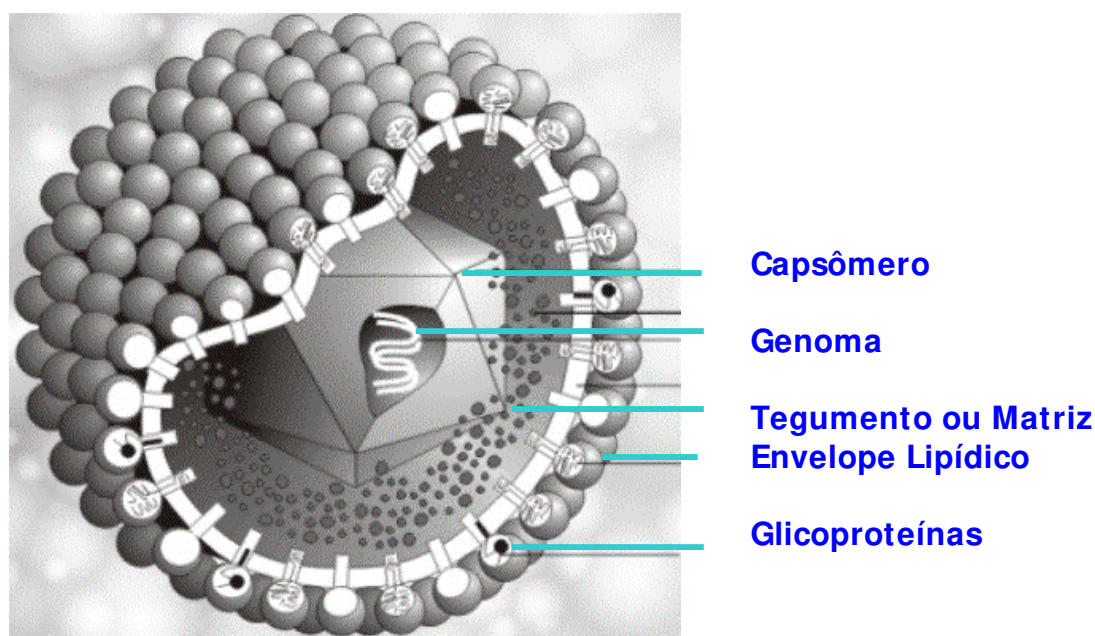
1.2-CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO HCMV

1.2.1-Classificação

O citomegalovírus humano foi originalmente classificado como um beta herpesvírus, baseado em critérios morfológicos e bioquímicos. A morfologia dos vírus do grupo herpes era desconhecida até 1960, quando foi observado o formato icosaédrico através de microscopia eletrônica. Devido à semelhança morfológica e à presença do DNA de fita dupla, o citomegalovírus foi considerado um membro do grupo herpes. Em 1973, o Grupo de Estudos dos Herpesvírus do Comitê Internacional para Nomenclatura dos Vírus decidiu não utilizar o termo “citomegalovírus” e recomendou que fosse dado um número arábico a todos os herpesvírus: o citomegalovírus humano ficou classificado como Herpesvírus Humano 5 (HHV-5). Em 1979 este Comitê reabilitou o nome citomegalovírus e dividiu a família *Herpesviridae* em 3 subfamílias representando os vírus herpes simples (*Alphaherpesvirinae*), citomegalovírus, herpesvírus humano tipo 6 e tipo 7 (*Bethaherpesvirinae*) e o grupo dos vírus linfoproliferativos (*Gammaherpesvirinae*) (**HO, 1991; BROWN & ABERNATHY, 1998**).

1.2.2-Estrutura Viral

O Citomegalovírus possui um diâmetro de aproximadamente 200 nm, e consiste de: 1) um core linear, com fita dupla de DNA; 2) um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 150 nm de diâmetro contendo 162 capsômeros; 3) um material amórfico e assimétrico rodeando o capsídeo e designado tegumento ou matriz; e 4) um envelope glicolipídico contendo glicoproteínas virais em sua superfície (ZAIA, 1990) (Figura 1).



Copyright 1994 – 97 Marko Reschke

Figura 1-Estrutura do Citomegalovírus Humano (HCMV).

<http://www.biografix.de/hcmv/html/metaframe.htm>

O tamanho do genoma do HCMV é de aproximadamente 230 Kilobases (229.354 pares de bases – GeneBank NC001347) ou massa molecular relativa de 150-155 x 10⁶ e uma densidade de 1.716-1.717 g/cm³ correspondente a 58% de guanosina e citosina.

Este grande genoma codifica mais de 200 proteínas e é composto de duas regiões únicas definidas como longa (UL) e curta (US), flanqueada por seqüências repetidas invertidas localizadas internamente (IRL e IRS) e nas extremidades (TRL e TRS) (CHEE *et al*, 1990; STINSKI, 1990). (Figura 2).

Sequência Gênômica do HCMV

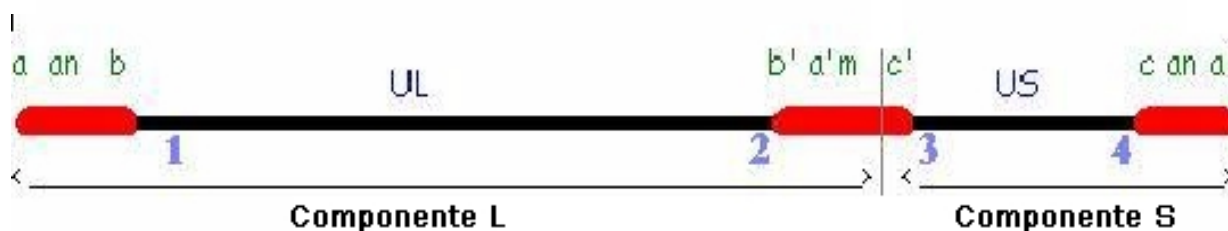


Figura 2-Organização do genoma do Citomegalovírus Humano.

<http://www.science.mcmaster.ca/Biology/Virology>

1.2.3-Fisiopatologia

O HCMV é um vírus lítico que causa um efeito citopático *in vitro* e *in vivo*. Quando o hospedeiro é infectado, o DNA do HCMV pode ser encontrado em todas as diferentes linhagens celulares e órgãos do corpo. Na infecção inicial, o HCMV infecta as células epiteliais das glândulas salivares, resultando em uma infecção persistente e um local de latência viral. O HCMV também infecta o sistema geniturinário, especificamente os túbulos proximais do rim próximo das áreas corticais. Virúria é muito comum e tem pouca consequência clínica. Apesar da replicação viral no rim, é raro ocorrer disfunção renal. Uma exceção pode acontecer em indivíduos que receberam transplante de rim, no qual o HCMV é associado com glomerulopatia e possível causa de rejeição do enxerto (GOODRICH, 2001).

1.2.4-Ciclo de Replicação e regulação gênica do HCMV

O ciclo de replicação do HCMV é lento em cultura celular e rápido no hospedeiro (EMERY *et al*, 1999), persistindo latente por muitos anos. É um agente oportunista quando diminuem as defesas do organismo infectado. O HCMV é citopático, podendo produzir destruição tecidual em vários tecidos, como, por exemplo, trato gastrointestinal, pulmões, cérebro, etc (ALFORD & BRITT, 1990).

O ciclo replicativo do HCMV apresenta padrão similar aos demais herpesvírus, onde após infecção e incorporação do material genético, um pequeno número de genes é transcrito, codificando proteínas que regulam sua expressão; estas proteínas são denominadas de antígenos imediatamente precoces (IEA) e estimulam a produção de proteínas denominadas de antígenos precoces (EA). Os antígenos são expressos nas membranas celulares e a seguir nas nucleares. Antígenos tardios (LA) tem função constitucional e são expressos após replicação do DNA (**STRAUS, 1990; COLIMON & MICHELSON, 1990**).

O Cítomegalovírus Humano e outros tipos de CMV que infectam outras espécies de animais são altamente espécie-específicas, mas suas características de replicação e síndromes da doença que acarretam são similares (**ALFORD & BRITT, 1990; HO, 1991; PANUTTI, 1984**.) Muitas cepas de HCMV circulam continuamente na população em geral (**VAN DER MERR *et al*, 1996**).

Recentemente, Bresnahan e Shenk, relataram que as partículas de HCMV não contêm só DNA, mas também quatro tipos de RNA mensageiro (RNAm) (**BRESNAHAN & SHENK, 2000**).

Esses quatro tipos de RNAm são transcritos de um gene imediatamente precoce (immediately-early), dois genes precoces (early) e um gene tardio (late). Ao penetrar na célula do hospedeiro, o capsídeo viral é transportado ao poro nuclear onde sua carga de DNA é lançada ao núcleo (**Figura 3**). Os quatro RNAm estão provavelmente localizados no tegumento viral, que é uma capa de proteína entre o capsídeo e o envelope (**ROIZMAN, 2000; BRESNAHAN & SHENK, 2000**).

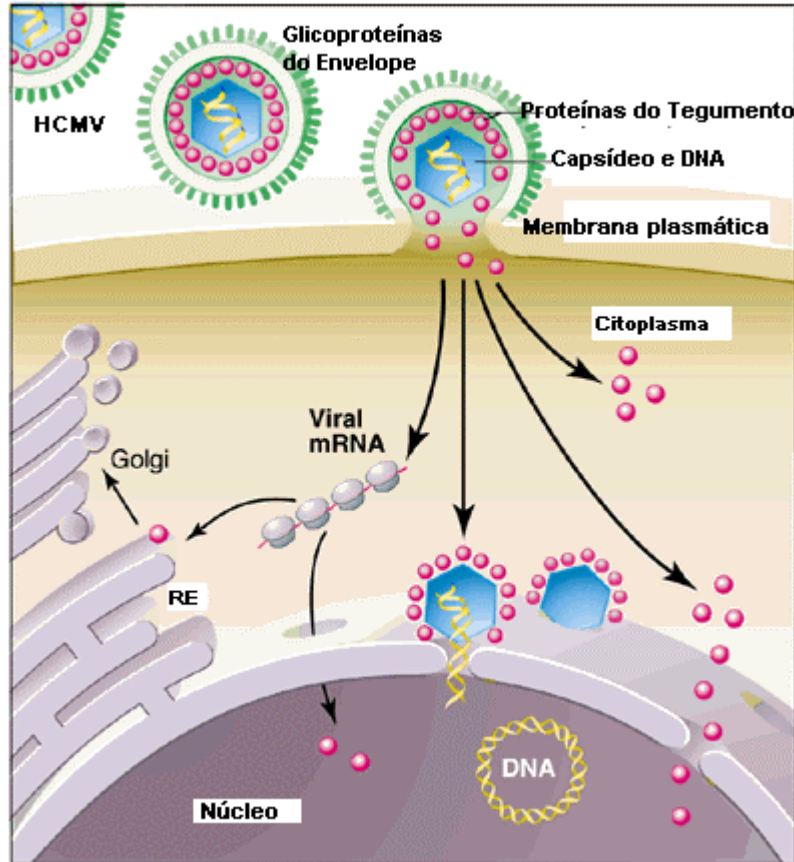


Figura 3-Mecanismo de infecção do HCMV nas células do hospedeiro.

Após fusão do envelope viral com a membrana plasmática, o capsídeo (com algumas proteínas associadas ao tegumento) é transportado para o poro nuclear onde o DNA viral é lançado no núcleo. Lá, o DNA forma um círculo e é transcrito pelo maquinário de transcrição celular. Outras proteínas do tegumento permanecem no citoplasma ou são transportadas independentemente ao núcleo. O RNAm viral é transportado para a célula hospedeira com o capsídeo e é traduzido no citoplasma. Pelo menos uma das proteínas codificadas pelo RNAm viral está associada com a cadeia retículo endoplasmático-Complexo de Golgi (BREISNAN & SCHRENK, 2000) .

Ambos, CMV murino e humano têm três famílias de genes, α (alfa), β (beta) e γ (gama). Elas são expressas nas fases imediatamente precoces (IE), precoces (E) e tardia (L) do ciclo de replicação das células infectadas. Cada uma das famílias de genes

imediatamente precoce e precoce têm uma função regulatória no ciclo celular (**SWEET, 1999**).

- ❖ α (IE) – nesta fase os genes são transcritos através de enzimas nucleares; os RNAm são transportados para o citoplasma e são traduzidos; ocorre a produção de certas proteínas regulatórias que são transportadas para o núcleo e que permitem ao vírus ter controle da síntese macromolecular da célula hospedeira. Os genes transcritos nessa fase podem ter influência na expressão de outros genes virais, seus próprios genes e, possivelmente, genes celulares;
- ❖ β (E) – inicia-se após o período IE e é caracterizada pela replicação do DNA viral, produção de proteínas nas células infectadas e produção da progênie;
- ❖ γ (L) – fase em que componentes estruturais ou de maturação dos vírus produzidos e o vírus infectante é eliminado da célula (**MUSTAFA, 1994**).

1.2.5- Características Físico-Químicas

O citomegalovírus é bastante termolábil, sua vida média a 37° C é de apenas 45 minutos (**PANUTTI, 1984; WELLER, 1971**). O HCMV é destruído rapidamente pelo calor (37° C por uma hora ou 56° C por 30 minutos), baixo pH (abaixo de 5), éter (20% por duas horas), luz ultravioleta por 5 minutos (**COSTA, 1999**) e ciclos de congelamento e descongelamento (**HUANG *et al*, 1980**).

A infectividade do HCMV é mais bem preservada por estocagem em diluentes de bicarbonato de sódio na presença de 35% de sorbitol a -90° C. As células infectadas com o vírus suspensas em meio Eagle com 10% a 20% de soro fetal e 10% de DMSO (dimethyl-sulfoxide) podem ser estocadas por tempo indefinido em nitrogênio líquido a -190° C (**WELLER, 1971; COSTA, 1999**).

1.3-EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

A infecção pelo HCMV é comum na maioria da população, infectando 0,5 a 1,0% de todos os recém-nascidos e mais ou menos 50% da população adulta em países desenvolvidos. É de baixa prevalência em países europeus, Austrália e América do Norte (40 a 60% dos indivíduos são infectados), enquanto que em populações de nível sócio-econômico mais baixo, a prevalência é significativamente maior, variando entre 80 a 100%. A prevalência de anticorpos contra o HCMV (anti-HCMV) eleva-se com a idade, atingindo níveis máximos após os 25 anos (**PANNUTI, 1984; HARDY *et al*, 1985**).

No Brasil, os dados epidemiológicos disponíveis são restritos a algumas áreas urbanas, tais como o estado de São Paulo. Estudos usando soros coletados de pessoas saudáveis de diferentes grupos de idade em São Paulo e testados para anticorpos anti-HCMV mostraram que em crianças de 0-4 anos de idade a soroprevalência era de 60%, com um lento aumento após os 15 anos de idade e 80% de positividade no grupo de idade entre 51 a 60 anos (**ALMEIDA *et al*, 2001**); a incidência nos Estados Unidos e no norte da Europa é de aproximadamente 50-60% (**NICHOLS & BOECKH, 2000**).

Aproximadamente 10% das infecções primárias em pacientes imunocompetentes estão associadas com a síndrome da mononucleose, caracterizada por mal-estar, febre e linfocitose atípica. A grande maioria das infecções primárias passa despercebida. O vírus então permanece latente no endotélio e em células mononucleares do sangue periférico, durante todo o tempo de vida do hospedeiro, controlada pela imunovigilância mediada por células (**NICHOLS & BOECKH, 2000**).

O HCMV é transmitido por: a) via parenteral, através de sangue ou seus derivados; b) contato inter-humano; c) via materno-fetal, através do canal de parto, contágio pós-parto ou transmissão intra-uterina e, d) transplantes de órgãos (**VERONESI *et al*, 1991**).

Os humanos são os únicos reservatórios de HCMV e a transmissão ocorre através do contato pessoa-a-pessoa. Recém-nascidos e crianças podem se tornar infectados durante o nascimento pela passagem através do cérvix uterino contaminado, durante o período pós-natal através do leite materno ou durante a infância através de contato direto com outras crianças em berçários ou creches e pode estar associado com seqüelas graves.

Representa a causa mais comum de retardo mental e distúrbios da audição em crianças. Após a puberdade, transmissão salivar e sexual representam o modo mais importante de infecção por HCMV (**de JONG et al, 1998**).

Com relação à epidemiologia em grupos de alto risco, sabe-se que pacientes imunossuprimidos, como os transplantados, os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e aqueles que são submetidos à quimioterapia têm maior risco de desenvolver a doença por HCMV (**COSTA, 1999**).

O HCMV é o mais importante patógeno entre os receptores de transplantes, sendo que a infecção é evidenciada em 2/3 dos casos, embora a doença clínica seja encontrada com menor frequência (**RUBIN, 1993; CAMARGO et al, 1996**).

Existem três padrões epidemiológicos da infecção por HCMV em receptores de órgãos transplantados: *infecção primária*, *reativação de infecção latente* e *reinfecção* (**RUBIN, 1990**).

❖ Na **infecção primária**, a fonte viral pode ser pré-natal (transmissão transplacentária) (**EPPS et al, 1995**), transfusão intrauterina (**VILMER & PÉROL, 1984**), perinatal (secreção cervical) e pós-natal (urina infectada, saliva, leite materno) (**EPPS et al, 1995**), transfusão de sangue e transplante de órgãos (**TEGTMEIER, 1989; FORMAN & ZAIA, 1995**). Geralmente, a infecção é mais fácil de ser adquirida em condições precárias de higiene. Entre as pessoas com condições sócio-econômicas baixas, a grande maioria das crianças tem sido infectada antes do início da puberdade (**DRAGO et al, 2000**).

Após a infecção primária, o HCMV permanece em uma condição de infecção latente, mas ocasionalmente torna-se reativado e os vírions infecciosos aparecem na saliva e/ou urina. Essas *reativações* temporárias são assintomáticas, mas permitem ao vírus que ele se espalhe horizontalmente e ainda verticalmente se a reativação ocorrer durante a gestação (**DRAGO et al, 2000**).

- ❖ A **reativação** é induzida pela alteração no relacionamento parasita-hospedeiro devido a mecanismo fisiológico, tal como ocorre na gravidez por um decréscimo natural das defesas imunológicas; as doenças debilitantes ou emprego de drogas imunossupressoras e procedimentos cirúrgicos (**DRAGO et al, 2000**).
- ❖ A **reinfeção** é devida a um vírus novo com um diferente tipo antigênico (**TEGMEIER, 1989**). Embora seja epidemiologicamente importante distinguir *reinfeção* e *reativação*, ambas são clinicamente similares. O termo infecção *recorrente*, portanto, é frequentemente usado para descrever ambas possibilidades. Em adultos normais, a infecção por HCMV pode ser também considerada uma doença sexualmente transmissível sendo mais prevalente em mulheres com infecção gonocócica anterior ou atual (**LESHER, 1988**).

1.4-PATOGÊNESE

Em geral, a patogênese do HCMV é similar à dos outros herpesvírus. Eles compartilham a capacidade de: 1) disseminar de célula-a-célula mesmo na presença de anticorpos circulantes; 2) estabelecer um estado latente no hospedeiro; 3) reativar em condições de imunossupressão, e 4) induzir no mínimo imunossupressão transitória no receptor (**DREW, 1988; SWEET & SMITH, 1990**).

A patogênese da doença por HCMV em receptores de TMO e CPP envolve (1) o papel da infecção progressiva do vírus, (2) o efeito da infecção pelo HCMV na função celular, (3) a interação do HCMV com linhagens de células hematopoiéticas; (4) a fuga da vigilância imune mediada pelo HCMV e (5) o papel da aloreatividade e GVHD na infecção pelo HCMV (**ZAIA, 1999**).

1.5-MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA POR HCMV

A doença em imunocompetentes quando se manifesta assume forma semelhante à mononucleose infecciosa, classicamente caracterizada por febre de duração prolongada, fraqueza, sudorese, mialgia, hepatomegalia, esplenomegalia ou ambos, e adenopatia.

Linfonodomegalia e exsudato amigdaliano são pouco encontrados, ao contrário do que se verifica na mononucleose infecciosa causada pelo vírus Epstein-Barr. Icterícia e exantema maculopapular podem ser eventualmente observados. Em relação aos exames laboratoriais, o hemograma pode apresentar linfocitose relativa e absoluta e presença de grande número de linfócitos atípicos. As enzimas hepáticas (TGO e TGP) podem estar moderadamente elevadas em cerca de 80% dos casos (**WELLER, 1971a; WELLER, 1971b; PANUTTI et al, 1987; PANUTTI et al, 2001**).

Porém, o vírus pode ser um importante patógeno no feto humano, em pacientes com defeitos de imunidade celular (SIDA, leucemia, linfoma), em receptores de TMO, CPP e de órgãos sólidos e aqueles submetidos a quimioterapia antineoplásica. Uma vez ocorrida a infecção, o HCMV pode permanecer latente, em equilíbrio com o organismo infectado, reativando a atividade viral quando houver diminuição da imunidade do hospedeiro, caracterizando o HCMV como agente oportunista. Um dos fatores que mais têm contribuído para o aumento da ocorrência da infecção por HCMV é o emprego cada vez mais comum de drogas imunossupressoras (**PANUTTI et al, 1984; HO, 1990; MYERS & AMSTERDAM, 1997**). Com o aumento da prevalência de AIDS, a infecção por HCMV transformou-se em um grave problema de saúde pública nos vários países do mundo. Devido à profunda e complexa deficiência imunológica causada pelo HIV, o HCMV freqüentemente causa doença disseminada nesse grupo de doentes. Além disso, a co-infecção entre HCMV e outros patógenos é muito comum nos pacientes com AIDS (**COSTA, 1999**).

Em pacientes transplantados, com câncer e outros imunossuprimidos, a freqüência e a gravidade da infecção e de suas manifestações clínicas são bastante variáveis. Elas dependem do tipo de transplante, das condições clínicas do doador, da presença ou não de reações devido à incompatibilidade dos antígenos de histocompatibilidade, da natureza e duração da quimioterapia e do regime de imunossupressão utilizada (**GRUNDY, 1990**). Nestes pacientes a doença se apresenta com sinais de síndrome de mononucleose sendo que o achado principal é febre de duração variável. Em ordem de freqüência podem ser observados: hepatomegalia, esplenomegalia, mialgia e/ou artralgia, elevações de enzimas hepáticas e linfocitose. Linfócitos atípicos são menos evidentes nesses pacientes e, particularmente, devido à imunossupressão, leucopenia

ocorre mais freqüentemente que leucocitose, juntamente com anemia e trombocitopenia. Após a síndrome da mononucleose, a pneumonia por HCMV é a mais freqüente manifestação em pacientes imunossuprimidos, principalmente em transplantados de medula. A infecção concomitante por fungos, bactérias gram-negativas e/ou *Pneumocystis carinii* é comum. Hepatite com hepatomegalia, anormalidades de testes de função hepática e icterícia são observados em 7 a 16% de transplantes renais. Coriorretinite secundária ao HCMV é outra entidade clínica cuja freqüência tem aumentado em pacientes imunossuprimidos, especialmente nos portadores de AIDS. O trato gastrointestinal vem cada vez mais sendo atingido pelo HCMV, principalmente nos pacientes com AIDS. O cólon é o local mais freqüentemente acometido, seguido pelo esôfago, reto e intestino delgado. As manifestações clínicas no trato gastrointestinal dependem do nível e grau de acometimento do órgão, bem como da ocorrência ou não de infecções concomitantes ou tumores (COSTA, 1999).

A pneumonia por citomegalovírus tem sido uma das mais importantes infecções oportunistas nos hospedeiros imunocomprometidos. A doença é particularmente grave em receptores de transplantes alogênicos de medula óssea (LJUNGMAN, 1995). Nos anos oitenta, foi considerado o maior problema infeccioso nestes pacientes porque foi observada uma mortalidade maior do que 80% mesmo após a introdução do ganciclovir, o primeiro antiviral com boa atividade contra o citomegalovírus *in vitro* e *in vivo* (SHEEP *et al*, 1985).

Atualmente, o tratamento da pneumonia intersticial pelo HCMV compreende o uso de ganciclovir e imunoglobulina endovenosa. Mesmo com este tratamento, uma vez instalada a pneumonia, pouco mais de metade dos casos poderão ser curados (LJUNGMAN & EINSELE, 1994). Em contraste ao ganciclovir que é fornecido pelo Ministério da Saúde no Brasil e está disponível a todos os pacientes com doença por HCMV, o governo não oferece subsídios para a aquisição de imunoglobulina endovenosa (IgIV-HCMV) e seu alto custo tem sido limitado e o uso é restrito a um pequeno número de pacientes (MACHADO *et al*, 2000)

1.6-DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INFECÇÃO ATIVA PELO HCMV

Os métodos convencionais para a detecção da infecção pelo HCMV incluem exame direto de amostras por microscopia eletrônica, identificação de células com corpúsculos de inclusão característicos, cultura viral e sorologia (**PREISER *et al*, 2001; PANUTTI, 2001**).

1.6.1-Microscopia Eletrônica

A vantagem deste método é sua rapidez, pois pode dar um resultado positivo em 15 a 30 minutos, além de se poderem examinar materiais eventualmente contaminados por fungos ou bactérias, que não são apropriados para isolamento viral. Contudo, além de necessitar de equipamento sofisticado e pessoal altamente treinado, tem uma sensibilidade relativamente baixa, só detectando HCMV em amostras que tenham altas concentrações virais. Não é exame usado na rotina (**PANUTTI, 2001**).

1.6.2-Exames Histopatológicos e Citológicos

A infecção pelo HCMV acarreta, *in vivo*, a formação de células grandes, com inclusões intranucleares (eventualmente intra-citoplasmáticas) que são características e podem ser facilmente visualizadas quando coradas com hematoxilina-eosina, Papanicolau, ou Giemsa. As células de inclusão citomegálicas podem ser demonstradas em fragmentos de tecidos (fígado, rim, pulmão, etc.), em sedimento urinário, lavado gástrico e broncoalveolar e outros materiais. Quando presentes têm grande valor diagnóstico. As grandes vantagens desta técnica são sua simplicidade, rapidez e baixo custo, podendo ser executada em qualquer laboratório. Contudo, a alta incidência de falsos resultados negativos limita muito seu uso e por isso deve ser complementada com técnicas mais sensíveis (**HODINKA & FRIEDMAN, 1991; SUASSUNA & MACHADO, 1992; PANUTTI, 2001**).

1.6.3-Isolamento Viral por Cultura Clássica

O HCMV pode ser isolado de materiais biológicos variados: urina, saliva, secreções cervicais, sêmen, leite, sangue, lavado e aspirado de órgãos e homogenados de tecidos sólidos. Por ser um vírus lábil, o material colhido deve ser processado imediatamente. Caso haja necessidade de conservação ou transporte, é aceitável uma temperatura em torno de 4° C procurando-se evitar o congelamento. Independentemente do material clínico, o isolamento do HCMV em cultura é demorado (COSTA, 1999).

O diagnóstico clássico utilizado para demonstrar infecção ativa por HCMV é a inoculação do material suspeito em cultura de fibroblastos humanos, única linhagem celular que permite sua replicação “*in vitro*”. Porém, além da complexidade envolvida com os métodos de cultura celular, a lenta replicação do vírus faz com que seja necessário um período mínimo de 25 dias para o resultado final (WELLER, 1971; WELLER, 1962, PANNUTI, 1984).

1.6.4-Métodos Sorológicos

Os métodos sorológicos detectam anticorpos IgM e IgG contra o HCMV e são importantes na identificação da fase da infecção (CHOU, 1990), porém apresentam algumas limitações importantes, sendo essas: pacientes imunossuprimidos podem apresentar infecção grave e, dependendo do grau de imunossupressão, podem ser encontrados resultados falso-negativos. Além disso, a detecção por métodos sorológicos nunca é precoce e necessita muitas vezes de acompanhamento com exames periódicos para definição diagnóstica. Mais recentemente tem sido utilizado testes imunoenzimáticos (ELISA) com anticorpos monoclonais para a detecção de partículas virais na urina ou soro (MCKEATING, 1985).

A introdução de testes laboratoriais rápidos e precoces tem permitido aos clínicos detectar a replicação viral e diagnosticar, portanto, a infecção ativa por HCMV antes do início da doença. Isso proporciona a oportunidade de iniciar o tratamento antiviral precocemente (SIA & PATEL, 2000). Essa então chamada terapia precoce (“*pre-emptive therapy*”) é definida como tratamento altamente efetivo administrado por um curto período,

em indivíduos que estão com um alto risco de desenvolver doença por HCMV (RUBIN, 1991).

O diagnóstico precoce da infecção por HCMV pode ser realizado por: imunocitoquímica de fibroblastos humanos infectados, o DEAFF (detection of *early antigen fluorescent foci*) ou “*shell vial*” (GRIFFITHS *et al*, 1984); a expressão da fosfoproteína de 65 kDa (*pp65*) da matriz do HCMV em leucócitos do sangue periférico, então chamado antigenemia (van der Bij *et al*, 1988a, van der Bij *et al*, 1988b), a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de seqüências de ácidos nucléicos virais (JIWA *et al*, 1989; EINSELE *et al*, 1995) e outros métodos moleculares, tais como a PCR quantitativa (COBAS), Nuclisens pp67 Nasba, Captura híbrida (RECOMMENDATIONS OF CDC, 2000).

1.6.5-Técnica da “Shell Vial” ou cultura com isolamento rápido

Esta técnica consiste basicamente em um isolamento viral clássico, em que diferentes materiais clínicos são inoculados em placas contendo lamínulas (“shell-vials”) com monocamadas de fibroblastos humanos em cultura. Contudo, em vez de se esperar até quatro semanas para aparecimento do efeito citopático característico do HCMV, adiciona-se a estas lamínulas, a intervalos de 24, 48 e 72 horas, uma mistura de anticorpos monoclonais contra diferentes antígenos do vírus, sendo a revelação feita através de técnicas de imunofluorescência. Este método detecta antígenos virais na superfície das células infectadas *in vitro* e apresenta especificidade similar ao da cultura convencional, porém, mais sensível e rápido (RAWLINSON, 1999) (Figura 4).

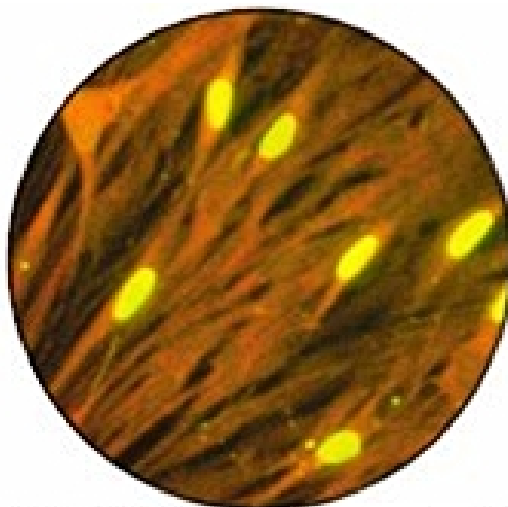


Figura 4-Cultura com isolamento rápido, fixado e corado 16 horas após inoculação, mostrando proteínas virais no núcleo de fibroblastos humanos infectados.

1.6.6-Detecção do antígeno pp65 do HCMV em sangue periférico (antigenemia)

O método da antigenemia tem sido considerado um grande avanço no diagnóstico da infecção por HCMV em transplantes de órgãos. A presença de antigenemia em leucócitos do sangue periférico proporciona um marcador precoce de infecção ativa pelo HCMV e é um teste rápido (**van der Berg *et al*, 1991**). Esse método depende do uso de anticorpos monoclonais que detectam o antígeno viral *pp65*, uma proteína estrutural expressa nos leucócitos do sangue durante a fase precoce do ciclo de replicação do HCMV.

Este teste é limitado à detecção de antígenos virais nos leucócitos. O resultado não é somente qualitativo, mas é também quantitativo, correlacionando a viremia com a gravidade da doença clínica (**LO *et al*, 1997**; **NIUBÓ *et al*, 1996**; **THE *et al*, 1992**).

O teste de antigenemia consiste em um número de fases incluindo o isolamento dos leucócitos do sangue periférico pela sedimentação com dextran, lise direta de leucócitos, preparação de lâminas microscópicas, imunocoloração com o uso de anticorpos monoclonais (C10 e C11) contra o HCMV, avaliação microscópica e contagem quantitativa (**ERICE *et al*, 1995**; **HO *et al*, 1998**; **THE *et al*, 1995**; **THE *et al*, 1990**). As lâminas citocentrifugadas contêm um dado número de células que são preparadas por centrifugação

com um sobrenadante rico em leucócitos. A fixação das lâminas é feita ou com acetona ou formaldeído; resultados superiores foram obtidos com a fixação com formaldeído (**BOECKH *et al*, 1994; GERNA *et al*, 1992; THE *et al*, 1992**).

A imunodeteção do antígeno do HCMV é possível através dos métodos de imunoperoxidase indireta ou imunofluorescência indireta (**THE *et al*, 1995**).

Em 1988, Win Van der Bij, acreditava que diagnósticos rápidos de infecção ativa por HCMV eram de grande importância para evitar o excesso de tratamento com drogas imunossupressoras (em receptores de transplantes) e guiar a terapia antiviral. A demonstração do HCMV em amostras de sangue é particularmente importante porque a viremia por HCMV é considerada um marcador de infecção ativa e tem demonstrado boa correlação com doença grave. A detecção do antígeno de HCMV em leucócitos do sangue periférico (antigenemia) tem sido demonstrada como uma técnica rápida (5 h) e sensível na detecção de HCMV (**WIM van der BIJ *et al*, 1988a; THE *et al*, 1990**).

O teste de antigenemia é um método sensível para a estimativa da carga viral sistêmica do HCMV. O método é uma boa escolha para laboratórios com baixo a médio volume de testes, sendo considerado o mais adequado para guiar a início da terapia precoce e para a monitorização da eficácia do tratamento com ganciclovir (**GONDO *et al*, 1994**). A desvantagem é que a amostra deve ser processada em curto espaço de tempo, sendo recomendável até 8 horas após a coleta para não haver a diminuição da sensibilidade e em pacientes com grave neutropenia o exame não pode ser realizado devido à baixa contagem de granulócitos. Alternativamente, a PCR para HCMV no plasma ou soro poderá ser realizada nessa situação (**SOLANO *et al*, 2001; BOECKH & BOIVIN, 1998; BOECKH *et al*, 1992**).

1.6.7-Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Com a introdução da amplificação de DNA por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (**SAIKI *et al*, 1985**), a detecção do HCMV foi levada a efeito em amostras contendo pequeno número de cópias do vírus (**SHIBATA *et al*, 1988; DEMMLER *et al*, 1988; OLIVE *et al*, 1989**). A amplificação gênica por PCR permite a produção de grandes quantidades de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos

complexos e em concentrações diminutas. Basicamente, este procedimento permite a amplificação de um fragmento de DNA escolhido, cuja concentração final excede em milhares de vezes a do DNA presente na amostra analisada (COSTA *et al*, 1992).

Este procedimento consiste em repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de dois iniciadores (“primers”) com orientações opostas, isto é, dois segmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos, com seqüências complementares às duas extremidades do fragmento alvo, e levadas a efeito por reação enzimática mediada por uma polimerase, com atividade em altas temperaturas (“*Taq* polimerase”). Cada ciclo de reação é constituído por três fases: separação das hélices de DNA a ser amplificado; ligação complementar entre os “primers” e o DNA e síntese do DNA pela *Taq* polimerase. A orientação dos “primers” faz com que a síntese de DNA ocorra na região interna entre eles. Assim, o produto da extensão de um “primer” é utilizado como substrato para o outro, o que resulta em cada ciclo, na duplicação da quantidade de DNA sintetizada pelo ciclo precedente. Assim, o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial, o que faculta no final de 30 ciclos um aumento na ordem de 10^6 cópias, partindo-se de uma única molécula (SAIKI, 1985; COSTA, 1992; SHIBATA, 1988) (Figura 5).

A PCR é um método rápido (4-6 h), específico e extremamente sensível, porém, devido a sua alta sensibilidade, os principais problemas são os falso-positivos resultantes da contaminação na execução do teste. Resultados falso-negativos podem ser causados pela variabilidade genética das cepas do HCMV ou pela presença de inibidores (THE *et al*, 1992). Uma importante vantagem da PCR em relação à antigenemia (*pp65*) é que as amostras podem ser estocadas em temperatura ambiente por >72 horas sem uma diminuição significativa nos níveis de DNA (ROBERTS *et al*, 1997).

O aumento da especificidade e sensibilidade da PCR foram alcançados pela “Nested-PCR”, onde o produto da primeira PCR, amplificada com um par de “primers”, é submetido à nova reação de amplificação utilizando-se um par de “primers” internos ao primeiro, sendo o produto então detectado por eletroforese em gel de agarose (BRYTTING, *et al*, 1991)

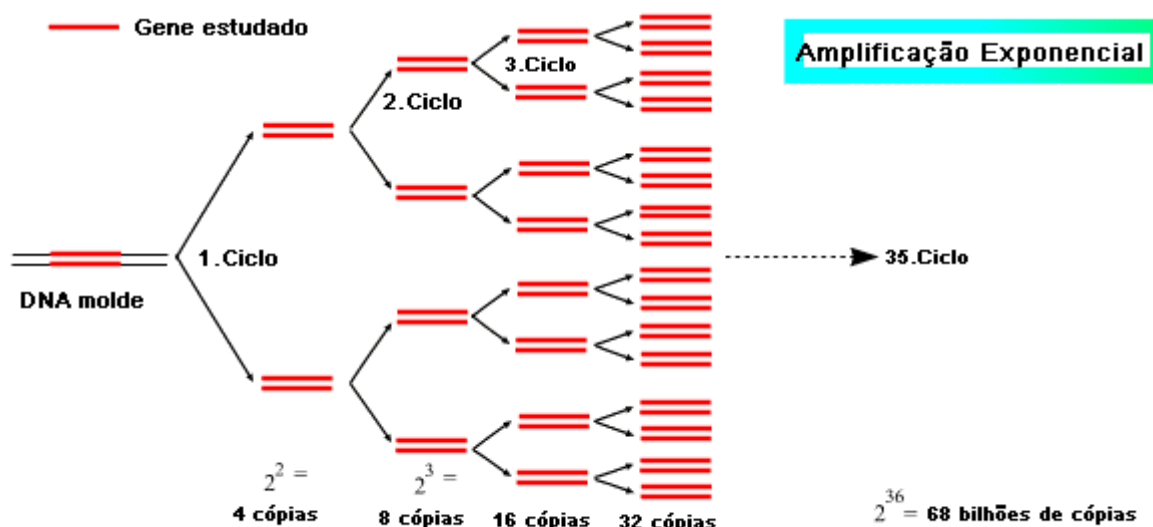


Figura 5-Esquema representando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

1.7-FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO ATIVA E DOENÇA PELO HCMV EM TRANSPLANTADOS DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS (TCPH).

Conhecer o status sorológico em relação ao HCMV de um indivíduo imunossuprimido é um fator importante, já que a soropositividade reflete uma infecção anterior e, portanto, todos os indivíduos soropositivos abrigam o HCMV de forma latente, podendo se reativar a qualquer momento. No receptor de transplante de órgãos, o conhecimento do status sorológico pré-transplante é necessário para permitir relacionar quando possível, doadores HCMV-negativos com receptores soronegativos. A relação entre o soro-status/HCMV do doador e do receptor reduz significativamente a incidência de doença por HCMV nesses pacientes (**PILLAY, 1993**).

Antes do uso do ganciclovir profilático, a citomegalovirose era a causa mais comum de morbidade e mortalidade após TCPH. Na ausência da profilaxia antiviral, a doença pelo HCMV ocorria entre 30 a 100 dias após o transplante em 70% dos receptores HCMV soropositivos e 25 a 40% dos receptores HCMV soronegativos recebendo medula soropositiva ou produtos sanguíneos não filtrados (**BOWDEN et al, 1986; MILLER et al, 1991**).

O uso de produtos sanguíneos HCMV soronegativos tem reduzido a incidência de infecção por HCMV em receptores HCMV soronegativos em aproximadamente 3% a 6% (MILLER *et al*, 1991)

Os pacientes que têm um risco menor são os pacientes HCMV-soronegativos com um doador soronegativo. Nestes pacientes, o maior fator de risco de infecção pelo HCMV é o uso de produtos sanguíneos de doadores soropositivos (**Tabela 1**) (STOCHI *et al*, 1998). O risco de doença é primariamente dependente do risco da infecção ativa por HCMV (MEYERS, 1990). Os fatores secundários incluem doença grave do enxerto contra o hospedeiro (GVHD ou DECH) (WINSTON *et al*, 1990); o transplante de um doador não-relacionado (MARKS *et al*, 1993) e o atraso na reconstituição da resposta da célula T citotóxica HCMV-específica (Li *et al*, 1994).

Tabela 1-Risco de doença por HCMV após TCPH alogênico em relação ao *status* sorológico doador/receptor.

Anticorpos HCMV		Risco de doença por HCMV	
Doador	Receptor	Doador Relacionado	Doador Não-Relacionado
		Muito Baixo	Muito Baixo
Negativo	Negativo	(HERMAN <i>et al</i> , 1982; BOWDEN <i>et al</i> , 1986)	(HERMAN <i>et al</i> , 1982; BOWDEN <i>et al</i> , 1986)
		Moderado	Moderado
Negativo	Positivo	(MEYERS <i>et al</i> , 1986; GOODRICH <i>et al</i> , 1994)	(MEYERS <i>et al</i> , 1986; GOODRICH <i>et al</i> , 1994)
		Alto	Muito Alto
Positivo	Negativo	(MEYERS <i>et al</i> , 1986; GOODRICH <i>et al</i> , 1994)	(MEYERS <i>et al</i> , 1986; GOODRICH <i>et al</i> , 1994)

A incidência de doença precoce pelo HCMV (dentro dos primeiros 100 dias após o transplante) tem diminuído substancialmente com o uso de profilaxia ou de terapia precoce com ganciclovir. Infelizmente, essa estratégia tem sido acompanhada por um aumento na incidência de doença tardia pelo HCMV (BOECKH *et al*, 1996a; BOECKH *et al*, 1999). Estudos têm demonstrado que a utilização precoce da terapia antiviral atrasa a reconstituição da imunidade do hospedeiro contra o vírus, colocando os pacientes em risco

de doença tardia quando tal terapia é descontinuada (**LI et al, 1994; BOECKH et al, 1996b**).

1.8- AGENTES ANTIVIRAIS COM ATIVIDADE CONTRA O HCMV

Atualmente, sete terapias antivirais são aprovadas pelo FDA (US Food and Drug Administration) na profilaxia ou terapia contra a infecção por HCMV: Imunoglobulina endovenosa do HCMV, Aciclovir, Valaciclovir, Ganciclovir, Valganciclovir, Foscarnet e Cidofovir. Os agentes antivirais podem ser administrados terapêuticamente para doença por HCMV ou profilaticamente (ex. terapia precoce), quando o risco de doença por HCMV é alto (ex. pacientes transplantados). Entre eles, ressaltamos:

1.8.1-Imunoglobulina endovenosa

Nucleosídeos são os verdadeiros agentes antivirais que agem contra o CMV, embora as imunoglobulinas possam produzir algum efeito antiviral, particularmente em combinação com estes agentes. O uso de imunoglobulina endovenosa é considerado assunto controverso e em ambos receptores soronegativos ou soropositivos, o principal benefício é provavelmente não-específico devido às diferenças entre as doses e tipos de imunoglobulinas, estado imunológico do doador e receptor, profilaxia da *GVHD* aguda, regime de condicionamento e uso de transfusão de granulócitos (**GUGLIELMO et al, 1994**).

Imunoglobulina endovenosa é preparada com uma mistura de plasma sanguíneo de adultos selecionados e que possuem altos títulos de anticorpos anti-HCMV (**SAWYER, 2000**).

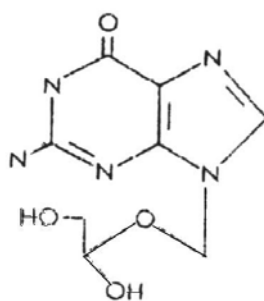
O uso de HCMV-IGIV ou IgIV em combinação com ganciclovir é considerado o tratamento de escolha para pneumonia por HCMV diagnosticada em pacientes receptores de TMO e CPP (**NICHOLS & BOECKH, 2000**).

1.8.2-Ganciclovir

Ganciclovir é o primeiro agente antiviral que é específico para o tratamento do CMV e ganciclovir endovenoso é geralmente considerado terapia de primeira linha para doença por CMV sintomática.

Ganciclovir sódico é um nucleosídeo acíclico sintético análogo do 2'-deoxiguanosina que inibe a replicação dos herpesvírus *in vivo* e *in vitro*. Difere estruturalmente do aciclovir por uma única cadeia caboxil lateral. Esta alteração estrutural confere à droga aproximadamente 50 vezes mais atividade que o aciclovir contra o HCMV (MAR *et al*, 1985).

O nome químico do ganciclovir é 9-[2-hidroxi-1-(hidroximetil)-etoximetil] guanina, embora seja mais comumente conhecido como dihidroxipropoximetil guanina (DHPG) (Figura 6). Ganciclovir tem uma fórmula molecular de $C_9H_{13}N_5O_4$ e um peso molecular de 255,23 g/l. Quando formulado como um sal monossódico, ganciclovir tem uma fórmula molecular de $C_9H_{12}N_5NaO_4$ e um peso molecular de 277,22 g/l (MAR *et al*, 1985).



Ganciclovir

Figura 6-Estrutura Química do Ganciclovir

Os mecanismos de ação do ganciclovir foram estudados *in vitro* em células humanas infectadas com o HCMV. Embora o completo mecanismo de ação não esteja compreendido, foi estabelecido que a capacidade do ganciclovir em inibir a replicação viral é decorrente de sua inibição seletiva na síntese do DNA viral pela forma trifosforilada da

droga. As DNA polimerases das células do hospedeiro são consideravelmente menos sensíveis do que a polimerase viral em relação aos efeitos do ganciclovir trifosfato (**MAR, 1985; VERHEYDEN, 1988**). Acredita-se que a atividade antiviral do ganciclovir-trifosfato seja o resultado da inibição da síntese do DNA viral que ocorre de duas maneiras:

- 1) Inibição competitiva da DNA polimerase viral; e
- 2) Incorporação do ganciclovir-trifosfato dentro do DNA viral, resultando assim na terminação do filamento de DNA viral.

Com a detecção precoce da infecção por HCMV, a terapia precoce com ganciclovir reduz significativamente o desenvolvimento da doença por HCMV (**WINSTON *et al*, 1993**).

O ganciclovir pode causar granulocitopenia, trombocitopenia, azoospermia e elevação da creatinina sérica. Pacientes com retinite por HCMV, tratados com ganciclovir endovenoso por 3 meses apresentam granulocitopenia em 40% dos casos e em 15% trombocitopenia, que em geral, desaparecem após descontinuação da terapia. A granulocitopenia devido ao ganciclovir pode ser prevenida com o uso concomitante de fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) (**CRUMPACKER, 1996**).

1.8.3-Foscarnet

Foscarnet (trisodium phosphonoformate) é um análogo pirofosfato que inibe reversivelmente e não-competitivamente a atividade da polimerase do DNA do HCMV (**BALFOUR, 1990; CHRISP & CLISSOLD, 1991**). Foscarnet não requer ativação intracelular para exercer sua atividade antiviral e não é incorporado à cadeia de DNA viral. Foscarnet bloqueia reversivelmente o sítio de ligação da DNA polimerase viral e inibe a clivagem de pirofosfato para deoxidonucleosídeo trifosfato (**BALFOUR, 1990; CHRISP & CLISSOLD, 1991; ERICE, 1999**). Foscarnet é o tratamento de primeira linha para retinite por CMV quando a terapia com ganciclovir é ineficaz ou não tolerada.

Em um estudo randomizado, a terapia precoce com Foscarnet foi associada com distúrbios eletrolíticos freqüentes. Eletrólitos no soro foram monitorados durante o tratamento com Foscarnet, e baixos níveis de eletrólitos encontrados foram corrigidos por

suplementação. A eficácia do Foscarnet e do Ganciclovir no tratamento precoce da infecção ativa por HCMV é similar, mas o ganciclovir está associado com neutropenia grave (REUSSER, *et al*, 2002; SALZBERGER *et al*, 1997).

1.8.4-Cidofovir (HPMPC)

Cidofovir ([S]-1-[3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl] cytosine) difosfato é um inibidor competitivo da polimerase do DNA do HCMV. Similarmente ao ganciclovir, a incorporação do cidofovir difosfato dentro do DNA viral causa uma demora e subsequente cessação do alongamento da cadeia do DNA do HCMV (DE CLERCQ, 1993; ERICE, A, 1999). Cidofovir tem sido associado com toxicidade renal moderada, similar ao descrito para Foscarnet em análise retrospectiva de experiências clínicas realizadas em centros da Europa (LJUNGMAN *et al*, 2001).

1.9-ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA PREVENÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA PELO HCMV

Apesar de uma literatura extensa, nenhum consenso surgiu até o momento a respeito da melhor estratégia preventiva para a infecção ativa pelo HCMV em TCPH (AVERY, 2000). Com o avanço da terapia antiviral efetiva, a possibilidade de profilaxia contra o HCMV tornou-se uma realidade. Diferentes estratégias de utilização do ganciclovir para controlar as infecções por citomegalovírus têm sido atualmente utilizadas:

- ❖ **Profilaxia universal:** refere-se ao programa que administra ganciclovir a todos os pacientes, independentemente dos resultados dos testes de investigação de viremia (excluindo somente os doadores negativos com receptores negativos para o HCMV de receber profilaxia).

Esta estratégia muitas vezes leva à terapia desnecessária, com o potencial risco de toxicidade à droga (GOODRICH *et al*, 1993; WINSTON *et al*, 1993; GOODRICH, *et al*, 1991; SPECTOR *et al*, 1984), incluindo neutropenias graves. Esta estratégia pode gerar custos adicionais em relação ao controle das complicações ocorridas (fatores de crescimento hematopoético, antibióticos e hospitalizações adicionais) (OSAROGIAGBON *et al*, 2000).

- ❖ **Terapia precoce (*pre-emptive therapy*)**: refere-se ao programa que dá início à terapia com ganciclovir a partir dos testes de monitorização com resultados positivos para infecção ativa por HCMV em pacientes assintomáticos ou oligossintomáticos;
- ❖ **Estratégias híbridas**: são aquelas que utilizam profilaxia universal e terapia precoce, para os diferentes grupos de pacientes (**EVERY, 2000**).

A estratégia mais comum em uso nos Estados Unidos, utilizada por mais da metade dos programas que participaram do levantamento realizado em 2000 por Avery e colaboradores, é a terapia precoce com ganciclovir, baseada em *um ou mais* testes de vigilância laboratorial. Porém, este levantamento foi meramente descritivo e não implicou na superioridade de uma estratégia preventiva ou de modalidades diagnósticas de HCMV sobre a outra. (**EVERY et al, 2000**)

Em receptores HCMV soronegativos, a forma de prevenir a doença por HCMV é evitar a exposição a fontes externas de HCMV pelo uso de doadores de sangue e medula óssea HCMV-soronegativos quando possível; ou pelo uso de filtros de leucodepleção (**BOWDEN et al, 1991; MILLER et al, 1991; WINSTON et al, 1991; GUGLIELMO et al, 1994**).

A utilização de terapia antiviral profilática nesse grupo de pacientes é difícil de se justificar porque a maioria não desenvolverá infecção ou doença por HCMV. Nestes casos, estratégias como o uso de monitorização semanal por antigenemia (**van der Bij et al, 1988a; van der Bij et al, 1988b**) ou técnicas de PCR (**JIWA et al, 1989; EINSELE et al, 1995**) podem ser o melhor modo de identificar precocemente pacientes com risco de desenvolver doença por HCMV.

Em receptores HCMV soropositivos, vários estudos têm avaliado o uso profilático do ganciclovir intravenoso. Estes estudos mostraram uma redução na incidência de doença por HCMV em pacientes recebendo ganciclovir, mas o freqüente aparecimento de neutropenia atrapalha os efeitos benéficos do ganciclovir no tratamento da doença por HCMV (**GOODRICH, 1993 & WINSTON, 1993; BALZBERGER et al, 1997**).

1.10-HISTÓRICO DOS TRANSPLANTES DE MEDULA ÓSSEA NO HEMOCENTRO/UNICAMP E A MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA POR CITOMEGALOVÍRUS.

No nosso controle histórico, a utilização do protocolo de profilaxia universal usando ganciclovir endovenoso em baixas doses em receptores alogênicos de medula óssea e de células progenitoras periféricas começou a ser realizada em Setembro de 1993. Quarenta e quatro pacientes receberam ganciclovir quando a contagem de neutrófilos atingiu 1.000 mm^3 e plaquetas 30.000 mm^3 . A dose utilizada foi de 5mg/kg/dia , 3 dias por semana, através de cateter central ou veia periférica até o dia +75. O status sorológico não foi utilizado como critério de exclusão ou inclusão no estudo. Não foram utilizadas técnicas de monitorização de infecção ativa pelo HCMV no período pós-transplante. Se a infecção ativa fosse suspeitada, o teste de PCR era realizado em amostras de sangue e/ou urina e/ou lavado brônquico. A detecção do DNA do HCMV por PCR ocorreu em 5 pacientes (11%). Somente 2 pacientes destes 5 (4,5%) tiveram diagnóstico confirmado de doença por HCMV: 01 teve pneumonia intersticial e o outro colite. Ambos se recuperaram com a instituição de tratamento com ganciclovir em doses convencionais. Sete óbitos ocorreram (16%), porém, nenhuma morte foi atribuída ao HCMV ou à toxicidade pelo ganciclovir (AZEVEDO *et al*, 1996).

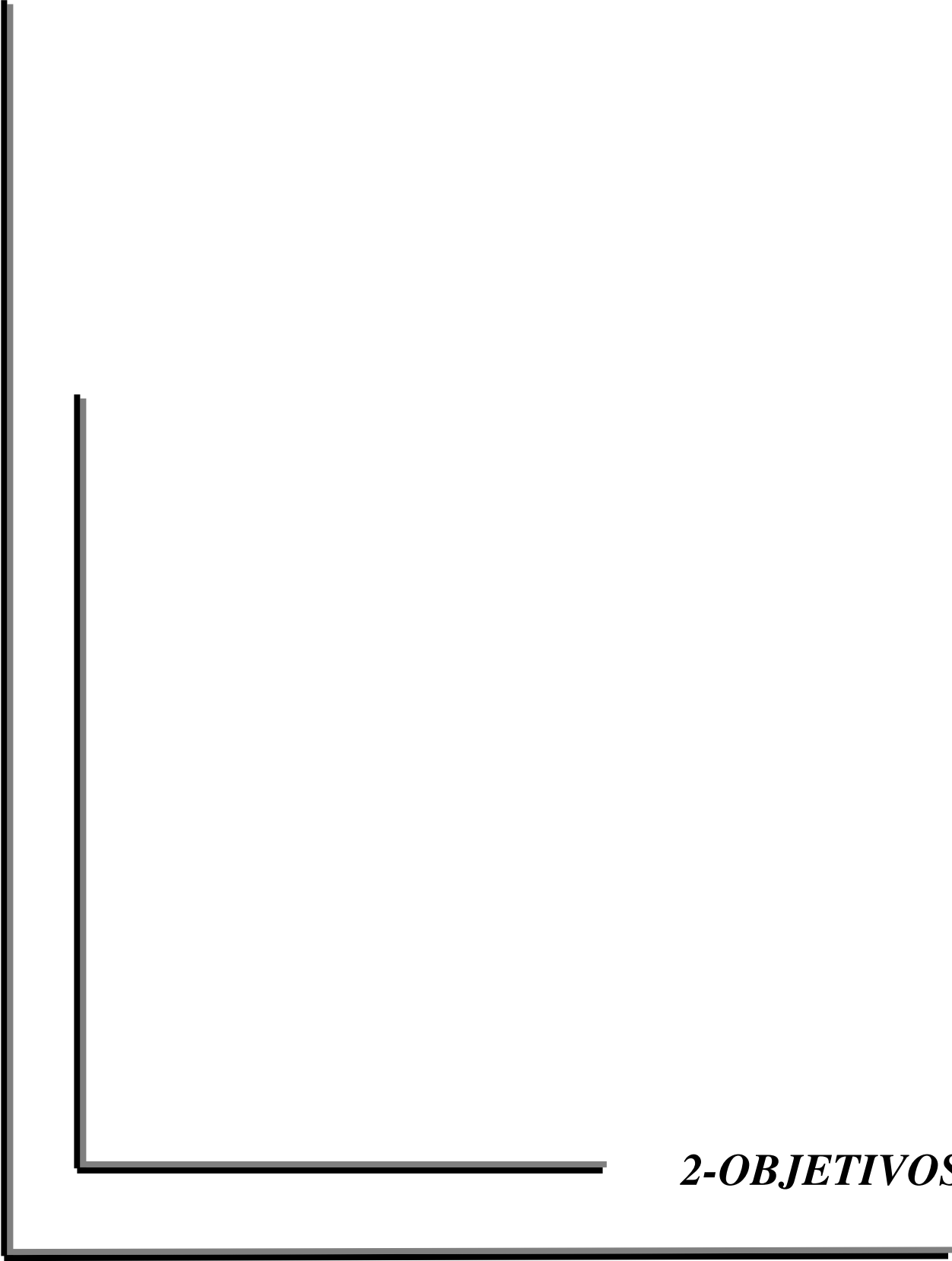
A monitorização laboratorial da infecção ativa pelo citomegalovírus nos pacientes transplantados de medula óssea e células precursoras periféricas começou a ser realizada a partir do segundo semestre de 1996, sendo feita com PCR semanal e sorologia mensais em 42 pacientes até 150 dias após o transplante. A profilaxia foi realizada com um protocolo de ganciclovir em baixas doses desde a pega do enxerto até 150 dias após o transplante. Os resultados preliminares deste protocolo foram apresentados na 2ª Reunião da Sociedade Européia de Hematologia (**Br J Haematol 1996, 93 (supp.2), p.250**). Durante a monitorização, entre os 42 pacientes, 18 apresentaram 2 ou mais PCR positivos (42,8%), caracterizando infecção ativa pelo HCMV. Desses, 3 pacientes apresentaram doença por HCMV (7,14%). Foi confirmado diagnóstico de doença por HCMV no trato gastrointestinal (TGI) em 3 desses pacientes. Destes, um óbito por HCMV ocorreu (33,3%).

No Serviço de Transplante de Medula Óssea da UNICAMP/HEMOCENTRO, foram utilizadas estratégias híbridas, porém, a profilaxia universal com ganciclovir ocorreu em baixas doses, com a intenção de minimizar os efeitos colaterais da droga, tais como a neutropenia.

Anteriormente à conclusão deste trabalho (**BONON *et al*, 2004**), ganciclovir universal era administrado neste Serviço, em todos os pacientes TCHP, exceto naqueles com diagnóstico de anemia aplástica ou com o padrão sorológico IgG-HCMV doador e receptor negativos (**Br J Haematol 1996, 93 (supp.2), p.250**). Atualmente, com a implantação do protocolo de diagnóstico e monitorização da infecção ativa por HCMV nestes pacientes a partir deste trabalho, o Serviço de Transplantes passou a utilizar a terapia precoce (*pre-emptive therapy*) como estratégia de prevenção da doença por HCMV após o transplante (**BONON *et al*, 2002; BONON *et al*, 2003**).

Escolhemos a antigenemia e a nested PCR como métodos a serem utilizados no diagnóstico precoce e na monitorização da infecção ativa por HCMV no grupo de pacientes transplantados alogênicos de TCHP estudados porque são métodos rápidos e sensíveis para esta finalidade. São especialmente adequados para a monitorização de pacientes com grande risco de desenvolverem doença grave, pois a positividade aconteceria antes do início dos sintomas.

A possibilidade de se fazer diagnóstico precoce é o melhor indicativo para um tratamento também precoce mais eficiente. (**MAYA & AZULAY, 2001**)



2-OBJETIVOS

PRINCIPAIS:

- ❖ Padronizar e implantar a técnica de antigenemia na detecção da infecção ativa pelo HCMV em pacientes submetidos a TCPH;
- ❖ Monitorizar, prospectivamente, pacientes submetidos a TCPH, em relação à infecção ativa e doença causadas pelo HCMV utilizando as técnicas de antigenemia, nested PCR e pesquisa de anticorpos específicos IgM e IgG por ELISA, contra o HCMV;
- ❖ Avaliar a eficácia da profilaxia universal com ganciclovir realizada pelo STMO do Hospital das Clínicas da UNICAMP/HEMOCENTRO em relação à infecção ativa e doenças causadas pelo HCMV;

SECUNDÁRIOS:

- Avaliar a incidência de infecção ativa e doença pelo HCMV detectada pela nested PCR e pela antigenemia nos pacientes que receberam profilaxia universal com ganciclovir e nos pacientes que não receberam profilaxia;
- Avaliar a acurácia dos testes de antigenemia, nested PCR, IgM e aumento dos títulos de IgG anti-HCMV, em relação à detecção da infecção ativa e doença pelo HCMV;
- Avaliar a probabilidade de detecção de infecção ativa e doença pelo HCMV por antigenemia e por nested PCR em pacientes que receberam profilaxia universal com ganciclovir e em pacientes que não receberam profilaxia;
- Avaliar a precocidade dos métodos em relação à detecção da infecção ativa pelo HCMV;
- Avaliar a probabilidade acumulada de sobrevida nos pacientes que receberam profilaxia universal com ganciclovir e em pacientes que não receberam profilaxia;
- Analisar os fatores de risco para infecção ativa e doença por HCMV nos grupos estudados.



***CASUÍSTICA E
MÉTODOS***

3.1-CASUÍSTICA

Foram estudados prospectivamente, 69 pacientes submetidos a transplantes alogênicos de medula óssea (MO) e/ou célula precursora periférica (CPP), acompanhados no Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO) do Hospital das Clínicas da UNICAMP/HEMOCENTRO.

A monitorização iniciou-se a partir do dia zero do transplante até 150 dias após o mesmo (ou até o óbito), semanalmente, no período compreendido entre julho de 1998 a dezembro de 2000.

Foram coletadas amostras de sangue em tubos contendo como anticoagulante EDTA e soro em tubo estéril seco, de todos os pacientes submetidos ao transplante durante o período acima citado. Foram incluídos no estudo seus respectivos doadores.

3.1.1-Critérios Utilizados Para Inclusão Dos Pacientes No Estudo

Foram utilizados os seguintes critérios para inclusão dos pacientes no estudo:

- ❖ Pacientes submetidos a transplantes alogênicos de MO e/ou CPP;
- ❖ Disponibilidade de amostras semanais de sangue dos receptores, no pré e pós-transplante, adequadas para a realização dos testes laboratoriais (nested PCR, antigenemia e sorologia IgM e IgG-HCMV por ELISA);
- ❖ Disponibilidade de amostras de sangue dos respectivos doadores antes do transplante, para a realização dos testes laboratoriais (nested PCR, antigenemia e sorologia IgM e IgG-HCMV por ELISA).

3.1.2-Protocolo De Acompanhamento Para A Realização Das Coletas

Durante o período do estudo, o protocolo de acompanhamento para a realização das coletas de sangue periférico foi o seguinte (**Tabela 2**):

- ❖ No dia do transplante: foram coletadas amostras de sangue total e de soro do receptor e do doador, sempre que possível;

- ❖ Coletas semanais subseqüentes foram realizadas no receptor a partir do dia +7 até o dia +150 após o transplante, até o óbito ou até a perda do enxerto;
- ❖ As amostras foram coletadas durante o período de internação na Enfermaria de Transplante de Medula Óssea do HC/UNICAMP e durante os retornos dos pacientes ao Ambulatório de Transfusão e Quimioterapia do HEMOCENTRO/UNICAMP, pela equipe de enfermagem especializada;
- ❖ As amostras foram enviadas imediatamente após a coleta ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular/FCM/UNICAMP, onde foram realizados os testes de Antigenemia e nested PCR. As amostras de soro foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia Clínica do HC/UNICAMP para a realização dos testes sorológicos IgM e IgG-HCMV por ELISA.

Todos os pacientes receptores de transplantes de MO e/ou CPP que participaram deste estudo, e seus doadores, foram informados sobre os procedimentos a serem adotados e concordaram com sua realização. Este Protocolo de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (ANEXO A), após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter sido aprovado os termos de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa.

Tabela 2-Esquema de coletas das amostras de sangue dos pacientes e dos doadores incluídos no estudo.

PRÉ - TRANSPLANTE		PÓS - TRANSPLANTE	
(doador e receptor)		(até dia + 150 - receptor)	
❖	PCR	❖	PCR semanal
❖	Antigenemia	❖	Antigenemia semanal
❖	Sorologia	❖	Sorologia mensal

Obs.As coletas para os testes de antigenemia e PCR foram realizadas semanalmente ou sempre que houvesse indicação. As coletas para a realização dos testes sorológicos foram realizadas mensalmente.

3.1.3-Protocolo De Administração Do Ganciclovir como Profilaxia Universal em Pacientes Transplantados de Células Progenitoras Hematopóicas (TCPH).

Ganciclovir endovenoso foi administrado nos pacientes de risco em relação à infecção ativa pelo HCMV (D+/R-; D+/R+ e D-/R+) na dose de **5 mg/kg/dia, 3 vezes por semana**, após a “*pega do enxerto*”, definida pela contagem de granulócitos acima de 500/mm³ por 2 ou mais dias consecutivos e plaquetas em número maior que 20.000/mm³ por 5 dias consecutivos), até 75 dias após o transplante.

O protocolo de profilaxia com ganciclovir foi seguido por todos os pacientes com doenças hematológicas malignas. Os pacientes com anemia aplástica não receberam profilaxia porque nesses pacientes o risco de adoecimento pelo HCMV é menor (LJUNGMAN *et al*, 1990; VALTEAU *et al*, 1988; WINGARD *et al*, 1988).

3.1.4-Protocolo de Tratamento Precoce de Infecção Ativa pelo HCMV guiado pela Positivização dos Testes de Monitorização.

ESQUEMA	DOSE
❖ Tratamento da Infecção Ativa	10 mg/kg/dia, por 7 dias + manutenção
❖ Manutenção	5 mg/kg/dia, 3 vezes por semana até 12 doses

3.1.5-Protocolo de Tratamento de Doença por HCMV

ESQUEMA	DOSE
❖ Tratamento da Doença	10 mg/kg/dia, por 21 dias + manutenção
❖ Manutenção	5 mg/kg/dia, 3 vezes por semana até 12 doses

3.1.6-Protocolo De Condicionamento Para O Preparo Do Transplante

LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC), LEUCEMIA

MIELÓIDE AGUDA (LMA) e SÍNDROME MIELODISPLÁSICA (SMD):

- ❖ **BUSSULFANO** - 4 mg/kg/dia, VO, do dia -7 ao dia -4. Dose total de 16 mg/kg.
- ❖ **CICLOFOSFAMIDA** - 60 mg/kg/dia, EV, dia -3 e -2, dose total de 120 mg/kg/dia.

LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA):

- ❖ **BUSSULFANO** - 4 mg/kg/dia, VO, do dia -7 ao dia -4. Dose total de 16 mg/kg.
- ❖ **CICLOFOSFAMIDA** - 60 mg/kg/dia, EV, dia -3 e -2, dose total de 120 mg/kg/dia.
- ❖ **ETOPOSIDE** – 40 mg/kg/dia, EV, dia -2 ou,
- ❖ **BUSSULFANO + CICLOFOSFAMIDA** com **IRRADIAÇÃO CORPORAL TOTAL**, dose total de 13,2 Gy hiperfracionado.

ANEMIA APLÁSTICA (AA):

- ❖ **BUSSULFANO** - 4 mg/kg/dia, VO, no dia -6.
- ❖ **CICLOFOSFAMIDA** - 50 mg/kg/dia, EV, dia -5 ao -2, dose total de 200 mg/kg/dia.

3.1.7-Protocolo de Profilaxia da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (GVHD):

- ❖ **CICLOSPORINA** - 3 mg/kg/dia, EV, iniciado no dia -1;
- ❖ **METOTREXATO** - 15 mg/m² - dia +1 e 10 mg/m² - dias +3 +6 e +11

3.1.8-Gravidade da Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (GVHD) Aguda.

A graduação clínica da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda foi baseada no estadiamento clínico, onde se levou em consideração, a percentagem da superfície corporal que apresentava envolvimento cutâneo com confirmação histológica, os níveis sanguíneos de bilirrubinas e o volume diário de diarreia (**PZEPIORKA et al, 1995**).

Baseado então neste estadiamento clínico, a graduação desta reação pode ser dividida em graus que variam de 0 a IV. O grau zero significa ausência de GVHD; o grau I (leve) compreende apenas envolvimento cutâneo, variando de menos do que 25% a 50% de comprometimento da superfície corpórea; no grau II (moderado) a alteração da pele pode variar de menos do que 25% até a eritrodermia generalizada, o nível sérico de bilirrubinas entre 2 e 3 mg/dl e o volume diarréico até 1.000 ml ao dia; o grau III (grave) compreende o envolvimento cutâneo de 25% da superfície corporal até a eritrodermia generalizada, níveis séricos de bilirrubinas entre 3 a 15 mg/dl, e o volume de diarreia de 1.000 ou mais de 1500 ml ao dia; o grau IV representa uma situação de extremo risco de vida, onde o comprometimento cutâneo pode variar de 25% da superfície do corpo até a eritrodermia generalizada com descamação e formação de bolhas cutâneas, o nível de bilirrubinas pode variar de 3 até mais de 15 mg/dl, e o volume diário de diarreia acima de 1.000 ml, até o aparecimento de dor abdominal e de íleo paralítico (**DULLEY, 1997**).

A graduação deste tipo de reação apresenta interesse tanto para definir a conduta terapêutica, como para se avaliar as porcentagens de sobrevida e as incidências de infecções. A Tabela 3 ilustra a graduação e o estadiamento clínico desta reação (**THOMAS et al, 1975**; (**PZEPIORKA et al, 1995**).

Tabela 3-Graduação e estadió clínico da *GVHD aguda*.

<i>Graduação Clínica da GVHD aguda</i>			
	Pele	Fígado	Intestino
+	Eritema máculopapular <25% SAC*	Bilirrubina 2-3mg/dl	Diarréia 500-1000ml/dia
++	Eritema máculopapular 25-50% SAC*	Bilirrubina 3-6mg/dl	Diarréia 1000-1500ml/dia
+++	Eritrodermia generalizada	Bilirrubina 6-15mg/dl	Diarréia >1500ml/dia
++++	Descamação e bolhas	Bilirrubina >15mg/dl	Dor abdominal ou íleo paralítico

*SAC Superfície de área corpórea

<i>Estadio Clínico da GVHD aguda</i>				
Graduação	Estágio			Dano Funcional
	Pele	Fígado	Intestino	
0 (nenhum)	0	0	0	0
I (leve)	+ a ++	0	0	0
II (moderado)	+ a +++	+	+	+
III (grave)	++ a +++	++ a +++	++ a +++	++
IV (risco de vida)	++ a ++++	++ a ++++	++ a ++++	+++

(THOMAS *et al*, 1975)

3.2-MÉTODOS

No controle dos pacientes de risco para doença pelo HCMV, é importante a utilização de técnicas rápidas e sensíveis de diagnóstico precoce de infecção ativa por HCMV. Neste estudo, foram realizadas as seguintes técnicas:

- ❖ Antigenemia para detecção e quantificação do antígeno pp65 do HCMV, no sangue periférico;
- ❖ Reação em cadeia da polimerase tipo “Nested”, para detecção de DNA do HCMV, no sangue periférico;
- ❖ Teste sorológico tipo ELISA para detecção de anticorpos da classe IgM e IgG contra o HCMV.

3.2.1-Antigenemia - Detecção do Antígeno pp65 do HCMV em Neutrófilos do Sangue Periférico.

A detecção do antígeno pp65 foi realizada de acordo com o método descrito por **Van der Bij *et al*, 1988; Van der Bij *et al*, 1989; Jiwa *et al*, 1989 e Boeckh M, 1992**, com algumas modificações:

3.2.1.1-Extração de Leucócitos Polimorfonucleares do Sangue Periférico

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo como anticoagulante EDTA, encaminhadas e processadas no prazo de até 6 horas após a coleta. Foram coletados de 5 a 10 ml de sangue. Este material foi transferido para tubos de plástico de 15 ml (tipo Falcon). Os leucócitos foram separados pela sedimentação com dextran a 5% diluído em PBS, pH 7.4 (sangue/dextran na proporção 4:1); homogeneizado gentilmente por inversão e colocado em estante inclinada para tubos em ângulo de 45 graus por 30 minutos em estufa à temperatura de 37° C. Usando Pipeta tipo Pasteur, o sobrenadante rico em leucócitos polimorfonucleares foi transferido para outro tubo de plástico de 15 ml e centrifugado 10 minutos a 1200 rpm. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi agitado no vórtex vigorosamente. Para remoção das células vermelhas persistentes, o sedimento celular foi suspenso em 10 ml da solução de cloreto de amônio gelado, pH 7.4, homogeneizado e mantido em temperatura de 4° C por 10 minutos, seguido de centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado novamente e o sedimento celular foi lavado com PBS e centrifugado 10 minutos a 1200 rpm, mais 2 ou 3 vezes. O sedimento celular foi então ressuspensionado em 200 µl a 1000 µl de PBS; dependendo da quantidade de leucócitos (após TMO ou CPP, a contagem de células brancas pode ser muito baixa, sendo necessário a ressuspensão em 200 µl).

3.2.1.2-Preparação das Lâminas

Os leucócitos foram contados em câmara de Neubauer e para cada amostra preparou-se uma suspensão com 1,5 a 2 x 10⁶ células/ml. 100 µl desta suspensão foram colocados no interior do citofunil e em seguida centrifugados em citocentrífuga (Marca

Revan – modelo Citociclo) por 5 minutos à 970 rpm ; as lâminas foram feitas em duplicata. A seguir, as lâminas foram secas, fixadas com Paraformaldeído por 10 minutos, lavadas 3 a 4 vezes com PBS e soro fetal bovino e permeabilizadas com Nonidet P-40 por 5 minutos. Após nova lavagem, as lâminas foram novamente secas, embrulhadas em papel manteiga e papel alumínio e estocadas à temperatura de - 80° C, até o momento da revelação.

Após a preparação das lâminas, o precipitado de leucócitos remanescente foi utilizado para o teste da nested PCR.

3.2.1.3-Coloração das Lâminas

As lâminas foram desembrulhadas, secas e a área da reação delimitada com esmalte. O anticorpo monoclonal utilizado foi o CLONAB HCMV do laboratório BIOTEST AG (Dreieck-W. - Germany), contendo uma combinação de anticorpos monoclonais C-10 e C-11, que reconhecem o antígeno pp65 do HCMV. Após a secagem do esmalte, as lâminas foram rinsadas com PBS e escorridas. A seguir, foram aplicados 35 µl de monoclonal diluído 1:10 em PBS por área de reação e incubado em câmara úmida à temperatura ambiente por 45 minutos. A área de reação a partir deste ponto não pode secar. A seguir, as lâminas foram lavadas 3 vezes, 5 minutos cada, com PBS. O conjugado utilizado foi o anti-mouse (Horse Radish Peroxidase labeled goat anti-mouse IgG) do laboratório BIOTEST AG. Foi aplicado 35 µl do conjugado “anti-mouse peroxidase” diluído 1:80 em PBS na área da reação. Então, as lâminas foram incubadas à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos e após, lavadas por 3 vezes com PBS, 5 minutos para cada lavagem. Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com a solução de AEC (amino-etil-carbazol - Sigma), recém-preparada (20 mg de AEC dissolvida em 5 ml de dimetilformamida - Sigma e em 100 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4.9) e adicionado 50 µl de H₂O₂ a 30%. As lâminas foram deixadas na solução de AEC, no escuro, por 8 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas por 10 minutos com tampão acetato de sódio 0.1 M, pH 4.9. Finalmente, lavadas 3 vezes com PBS, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos e coradas com hematoxilina de Mayer, marca MERCK, (na diluição 1:10), por 20 a 30 segundos, rinsadas com água destilada até eliminar todo o corante e montadas com glicerina tamponada.

3.2.1.4-Leitura e Interpretação das Lâminas

Para a leitura das lâminas (**Figura 7**) foi utilizado um microscópio óptico, marca Nikon, aumento de 40 vezes e foram observadas:

- ❖ **Células HCMV antígeno *pp65* positivas:** identificadas pela coloração marrom característica, nuclear ou perinuclear, principalmente em leucócitos polimorfonucleares; ocasionalmente em monócitos.
- ❖ **Células HCMV antígeno *pp65* negativas:** núcleo azul

Controles positivos foram utilizados em todas as reações e consistia de lâminas congeladas de um ou mais pacientes com antigenemia sabidamente positiva ou controles comerciais (fibroblastos fetais humanos infectados com HCMV).

A **Figura 7** ilustra células antígeno-positivas e negativas em uma reação de antigenemia para o HCMV.

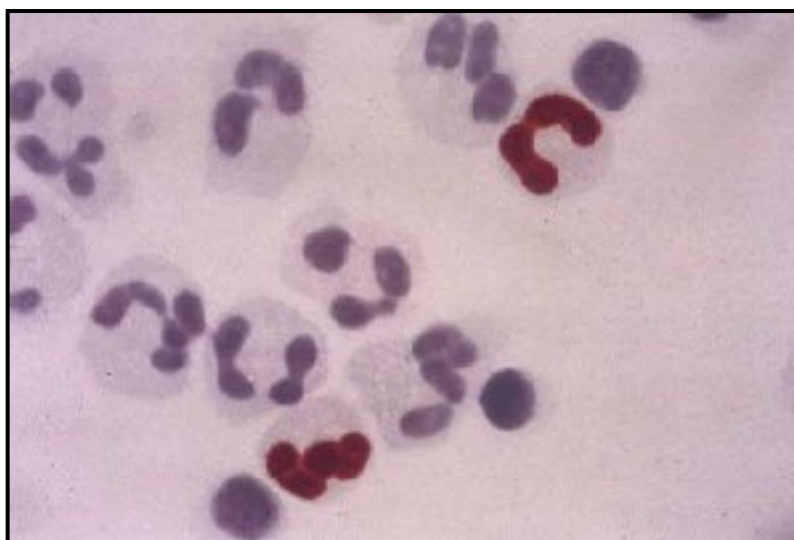


Figura 7-Reação de imunoperoxidase (antigenemia). Células antígeno-positivas *pp65* do HCMV, identificadas pela coloração castanho-avermelhada nuclear ou perinuclear em leucócitos polimorfonucleares; Células negativas – núcleo azul, Os leucócitos foram preparados em lâminas microscópicas, fixadas com Paraformaldeído/NP40 e submetidos à coloração com imunoperoxidase com a utilização dos anticorpos monoclonais C10/C11.

3.2.2-Reação em Cadeia da Polimerase Tipo Nested PCR

3.2.2.1-Extração de DNA

A extração do DNA genômico de leucócitos foi realizada a partir do precipitado de leucócitos extraídos com Dextran 5%, anteriormente descrito.

3.2.2.2-Lise de Leucócitos

O precipitado de leucócitos foi lisado em solução de TKM1 (Tris - HCl 10 mM (pH 7.6); KCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM e EDTA 20 mM), centrifugados por 10 minutos a 2.500 rpm, por duas vezes consecutivas, quando foi adicionado 3 gotas de Nonidet P-40 na primeira lavagem. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado a solução de TKM2, 8 ml da solução contendo Tris - HCl 10 mM (pH 7.6); NaCl 0,4 M; MgCl₂ 10 mM; KCl 10 mM; EDTA 2 mM e 0,025 mM de duodecil sulfato de sódio (SDS) 20%. Em seguida o material foi incubado por 40 minutos a uma temperatura de 56° C e após incubação adicionou-se 0,3 ml de NaCl 5 M. O material foi centrifugado por 15 minutos a 6.000 rpm, e após centrifugação transferiu-se o sobrenadante para outro tubo, descartando o precipitado de proteínas.

3.2.2.3-Precipitação do DNA

Depois da transferência da fase aquosa para outro tubo, foi realizada a precipitação do ácido nucléico pela adição de acetato de sódio 3M pH 5.3 (10% do volume) e etanol absoluto gelado (3 vezes o volume).

O DNA foi solubilizado em água destilada, deionizada e estéril e deixado em banho-maria a 37° C por 8 horas. Sua concentração foi estimada pelo espectrofotômetro, através do valor da densidade ótica em comprimento de onda igual a 260 nm (SAMBROOK *et al*, 1989).

3.2.2.4-Amplificação Gênica do HCMV pela Reação em Cadeia da Polimerase PCR

3.2.2.4.1-Condições da Reação

A Reação em Cadeia da Polimerase seguiu o método descrito por Saiki *et al* (SAIKI *et al*, 1985; SHIBATA *et al*, 1988; DEMMLER *et al*, 1988), com algumas modificações. Cada reação de amplificação utilizou 0,5 a 1 µg do DNA (obtido pelo método de extração de DNA anteriormente descrito) em volume total de 20 µl, contendo 50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris (pH 8.4), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 0,1 mM de cada “primer”, 200 mM da mistura desoxirribunucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 2 unidades de Taq DNA polimerase.

Foram complementados 30 ciclos de amplificação para cada amostra e cada ciclo foi constituído de 3 etapas: a) separação das hélices de DNA por aquecimento a 94° C durante 1 minuto; b) ligação complementar entre os “primers” e o DNA em temperatura de 55° C por 1 minuto (anelamento) e c) síntese do DNA pela Taq polimerase, em temperatura de 72° C por 1 minuto (extensão).

Os ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler” - Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn, EUA). As amostras foram aquecidas inicialmente a 94° C por 7 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que pudesse interferir com a reação enzimática e, após o último ciclo, o período de extensão final (72° C) foi de 7 minutos.

3.2.2.4.2-Iniciadores (“Primers”) Externos

Foram usados dois iniciadores que flanqueiam uma região conservada nas diversas cepas de vírus HCMV, não amplificando DNA de outros herpes-vírus (**Tabela 4**).

Tabela 4-Seqüência dos primers externos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HCMV, utilizados na PCR.

Primers externos *	Seqüência (5' → 3')	Localização do produto amplificado no genoma §
MIE 4	CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C	731-755
MIE 5	CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTG G	1165-1141

*MIE = Principal antígeno imediatamente precoce - Human cytomegalovirus (Towne) major immediate-early antigen (MIE) gene, exon 4. (GeneBank HS5MIE4).

§ Expresso como número de nucleotídeos. Os nucleotídeos são numerados seqüencialmente dentro de cada gene.

O par de primers denominados primers MIE, amplificam uma seqüência de **435** pares de base do DNA do HCMV que codifica uma porção do antígeno “major immediate-early” (MIE) do HCMV (cepa Towne). A porção do gene MIE que é amplificado está contido no exon 4 deste gene (**DEMMLER, 1988**)

3.2.2.4.3-Reamplificação do Genoma do HCMV pela Nested PCR

Utilizando-se do mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação foi reamplificado utilizando um par de “primers” interno (**Tabela 5**).

Tabela 5-Seqüência de primers internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HCMV utilizados na nested PCR.

Primers internos *	Seqüência (5' → 3')	Localização do produto amplificado no genoma §
IE 1	CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC	926-945
IE 2	CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC	1087-1067

* IE = antígeno imediatamente precoce - Human cytomegalovirus (Towne) immediate-early antigen (IE) gene, exon 4. (GeneBank HS5MIE4).

§ Expresso como número de nucleotídeos. Os nucleotídeos são numerados seqüencialmente dentro de cada gene.

O par de primers denominados primers IE, amplificam uma seqüência de **159** pares de base do DNA do HCMV que codifica uma porção do antígeno “immediate-early” (IE) do HCMV (cepa Towne). A porção do gene IE que é amplificado está contido no exon 4 deste gene. (Stenberg *et al*, 1984)

As condições da reação foram as mesmas utilizadas para fazer a primeira reação de amplificação (PCR).

3.2.2.4-Detecção do Fragmento Amplificado

Após as 2 reações de amplificação e reamplificação, 5 µl do produto da nested PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio para visualização do fragmento com luz ultravioleta. Nas amostras positivas foram observados um fragmento de DNA de 159 pb ao passo que não foi observado nenhum fragmento nas amostras negativas.

Em todos os experimentos realizados, foi utilizado como controle positivo da reação a cepa AD-169 do HCMV e como controle negativo a água (**Figura 8**).

3.2.2.5-Amplificação Gênica de um Fragmento do Gene da Beta-Globina Humana pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação de um fragmento do gene da Beta-Globina (β -Globina) humana foi utilizada nas amostras estudadas como controle interno da reação. O produto obtido de **357** pares de bases indicou principalmente a presença de DNA nas amostras e que o DNA extraído era de boa qualidade e que não continha substâncias inibidoras da reação, garantindo assim, um controle de qualidade do experimento, indispensável à segurança dos resultados.

3.2.2.5.1-Condições da Reação

A reação em cadeia da polimerase com controle interno da reação seguiu o método descrito por Saiki *et al* (SAIKI *et al*, 1985) para PCR simples e o método descrito por Brainard *et al* (BRAINARD *et al*, 1994) para a nested PCR.

3.2.2.5.2-Iniciadores (“Primers”) Externos que Flanqueiam o Gene da Beta-Globina Humana, para a Primeira Amplificação.

Foram utilizados dois iniciadores que flanqueiam uma região constante do gene da β - globina (Tabela 6).

Tabela 6-Seqüência de primers externos que flanqueiam uma região conservada do gene da β -Globina utilizados na PCR.

Primers externos *	Seqüência (5' → 3')	Localização do produto amplificado no genoma §
P3	AGA CAG AGA AGA CTC TTG	62336-62353
P5	TCA TTC GTC TGT TTC CCA TTC	62726-62746

Genoma de *Homo Sapiens*, região do complexo genômico da Globina Beta (HBB@), localizado no braço curto do cromossomo 11, posição da banda 15 (GeneBank NG000007).

§ Expresso como número de nucleotídeos. Os nucleotídeos são numerados seqüencialmente dentro de cada gene.

O par de primers denominado primers P amplifica uma seqüência de 411 pares de base do DNA do gene da Globina Beta, na primeira reação de PCR.

3.2.2.5.3-Reamplificação do Genoma da Beta-Globina pela Nested PCR

Utilizando-se do mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação foi reamplificado com o par de “primers” internos (Tabela 7).

Tabela 7-Seqüência de primers internos que flanqueiam uma região conservada do gene da β -Globina utilizados na nested PCR.

Primers internos*	Seqüência (5' → 3')	Localização do produto amplificado no genoma §
110	CTG CCT ATT GGT CTA TTT T	62379-62702
109	CCC TTC TTC CTA TGA CAT GAA CTT AAC CAT	62676-62702

* Genoma de *Homo Sapiens*, região do complexo genômico da Globina Beta (HBB@), localizado no braço curto do cromossomo 11, posição da banda 15. (GeneBank NG000007).

§ Expresso como número de nucleotídeos. Os nucleotídeos são numerados seqüencialmente dentro de cada gene.

O par de primers denominados primers 110 e 109 amplificam uma seqüência de **357** pares de base do DNA do gene da Globina Beta (**Figura 8**).

A **Figura 8** ilustra os resultados da amplificação dos fragmentos do HCMV e da β -Globina Humana pela Reação da nested PCR.

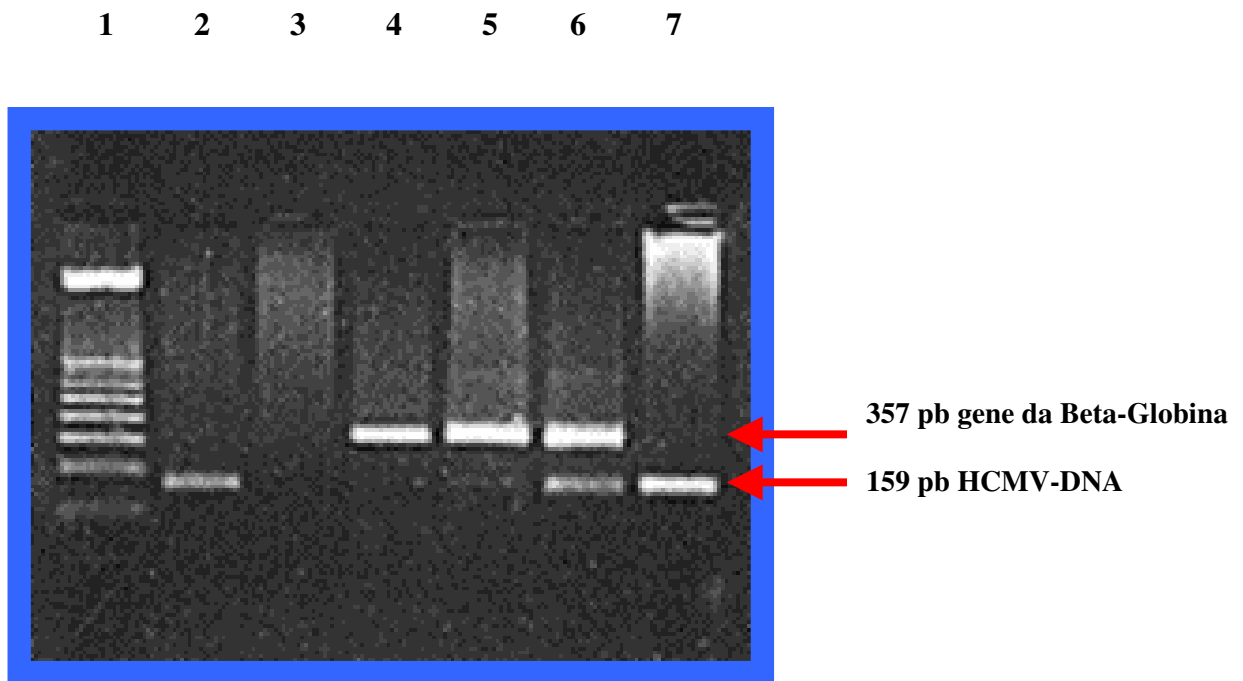


Figura 8-Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2%. Linha 1 – Marcador de peso molecular (Ladder de 100 pb – GIBCO BRL); Linha 2 – controle positivo (cepa AD169 do HCMV); Linha 3 – controle negativo; Linhas 4 e 5 – amostras de DNA de sangue positivas para o gene da Beta-Globina (controle interno da reação) e negativas para o HCMV; Linha 6 – amostra de DNA de sangue positiva para o gene da Beta-Globina e para o HCMV; Linha 7 – controle positivo (cepa AD169 do HCMV).

3.2.3-Cuidados Especiais Utilizados para se evitar Contaminação das Amostras durante a Reação da PCR

- ❖ As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em salas diferentes (sala pré-PCR) de onde a amplificação foi feita (sala pós-PCR);
- ❖ Todos os reagentes e materiais pré-PCR e pós-PCR foram preparados e utilizados em ambientes diferentes;

- ❖ Antes da abertura dos tubos de microcentrífuga foi efetuada rápida centrifugação para concentrar o líquido contido no tubo na região inferior e evitar sua dispersão por evaporação.
- ❖ Todo material plástico (ponteiras e tubos plásticos para PCR) utilizado foi novo e não autoclavado;
- ❖ Trocas constantes de luvas foram feitas durante todo o procedimento.

3.2.4-DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS IgM E IgG ANTI-HCMV UTILIZANDO O MÉTODO ELISA

Para as reações sorológicas foram coletados 8 ml de sangue em tubo estéril seco. Após a centrifugação, os soros foram separados, aliquotados e armazenados a -20° C até sua utilização. A detecção de anticorpos das classes IgM e IgG anti-HCMV foi realizada utilizando kits comerciais das marcas Sorin (Sorin Biomédica Diagnostics, Saluggia, Itália) e Cobas CORE (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), segundo as especificações dos fabricantes.

Na pesquisa de anticorpos IgM anti-HCMV com os kits da Sorin, 100 µl de amostras de soro diluídas a 1:101, foram adicionadas à cavidade da placa de ELISA, sensibilizados com anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-IgM humana. Após incubação por 1 hora a 37° C, as placas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos (SST), contendo Tween 20 (TW). A seguir, concentrações apropriadas de antígenos de HCMV e conjugado (anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-HCMV marcado com peroxidase) foram misturados, e 100 µl dessa solução foram adicionados às cavidades e as placas deixadas em repouso por 1 hora a 37° C. As placas foram então lavadas com SST-TW, como já descrito, e 100 µl do sistema substrato (tetrametilbenzidina-peróxido de hidrogênio) foram adicionados às cavidades. Trinta minutos após a adição do sistema substrato, as reações foram bloqueadas adicionando-se às cavidades 200 µl de ácido sulfúrico 1N. As absorbâncias das reações foram lidas a 450, 630nm, utilizando uma leitora de ELISA (ETI-SYSTEM READER SORIN BIOMÉDICA, Itália). Os cálculos foram realizados automaticamente através de um programa de computação específico (ETI-

SYSTEM SOFTWARE). Todas as reações foram realizadas em duplicata e as médias das densidades ópticas (DO) foram consideradas. Em cada ensaio, soros controles foram incluídos para o cálculo do “cut-off”. Amostras cujas absorbâncias foram maiores que o valor do “cut-off” foram consideradas reagentes.

Para a pesquisa de anticorpos IgG anti-HCMV, 100 µl de amostras de soro diluídas 1:505 foram adicionadas às cavidades de placas de ELISA revestidas com antígeno de HCMV. Após incubação das placas durante 1 hora à 37° C, as cavidades foram lavadas e às mesmas foram adicionadas 100 µl de anti-IgG humana marcada com peroxidase. Após incubação por 1 hora à 37° C, as cavidades foram lavadas e às mesmas foram adicionados 100 µl do sistema substrato (TMB-H₂O₂), as reações foram bloqueadas adicionando-se às cavidades 200 µl de ácido sulfúrico 1 N. As absorbâncias das reações foram lidas a 450, 630 nm, utilizando uma leitora de ELISA (ETI-SYSTEM READER SORIN BIOMÉDICA, Itália). Os cálculos foram realizados automaticamente através de um programa de computação específico (ETI-SYSTEM SOFTWARE). Todas as reações foram realizadas em duplicata e as médias das densidades ópticas (DO) foram consideradas. Em cada ensaio, soros controles foram incluídos para o cálculo do “cut-off”. Amostras cujas absorbâncias foram maiores que o valor do “cut-off” foram consideradas reagentes.

A detecção de anticorpos IgM e IgG anti-HCMV com o kit Cobas CORE é totalmente automatizada. Para a pesquisa de anticorpos IgM, as amostras de soros são misturadas com esferas de poliestireno revestidas com anticorpos monoclonais de camundongo anti-IgM humana. Após o período de incubação e lavagem das esferas, os anticorpos IgM específicos são reconhecidos simultaneamente por dois sistemas de detecção, o primeiro composto pelo antígeno de CMV (linhagem AD 169, cultura de células) e fragmentos F(ab')₂ de anticorpos IgG de camundongo anti-HCMV marcados com peroxidase e o segundo de antígeno recombinante p52 de HCMV (UL44) marcado com peroxidase. Após o período de incubação e lavagem das esferas, as moléculas de enzima fixadas reagem com o substrato apropriado, sendo a intensidade da cor resultante proporcional à quantidade de anticorpos IgM anti-HCMV presentes na amostra de soro. Utilizando um valor de cut-off definido por soros controle, o Cobas CORE calcula automaticamente os resultados, que são expressos como negativos, positivos ou duvidosos.

Para a pesquisa de anticorpos IgG, as amostras de soro são misturadas com esferas de poliestireno revestidas com antígenos recombinantes de HCMV. Após o período de incubação e lavagem das esferas, os anticorpos IgG específicos são reconhecidos por anticorpos monoclonais de camundongo anti-IgG humana marcados com peroxidase. Após o período de incubação e lavagem das esferas, as moléculas de enzima fixadas reagem com o substrato apropriado, sendo a intensidade da cor resultante proporcional à quantidade de anticorpos anti-HCMV presentes na amostra de soro. Utilizando uma curva de calibração apropriada, o Cobas CORE calcula automaticamente os resultados, que são expressos como negativos (<0.5 UI/ml), duvidosos (0.5 a 0.7 UI/ml) ou positivos (>0.7 UI/ml).

3.2.5-Critérios utilizados para Definição de Infecção Ativa por HCMV

A presença de pelo menos um dos itens abaixo foi considerada indicativa de infecção ativa por HCMV:

- ❖ Soroconversão após o transplante, com o aparecimento dos anticorpos IgM e/ou IgG anti-HCMV, detectados por ELISA (**infecção primária**);
- ❖ Aumento significativo dos títulos de anticorpos IgG anti-HCMV pós-transplante, comparados com os títulos no pré-transplante, e/ou aparecimento de IgM anti-HCMV, detectados por ELISA (**infecção secundária**);
- ❖ **Nested PCR** - duas ou mais reações positivas, consecutivas (**EINSELE et al, 1995**);
- ❖ **Antigenemia** - uma ou mais células antígeno-positivas para HCMV, detectadas nos leucócitos polimorfonucleares (**BOECKH et al, 1999**).

3.2.6-Critérios utilizados para Definição de Doença por HCMV

Para caracterização de doença por HCMV, além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas acima, fez-se necessária a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo HCMV (**LJUNGMAN & PLOTKIN, 1995; LJUNGMAN et al, 2002**):

- ❖ **Pneumonia (HCMV-IP)** - a presença de sinais e/ou sintomas de doença pulmonar combinado com a detecção do CMV em lavado brônquio-alveolar ou biópsia de pulmão. A detecção deverá ser realizada por cultura celular, testes histopatológicos, análise imunohistoquímica ou hibridização *in situ*.
- ❖ **Doença Gastrointestinal (HCMV-TGI)** - sintomas gastrointestinais (colite, gastrite ou esofagite) associados com histologia ou imunohistoquímica positiva para HCMV de biópsias de lesões macroscópicas do tracto gastrointestinal;
- ❖ **Hepatite** - O vírus deverá ser demonstrado em biópsias hepáticas (por cultura, imunohistoquímica, hibridização “*in situ*” ou PCR) em combinação com:
 - Aumento de pelo menos duas vezes o valor máximo normal de alanina-amino-transferase (ALT);
 - Achados histopatológicos consistentes com hepatite ou colangite;
- ❖ **Doenças Neurológicas** - Sintomas como encefalite, mielite transversa ou outros sinais de doença difusa do sistema nervoso central juntamente com a detecção de HCMV em fluido cerebroespinal por PCR, por cultura ou detecção do antígeno;
- ❖ **Retinite** - lesões oftalmológicas típicas, com ou sem provas virológicas, diagnosticadas pelo exame de fundo de olho, realizado pelo oftalmologista, com presença de retinite necrotizante com infiltrado branco algodinoso, áreas de hemorragia e irite e vitrite mínima (PANUTTI *et al*, 1996).

3.2.7-Critérios utilizados para Definição de Recorrência de Infecção Ativa por HCMV

- ❖ Recorrência da infecção ativa pelo HCMV foi definido como infecção ocorrendo após a negatificação dos testes de AGM e/ou PCR após o tratamento do episódio inicial da infecção.

3.2.8-Critérios Utilizados para Definição de Infecção Ativa e/ou Doença Tardia por HCMV

- ❖ Infecção ativa e doença por HCMV tardia foram definidas como aquelas que ocorreram mais de 100 dias após o transplante.

3.2.9-Metodologia Estatística Utilizada

As proporções de pacientes dentro de cada grupo de características e resultados foram comparadas utilizando o teste de Fisher (“Fisher’s exact test”) e as comparações das variáveis contínuas também foram realizadas utilizando o teste de Wilcoxon (“Wilcoxon rank sum test”).

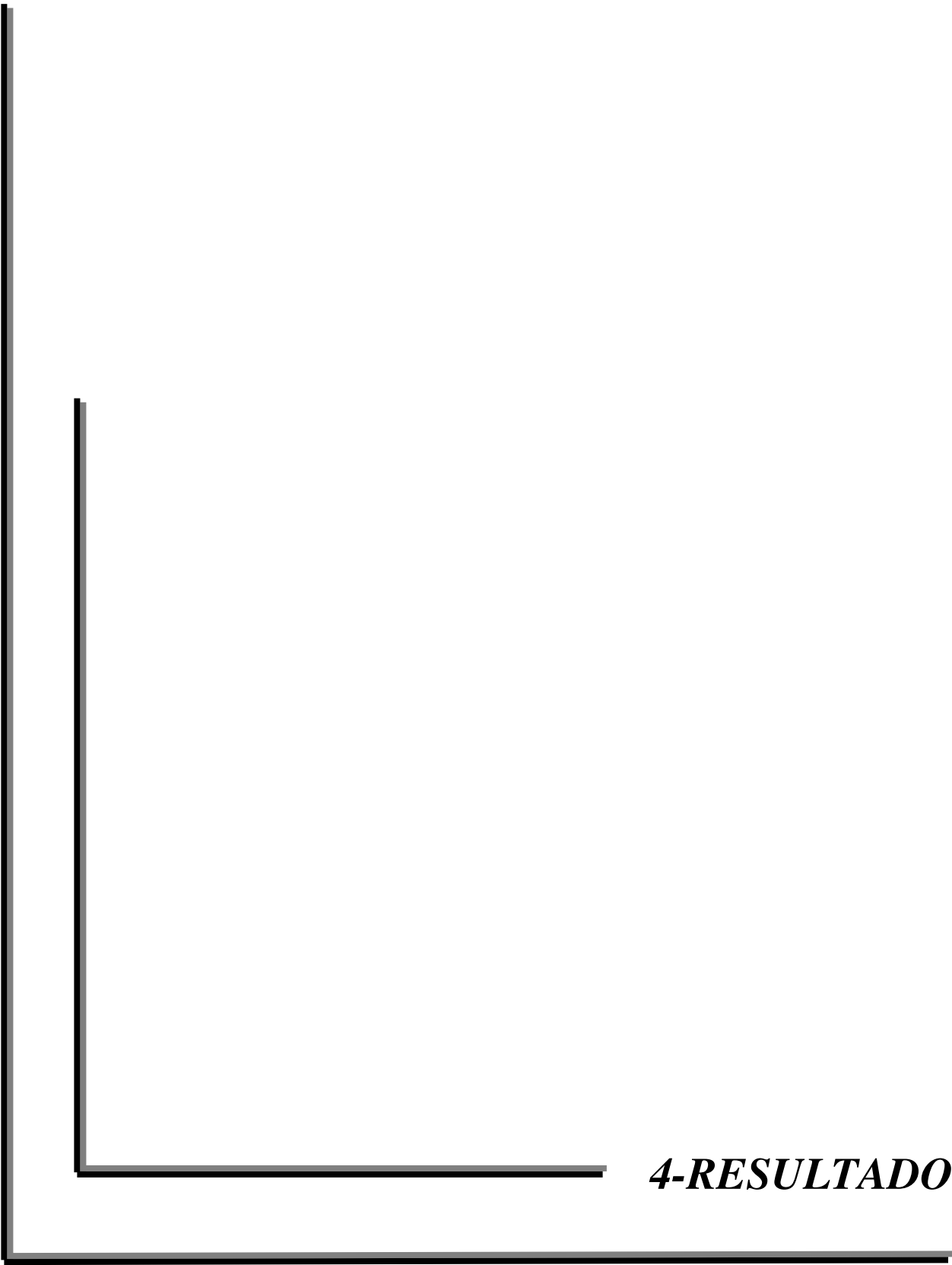
Os pacientes foram monitorizados até o dia 150 após o transplante ou até o dia 1.152 para sobrevida global.

Todos os dados foram analisados utilizando estatísticas descritivas (mediana e médias para variáveis contínuas e porcentagens para variáveis categóricas).

A probabilidade de eventos (antigenemia positiva e PCR positivo) e as curvas de sobrevida foram analisadas utilizando o método de Kaplan-Meier (“estimate of a survival curve using the Kaplan-Meier method”) (**KAPLAN & MEIER, 1958**) e os grupos foram comparados utilizando o teste de log-rank ou Mantel-Haenzel. A análise de regressão univariada foi verificada utilizando-se Modelos de Riscos Proporcionais de Cox (“Cox Proportional Hazards Regression Model”). Os fatores de risco incluídos foram tipo de enxerto, idade do doador, idade e sexo do receptor, sexo do doador versus receptor, doença hematológica maligna, profilaxia universal com ganciclovir, sorostatus receptor-doador e GVHD aguda. Sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos utilizados foram previamente definidos (**ALTMAN, 1991**).

O valor de $P < 0.05$ foi considerado como estatisticamente significante.

As análises estatísticas foram realizadas com o software S-Plus 2000 da MathSoft, Inc.



4-RESULTADOS

4.1-TOTAL DE EXAMES REALIZADOS DURANTE A MONITORIZAÇÃO

Foram realizados neste estudo, **2.565 exames** para detecção de infecção ativa pelo HCMV, incluindo os exames de nested PCR (1.127), AGM (1.092) e os sorológicos IgM e IgG-HCMV (346) nos 69 pacientes monitorizados (**Tabela 8**).

Tabela 8-Total de exames realizados nos pacientes monitorizados (incluindo doadores).

	POSITIVOS	NEGATIVOS	*INDETERMINADOS	TOTAL
NESTED PCR	353 (31,3%)	678 (60,1%)	96 (8,5%)	1.127
ANTIGENEMIA	97 (8,9%)	732 (67%)	263 (24%)	1.092
SOROLOGIA				346
TOTAL	450 (20,3%)	1.410 (63,5%)	359/2.219 (16,7%)	2.565

** neste grupo estão incluídas também as amostras que não apresentaram DNA ou número de células suficientes para a realização dos testes de Nested PCR e antigenemia*

4.2-CARACTERÍSTICAS DOS DOADORES INCLUÍDOS NO ESTUDO

Foram avaliados 69 doadores (referentes aos receptores incluídos no estudo), irmãos, HLA idênticos, sendo que 40 foram doadores do sexo masculino (58%) e 29 foram doadores do sexo feminino (42%). A idade mediana dos doadores foi de 24 anos (variação 4 a 58 anos). A soropositividade ELISA IgG para o HCMV entre os doadores foi de **81,15%**.

Quarenta e cinco (65,2%) foram doadores referentes aos receptores do **Grupo A** (grupo de receptores de transplantes de células progenitoras hematopoéticas que **receberam profilaxia universal** contra o HCMV), 25 (55,5%) eram do sexo masculino e 20 (44,4%) do sexo feminino. A idade mediana dos doadores relacionados ao Grupo A foi de **33 anos** (variação 5 a 58 anos).

Vinte e quatro (34,8%) foram doadores referentes aos receptores do **Grupo B** (grupo de receptores de TCPH que **não receberam profilaxia universal** contra o HCMV), 15 (62,5%) eram do sexo masculino e 9 (37,5%) eram do sexo feminino. A idade mediana dos doadores relacionados ao Grupo B foi de **18 anos** (variação 4-58 anos) (**Tabela 9**).

Tabela 9-Características dos 69 doadores estudados separados pelos grupos de estudo.

	Grupo A	Grupo B	Total	p
Número de doadores (%)	45 (65,2)	24 (34,8)	69 (100)	
Sexo M/F	25/20	15/9	40/29	NS⁽¹⁾
(%/%)	(55,5/44,5)	(62,5/37,5)	(58/42)	
Idade em anos - mediana	33 (5-58 anos)	18 (4-58 anos)	24 (4-58 anos)	0,0016⁽²⁾
(variação)				
Sorologia-ELISA	41/45 (91,1)	15/24 (62,5)	56/69 (81,15)	
IgG - HCMV+ (%)				0,0077⁽³⁾
Sorologia-ELISA	4/45 (8,9)	9/24 (37,5)	13/69 (18,8)	
IgG - HCMV - (%)				

(1) Qui-Quadrado; (2) Teste de Wilcoxon; (3) Teste de Fisher

Legenda: **Sexo M:** doadores do sexo masculino; **sexo F:** doadores do sexo feminino; **IgG-HCMV:** imunoglobulina da classe G contra o HCMV; **+**: doador com IgG positiva contra o HCMV; **-**: doador com IgG negativa contra o HCMV.

As características referentes à idade, sexo e à soropositividade IgG contra o HCMV no pré-transplante dos doadores poderão ser observadas no **Gráfico 1**.

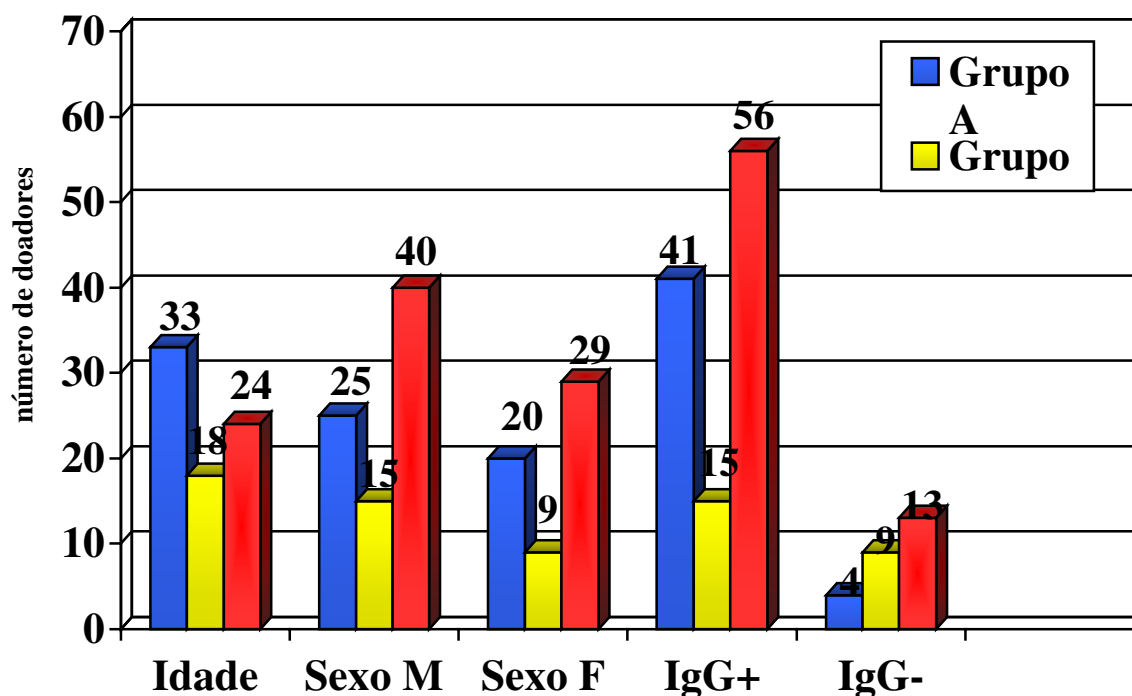


Gráfico 1-Características dos doadores em relação à idade, sexo e à sorologia IgG-HCMV.

Em relação aos testes realizados no período do pré-transplante, do total de 69 doadores acima mencionados, todos foram avaliados pelos testes sorológicos (IgM e IgG-HCMV por ELISA); 48 doadores foram analisados pela nested PCR, sendo que, 41 também foram analisados pela antigenemia. Os motivos dos outros doadores não terem sido analisados por estes testes foram por indisponibilidade de coleta das amostras. Todos os testes analisados nesse grupo de doadores no pré-transplante apresentaram resultados negativos para infecção ativa por HCMV (APÊNDICE B).

4.3-CARACTERÍSTICAS DOS RECEPTORES INCLUÍDOS NO ESTUDO

Participaram do protocolo de monitorização 69 receptores alogênicos de medula óssea e/ou de células progenitoras periféricas, sendo que 48 foram receptores do sexo masculino e 21 do sexo feminino. A idade mediana dos receptores foi de **27,8 anos**

(variação 2 - 59 anos). Foram estudados dois grupos de pacientes (Tabela 10, 11 e Gráfico 2):

- ❖ **Grupo A (pacientes que receberam profilaxia universal contra o HCMV):** Foram aqueles com doença hematológica maligna (LMC, LMA, SMD, LLA) e *status* sorológico IgG-HCMV positivo no pré-transplante, com doador soropositivo ou soronegativo (D+/R+; D-/R+) e receptores soronegativos com doadores soropositivos (D+/R-) (alto risco). Este grupo foi composto por **45 pacientes**.
- ❖ **Grupo B (pacientes que não receberam profilaxia universal contra o HCMV):** Foram aqueles com doença hematológica não-maligna no pré-transplante (AA) ou *status* sorológico IgG-HCMV: D-/R-. Este grupo foi composto por **24 pacientes**, sendo 13 adultos com doença hematológica não-maligna, 1 com doença hematológica maligna e status D-/R-, e dez crianças (7 com doença hematológica maligna e 3 com anemia aplástica), não receberam profilaxia universal, pois não seguiram o mesmo protocolo.

Tabela 10-Características dos 69 receptores incluídos no estudo.

	Grupo A (%)	Grupo B (%)	Total	p
Número de Receptores	45 (65,2)	24 (34,8)	69 (100)	
Sexo M/F	30/15	18/6	48/21	
	(66,6/33,3)	(75/25)	(69,6/30,4)	NS⁽¹⁾
Idade em anos mediana (variação)	31,6	20,9	27,8	
	(8-59)	(2-53)	(2-59)	0,001⁽²⁾
Doença de Base:				
Malignas:	45/45	11/24	56	
• LMC	33 (73,3)	5 (20,8)	38 (55)	
• SMD	1 (2,2)	0	1 (1,4)	
• LLA	2 (4,5)	2 (8,3)	4 (5,8)	0,001^(3,4)
• LMA	9 (20)	4 (16,7)	13 (18,8)	
- Não-malignas:	0/45	13/24	13	
• AA	0	13 (54)	13 (18,8)	
Sorologia - ELISA	41 (91,2)	19 (79,2)	60 (87,0)	
IgG-HCMV + (%)				NS⁽³⁾
Sorologia -ELISA	4 (8,8)	5 (20,8)	9 (13,0)	
IgG-HCMV - (%)				

(1) *Qui-Quadrado*; (2) *Teste de Wilcoxon*; (3) *Teste de Fisher*; (4) *Maligna x não maligna*

Legenda: **Grupo A:** receptores que receberam ganciclovir universal; **Grupo B:** receptores que não-receberam ganciclovir universal; **M/F:** sexo masculino/sexo feminino; **IgG:** imunoglobulina da classe G do HCMV; **+**: receptor com sorologia IgG positiva contra o HCMV; **-:** receptor com sorologia IgG negativa contra o HCMV; doenças hematológicas malignas dos pacientes do estudo: **LMC:** leucemia mielóide crônica; **SMD:** síndrome mielodisplásica; **LLA:** leucemia linfóide aguda; **LMA:** leucemia mielóide aguda; doença hematológica não-maligna: **AA:** anemia aplástica.

Tabela 11-Características referentes ao transplante nos Grupos A e B estudados: Status sorológico (HCMV) do doador e receptor (D/R), tipo de enxerto realizado e sexo do doador e receptor.

Status sorológico pré-transplante	IgG-HCMV	Grupo A (%)	Grupo B (%)	Total (%)	P*
D/R					
• D+/R+ (n, %)		37 (82)	15 (62,5)	52 (75,4)	
• D+/R- (n, %)		4 (8,9)	0	4 (5,8)	
• D-/R+ (n, %)		4 (8,9)	4 (16,7)	8 (11,6)	0,011
• D-/R- (n, %)		0	5 (20,8)	5 (7,2)	
Tipo de Enxerto:					
• MO (n, %)		26 (57,8)	23 (95,8)	49 (71)	
• CPP (n, %)		18 (40)	1 (4,2)	19 (27,5)	0,0014
• MO+CPP (n, %)		1 (2,2)	0	1 (1,4)	NA
Sexo D/R:					
• FF (n, %)		7 (15,5)	4 (16,6)	11 (15,9)	
• FM (n, %)		13 (28,8)	5 (20,8)	18 (26)	
• MF (n, %)		8 (17,8)	2 (8,3)	10 (14,5)	NS
• MM (n, %)		17 (37,8)	13 (54,2)	30 (43,5)	

* – *Teste de Fisher*

Legenda: Grupo A: receptores que receberam ganciclovir universal profilático; Grupo B: receptores que não-receberam ganciclovir universal profilático; IgG: imunoglobulina da classe G do HCMV; R+: receptor com sorologia IgG positiva contra o HCMV; R-: receptor com sorologia IgG negativa contra o HCMV; D+: doador com sorologia IgG positiva contra o HCMV; D-: doador com sorologia IgG negativa contra o HCMV. Tipo de enxerto: MO: medula óssea; CPP: célula progenitora periférica. Sexo Doador/Receptor: FF: doador do sexo feminino com receptor do sexo feminino; FM: doador do sexo feminino com receptor do sexo masculino; MF: doador do sexo masculino com receptor do sexo feminino; MM: doador do sexo masculino com receptor do sexo masculino; NA: não avaliado; NS: não significativo.

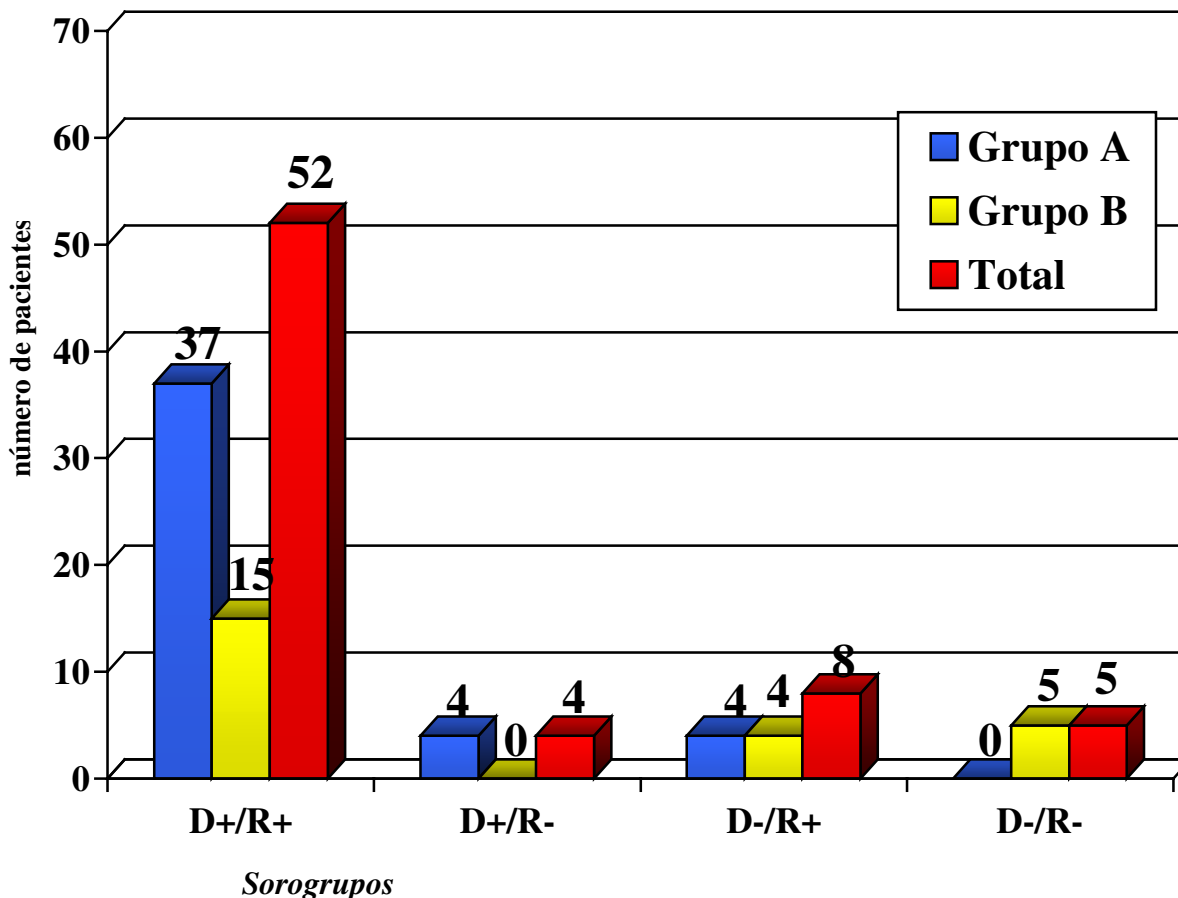


Gráfico 2-Status sorológico em relação ao HCMV do doador e receptor (D/R).

4.4-INFECCÃO ATIVA PELO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

A infecção ativa pelo HCMV foi detectada por PCR e/ou AGM em 55/69 pacientes estudados (79,7%); 47/69 pacientes (68,1%), tiveram pelo menos 2 resultados de PCR positivos consecutivos; 39/69 pacientes (56,5%), tiveram pelo menos 1 célula antígeno-pp65 positiva. Em 6/69 pacientes (8,7%) a sorologia IgM-HCMV foi positiva (ELISA). 12/69 pacientes (17,4%) apresentaram aumentos significativos dos títulos de anticorpos IgG-HCMV detectados por ELISA (Tabela 12). O tempo 0 refere-se ao dia do transplante.

Entre os 55/69 pacientes com infecção ativa, 6/55 (10,9%) apresentaram doença por HCMV. Entre os 6 pacientes que tiveram doença por HCMV, a taxa de óbito foi de 33,3% (2/6). Nove pacientes (16,4%) apresentaram GVHD agudo; destes, 4 pertenciam

ao Grupo A e 5 pertenciam ao Grupo B, sendo que destes 9 pacientes, 2 evoluíram para doença por HCMV (destes, 1 óbito por HCMV ocorreu).

Grupo A: 36/45 pacientes deste grupo (**80%**) apresentaram infecção ativa pelo HCMV, diagnosticada por PCR e/ou AGM, com uma mediana de tempo de **54** dias após o transplante (variação 0-145 dias); 31/45 pacientes (**68,9%**) tiveram pelo menos 2 resultados de PCR positivos consecutivos, com uma mediana de **54** dias (variação 0-145 dias) após o transplante. 23/45 pacientes (**51%**), tiveram pelo menos 1 célula antígeno-positiva, com uma mediana de **62** dias (variação 17-131 dias) após o transplante. Em 4/45 pacientes (**8,9%**), a sorologia IgM-HCMV foi positiva por ELISA. Em 9/45 pacientes (**20%**), houve aumento significativo dos títulos de anticorpos IgG-HCMV.

Entre os 36/45 pacientes com infecção ativa pelo HCMV do Grupo A, 2 (5,5%) apresentaram doença por HCMV; porém, nenhum óbito por HCMV ocorreu.

Em 8/45 pacientes (17,7%), só a nested PCR fez diagnóstico de infecção ativa pelo HCMV. Em 5/45 pacientes (11,1%), só a AGM fez diagnóstico de infecção ativa pelo HCMV. Em 9/45 pacientes (20%), não foi diagnosticada infecção ativa pelo HCMV por nenhum dos métodos utilizados e todos permaneceram assintomáticos durante o seguimento.

Os pacientes do **Grupo A** receberam profilaxia universal com ganciclovir (contra o HCMV) com o início em média **27 dias** após o transplante.

Grupo B: 19/24 pacientes (79,2%) apresentaram infecção ativa pelo HCMV, diagnosticada por PCR e/ou AGM, com uma mediana de tempo de **26** dias (variação 0 - 103 dias); 16/24 pacientes (66,7%) tiveram pelo menos 2 ou mais resultados de PCR positivos consecutivos, com uma mediana de **24** dias (variação 0 - 86 dias); 16/24 pacientes (66,7%) tiveram pelo menos 1 célula antígeno positiva, com uma mediana de **34** dias (variação 5 -103 dias) após o transplante. Em 8,3% (2/24 pacientes), a sorologia IgM-HCMV por ELISA foi

positiva. Em 3/24 pacientes (12,5%) houve aumento significativo dos títulos de IgG-HCMV.

Entre os 19 pacientes com infecção ativa pelo HCMV pertencentes ao Grupo B, 4 (21%) apresentaram doença pelo HCMV, 2 óbitos ocorreram (50%), tendo como causa principal doença disseminada pelo HCMV.

Em 3/24 pacientes (12,5%), só a nested PCR fez diagnóstico de infecção ativa pelo HCMV. Em 3/24 pacientes (12,5%), só a AGM fez diagnóstico de infecção ativa pelo HCMV. Em 5/24 pacientes (20,8%), não foi diagnosticada infecção ativa pelo HCMV por nenhum dos métodos utilizados e todos permaneceram assintomáticos durante todo o seguimento.

Onze pacientes do Grupo A e 5 pacientes do Grupo B tiveram infecção ativa tardia (100 dias após o transplante). Doença tardia por HCMV não ocorreu nestes pacientes durante todo o período de seguimento.

Tabela 12-Resultados dos testes de monitorização laboratorial nos grupos estudados.

	Grupo A	Grupo B	P
Status Sobrevida 150 dias (vivo/morto)	40/5	19/5	NS⁽¹⁾
Infecção ativa por HCMV detectada por PCR e/ou AGM (%)	36/45 (80)	19/24 (79,2)	NS⁽¹⁾
Infecção ativa por HCMV detectada por PCR (%)	31/45 (68,9)	16/24 (66,7)	
Infecção ativa por HCMV detectada por AGM (%)	23/45 (51)	16/24 (66,7)	NS⁽²⁾
IgM-HCMV (%)	4/45 (9)	2/24 (8,5)	NS⁽¹⁾
Aumento dos títulos de IgG-HCMV (%)	9/45 (20)	3/24 (12,5)	NS⁽¹⁾
Doença por HCMV comprovada (%)	2/45 (4,5)	4/24(16,5)	NS⁽¹⁾
Óbito por HCMV (%)	0	2/24 (8,5)	NS⁽¹⁾

(1) *Teste exato de Fisher*; (2) *Teste de Wilcoxon*

Legenda: **PCR** – reação em cadeia da polimerase; **AGM** – antigenemia; **IgG**: imunoglobulina da classe G do HCMV; **IgM** - imunoglobulina da classe M do HCMV.

4.5-ANÁLISE DE INFECÇÃO ATIVA PELO HCMV PELO STATUS SOROLÓGICO

Cinco pacientes (9%), tiveram **infecções primárias**, sendo 4/36 (11%) pacientes do Grupo A e 1/19 (5,3%) do Grupo B. As **reinfecções ou reativações** (infecções secundárias) ocorreram em 51/55 (92,7%) pacientes, sendo que 33/45 (73,3%) das infecções secundárias foram diagnosticadas nos pacientes do Grupo A e 18/24 (75%) nos pacientes do Grupo B (**Tabela 13**).

Entre os 55 receptores com infecção ativa, 45 eram soropositivos para o HCMV (81,8%) e receberam o enxerto de doadores também soropositivos (**D+/R+**). Do Grupo A, 30/36 pacientes (83,3%) eram soropositivos para o HCMV e receberam enxerto de doadores soropositivos e do Grupo B, 15/19 pacientes (78,9%) eram soropositivos e receberam enxerto de doadores soropositivos.

Sete receptores eram soropositivos para o HCMV e receberam enxertos de doadores soronegativos, sendo que 4/45 receptores positivos/doadores negativos eram do Grupo A (8,9%) e 3/24 (12,5%) do Grupo B.

Cinco receptores eram soronegativos e receberam enxerto de doadores soropositivos (**D+/R-**). Quatro deles tiveram infecção ativa pelo HCMV, detectada por PCR e/ou AGM, contudo, nenhum evoluiu para doença por HCMV.

Tabela 13-Incidência de infecção ativa pelo HCMV detectada nos receptores estudados, divididos pelo status sorológico.

	Grupo A	Grupo B	Total
Taxa de Infecção Ativa, n (%)	36/45 (80,0)	19/24 (79,2)	55/69 (79,7)
Infecção Primária:	4/36 (11,0)	1/19 (5,3)	5/55 (9,0)
D+/R-	4/4 (100)	-	4/55 (7,3)
D-/R-	-	1/1 (100)	1/4 (25)
Infecção Secundária:	33/45 (73,3)	18/24 (75)	51/55 (92,7)
D+/R+	30/33 (90,9)	15/19 (83,3)	45/51 (88,2)
D-/R+	3/33 (9,1)	3/19 (16,7)	6/51 (11,8)

Legenda: **D+**: doador com sorologia IgG positiva para o HCMV; **R+**: receptor com sorologia IgG positiva para o HCMV; **D-**: doador com sorologia IgG negativa para o HCMV; **R-**: receptor com sorologia IgG negativa para o HCMV.

Tabela 14–Índice de infecção ativa, recorrência após término do tratamento com ganciclovir, doença e óbito por HCMV e presença de GVHD, baseados no status sorológico IgG-HCMV do doador (D) e do receptor (R), nos grupos estudados.

	Status IgG-HCMV	Pacientes, n (%)	Infecção ativa pelo HCMV (PCR+ e/ou AGM+), n (%)	Recorrência da Infecção ativa	Doença por HCMV	Óbito por HCMV	GVHD
GRUPO A	D+/R+	37 (82)	29 (78,4)	5/29 (20,7)	2 (5,4)	0	3 (8,1)
	D+/R-	5 (8,9)	4 (75,0)	0/4 (0)	0	0	1 (25,0)
	D-/R+	3 (6,7)	3 (100)	1/3 (33,3)	0	0	0
	TOTAL	45 (100)	36 (80,0)	6/36 (16,7)	2 (4,4)	0	4 (8,9)
GRUPO B	D+/R+	15 (62,5)	14 (93,3)	4/14 (21,4)	3 (20,0)	1 (6,7)	5 (33,3)
	D-/R+	4 (16,7)	3 (75,0)	1/3 (33,3)	1 (25,0)	1 (25,0)	0
	D-/R-	5 (20,8)	2 (40,0)	0	0	0	0
	TOTAL	24 (100)	19 (79,2)	5/19 (26,3)	4 (16,7)	2 (8,3)	5 (20,8)

Legenda: **D+**: doador com sorologia IgG positiva para o HCMV; **R+**: receptor com sorologia IgG positiva para o HCMV; **D-**: doador com sorologia IgG negativa para o HCMV; **R-**: receptor com sorologia IgG negativa para o HCMV.

A análise da **Tabela 14** permite observar o índice de infecção ativa e doença pelo HCMV estratificados pela sorologia do doador (D) e receptor (R). O sorogrupo **D+/R+** apresentou infecção ativa em **82,7%** dos casos, sendo **78,4%** dos casos no **Grupo A** e **93,3%** dos casos no **Grupo B**. Todos os casos de doença por HCMV comprovada pertenciam a este sorogrupo.

4.6-TEMPOS DE INÍCIO DE DETECÇÃO DE INFECCÃO ATIVA PELO HCMV

A comparação entre os tempos de início de detecção de infecção ativa pelo HCMV por AGM e PCR mostrou diferenças significantes entre os Grupos A e B (**Tabela 15**).

Tabela 15-Mediana dos tempos de início de detecção de infecção ativa pelo HCMV por PCR ou AGM.

	Grupo A	Grupo B	P*
Dia início infecção ativa detectada por PCR e/ou AGM – mediana - dias (variação)	54 (0-145)	26 (0-103)	0,007
Dia início infecção ativa detectada por PCR – mediana - dias (variação)	54 (0-145)	24 (0-86)	0,004
Dia início infecção ativa detectada por AGM – mediana – dias (variação)	62 (17-131)	34 (5-103)	0,045

**Teste de Wilcoxon.*

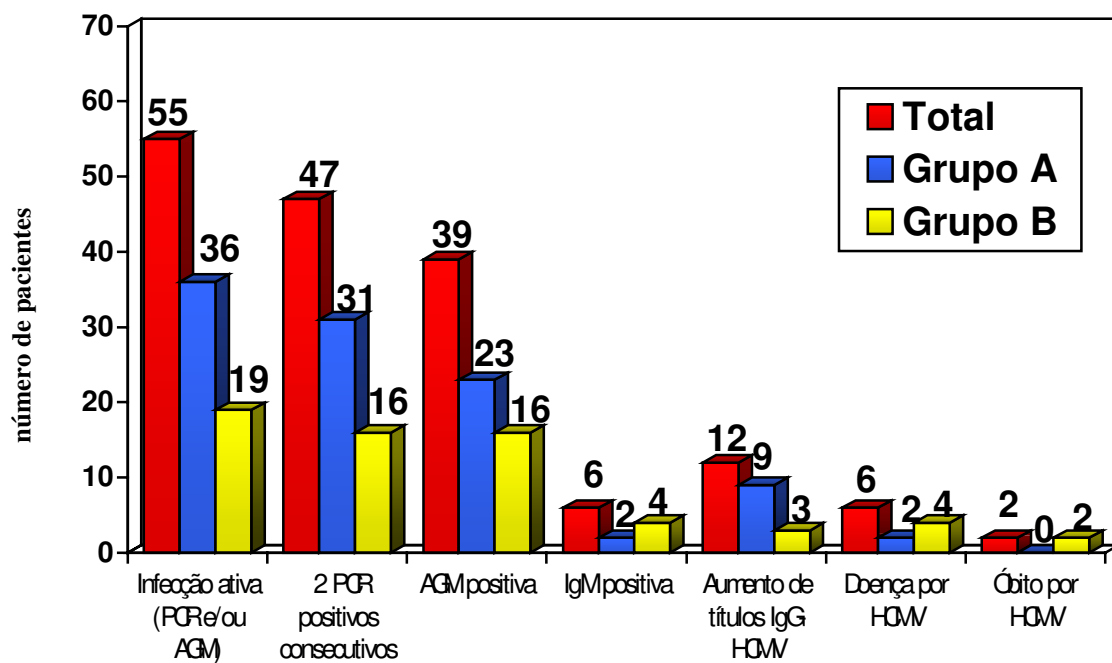


Gráfico 3-Resultados dos testes de monitorização laboratorial nos grupos estudados

4.7-COMPARAÇÃO ENTRE PCR E ANTIGENEMIA NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO ATIVA PELO HCMV NOS GRUPOS ESTUDADOS.

Os testes de nested PCR e de antigenemia foram realizados na mesma amostra obtida desde o dia 0 até o dia 150 após transplante. O valor preditivo positivo da antigenemia foi **78,3%** e o valor preditivo negativo foi de **40,9%** nos pacientes do **Grupo**

A e nos pacientes do **Grupo B** foi **81,2%** e **62,5%**, respectivamente. A sensibilidade e a especificidade da antigenemia no **Grupo A** foi de **58%** e **64,3%** e no **Grupo B**, **82,25%** e **62,5%**, respectivamente, usando a PCR como referência padrão (KULKARNI *et al*, 2001).

As concordâncias entre AGM e PCR foram analisadas e divididas em seis grupos: (a) AGM e PCR ambas negativas; (b) apenas AGM positiva; (c) apenas PCR positiva; (d) AGM positiva precedendo PCR positiva; (e) PCR positiva precedendo AGM positiva (f) AGM e PCR positivas simultaneamente (**Tabela 16**).

Entre os pacientes do **Grupo A**, nem PCR e AGM foram detectadas em 9/45 pacientes (20%) durante a monitorização. Esses pacientes não receberam terapia com ganciclovir. Apenas AGM positiva foi detectada em 5/45 pacientes (11,1%). Apenas PCR positiva foi detectada em 8/45 pacientes (17,8%). AGM positiva precedeu a PCR positiva em 3/45 pacientes (6,6%). PCR positiva precedendo AGM positiva ocorreu em 9/45 pacientes (20%). AGM e PCR positivas ao mesmo tempo ocorreram em 7/45 pacientes (15,5%).

No **Grupo B**, nem AGM e PCR foram detectadas em 5/24 pacientes (20,8%) durante a monitorização. Esses pacientes não receberam terapia com ganciclovir. Apenas AGM positiva em 3/24 pacientes (12,5%). Apenas PCR positiva em 3/24 pacientes (12,3%). AGM tornou-se positiva antes da PCR positiva em 1/24 pacientes (4,16%) e PCR positiva precedeu a AGM positiva em 9/24 pacientes (37,5%). AGM e PCR foram positivas ao mesmo tempo em 2/24 pacientes (8,3%).

Tabela 16-Concordância entre AGM e PCR nas amostras coletadas dos 69 pacientes monitorizados.

	AGM/PCR negativas	Apenas AGM+	Apenas PCR+	AGM (+) precede PCR (+)	PCR (+) precede AGM (+)	AGM+ e PCR+ simultâneamente
Grupo A (n = 45)	9 (20%)	5 (11.1%)	8 (17.8%)	3 (6.6%)	9 (20%)	7 (15.5%)
Grupo B (n = 24)	5 (20.8%)	3 (12.3%)	3 (12.3%)	1 (4.16%)	9 (37.5%)	2 (8.3%)
Total (n = 69)	14 (20.3%)	8 (11.6%)	11 (15.9%)	4 (5.8%)	18 (26%)	9 (13%)
p*	NS	NS	NS	NS	0,045	NS

(+) – positivo; * Teste exato de Fischer.

4.7.1-Curva de Probabilidade de Detecção de Infecção Ativa por HCMV pela PCR Versus Antigenemia nos Pacientes do Grupo A.

A comparação entre as Curvas de Probabilidade de detecção de infecção ativa entre os testes de PCR e AGM no **Grupo A** mostrou diferença estatisticamente significativa entre as probabilidades acumuladas de detecção de infecção ativa pelo HCMV até o final do seguimento (**Gráfico 4, $p = 0,04$**).

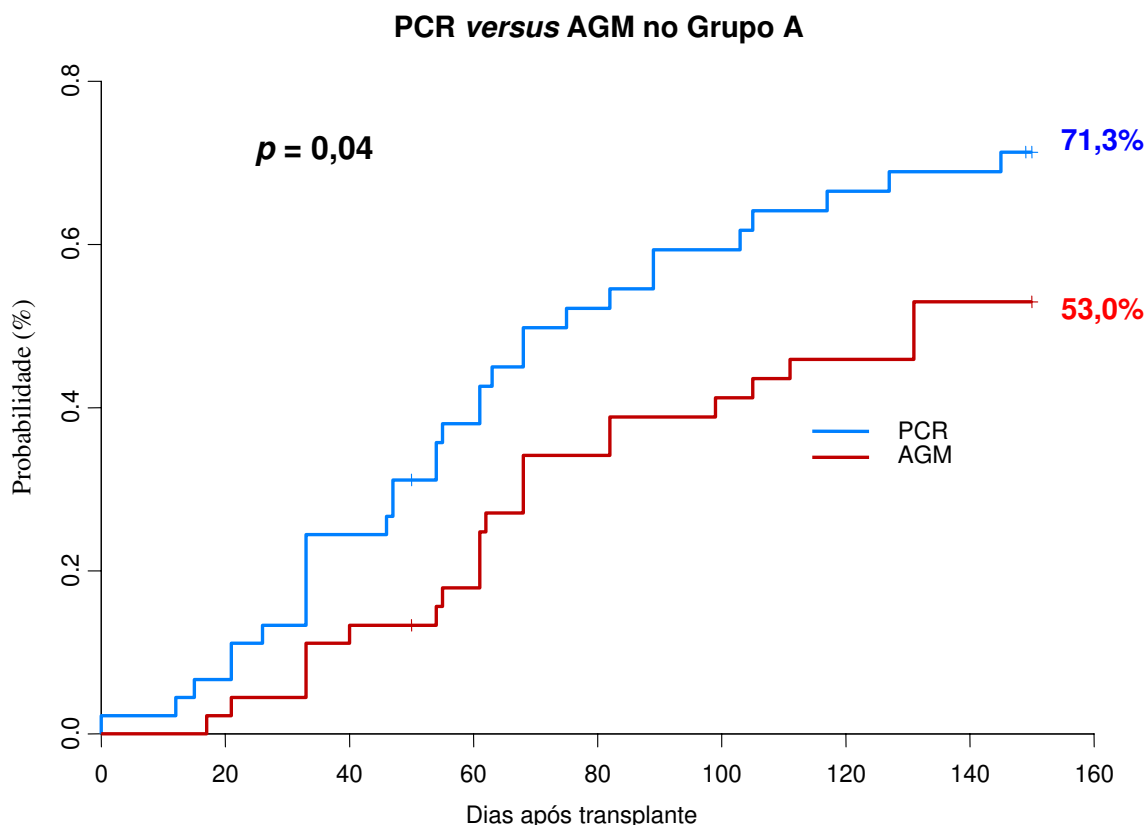


Gráfico 4-Curvas de Probabilidade acumulada de ocorrência de Infecção Ativa pelo HCMV detectada pelo teste de PCR *versus* Antigenemia (**Grupo A**).

4.7.2-Curva de Probabilidade de Detecção de Infecção Ativa por HCMV pela PCR Versus Antigenemia nos Pacientes do Grupo B.

A comparação entre as Curvas de Probabilidade de detecção de infecção ativa por HCMV entre os testes de PCR e Antigenemia no **Grupo B** não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as probabilidades acumuladas de detecção de infecção ativa pelo HCMV até o final do seguimento (**Gráfico 5, $p = 0,56$**).

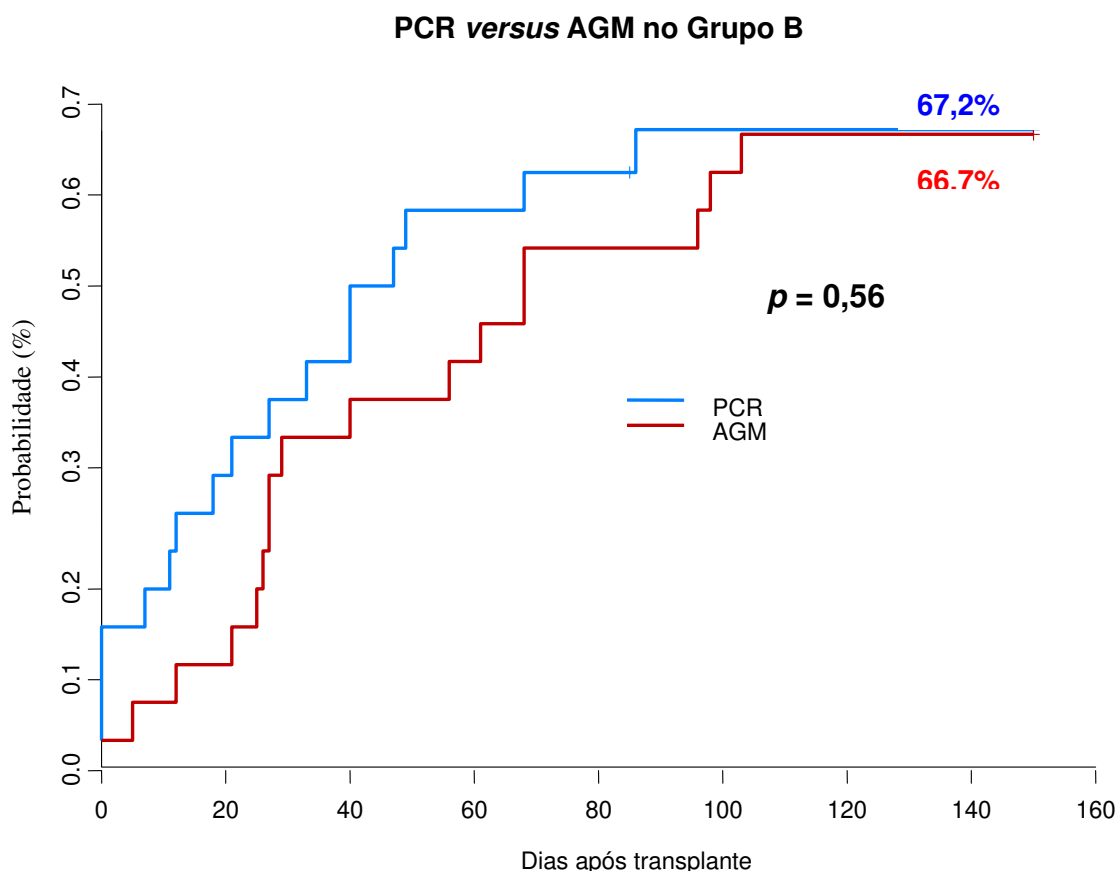


Gráfico 5-Curvas de Probabilidade acumulada de ocorrência de infecção ativa pelo HCMV detectada pelos testes de PCR *versus* Antigenemia (**Grupo B**).

4.7.3-Curva de Probabilidade de Detecção de Infecção Ativa pelo HCMV nos Grupos Estudados Utilizando a PCR como Teste Diagnóstico.

A comparação das Curvas de Probabilidade de infecção ativa nos **Grupos A e B** pelo teste de PCR não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre as probabilidades acumuladas de detecção de infecção ativa pelo HCMV até o final do seguimento (**Gráfico 6, $P = 0,47$**).

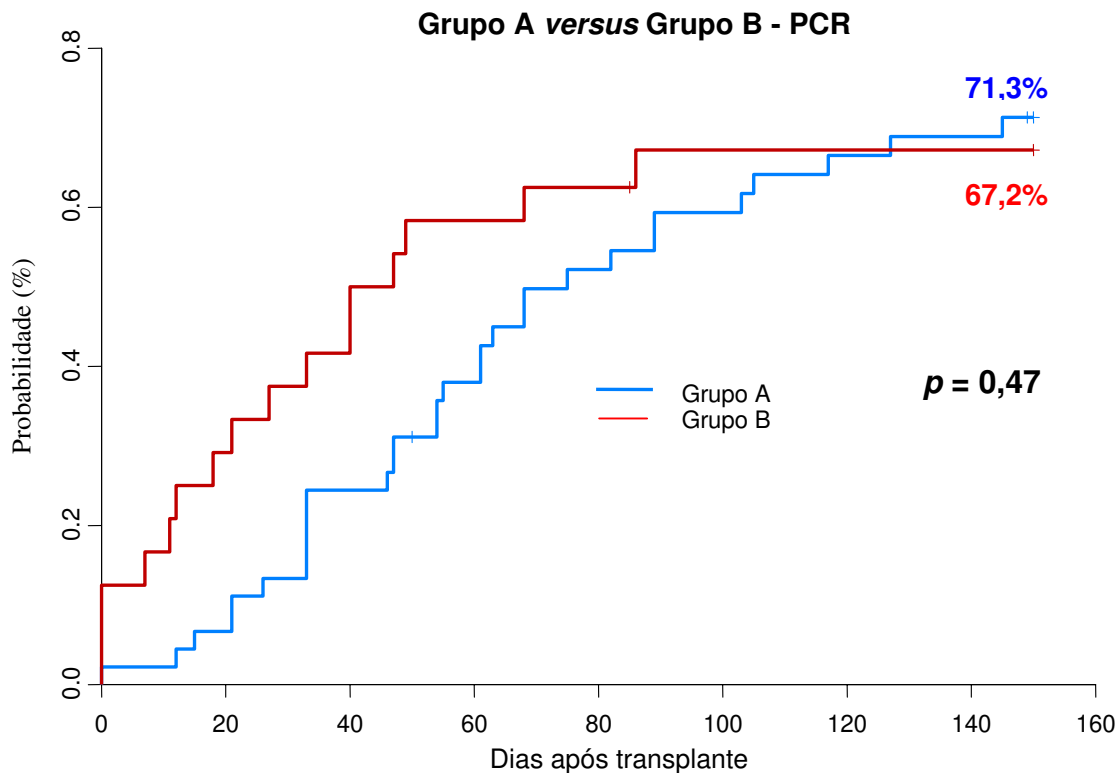


Gráfico 6-Curvas de Probabilidade acumulada de ocorrência de infecção ativa por HCMV detectada pelo teste de **PCR** nos **Grupos A e B** estudados.

4.7.4-Curva de Probabilidade de Detecção de Infecção Ativa pelo HCMV nos Grupos Estudados Utilizando a AGM como Teste Diagnóstico.

A comparação das Curvas de Probabilidade dos pacientes do **Grupo A e B** e a detecção da Infecção Ativa pelo Teste de **AGM** não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre as probabilidades acumuladas de detecção de infecção ativa pelo HCMV por AGM nos dois grupos estudados até o final do seguimento (**Gráfico 7, $P = 0,09$**).

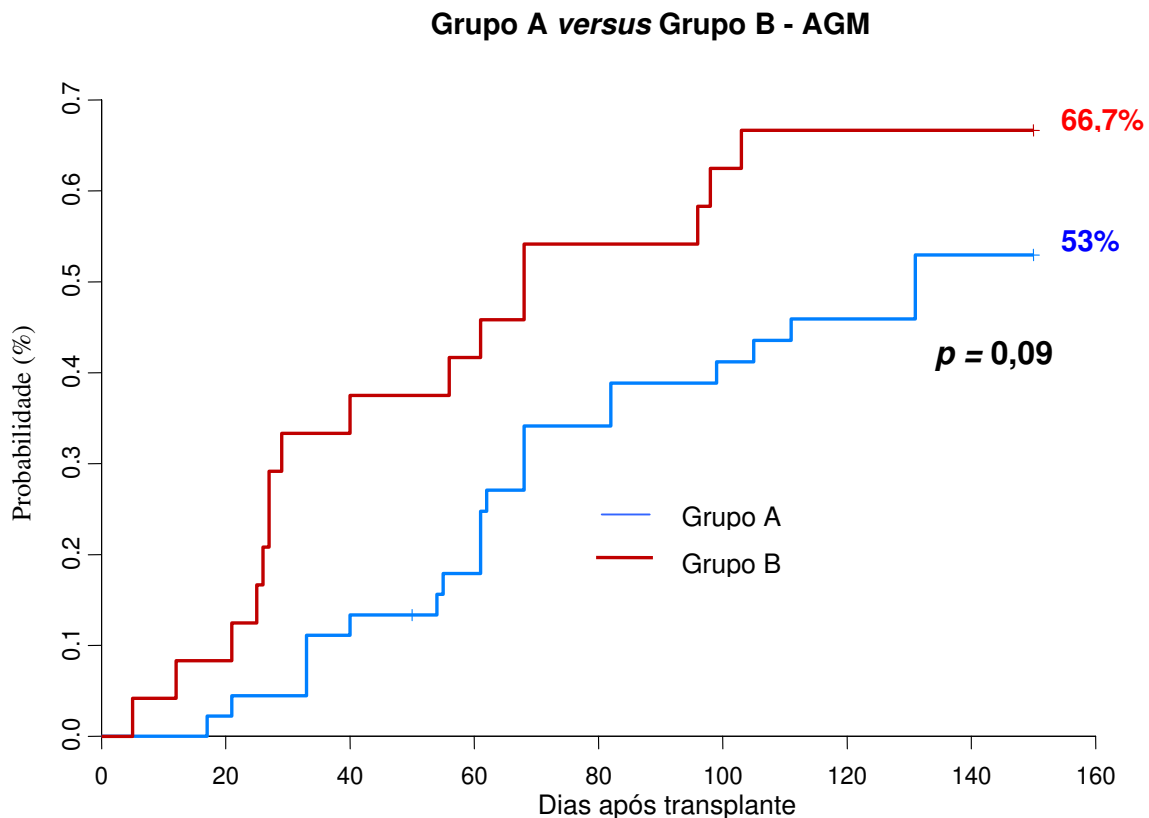


Gráfico 7-Curvas de Probabilidade acumulada de ocorrência de infecção ativa pelo teste de **AGM** nos **Grupos A e B** estudados.

4.8-COMPARAÇÃO ENTRE “GVHD” AGUDA E INFECÇÃO ATIVA PELO HCMV

Ocorreram ao longo do estudo, 9 casos de *GVHD* aguda e todos apresentavam Infecção Ativa pelo HCMV. A **Tabela 17** apresenta uma comparação entre a presença de infecção ativa por HCMV nos pacientes estudados e a ocorrência de *GVHD*.

A análise (Teste Exato de Fischer) entre Infecção ativa e *GVHD* agudo, não mostrou diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos grupos de estudo.

Tabela 17-Casos de GVHD aguda em relação à infecção ativa pelo HCMV nos Grupos estudados.

	Infecção ativa (+)	Infecção ativa (-)	Total	p	
Grupo Total	GVHD agudo (+)	9	0	9	
	GVHD agudo (-)	46	14	60	0,1872⁽¹⁾
	Total	55	14	69	
	Infecção ativa (+)	Infecção ativa (-)	Total	p	
Grupo A	GVHD agudo (+)	4	0	4	
	GVHD agudo (-)	32	9	41	0,5687⁽¹⁾
	Total	36	9	45	
	Infecção ativa (+)	Infecção ativa (-)	Total	p	
Grupo B	GVHD agudo (+)	5	0	5	
	GVHD agudo (-)	14	5	19	0,544⁽¹⁾
	Total	19	5	24	

⁽¹⁾- Teste de Fisher

4.9-INCIDÊNCIA DE DOENÇA PELO HCMV

Nos pacientes do **Grupo A**, o aparecimento de doença pelo HCMV foi observado em 2 dos 36 pacientes com infecção ativa após o transplante. Esses 2 pacientes desenvolveram doença gastrointestinal, comprovada por biópsia.

A média do tempo de aparecimento de doença por HCMV foi de **57 dias**, variando de 33 a 81 dias. Nenhum paciente deste grupo foi a óbito por doença pelo HCMV.

Nos pacientes do **Grupo B**, o aparecimento de doença por HCMV foi observado em 4 dos 19 pacientes com infecção ativa estudados. Desses, um teve retinopatia, o outro teve HCMV no TGI e outros dois foram à óbito por HCMV disseminado.

A média do tempo de aparecimento de doença por HCMV foi de **60,2 dias**, variando de 5 a 89 dias.

A **Tabela 18** demonstra os órgãos acometidos com doença por HCMV apresentados pelos 6 pacientes. Também documenta o início dos sintomas em relação ao primeiro dia de positividade por cada método utilizado na monitorização dos pacientes em relação à infecção ativa pelo HCMV.

Tabela 18-Pacientes que apresentaram doença comprovada, em dias após o transplante e resultados laboratoriais.

n	Status D/R	Doença de Base	Tipo de Enxerto	Grupo	Doença HCMV	Tempo após o transplante (dias)				
						Início dos Sintomas	PCR+	AGM+ (n.cel.+)	IgM+	Aum. IgG
6	+/+	LMC	MO	A	TGI	81	44	55 (3)	98	-
7	+/+	AA	MO	B	CR	40	0	68 (26)	-	-
14	+/+	SMD	CPP	A	TGI	33	33	33 (5)	82	-
32*	+/+	AA	MO	B	TGI	46	12	29 (50)	58	-
34	-/+	AA	MO	B	TGI	89	5	67 (50)	-	113
69*	+/+	AA	MO	B	PI	66	49	56 (52)	-	-

Legenda: **D/R** – doador/receptor; **MO** – medula óssea; **CPP** – células progenitoras periféricas; **n.cel.** número de células positivas por antigenemia; **TGI** – trato gastrointestinal; **CR** – coriorretinite; **PI** – pneumonite intersticial; **PCR+** - reação em cadeia da polimerase positiva; **AGM+** - antigenemia positiva; **IgM+** - imunoglobulina da classe M do HCMV positiva; **Aum. de IgG** – aumento significativo dos títulos de Imunoglobulinas da classe G durante o seguimento; * - pacientes com *GVHD* agudo e que foram à óbito por HCMV disseminado.

Todos os pacientes tiveram doença por HCMV comprovada por biópsia e/ou necrópsia. Os pacientes 6, 14, 32 e 34 apresentaram doença por HCMV na região gástrica. O paciente 7 apresentou coriorretinite. Os pacientes 34 e 69 foram à óbito por HCMV disseminado (**Apêndice D**).

Nos pacientes com doença pelo HCMV, os achados clínicos e laboratoriais foram os seguintes:

- 1) Paciente 6 / LBM/ viva:** Portadora de LMC iniciou a **profilaxia universal com ganciclovir** no dia +40 (11 doses de 400 mg cada). A partir do dia +81 começou a apresentar febre e foi feita suspeita clínica de doença pelo HCMV. No dia +88 apresentava inapetência, epigastralgia e mantinha o

quadro febril, sendo então submetida à endoscopia digestiva alta (EDA) no dia +89, tendo como resultado gastrite e duodenite endoscópica enantematosa, sugerindo infecção específica pelo HCMV ou quadro de *GVHD*. Durante o exame foram retirados fragmentos de tecido para a realização de biópsias, cujo laudo comprovou infecção pelo HCMV na região pilórica. Iniciou-se então, o tratamento com ganciclovir no dia +90, por 21 dias (42 doses de 300 mg cada), seguido por 14 doses de manutenção. A antigenemia e a PCR tornaram-se ambas positivas no dia +55 e +44, respectivamente, 46 dias antes da confirmação diagnóstica por biópsia. Apresentou IgM positiva a partir do dia +98. A PCR e antigenemia permaneceram positivas por um longo período e a negatificação ocorreu com a evolução do tratamento, sendo que a PCR permaneceu positiva por um período maior que a antigenemia. A gastrite pelo HCMV regrediu com o tratamento antiviral, porém, o paciente desenvolveu coriorretinite pelo HCMV.

2) **Paciente 7/EFN/vivo:** Portador de anemia aplástica grave, **não recebeu profilaxia universal com ganciclovir**, apresentou sintomas de HCMV ocular desde o dia +40 pós-transplante. A PCR apresentou-se positiva desde o pré-transplante e durante todo o seguimento. A AGM neste paciente foi positiva desde o dia +68 pós-transplante. O paciente não recebeu tratamento precoce devido a seu estado clínico e no dia +304 pós-transplante, foi diagnosticado HCMV ocular, iniciando o tratamento com ganciclovir (42 doses de 250 mg cada) + 12 doses de manutenção. Não apresentou IgM positiva.

3) **Paciente 14/KGB/viva:** Portadora de Síndrome Mielodisplásica, a paciente iniciou **profilaxia universal com ganciclovir** a partir do dia +24 (31 doses de 220 mg cada). Evoluiu com PCR e AGM positivas, ambas iniciadas dia +33 e sintomatologia gástrica no mesmo dia. Foi realizada EDA no dia +33 e a mesma demonstrou esofagite erosiva e gastrite específicas. Iniciado tratamento para doença pelo HCMV no dia +60 seguido por doses de manutenção. Nos exames de controle manteve PCR positiva. No dia +96

realizou outra EDA que demonstrou gastrite específica. No dia +98 foi então submetida ao tratamento de doença pelo HCMV por 21 dias (42 doses de 220 mg cada) seguida das doses de manutenção até dia +147. No dia +153 a PCR persistiu positiva, mas a sintomatologia evoluiu bem sem intercorrências. Apresentou IgM positiva a partir do dia +82.

4) Paciente 26/BCSD/viva: Portadora de anemia aplástica grave, portanto, **não recebeu profilaxia universal com ganciclovir**. Começou a apresentar vômitos e epigastralgia no dia +46, mantendo este quadro até o dia +51, onde foi realizada EDA e foram colhidos 3 fragmentos de lesão gástrica e enviados para biópsia. No dia +58, começou a apresentar também diarreia, e devido a suspeita de infecção pelo HCMV, iniciou-se o tratamento com ganciclovir (42 doses de 360 mg cada). **Biópsia:** confirmou o diagnóstico: gastrite crônica de antro em atividade com inclusões virais citomegálicas. Foi mantido o tratamento por 21 dias, seguido de 12 doses de manutenção. A paciente apresentou melhora do quadro, porém, voltou a apresentar infecção ativa pelo HCMV no dia +130, sendo tratada por 7 dias com ganciclovir (14 doses de 360 mg cada) + 9 doses de manutenção. A antigenemia e a PCR tornaram-se positivas 41 e 34 dias antes do aparecimento dos sintomas, respectivamente e a negatificação destes exames ocorreu após o tratamento; a paciente apresentou IgM positiva a partir do dia +58 e durante o período da doença.

5) Paciente 28/AVSS/óbito: Portadora de anemia aplástica grave, **não recebeu profilaxia universal com ganciclovir**. Apresentava AGM positiva dia +67 e +75. A PCR positivou-se a partir do dia +47. A partir do dia +89 apresentou neutropenia. Evoluiu com epigastralgia e febre. Internada no dia +99. EDA realizado dia +102 revelou pangastrite erosiva. Evoluiu com necrose gástrica, submetida a gastrectomia e esplenectomia. Foi realizada reexploração cirúrgica no 3º. PO devido a deiscência da anastomose. Evoluiu com choque séptico e óbito no dia +110. Iniciado tratamento para doença pelo HCMV no dia +106 devido ao resultado de HCMV positivo na

biópsia gástrica (12 doses de 350mg cada). A paciente não apresentou IgM positiva.

6) Paciente 69/JCST/óbito: Paciente portadora de anemia aplástica grave, **não recebeu profilaxia universal com ganciclovir**, apresentou no dia +49 PCR e dia +56 AGM positivas. A partir do dia +66 foi internada com dor abdominal intensa e diarreia há um dia. Ao exame físico de entrada: REG, descorada+, eupnéica, acianótica, afebril, anictérica. Abdome flácido, indolor à palpação, RHA presentes. Rotina de abdome agudo: discreta distensão de alças sem nível líquido. No dia +68 evoluiu com confusão mental e ficou desorientada. Ultra-som abdominal mostrou imagem hipocogênica no fígado, contornos irregulares, homogênea, medindo 3,0 x 1,8 cm, compatível com lesão focal hepática. Ausência de ascite. Tomografia computadorizada de abdome mostrou lesão focal hepática – etiologia infecciosa não pode ser descartada. No dia +69, apresentou melhora do estado geral e de consciência. Abdome: RHA presentes, sem visceromegalias. Iniciado tratamento com ganciclovir. No dia +70 pós-transplante, apresentou-se com sangramentos em locais de punção venosa e pelo tubo oro-traqueal. Lesões papulares pelo corpo e couro cabeludo. À noite evoluiu para óbito. **Necrópsia:** Pulmões: alvéolos e brônquios preenchidos quase que totalmente por substância eosinofílica acelular. Presença de inúmeras células alveolares aumentadas de tamanho com inclusões nucleares circundadas por halo claro e múltiplas inclusões citoplasmáticas basofílicas. Ausência de infiltrado inflamatório neutrofílico. Compatível com pneumonia pelo HCMV. Glândula submandibular: apresentando inclusão citomegálica. **CAUSA DO ÓBITO:** Citomegalovirose em pulmão e glândula submandibular. Hepatite e esofagite atribuídas ao Herpes simples. IgM-HCMV não foi detectado.

4.9.1-Curva de Probabilidade de Doença por HCMV nos Grupos Estudados.

A comparação das curvas de probabilidade de doença por HCMV nos Grupos A e B não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre as probabilidades acumuladas de doença nos grupos estudados até o final do seguimento ($P=0.086$) (Gráfico 8).

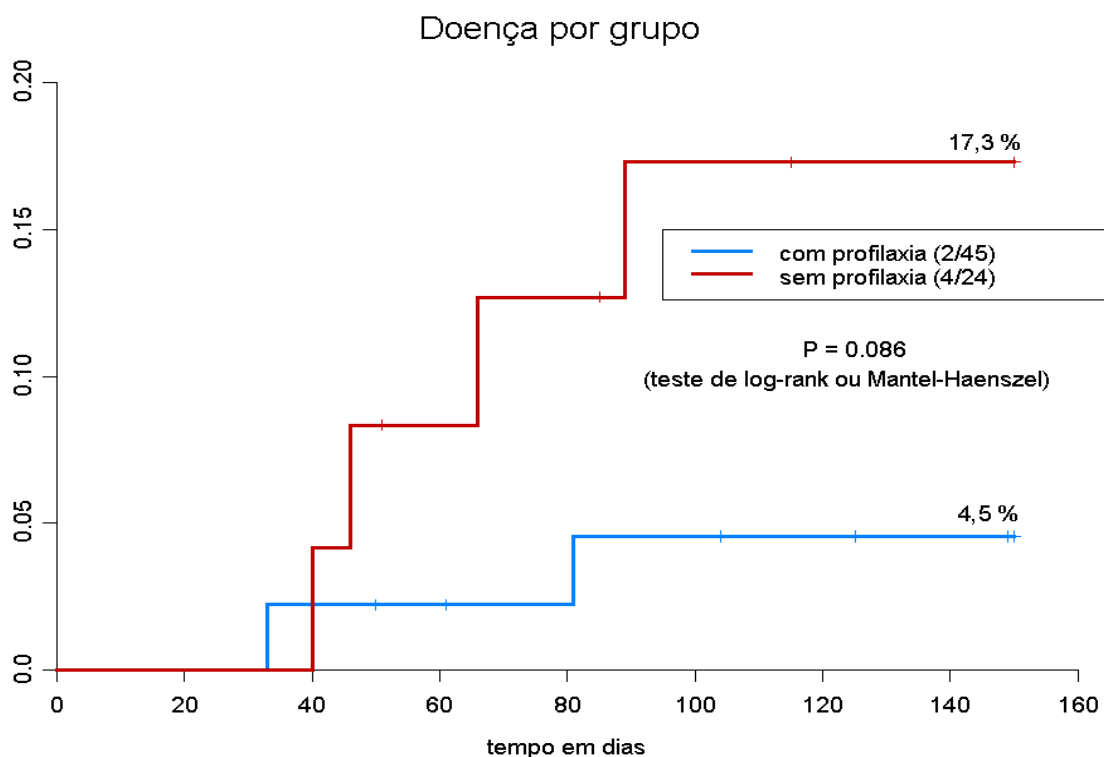


Gráfico 8-Curva de Probabilidade acumulada de ocorrência de **doença** pelo HCMV nos Grupos estudados.

4.10-CAUSA DOS ÓBITOS OCORRIDOS DURANTE O SEGUIMENTO DOS PACIENTES ESTUDADOS.

A **Tabela 19** demonstra a causa dos óbitos ocorridos durante o tempo de seguimento (até 150 dias após o transplante).

Tabela 19-Causa dos óbitos ocorridos durante o tempo de seguimento.

Paciente	Grupo	data óbito	SOBREVIDA (dias pós- transplante)	CAUSA DO ÓBITO
12	B	12/02/99	8	RECIDIVA DA DOENÇA
17	B	03/04/99	51	GVHDa
24	A	16/07/99	50	INFECÇÃO BACTERIANA
34	B	06/12/99	109	choque séptico, necrose e perfuração gástrica por HCMV
39	A	30/11/99	61	RECIDIVA DA DOENÇA
42	A	15/03/00	149	PROGRESSÃO DA DOENÇA
55	A	23/08/00	125	GVHDa
59	B	01/10/00	115	INFECÇÃO BACTERIANA
64	A	17/01/01	104	GVHDa
69	B	01/02/00	70	HCMV em pulmão e glândula submandibular

Legenda: **GVHDa** – doença do enxerto *versus* hospedeiro aguda.

4.11-CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA

A comparação entre as Curvas de Sobrevida dos pacientes do **Grupo A** e do **Grupo B** não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre as probabilidades acumuladas de sobrevida nos dois grupos, até o final do seguimento (**Gráfico 9, $p = 0,27$**).

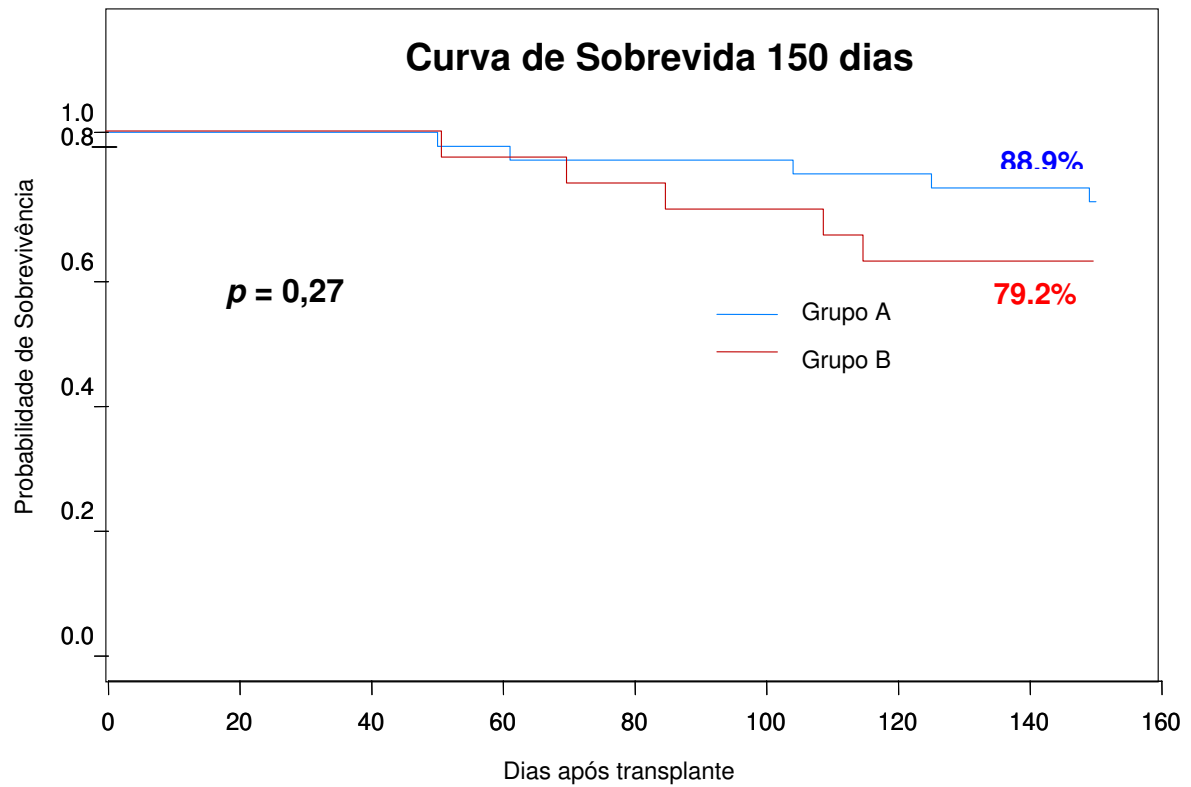


Gráfico 9-Curva de Sobrevida até 150 dias pós-transplante dos pacientes referentes ao Grupo A e Grupo B estudados.

A sobrevida Global dos pacientes foi calculada tendo como base até **1.152** dias após o transplante, como mostra o **Gráfico 10** e não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre o Grupo A e Grupo B ($P = 0,68$).

Curva de Sobrevida Global

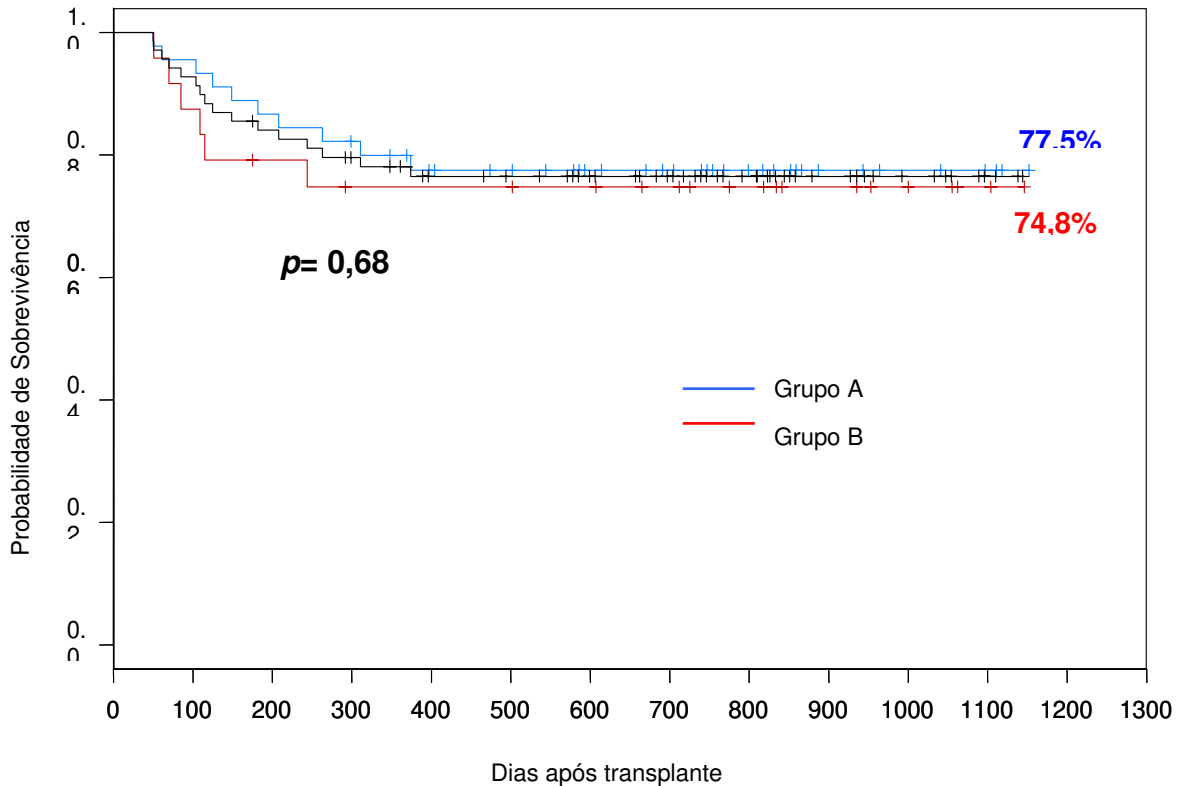


Gráfico 10-Curva de Sobrevida Global (até 1.152 dias após o transplante) dos pacientes referentes ao Grupo A e Grupo B estudados.

4.12-FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO ATIVA PELO HCMV NOS GRUPOS ESTUDADOS.

Na análise univariada realizada pelos Modelos de Cox (“Cox Proportional Hazards Models”), nenhum fator de risco testado foi estatisticamente significativo (tipo de enxerto, idade do doador, sexo doador-receptor, utilização de profilaxia universal, status sorológico) para infecção ativa (PCR+ e/ou AGM+) nos pacientes do Grupo A. No Grupo B, os fatores de risco (sexo do receptor, idade do receptor e idade do doador, tiveram um

valor estatisticamente significativo ($P = 0,047$; $0,027$ e $0,017$, respectivamente). Para antigenemia, no Grupo B, os fatores de risco idade do receptor, idade do doador e doença maligna, tiveram um valor significativo ($P = 0,0087$; $0,0055$ e $0,025$, respectivamente). A análise multivariada não mostrou significância para nenhuma das variáveis analisadas (**Apêndice F**).

4.13-FATORES DE RISCO PARA DOENÇA PELO HCMV

Na análise univariada realizada pelos Modelos de Cox (“Cox Proportional Hazards Models”), nenhum fator de risco testado foi estatisticamente significativo (tipo de enxerto, idade do doador, sexo doador-receptor, utilização de profilaxia universal, status sorológico) para doença pelo HCMV nos grupos estudados. A análise multivariada não mostrou significância para nenhuma das variáveis analisadas.

4.14-MEDIDAS DE ACURÁCIA PARA OS TESTES DE NESTED PCR, ANTIGENEMIA, IgM-HCMV E AUMENTO DOS TÍTULOS DE IgG-HCMV NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO ATIVA E DOENÇA POR HCMV.

Foram realizados cálculos de medidas de acurácia para a detecção da infecção ativa por HCMV nos grupos estudados, utilizando a PCR como referência padrão (Tabelas 20 a 27).

Tabela 20- Comparação entre **PCR e AGM** em relação à **infecção ativa** por HCMV nos grupos estudados.

		PCR (+)	PCR (-)	TOTAL
Grupo Total	AGM (+)	31	8	39
	AGM (-)	16	14	30
	TOTAL	47	22	69
Grupo A		PCR (+)	PCR (-)	TOTAL
	AGM (+)	18	5	23
	AGM (-)	13	9	22
	TOTAL	31	14	45
Grupo B		PCR (+)	PCR (-)	TOTAL
	AGM (+)	13	3	16
	AGM (-)	3	5	8
	TOTAL	16	8	24

Tabela 21- Índices obtidos pelo **teste de antigenemia** em relação à **infecção ativa** por HCMV nos Grupos estudados.

	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia
Grupo Total	66%	63,7%	79,5%	46,7%	65%
Grupo A	58%	64,3%	78,3	40,9%	60%
Grupo B	81,3%	62,5%	81,3%	62,5%	75%

Tabela 22- Comparação entre PCR, AGM, IgM e aumento de títulos de IgG em relação à **doença** por HCMV no **Grupo Total**.

	DOENÇA (+)	DOENÇA (-)	TOTAL
PCR (+)	6	41	47
PCR (-)	0	22	22
TOTAL	6	63	69
AGM (+)	6	33	39
AGM (-)	0	30	30
TOTAL	6	63	69
IgM (+)	2	4	6
IgM (-)	0	30	30
TOTAL	2	34	36
AUM. IgG (+)	1	11	12
AUM. IgG (-)	5	52	57
TOTAL	6	63	69

Tabela 23- Índices obtidos pelos testes diagnósticos em relação à **doença** por HCMV no **Grupo Total** estudado.

Doença por HCMV – Grupo Total					
	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia
PCR	100%	34,9%	12,7%	100%	40,6%
AGM	100%	47,6%	15,3%	100%	52,2%
IgM	33%	93%	33%	93,6%	88,4%
Aum. IgG	16,6%	82,5%	8,3%	91,2%	76,8%

Tabela 24- Comparação entre PCR, AGM, IgM e aumento de títulos de IgG em relação à doença por HCMV no Grupo A.

	DOENÇA (+)	DOENÇA (-)	TOTAL
PCR (+)	2	29	31
PCR (-)	0	14	14
TOTAL	2	43	45
AGM (+)	2	21	23
AGM (-)	0	22	22
TOTAL	2	43	45
IgM (+)	1	3	4
IgM (-)	1	40	41
TOTAL	2	43	45
AUM. IgG (+)	0	9	9
AUM. IgG (-)	2	34	36
TOTAL	2	43	45

Tabela 25- Índices obtidos pelos testes diagnósticos em relação à doença por HCMV em receptores do Grupo A.

Doença por HCMV – Grupo A					
	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia
PCR	100%	32,55%	6,4%	100%	35,5%
AGM	100%	51,2%	8,7%	100%	53,3%
IgM	50%	93%	25%	97,5%	91%
Aum. IgG	0%	79%	0%	94,4%	75,5%

Tabela 26- Comparação entre PCR, AGM, IgM e aumento de título de IgG em relação à doença por HCMV no Grupo B.

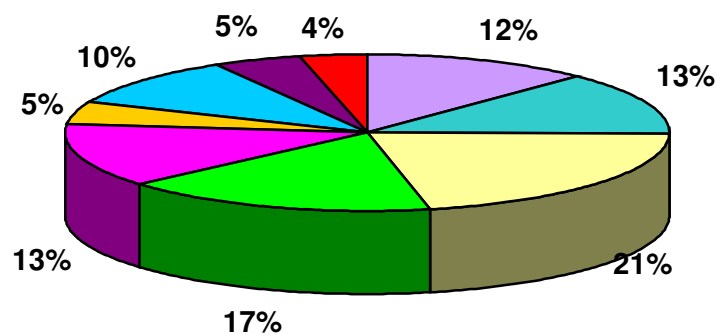
	DOENÇA (+)	DOENÇA (-)	TOTAL
PCR (+)	4	12	16
PCR (-)	0	8	8
TOTAL	4	20	24
AGM (+)	4	12	16
AGM (-)	0	8	8
TOTAL	4	20	24
Grupo B			
IgM (+)	1	1	2
IgM (-)	3	19	22
TOTAL	4	20	24
AUM. IgG (+)	1	2	3
AUM. IgG (-)	3	18	21
TOTAL	4	20	24

Tabela 27- Índices obtidos pelos testes diagnósticos em relação à doença por HCMV em receptores do Grupo B.

Doença por HCMV – Grupo B					
	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia
PCR	100%	40%	25%	100%	50%
AGM	100%	40%	25%	100%	50%
IgM	25%	95%	50%	86,3%	83%
Aum. IgG	25%	90%	33%	85,7%	79%

4.15-AVALIAÇÃO DO TESTE DE ANTIGENEMIA NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO ATIVA PELO HCMV NOS PACIENTES ESTUDADOS.

Os resultados dos testes de antigenemia positivas dos 39 pacientes do Grupo Total estudado, estão representados no **Gráfico 11**, de acordo com a quantidade de células positivas encontradas:



Relação entre o nível de antigenemia e a presença de manifestações clínicas

Quantidade de células positivas/

(n = número de amostras) -

Presença de manifestações clínicas

1-2 (n=13) - 0 (0)	3-4 (n=14) - 0 (0)
5-9 (n=23) - 0 (0)	10-12 (n=8) - 0 (0)
13-20 (n=14) - 1 (7,14%)	21-42 (n=5) - 0 (0)
43-99 (n=11) - 3 (27,3%)	100-199 (n=5) - 1 (20%)
200-500 (n=4) - 1 (25%)	

Gráfico 11-Variação entre a quantidade de células positivas reveladas pelo teste de antigenemia no **Grupo Total** estudado.

4.16-AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DA ANTIGENEMIA CONSIDERANDO INFECÇÃO ATIVA, VALORES ACIMA DE 10 CÉLULAS POSITIVAS.

Observamos que **23%** dos pacientes que apresentaram antigenemia **acima de 10 células** positivas desenvolveram doença pelo HCMV e 43 dos 63 pacientes com antigenemia persistentemente negativa (abaixo de 10 células positivas), não desenvolveram doença pelo HCMV durante o período pós-transplante estudado (150 dias) (**Tabela 28**).

Tabela 28-Avaliação do número de células-positivas em relação à doença por HCMV nos pacientes estudados do **Grupo Total**.

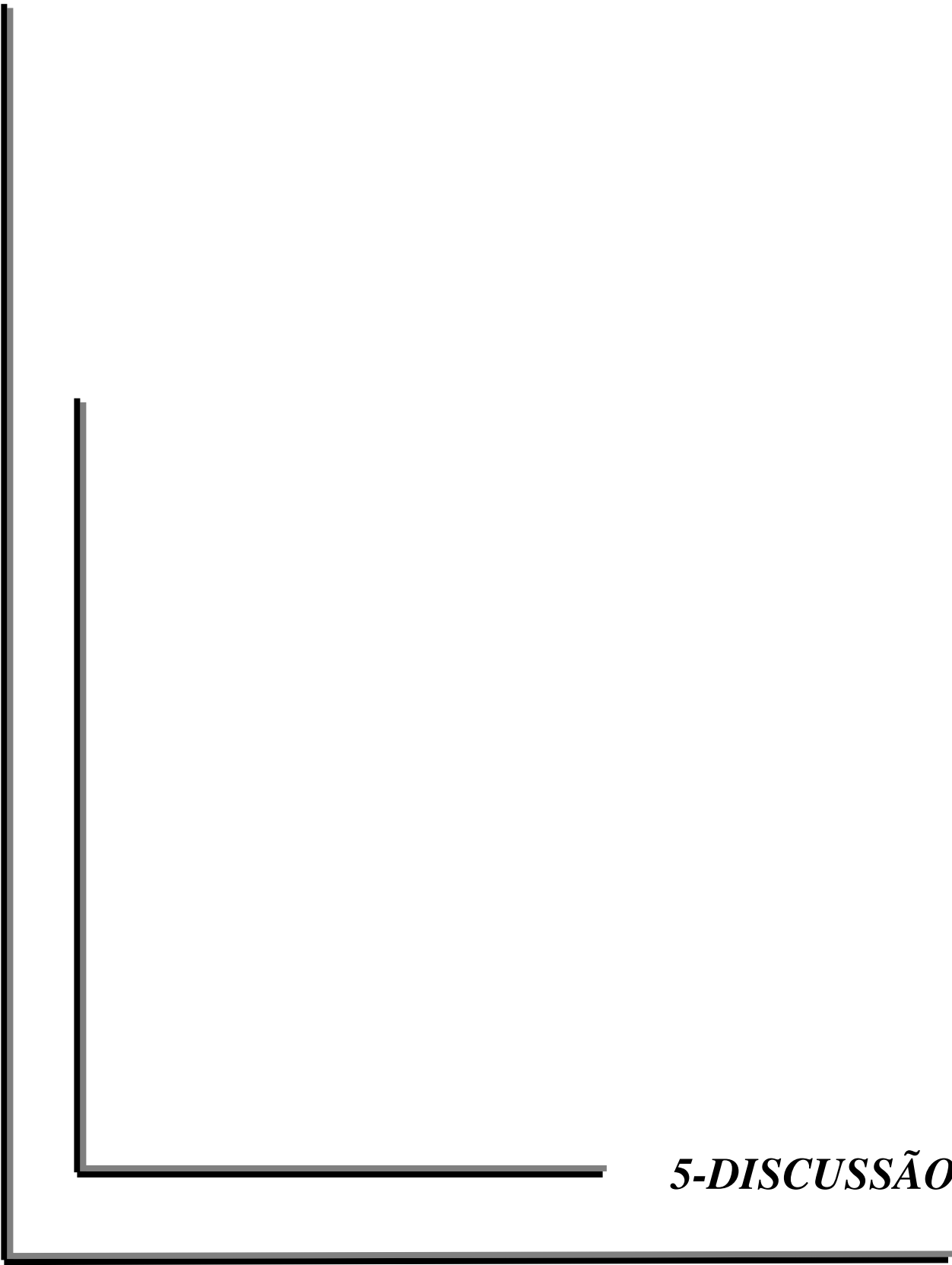
Grupo Total				
	Doença (+)	Doença (-)	Total	p*
AGM ≥ 10 células positivas (*)	6	20	26	
AGM < 10 células positivas (negativa)	0	43	43	0,0019⁽¹⁾
Total	6	63	69	

* *Teste de Fisher*

NOTA: Avaliação feita até 150 dias após o transplante

(*) Neutrófilos positivos em 300.000 contados

Se considerarmos antigenemia acima de 10 células: **Sensibilidade:** 100%; **Especificidade:** 68,2%; **VPP:** 23%; **VPN:** 100%; **Acurácia:** 71% em relação do diagnóstico da doença por HCMV.



5-DISCUSSÃO

O Citomegalovírus Humano (HCMV) é membro da família dos vírus *Herpesviridae* e têm em comum as propriedades biológicas de latência e reativação. Cerca de 1% de todos os recém-nascidos têm infecção congênita pelo HCMV e o aumento da soroprevalência ocorre nos primeiros cinco anos de vida (NICHOLS & BOECKH, 2000). Na adolescência, cerca de 80% - 100% dos indivíduos nos países em desenvolvimento terão anticorpos anti-HCMV detectáveis. No entanto, a incidência média nos Estados Unidos e oeste da Europa é de aproximadamente 50 -60% (NELSON & DEMMLER, 1997). A grande maioria das infecções primárias passa despercebida. Após a infecção, o vírus permanece em latência nas células endoteliais e mononucleares do sangue periférico do hospedeiro e é controlado pela imunovigilância mediada por células. Em pacientes portadores de AIDS e nos imunossuprimidos devido a transplantes de células hematopoéticas primordiais e de órgãos sólidos, a infecção pelo HCMV é uma causa importante de complicação infecciosa, aumentando a morbidade e mortalidade nesses grupos de risco (NICHOLS & BOECKH, 2000; REUSSER, 1996).

Com o aumento crescente de pacientes imunossuprimidos, especialmente aqueles associados a transplantes de órgãos e de células progenitoras hematopoéticas, a infecção pelo HCMV tornou-se mais comum. O desenvolvimento de métodos laboratoriais de diagnóstico rápido e precoce da infecção ativa pelo HCMV tem tido um papel importante na prevenção e monitorização do tratamento da doença pelo HCMV, especialmente em receptores de transplantes. Recentes avanços têm sido realizados com o desenvolvimento dessas metodologias (REUSSER, 2002).

A terapia específica contra a doença pelo HCMV já estabelecida, freqüentemente se torna pouco efetiva se instituída tardiamente. Por este motivo, investigadores têm se esforçado no sentido de desenvolverem estratégias de prevenção da doença. A primeira estratégia de prevenção, chamada **profilaxia universal**, trata todos os pacientes de risco para doença pelo HCMV de acordo com o “*status sorológico*” pré-transplante do receptor e do doador, administrando ganciclovir a partir da “pega” do enxerto. A segunda estratégia, conhecida como **terapia precoce** ou “*preemptive therapy*”, administra a terapia antiviral somente se alguma evidência laboratorial de replicação viral ativa aparecer. Esta estratégia beneficia os pacientes que possuem um risco real de

desenvolver doença pelo HCMV, enquanto minimiza os custos e a toxicidade da aplicação da profilaxia universal (NICHOLS & BOECKH, 2000).

De acordo com as recomendações do CDC (**Recommendations of CDC, 2001**), os serviços de transplantes devem escolher um ou mais dos seguintes métodos de diagnóstico para determinar a necessidade de tratamento precoce: (1) detecção do antígeno *pp65* do HCMV nos leucócitos (antigenemia) (BOECKH, 1996a; BOECKH, 1996b); (2) detecção do DNA do HCMV pelo uso de PCR (EINSELE *et al*, 1995); (3) isolamento do vírus a partir de urina, saliva, sangue ou lavado bronco-alveolar pelo uso de cultura rápida (*shell-vial*) ou (4) cultura clássica. Serviços sem acesso aos testes de PCR ou antigenemia deverão utilizar profilaxia universal ao invés de terapia precoce para a prevenção da doença pelo HCMV (GOODRICH *et al*, 1993).

O método de antigenemia para diagnóstico precoce de infecção ativa pelo HCMV utiliza anticorpos monoclonais para detectar a proteína *pp65* do HCMV em leucócitos periféricos. O antígeno *pp65* está localizado principalmente no núcleo dos neutrófilos. Pacientes com doença avançada ou disseminada podem ainda ter o antígeno *pp65* detectado nas células endoteliais circulantes (GERNA, 1998). O método da antigenemia não é padronizado universalmente e diferentes laboratórios podem utilizar metodologias diversificadas (THE *et al*, 1995). A detecção ótima de antígenos do HCMV pelo método da antigenemia é dependente da análise de uma boa preparação leucocitária (BALDANTI, 1998). Os resultados geralmente são expressos como o número de leucócitos *pp65*-positivos por 100.000 ou 200.000 leucócitos contados. Esse método pode ser realizado em aproximadamente 6 horas, mas isso requer tempo exaustivo na realização do método e na interpretação dos resultados. A maior limitação de muitos laboratórios é o fato de que há uma diminuição da quantificação da antigenemia após estocagem das amostras de sangue que necessitam de processamento dentro de até seis horas após a coleta (BOECKH, 1998).

Acreditamos que o desempenho da antigenemia é melhor com a utilização da fixação das células com formaldeído do que acetona (GERNA *et al*, 1992; BOECKH *et al*, 1994; THE, 1995). Portanto, padronizamos o teste de antigenemia com esse tipo de fixação. Utilizamos também na padronização, o anticorpo monoclonal conjugado à

peroxidase e não à fluoresceína, que, de acordo com alguns autores, tornaria a leitura das lâminas mais discriminatória (**REVELO *et al*, 1989; GERNA *et al*, 1992; EHRNST *et al*, 1993; BOECKH *et al*, 1994**). Outras desvantagens de se usar o anticorpo monoclonal conjugado à fluoresceína, seriam: 1) torna a leitura das lâminas mais cansativa; 2) necessidade de microscópio de fluorescência; 3) a camada de leucócitos corada com hematoxilina não pode ser visualizada, quando há suspeita de perda de parte dos leucócitos durante a citocentrifugação (**THE *et al*, 1995**).

Há uma forte correlação entre antigenemia, infecção ativa e níveis de detecção de HCMV-DNA em pacientes imunossuprimidos em monitorização de infecções pelo HCMV e na avaliação da eficácia da terapia antiviral (**BALDANTI, 1998**). Estudos mostram que a antigenemia é mais sensível do que os métodos de cultura e ainda é tão ou pouco menos sensível que a PCR na detecção da infecção ativa pelo HCMV (**BOECKH, 1998**). A antigenemia pode detectar infecção ativa de 7 a 14 dias antes do início da doença pelo HCMV (**BOECKH, 1992; THE *et al*, 1992**). A quantificação da antigenemia pode ser utilizada para prever doença pelo HCMV. Embora o limite significativo para prever doença pelo HCMV seja diferente entre os grupos de pacientes estudados, em todo grupo de pacientes um alto nível de antigenemia tem um alto valor preditivo. Porém, baixos níveis de antigenemia podem progredir rapidamente e causar doença, principalmente em receptores de medula óssea ou células progenitoras. (**BOECKH, 1998**).

A reação em cadeia da polimerase foi primeiramente utilizada por Saiki e colaboradores, em 1985 (**SAIKI, 1985**), e atualmente tem sido muito utilizada no diagnóstico de várias doenças infecciosas. Em 1988, Demmler e Shibata foram os que inicialmente utilizaram a PCR no diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV. Eles demonstraram que a PCR simples seguida de hibridização com sondas específicas era mais sensível do que a cultura viral clássica para a detecção do HCMV (**DEMMLER & SHIBATA, 1988**).

No Brasil, o primeiro estudo que utilizou a PCR na identificação da infecção ativa pelo HCMV foi o trabalho de **COSTA *et al*, 1999**, utilizando a PCR simples seguida de hibridização específica em amostras de urina de 37 pacientes transplantados renais. Os resultados foram comparados com testes sorológicos (ELISA e Imunofluorescência) e

mostraram que 32/37 pacientes (86,48%) apresentaram evidências de infecção ativa pelo HCMV; destes, 16 (43,2%) apresentaram manifestações clínicas sugestivas de provável doença pelo HCMV. Este estudo confirma a relevância da infecção ativa pelo HCMV após o transplante renal.

A amplificação dos ácidos nucléicos por métodos de PCR tem se tornado o método mais amplamente utilizado no diagnóstico precoce de infecções virais. Há diferentes versões dos métodos de PCR utilizados em diversos laboratórios. A nested PCR, utilizada neste estudo, é uma técnica de PCR dupla, desenvolvida para alcançar resultados mais rápidos quando comparada à PCR simples seguida de hibridização (PORTEN-JORDAN *et al*, 1990; XU *et al*, 1993; BRAINARD, 1994; FOX *et al*, 1995; EHRNST, 1996; YUEN *et al*, 1995). Neste caso, a detecção do fragmento amplificado ocorreu por visualização direta; as vantagens deste procedimento são óbvias tanto do ponto de vista de rapidez e praticidade, quanto do ponto de vista econômico. A detecção do fragmento amplificado (amplicon) dá-se pela visualização direta em gel de agarose sob luz ultravioleta (BRAINARD, 1994; XU *et al*, 1993; PORTER-JORDAN, 1990, FOX, 1995, EHRNST, 1996).

Em relação à literatura, inúmeros trabalhos têm demonstrado a eficácia do tratamento profilático em transplantados de medula óssea na prevenção de doença pelo HCMV (HUMAR *et al*, 2001; MACHADO, 2000; MANDANAS, 1996).

Quatro estudos duplo-cegos com controle-placebo para a prevenção da doença pelo HCMV em transplantados alogênicos de células progenitoras hematopoéticas tiveram início em 1991. Os primeiros dois estudos usaram uma estratégia de terapia precoce com ganciclovir após a “pega” do enxerto guiada pela positividade da cultura viral (SCHMIDT *et al*, 1991; GOODRICH *et al*, 1991). Os outros dois estudos utilizaram a estratégia de profilaxia universal, por meio de ganciclovir que foi administrado em pacientes soropositivos para HCMV antes do transplante (GOODRICH *et al*, 1993; WINSTON *et al*, 1993). Estes quatro estudos concluíram que (1) ganciclovir reduz a incidência da doença pelo HCMV quando utilizado profilaticamente e precocemente; (2) o principal efeito tóxico do ganciclovir é a neutropenia; (3) uma estratégia precoce baseada na cultura viral positiva é menos efetiva do que a profilaxia universal na prevenção da doença pelo

HCMV, com 13-29% versus 3%, respectivamente, de risco dos pacientes desenvolverem doença pelo HCMV; (4) terapia profilática universal significa tratamento extra em muitos pacientes que não desenvolverão doença pelo HCMV.

Em populações com alta soroprevalência para o HCMV, onde a manutenção de estoques adequados de produtos soronegativos e o uso de sangue filtrado é muito caro, o uso da profilaxia universal com ganciclovir tem sido utilizada na maioria dos pacientes com sorologia positiva e neoplasias malignas. Tendo como base o fato do Brasil apresentar epidemiologia desfavorável para o HCMV, a decisão institucional de usar ganciclovir universal como modalidade terapêutica foi tomada quando a monitorização laboratorial de infecção ativa pelo HCMV ainda não estava disponível. Em 1998, quando estes testes foram implantados em nossa Instituição, optou-se por manter a profilaxia universal para avaliar sua eficácia, e os dados disponíveis na época ainda não eram conclusivos em relação ao tratamento “pré-emptivo”, o que resultou neste trabalho, que foi pioneiro em realizar monitorização laboratorial de infecção ativa pelo HCMV em pacientes que receberam profilaxia universal. Os resultados aqui apresentados resumem nossa experiência usando estas estratégias, no contexto financeiro de um país em desenvolvimento, onde a maioria dos pacientes e doadores são CMV-soropositivos e, portanto apresentando um alto risco de infecção pelo HCMV.

Todos os pacientes tiveram acesso aos mesmos recursos laboratoriais de diagnóstico precoce de infecção ativa pelo HCMV: a nested PCR e a antigenemia em neutrófilos do sangue periférico. Utilizamos também, a detecção de anticorpos anti-HCMV (IgM e IgG por ELISA) na determinação do *status* sorológico pré-transplante dos doadores e receptores monitorizados, bem como no acompanhamento mensal dos receptores durante o período de 150 dias após o transplante. O aparecimento de IgM-HCMV e o aumento de quatro vezes ou mais dos títulos iniciais de IgG-HCMV foram critérios indicativos de infecção ativa pelo HCMV, porém, neste estudo não foram utilizados com a finalidade de diagnóstico, apenas como comparação com os outros métodos diagnósticos.

Utilizamos como critério de positividade para infecção ativa pelo HCMV a detecção de 1 ou mais células antígeno-positivas *pp65* por antigenemia e/ou a ocorrência de 2 ou mais reações de nested PCR positivas consecutivas no sangue. Com estes critérios,

terapia precoce com ganciclovir foi administrada nesses pacientes com infecção ativa documentada laboratorialmente.

A alta incidência de infecção ativa detectada por AGM e/ou N-PCR em nossos pacientes foi comparável a outros trabalhos previamente publicados (**CHAKRABARTI et al, 2002; YAKUSHIJI et al, 2002; MACHADO et al, 2000**). Embora a proporção de doadores e receptores HCMV - soronegativos seja pequena, quase todos os testes positivos ocorreram em pacientes HCMV - soropositivos em ambos os grupos estudados. Em concordância com estudos anteriores (**CHAKRABARTI et al, 2002; STOCCHI et al, 1999**), a detecção do início da infecção ativa foi atrasada no grupo que utilizou profilaxia universal em comparação ao grupo pre-emptivo ($p=0,007$). Isso pode refletir a interferência do ganciclovir na recuperação natural das células T HCMV - específicas, o que é esperado ocorrer entre os dias 40 e 90 pós-transplante. Também uso prolongado do ganciclovir induz a um atraso na recuperação dessa resposta e contribui para o aparecimento da doença tardia. A reativação da infecção pelo HCMV após o transplante é um poderoso estímulo para o desenvolvimento da resposta celular T - específica ao HCMV, e a introdução da terapia com ganciclovir pode abortar esta resposta (**BOECKH et al, 1997; LI et al, 1994**).

A monitorização laboratorial indicou precocemente, todos os pacientes que desenvolveram doença pelo HCMV. Mesmo fazendo terapia preventiva, a incidência global da doença pelo HCMV foi de 8,7%, o que é comparável com relatos da literatura, onde índices de incidência variam de 0 a 16% (**BOECKH et al, 1996; MACHADO et al, 2001; MORI et al, 2000; HEBART et al, 1996; MANTEIGA et al, 1998**).

Embora nossos grupos de estudo não tenham sido randomizados, eles apresentaram duas populações com alta porcentagem de soropositividade ao HCMV em adultos e crianças. Não houve nenhuma diferença significativa entre as taxas de infecção ativa pelo HCMV entre os dois grupos. Doença pelo HCMV também não foi diferente estatisticamente, embora no grupo pré-emptivo, houve uma alta taxa de pacientes afetados, todos com anemia aplástica, com 2 óbitos por disseminação da doença pelo HCMV, que de acordo com o protocolo Institucional, não recebem profilaxia universal.

O intervalo de tempo de detecção de infecção ativa por PCR e/ou AGM e o aparecimento dos sintomas de doença pelo HCMV, mostrou que a positividade destes testes antecedeu o diagnóstico de doença pelo HCMV na maioria dos casos.

A probabilidade acumulada de adoecimento pelo HCMV até 150 dias após o transplante foi de 4,5% nos pacientes do **Grupo A** e de 17,3% no **Grupo B**. Estes resultados mostram uma tendência a menor incidência de doença no **Grupo A**, embora a comparação dos grupos não tenha alcançado resultados estatisticamente significantes.

A detecção de infecção ativa pela PCR ou pela antigenemia, que são métodos sensíveis para o diagnóstico de infecção ativa pelo HCMV, apresentaram neste trabalho, baixos valores preditivos positivos para doença pelo HCMV, comparável a outro trabalho brasileiro (CAMARGO *et al*, 2001). Os valores preditivos positivos para doença pelo HCMV podem ser aumentados quando valores específicos de cut-off nos teste de antigenemia forem utilizados e para os testes de PCR, outros materiais além do sangue total, tais como plasma ou soro, forem usados e principalmente a utilização da PCR quantitativa (EINSELE *et al*, 1999).

Sintomas clínicos de doença pelo HCMV ocorreram em somente 6 dos 55 pacientes (10,9%) que tiveram episódios de infecção ativa pelo HCMV. No **Grupo A**, os sintomas clínicos estiveram presentes em 2 dos 36 pacientes (5,55%) que apresentaram episódios de infecção ativa pelo HCMV. No **Grupo B**, os sintomas clínicos estiveram presentes em 4 dos 19 pacientes (21%) que apresentaram episódios de infecção ativa pelo HCMV.

Fatores de risco conhecidos para doença pelo HCMV, tais como o aparecimento da infecção ativa, tipo de enxerto e GVHD aguda (ZAIA, 1999), também estavam presentes em nossos pacientes. Todos os pacientes com doença pelo HCMV tiveram ao menos um desses fatores de risco. Nenhum outro fator de risco pode ser identificado. O órgão mais comum afetado pelo HCMV foi o trato gastrointestinal, como descrito por outro autor (ZAIA, 1999).

A sobrevida global foi a mesma em ambos os grupos estudados até o dia 1.152 após transplante. Isso poderia indicar que não houve superioridade entre profilaxia universal e terapia pre-emptiva em relação ao CMV. Resultados similares foram

observados em pacientes com sorologia mais favorável, em doadores não-relacionados e também em doadores relacionados, sugerindo que a terapia pré-emptiva tem o mesmo impacto que a profilaxia universal (**BOECKH, 1996; STOCCHI, 1999**).

Em nossa casuística não observamos a ocorrência de doença tardia pelo HCMV (após 100 dias de transplante) e não houve nenhuma toxicidade atribuída ao ganciclovir, exceto neutropenia, que foi reversível, e todos os pacientes que precisaram interromper o tratamento, puderam reiniciá-lo após a neutropenia ser resolvida. Isso sugere que a neutropenia não é uma complicação que possa ser associada à profilaxia quando utilizada em baixas doses. A eficácia do ganciclovir profilático pode ser aumentada com a administração concomitante de fator estimulador de colônia (GSF) (**WINSTON *et al*, 1993**). Esta estratégia foi adotada para os pacientes de nossa casuística.

Dos doadores estudados, 56 (81,15%) apresentaram IgG-HCMV positivo por ELISA no pré-transplante, indicando uma taxa de positividade compatível com o nosso meio. Os receptores apresentaram uma positividade IgG-HCMV no pré-transplante de 85,5%, também demonstrando uma alta prevalência de anticorpos IgG-HCMV. Estes dados são compatíveis com os dados da literatura brasileira (**SUASSUNA *et al*, 1995; COSTA *et al*, 1999; CAMARGO *et al*, 1996; AQUINO & FIGUEIREDO, 2001; MUSSI-PINHATA *et al*, 1998**), que demonstraram uma alta prevalência de infecção pelo HCMV. Observamos que a combinação de doador com sorologia IgG-HCMV negativa com receptor com sorologia IgG-HCMV negativa (**D-/R-**) não foi freqüente (8,7% no **Grupo Total**).

A presença da imunoglobulina da classe IgM do HCMV foi encontrada em somente 8,7% do Grupo Total de pacientes (4 pacientes do Grupo A e 2 pacientes do Grupo B). A positividade da IgM anti-HCMV pode estar relacionada à infecção aguda primária ou à reativação de uma infecção latente ou ainda à reinfecção. Aumentos significativos de títulos de IgG anti-HCMV (\geq quatro vezes os títulos iniciais) foram observados em 12 pacientes (17,5%). Nove pacientes com aumento de IgG-HCMV pertenciam ao Grupo A e 3 ao Grupo B.

No sorogrupo **D+/R-** (maior risco de desenvolver doença pelo HCMV), composto por 4/69 pacientes (5,8%), três pacientes deste grupo tiveram infecção primária, porém nenhum deles evoluiu para doença pelo HCMV.

Em nosso estudo, os testes de AGM e N-PCR foram igualmente efetivos no diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV e doença. Hebart e colaboradores compararam PCR no soro e plasma e AGM no sangue total e mostrou que estas técnicas eram igualmente adequadas na detecção da infecção ativa e no controle da eficácia da terapia antiviral em pacientes transplantados de medula (**HEBART *et al*, 1996**). Sangue total é superior ao plasma na detecção da infecção ativa pelo método de PCR, e que leucócitos de sangue periférico e células mononucleares são equivalentes (**RAZONABLE *et al*, 2002**). Várias técnicas estão atualmente disponíveis para a detecção precoce do HCMV, incluindo PCR quantitativo (**GOR *et al*, 1998**), detecção do RNAm (**GERNA *et al*, 2000**) e métodos de captura híbrida (**HEBART *et al*, 2001**). Estas técnicas ainda não estão adequadamente testadas ou totalmente disponíveis (**LJUNGMAN, 2002**).

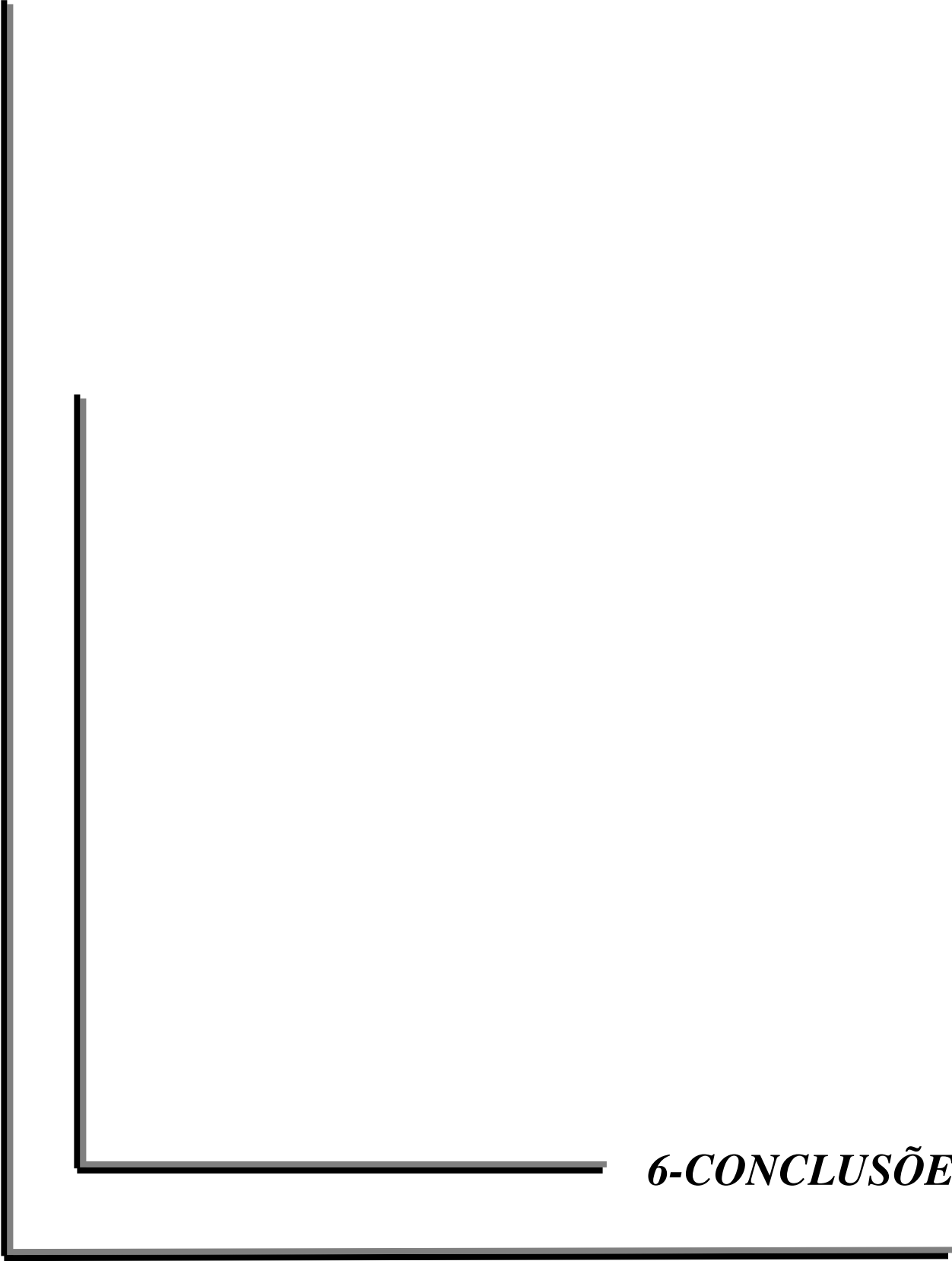
Atualmente, o real-time PCR, um método quantitativo inicialmente descrito por **HEID *et al***, em 1996, oferece muitas vantagens sobre a PCR convencional: primeiramente, tempo rápido de resultado devido à remoção da necessidade do processamento de pós-amplificação; em segundo lugar, a redução do risco de contaminação porque as reações são realizadas em um tubo simples que permanece lacrado; terceiro, há significativa economia de reagentes com o uso de pequenas quantidades de volume de reagentes e finalmente, há a oportunidade de quantificar com a introdução de sondas de hibridização (**NITSCHKE, 1999; ESPY, 2000; NICOLL, 2001; HEID *et al*, 1996**). A real-time PCR tem sido desenvolvida para combinar amplificação com quantificação do produto amplificado (**NICOLL, 2001; MACHIDA *et al*, 2000; GRISCELLI *et al*, 2001; MORI *et al*, 2002**).

Observamos que muitas amostras apresentaram células insuficientes para a realização dos testes de antígenemia e PCR (sem DNA), principalmente no período imediatamente após o transplante, ou, antes da “pega” do enxerto, onde a contagem de células é muito baixa, porém, isto não interferiu nos resultados finais, e neste período a incidência de infecção ativa pelo HCMV é baixa.

Com este trabalho, utilizando técnicas sensíveis e precoces (**SHIBATA *et al*, 1988; DEMMLER *et al*, 1988; EINSELE *et al*, 2000; VAN DER BIJ *et al*, 1988; HALWACHS *et al*, 1993; PANNUTI *et al*, 1996**), pudemos identificar os pacientes com risco de desenvolver doença pelo HCMV, evitando possíveis riscos com o tratamento profilático universal e custos desnecessários. A partir de nossas conclusões, o protocolo de prevenção da infecção ativa e doença pelo HCMV com ganciclovir universal em baixas doses da UNICAMP passará a não ser mais realizado, pois com a implantação da monitorização laboratorial pudemos indicar o tratamento pré-emptivo. A profilaxia universal com ganciclovir em baixas doses utilizada nos pacientes do Grupo A pareceu apenas atrasar e não reduzir a ocorrência da infecção ativa. Porém, dentre os pacientes que receberam profilaxia, apenas dois evoluíram para doença pelo HCMV a qual não foi grave. O tratamento da infecção ativa com ganciclovir também se mostrou eficiente, tendo ocorrido a negatificação dos testes após sua utilização. Tivemos dois óbitos pelo HCMV, tendo sido o tratamento iniciado tardiamente. No presente trabalho, o tempo de monitorização laboratorial após o transplante incluiu o período de aparecimento de doença tardia (após os 100 dias de transplante), porém, este tempo poderá ser estendido, principalmente em pacientes com risco maior de desenvolver essa patologia (ex. aqueles com GVHD aguda e crônica).

Infecção ativa tardia pelo HCMV ocorreu em onze pacientes do grupo com profilaxia universal e em cinco pacientes do grupo pré-emptivo. A realização de um longo período de monitorização para HCMV (após 100 dias de transplante) tem sido descrito em poucos estudos (**MACHADO *et al*, 2001; RAZONABLE *et al*, 2002**). Desde que a infecção ativa tardia predispõe o paciente à doença tardia pelo HCMV, seria interessante monitorizar pacientes com alto risco de desenvolver doença tardia, como aqueles com GVHD aguda e crônica (**PEGGS *et al*, 2000**) por um período mais extenso, como em nosso trabalho após o transplante. Dependendo do risco dos pacientes, a incidência de doença tardia pode ser maior que 18% em pacientes transplantados três meses após o transplante (**BOECKH *et al*, 2003**). A terapia pré-emptiva tem a vantagem de minimizar a ocorrência de doença tardia (**HUMAR *et al*, 2001**). Embora em nosso estudo tenha ocorrido infecção ativa tardia, a doença tardia por CMV não foi observada.

No Brasil, onde existe uma epidemiologia desfavorável para o HCMV (COSTA *et al*, 1999) e muitos pacientes dependem de instituições públicas de saúde (EID *et al*, 2002), o uso da N-PCR (SHIBATA *et al*, 1988; DEMMLER *et al*, 1988; EINSELE *et al*, 2000) e/ou da AGM (VAN DER BIJ *et al*, 1988; HALWACHS *et al*, 1993; PANNUTI *et al*, 1996), técnicas sensíveis e de baixo custo para a detecção precoce da infecção ativa pelo HCMV, podem adequadamente guiar a terapia pré-emptiva. Isso pode permitir tratamento precoce antes do desenvolvimento de doença clínica significativa, evitando a toxicidade relacionada ao uso de antivirais e ao alto custo da profilaxia antiviral universal.



6-CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados no presente estudo, obtivemos as seguintes conclusões:

- ❖ Padronizou-se e implantou-se a técnica da antígenemia na detecção da infecção ativa pelo HCMV em pacientes submetidos a TCPH;
- ❖ Monitorizou-se, prospectivamente, pacientes submetidos a TCPH em relação à infecção ativa e doença por HCMV utilizando as técnicas de antígenemia, PCR dupla e pesquisa de anticorpos específicos IgM e IgG por ELISA, contra o HCMV;
- O teste de **PCR** não se mostrou mais precoce na detecção da Infecção Ativa por HCMV do que a **antígenemia** nos pacientes do **Grupo A** (**54 e 62** dias, respectivamente, $P=NS$); contudo, a probabilidade de detecção de Infecção Ativa por **PCR** foi de **71,3%** e por **antígenemia** foi de **53%**, $P=0,04$.
- O teste de **PCR** mostrou-se mais precoce do que **antígenemia** na detecção da Infecção Ativa por HCMV nos pacientes do **Grupo B** (**24 e 34** dias, respectivamente, $P=0,03$). A probabilidade de detecção de Infecção Ativa por **PCR** foi de **67,2%** e por **antígenemia** foi de **66,7%**, $P=NS$.
- A profilaxia universal com ganciclovir em baixas doses não se mostrou efetiva na redução da probabilidade de detecção de infecção ativa pelo HCMV pelo teste de **antígenemia** até 150 dias após o transplante. A probabilidade de detecção de infecção ativa pelo HCMV no **Grupo A** foi de **53%** e no **Grupo B** de **66,7%**, $P=NS$.
- A profilaxia universal com ganciclovir em baixas doses não se mostrou efetiva na redução da probabilidade de detecção de infecção ativa pelo HCMV por **PCR** até 150 dias após o transplante. A probabilidade de detecção de infecção ativa pelo HCMV foi de **71,3%** nos pacientes do **Grupo A** e **67,2%** nos pacientes do **Grupo B**, $P=NS$.
- A profilaxia universal com ganciclovir em baixas doses não se mostrou efetiva na redução da probabilidade de **doença** HCMV até 150 dias após o transplante. A probabilidade de doença pelo HCMV foi de **4,5%** nos pacientes do **Grupo A** e **17,3%** nos pacientes do **Grupo B**, $P=NS$.

- A profilaxia universal com ganciclovir não reduziu a frequência de detecção da infecção ativa pelo HCMV pelos testes de **AGM e/ou PCR** nos Grupos A e B (**80%** e **79,7%**, respectivamente, $P=NS$), contudo, pudemos observar que houve um retardo na detecção da infecção ativa por PCR e/ou AGM nos pacientes do **Grupo A** em comparação aos do **Grupo B** (**54 e 26** dias, respectivamente, $P=0,007$).
- A profilaxia universal com ganciclovir não teve impacto sobre a sobrevida dos pacientes até 150 dias de seguimento após o transplante. A probabilidade acumulada de sobrevida no **Grupo A** foi de **88,9%** e no **Grupo B** foi de **79,2%**, $P=NS$.
- A profilaxia universal com ganciclovir não teve impacto sobre a sobrevida dos pacientes até 1.152 dias de seguimento após o transplante. A probabilidade acumulada de sobrevida no **Grupo A** foi de **77,5%** e no **Grupo B** foi de **74,8%**, $P=NS$.
- Com a introdução de métodos de diagnóstico precoce de detecção da infecção ativa pelo HCMV, como o propiciado pela antigenemia e/ou pela PCR dupla na rotina de vigilância viral para o HCMV, pudemos identificar precocemente os pacientes com maior risco de desenvolver doença por HCMV após o transplante, favorecendo o emprego de terapia antiviral específica, somente nesses casos.



***7-REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

ALFORD, C.A. & BRITT, W.J. - Cytomegalovirus in: Fields, B.N. & Knipe, D.M. **Virology 2 ed., Nova Iorque, Raven Press: 1981-2010, 1990.**

ALMEIDA, L.N.B; AZEVEDO, R.S.; AMAKU, M; MASSAD, E. Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community of São Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pública*; **35(2): 124-129, 2001.**

ALTMAN, D.G. *Practical statistics for medical research*, 14. London: Chapman and Hall; 1991. **p.410-411.**

AQUINO, V.H. & FIGUEIREDO, L.T.M. Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients diagnosed by nested-PCR. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **34: 93-101, 2001.**

AVERY, R.K.; ADAL, K.A.; LONGWORTH, D.L.; BOWELL, B.J. A survey of allogeneic bone marrow transplant programs in the United States regarding cytomegalovirus prophylaxis and pre-emptive therapy. *Bone Marrow Transplantation* **26: 763-767, 2000.**

AZEVEDO, A.M.; TORQUATO, J.P.; VIGORITO, A.C. *et al.* Prophylaxis of Cytomegalovirus Infection with Low-dose Intravenous Ganciclovir in Allogeneic Bone Marrow Transplant Patients. *Br J Haematol*, **93 (Suppl.2), p.250, 1996.**

BALDANTI, F.; REVELLO, M.G.; PERCIVALLE G.G. Use of the human cytomegalovirus (HCMV) antigenemia assay for diagnosis and monitoring of HCMV infections and detection of antiviral drug resistance in the immunocompromised. *J Clin Virol* **11: 51-60, 1998.**

BALFOUR, H.H., JR. Management of cytomegalovirus disease with antiviral drugs. *Rev Infect Dis* **12 (Suppl.7): S849-S860, 1990.**

BOECKH M, LEISENRING W, RIDDELL SR, BOWDEN RA, HUANG ML, MYERSON D, STEVENS-AYERS T, FLOWERS ME, CUNNINGHAM T, COREY L. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* **15: 407-14, 2003.**

BOECKH, M., BOWDEN, R.A., GOODRICH, J.M., PETTINGER, M., MEYERS, J.D. Cytomegalovirus Antigen Detection in Peripheral Blood Leukocytes After Allogeneic Marrow Transplantation. *Blood* **80(5): 1358-1364, 1992.**

BOECKH, M., BOWDEN, R.A., GOOLEY, T., MYERSON, D., COREY, L. Successful modification of a pp65 antigenemia-based treatment strategy for prevention of CMV disease in allogeneic marrow transplant recipients. *Blood* **93**: 1781-1782, 1999 (letter).

BOECKH, M., GOOLEY, T.A., MYERSON, D. CUNNINGHAM, T., SCHOCH, G., BOWDEN, R.A. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood* **88**: 4063-4071, 1996a.

BOECKH, M., LJUNGMAN, P. Cytomegalovirus infection in bone marrow transplant recipients. In: Bowden R.A., Ljungman, P., Paya, C., editors. *Transplant Infections*. Lippincott-Raven: 215-227, 1998.

BOECKH, M., RIDDELL, S.R., CUNNINGHAM, T. *et al.* Increased incidence of late CMV disease in allogeneic marrow transplant recipients after ganciclovir prophylaxis is due to a lack of CMV-specific T-cell responses. *Blood* **88** (Suppl. 1): 302a, 1996b.

BOECKH, M.; BOIVIN, G. Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications. *Clin Microbiol Rev* **11**(3): 533-554, 1998.

BOECKH, M.; HAWKINS, G.; MYERSON, D.; ZAIA, J.; BOWDEN, R.A. Plasma PCR for cytomegalovirus DNA after allogeneic marrow transplantation: comparison with PCR using peripheral blood leukocytes, pp65 antigenemia and viral culture. *Transplantation* **64**: 108-113, 1997.

BOECKH, M.; WOGERD, P.M.; STEVENS-AYERS, T.; RAY, C.G.; BOWDEN, R.A. Factors influencing detection of quantitative cytomegalovirus antigenemia. *J Clin Microbiol*, **32**: 832-834, 1994.

BONON SHA; ROSSI CL; DE SOUZA CA *et al.* CMV infection with Nested-PCR and antigenemia assays in patients who received or not ganciclovir universal prophylaxis in HLA identical sibling hematopoietic stem cell transplants. *Blood* **100** (11): 845a, 2002.

BONON SHA; ROSSI CL; DE SOUZA CA *et al.* Cytomegalovirus infection surveillance with Nested-PCR and antigenemia assays in patients receiving/not receiving ganciclovir universal prophylaxis in HLA identical sibling hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplantation* **31** (Supp 1): S93, 2003.

BONON, S.H.A.; MENONI, S.M.F.; ROSSI, C.L., *et al.* Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. *J Infection, in press.*

BOWDEN, R.A.; SAYERS, M.; FLOURNOY, N. *et al.* Cytomegalovirus immune globulin and seronegative products to prevent primary cytomegalovirus infection after marrow transplantation. *N Engl J Med* **314**: 1006-1010, 1986.

BOWDEN, R.A.; SLICHTER, S.J.; SAYERS, M.H.; MORI, M.; CAYS, M.J.; MEYERS, J.D. Use of leukocyte-depleted platelets and cytomegalovirus-seronegative red blood cells for prevention of primary cytomegalovirus infection after marrow transplant. *Blood* **78**: 246-50, 1991.

BRAINARD, JENNIFER A. Detection of Cytomegalovirus in liver transplants biopsies. *Transplantation* **57(12)**: 1753-1757, 1994.

BRESNAHAN, W.A. & SHENK, T. A Subset of Viral Transcripts Package Within Human Cytomegalovirus Particles. *Science*, **288**: 2373-2376, 2000.

BROWN, H.L. & ABERNATHY, M.P. Cytomegalovirus Infection. *Seminars in Perinatology*, **22(4)**: 260-266, 1998.

BRYTTING, M.; SUNDQUIST, V.; STALHANDSKE, P.; LINDE A.; WAHREN, B. Cytomegalovirus detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. *J Virol Methods* **32**: 127-138, 1991.

CAMARGO, L.F.A.; GRANATO, C.F.H.; TOMYIAMA, H.T.; COBO, E.; AJZEN, H.; PESTANA, J.O.M. Infecção pelo CMV em pacientes submetidos a transplante renal: Estudo de 20 casos. *J. Bras. Nefrol.* **18(2)**: 130-136, 1996.

CAMARGO, L.F.A.; UIP, D.E.; SIMPSON, A.A.G.; CABALLERO, O.; STOLF, N.A.G.; VILAS-BOAS, L.S.; PANNUTTI, C.S. Comparison between antigenemia and a quantitative-competitive polymerase chain reaction for the diagnosis of cytomegalovirus infection after heart transplantation. *Transplantation* **71**, 412-417, 2001.

CHAKRABARTI S; MACKINNON S; CHOPRA R; *et al.* High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. *Blood* **99**: 4357-4363, 2002.

- CHEE, M.A. ; BANKIER, A.T.; BECK, S., *et al.* An analysis of the protein coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol*, **154**: 125-169, 1990.
- CHOU, S. Newer Methods for Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. *Rev. Infect. Dis.* **12(7)**: 727-735, 1990.
- CHRISP, P. AND CLISSOLD, S.P. Foscarnet: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunocompromised patients with CMV retinitis. *Drugs* **41**: 104-129, 1991.
- COLE R, KUTTNER AG. Filterable virus present in the salivary glands of guinea pigs. *J Exp Med*, **44**: 855-873, 1926.
- COLIMON, R. & MICHELSON, S. Human Cytomegalovirus: pathology, diagnosis, and treatment. *Adv. Nephrol.*: 333-356, 1990.
- COSTA, F.F., COSTA, S.C.B. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): princípios e aplicações clínicas. *Rev. Bras. Reumatol.* **32**: 142-146, 1992.
- COSTA, S.C.B. Infecção por citomegalovírus (CMV): Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento. *Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica*, **25(1)**: 18-28, 1999.
- COSTA, S.C.B.; MIRANDA, S.R.P.; ALVES, G.; ROSSI, C.L.; FIGUEIREDO, L.T.M.; COSTA, F.F. Detection of cytomegalovirus infections by PCR in renal transplant patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **32**: 953-959, 1999.
- CRUMPACKER, C.S. Ganciclovir. *N. Engl. J. Med.* **335(10)**: 721-729, 1996.
- DE CLERCQ, E. Therapeutic potential of HPMPC as an antiviral drug. *Rev Med Virol* **3**: 85-96, 1993.
- DEMMLER, G.J.; BUFFONE, G.J.; SCHIMBOR, C.M.; MAY, R.A. Detection of Cytomegalovirus in Urine from Newborns by Using Polymerase Chain Reaction DNA Amplification. *J. Infect. Dis.* **158**: 1177-1184, 1988.
- DRAGO, F.; ARAGONE, M.G.; LUGANI, C.; REBORA, A. Cytomegalovirus Infection in Normal and Immunocompromised Humans. *Dermatology*, **200**: 189-195, 2000.
- DREW, W.L. Herpesviridae: Cytomegalovirus. *Laboratory Diagnosis Infectious Diseases (Principles and Practice)*, vol II, 247-260, 1988.

DULLEY, F.L. **Boletim COSAH, Coordenação de Sangue e Hemoderivados MS/SAS/DAPS -ano II, n.14, 1997.**

EHNST, A. The clinical relevance of different laboratory test in CMV diagnosis. *Journal of Infectious Disease*, **Supl 100: 64-71, 1996.**

EHRNST, A., BARKHOLT, L., BRATTSTROM, C., CZAJKOWSKI, J., TEODOSIU, O., TOLLEMAR, J., LJUNGMAN, P. Detection of CMV-matrix pp65 antigen in leucocytes by immunofluorescence as a marker of CMV disease. *J Med Virol.* **Feb;39(2):118-24, 1993.**

EID K; MIRANDA E; VIGORITO A *et al.* Critical analysis concerning the availability of full match sibling donors and feasibility of allogeneic bone marrow transplantation in Brazil. *Bone Marrow Transplant* **29 (Suppl 2): S238, 2002.**

EINSELE H; HEBART H; KAUFFMANN-SCHNEIDER *et al.* Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection. *Bone Marrow Transplant* **25: 757-763, 2000.**

EINSELE, H. & HEBART, H. Cytomegalovirus infection following stem cell transplantation. *Haematologica* **84: (EHA-4 educational book): 46-49, 1999.**

EINSELE, H.; EHNINGER, G.; HEBART, H; *et al.* Polymerase Chain Reaction Monitoring Reduces the Incidence of Cytomegalovirus Disease and the Duration and Side Effects of Antiviral Therapy After Bone Marrow Transplantation. *Blood* **86(7): 2815-2820, 1995.**

EMERY, V.C.; COPE, A.V.; BOWEN, E.F. *et al.* The Dynamics of Human Cytomegalovirus Replication In Vivo. *J Exp Med* ; **190 (2): 177-182, 1999.**

EPPS, R.E.; PITTELKOW, M.R.; SU, D.W.P.: TORCH syndrome. *Semin Dermatol*; **14: 179-186, 1995.**

ERICE, A. Resistance of Human Cytomegalovirus to Antiviral Drugs. *Clinical Microbiology Reviews*; **12(2): 286-297, 1999.**

ERICE, A.; HOLM, M.A.; SANJUAN, M.V.; DUNN, D.L.; GILL, P.C.; BALFOUR JR, H.H. Evaluation of CMV-vue antigenemia assay for rapid detection of cytomegalovirus in mixed-leukocyte blood fractions. *J. Clin Microbiol* **33: 1014-1015, 1995.**

ESPY, M.J.; UHL, J.R.; MITCHELL, O.S.; THORVILSON, J.N.; SVIEN, K.A.; WOLD, A.D., SMITH, T.F. Diagnosis of herpes simplex infection in the clinical laboratory by Lightcycler PCR. *J Clin Microbiol* **38: 795-799, 2000.**

FARBER S, WOLBACH SB. Intranuclear and cytoplasmic inclusions (protozoan-like bodies) in the salivary glands and other organs of infants. *Am J Pathol*, **8: 123-135, 1932.**

FORMAN, S.J.; ZAIA, J.A. Treatment and prevention of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: where do you stand? *Blood* **83: 2392, 1994.**

FOX, J.D.; ZUCKERMAN, M.A.; GAZZARD, B.G.; TEDDER, R.S.; MILLER, R.F. Detection of herpesvirus DNA by nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus-infected persons with neurologic disease. A prospective evaluation. *Journal of Infectious Disease*, **172: 1087-1090, 1995.**

GERNA G, BALDANTI F, LILLERI D *et al.* Human cytomegalovirus immediate-early mRNA detection by nucleic acid sequence-based amplification as a new parameter for pre-emptive therapy in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* **38: 1845-1853, 2000.**

GERNA, G.; ZAVATTONI, M.; PERCIVALLE, E.; GROSSI, P.; TOSELLINI, M; REVELLO, M.G. Rising levels of Human Cytomegalovirus (HCMV) antigenemia during initial treatment of solid-organ transplant recipients with primary HCMV infection. *J Clin Microbiol* **36: 1113-1116, 1998.**

GERNA, G.; ZIPETO, E.; PERCIVALLE, PÁREA, M.; REVELLO, M.G.; MACCARIO, R. PERI, G.; MILANESI, G. Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear Leukocytes from viremic patients. *J. Infect. Dis.*, **166: 1236-1244, 1992.**

GONDO, H.; MINEMATSU, T.; HARADA, M. *et al.* Cytomegalovirus (CMV) antigenaemia for a rapid diagnosis and monitoring of CMV-associated disease after bone marrow transplantation. *Br J Haematol*; **86 (1): 130-137, 1994.**

GOODPASTURE, E.W.; TALBOT, F.B. Concerning the nature of protozoan-like cells in certain lesions of infancy. *Am J Dis Child*, **21: 415-425, 1921.**

GOODRICH, J.M. Cytomegalovirus. *eMedicine Journal*, **September 10; vol 2, n.9, 2001.**

GOODRICH, J.M., MORI, M., GLEAVES, C.A., MOND, C., CAYRS, M., EBELING, D., BUHLES, W.C., DEARMOND, B., MEYERS, J.D. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* **235(23): 1601-1607, 1991.**

GOODRICH, J.M.; BOECKH, M.; BOWDEN, R. Strategies for the prevention of cytomegalovirus disease after marrow transplantation. *Clin Infect Dis*; **19: 287-298, 1994.**

GOODRICH, J.M.; BOWDEN, R.A.; FISHER, L.; KELLER, B.S.N.C.; SCHOCH, B.A.; MEYERS, J.D. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med* **118: 173-178, 1993.**

GOR D, SABIN C, PRENTICE HG et al. Longitudinal fluctuations in cytomegalovirus load in bone marrow transplant patients: relationship between peak virus load, donor/recipient serostatus, acute GVHD and CMV disease. *Bone Marrow Transplant* **21: 597-605, 1998.**

GRIFFITHS, P.D.; PANJWANI, D.D.; STIRK, P.R.; GANCZAKOWSKI, M.; BALL, M.G.; BLACKLOCK, H.A.; PRENTICE, H.G. Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients by detection of early antigen fluorescent foci. *Lancet*; **ii: 1242-1244, 1984.**

GRISCELLI, F; BARROIS, M.; CHAUVIN, S.; LASTERE, S.; BELLET, D.; BOURHIS, J-H. Quantification of Human Cytomegalovirus DNA in Bone Marrow Transplant Recipients by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* **39 (12): 4362-4369, 2001.**

GRUNDY, J.E. Virologic and pathogenetic aspects of cytomegalovirus infection. *Rev Infec Dis*; **12(Suppl 7): 711-719, 1990.**

GUGLIELMO, B.J.; WONG-BERINGER, A.; LINKER, C.A. Immune globulin therapy in allogeneic bone marrow transplant: a critical review. *Bone Marrow Transplantation* ; **13: 499-510, 1994.**

HALWACHS G, ZACH R, POGGLITSCH H, HOLZER H, TIRAN A, IBERER F, WASLER A, TSCHELIESSNIGG HP, LANZER G, FOLSCH B, et al. A rapid immunocytochemical assay for CMV detection in peripheral blood of organ-transplanted patients in clinical practice. *Transplantation* **56: 338-42, 1993.**

HANSHAW JB, DIDGEON JA, MARSHALL WC. Viral Diseases of the Fetus and Newborn. Philadelphia, **WB Saunders Co, 2nd Ed, 1985.**

HARDY, A.M.; ALLEN JR.; MORGAN, W.M.; CURRAN, J.W. - The incidence rate of acquired immunodeficiency syndrome in selected populations. **JAMA 253: 215-220, 1985.**

HEBART H, MÜLLER C, LÖFFLER J et al. Monitoring of CMV infection: a comparison of PCR from whole blood, plasma-PCR, pp65-antigenemia and virus culture in patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **17: 861-868, 1996.**

HEBART H, WUCHTER P, LOCCR J et al. Evaluation of the Murex CMV DNA hybrid capture assay version 2.0 for early diagnosis of cytomegalovirus infection in recipients of an allogeneic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* **28: 213-218, 2001.**

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J. AND WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6: 986-994, 1996.**

HERSMAN, J.; MEYERS, J.D.; THOMAS, E.D.; BUCKNER, C.D.; CLIFT, R. The effect of granulocyte transfusion on the incidence of cytomegalovirus infection after allogeneic marrow transplantation. *Ann Intern Med*; **96: 149-152, 1982.**

HO, M. - Cytomegalovirus in: MANDELL, G.L.; DOUGLAS Jr, R.G.; BENNETT, J.E. Principles and Practice of Infectious Diseases. 3.ed., New York, *Churchill Livingstone: 1159-72, 1990.*

HO, M. - Cytomegalovirus: Biology and Infection, 2.ed. New York, *Plenum Publishing Corporation: 1-440, 1991.*

HODINKA, R.L.; FRIEDMAN, H.M. Human cytomegalovirus. In Ballows, A.; Hausler Jr, W.J.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D.; Shadomy, H.J.; eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed., American Society for Microbiology, Washington D.C., pp.829-837, 1991.

HUANG, E.S., HUONG ,S.M., TEGMEIER, G.E., ALFORD, C.A. JR. Cytomegalovirus: Genetic Variation of viral Genomes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **354: 332-346, 1980.**

HUMAR, A.; LIPTON, J.; WELSH, S.; MOUSSA, G.; MESSNER, H. AND MAZZULLI, T. A randomized trial comparing cytomegalovirus antigenemia assay vs screening bronchoscopy for the early detection and prevention of disease in allogeneic bone marrow and peripheral blood stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation* **28, 485-490, 2001.**

JIWA, N.M., VAN DER RIJKE, F.M., MULDER, A., VAN DER BIJ, W., THE, T.H., ROTHBARTH, PH.H., VELZING, J., VAN DER PLOEG, M., RAAP, A.K. An improved immunocytochemical method for the detection of human cytomegalovirus antigens in peripheral blood leukocytes. *Histochemistry* **91**: 345-349, 1989.

JIWA, N.M., VAN GEMERT, G.W., RAAP, A.K., VAN DER RIJKE, F.M., MULDER, A., LENS, P.F., SALIMANS, M.M.M. ZWAAN, F.E., VAN DORP, W, VAN DER PLOEG, M. Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood Leukocytes of Viremic Transplant Recipients by the Polymerase Chain Reaction. *Transplantation* **48**: 72-76, 1989.

JONG, M.D.; GALASSO, G.J; GAZZARD, B.; GRIFFITHS, P.D.; JABS, D.A.; KERN, E.R., SPECTOR, S.A. Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Research* **39**: 141-162, 1998.

KAPLAN, E.D. & MEIER, P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* **53**: 457-481, 1958.

KULKARNI A; WESTMORELAND D e FOX JD. Molecular-based strategies for assessment of CMV infection and disease in immunosuppressed transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* **7**: 179-186, 2001.

LESHER, J.L. Cytomegalovirus infections and the skin. *J Am Acad Dermatol* **18**: 1333-1338, 1988.

LI, C.R., GREENBERG, P.D., GILBERT, M.J., GOODRICH, J.M. RIDDELL, S.R. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood*, **83**: 1971-1979, 1994.

LIPSCHUTZ, B. Untersuchungen über die Aetiologie der Krankheiten d. herpes genitalis, etc. *Arch Dermatol Syphilol*, **136**: 428-482, 1921.

LJUNGMAN & EINSELE. Cytomegalovirus infection. *Curr Opin Hematol*. Nov;**1(6)**:418-22. Review, 1994.

LJUNGMAN P. Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* **118**: 44-57, 2002.

LJUNGMAN, P. AND PLOTKIN, S.A. Workshop on CMV Disease: Definitions, Clinical Severity Scores, and New Syndromes. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **99: 87-89, 1995.**

LJUNGMAN, P.; LAMBERTENGHI, D.; PLATZBECKER, U., *et al.* Cido fovir for CMV infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients. *Blood*; **97: 388, 2001.**

LJUNGMAN, P.; NIEDERWIESER, D.; PEPE, M.S.; LONGTON, G.; STORB, R.; MEYERS, J.D. Cytomegalovirus infection after marrow transplantation for aplastic anemia. *Bone Marrow Transplantation* **6: 295-300, 1990.**

LO, C.Y.; K.Y.YUEN; S.L.LUI; F.K.LI; T.M. CHAN; W.K.LO AND I.K.CHENG. Diagnosing cytomegalovirus disease in CMV seropositive renal allograft recipients: a comparison between the detection of CMV DNAemia by polymerase chain reaction and antigenemia by CMV pp65 assay. *Clin Transplant.* **11: 286-293, 1997.**

MACHADO CM; MENEZES RX; MACEDO MCA *et al.* Extended antigenemia surveillance and late cytomegalovirus infection after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* **28: 1053-1059, 2001.**

MACHADO, C.M.; DULLEY, F.L.; VILAS BOAS, L.S.; CASTELLI, J.B.; MACEDO, M.C.A.; SILVA, R.L.; PALLOTA, R.; SABOYA, R.S. AND PANNUTTI, C.S. CMV pneumonia in allogeneic BMT recipients undergoing early treatment or pre-emptive ganciclovir therapy. *Bone Marrow Transplantation* **26: 413-417, 2000.**

MACHIDA, U; KAMI, M; FUKUI, T; KAZUYAMA ,Y; KINOSHITA, M., *et al.* Real-Time Automated PCR for Early Diagnosis and Monitoring of Cytomegalovirus Infection after Bone Marrow Transplantation. *J Clin Microbiol* **38: 2536-2542, 2000.**

MANDANAS, R.A., SAEZ, R.A, SELBY, G.B, CONFER, D.L. Cytomegalovirus surveillance and prevention in allogeneic bone marrow transplantation: examination of a preemptive plan of ganciclovir therapy. *Am J Haematol.* **1996 Feb;51(2):104-11.**

MANTEIGA R, MARTINO R, SUREDA A *et al.* Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided pre-emptive treatment with ganciclovir after allogeneic stem transplantation: a single-center experience. *Bone Marrow Transplant*; **22: 89-904, 1998.**

MAR, E.C.; CHIOU, J.F; CHENG, Y.C., HUANG, E.S. Inhibition of cellular DNA polymerase- α and human cytomegalovirus-induced DNA polymerase by the triphosphates of 9-(2-hydroxyethoxy-methyl) guanine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine. *J Med Virol* **53: 776-780, 1985.**

MARKS, DI; CULIS, JO; WARD, KN *et al.* Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia using siblings and volunteer unrelated donors. *Ann Intern Med*; **119: 207-214, 1993.**

MAYA, TC AND AZULAY, DR. Infecção por Citomegalovírus. In: Lupi, O; Silva, AS; Pereira Jr, AC. **Herpes - Clínica, Diagnóstico e Tratamento. 1ª. edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda. Cap. 8, p. 135-156, 2000.**

MCKEATING, J.A., STAGNO, S., STIRK, P.R., GRIFITHS,P.D. Detection of Cytomegalovirus in Urine by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Med. Virol.* **16: 367-373, 1985.**

MEYERS, J.D.; FLOURNOY, N.; THOMAS, E.D. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J. Infect. Dis.* **153: 478-88, 1986.**

MEYERS, J.D.LJUNGMAN, P.; FISCHER, L.D. Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplant: importance of cytomegalovirus viremia. *J. Infect. Dis.* **162: 373-380, 1990.**

MILLER, WJ; MCCULLOUGH, J; BALFOUR, HH, *et al.* Prevention of cytomegalovirus infection following bone marrow transplantation: a randomized trial of blood product screening. *Bone Marrow Transplantation*; **7: 227-234, 1991.**

MORI T, OKAMOTO S, MATSUOKA S *et al.* Risk-adapted pre-emptive therapy for cytomegalovirus disease in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*; **25: 765-769, 2000.**

MORI, T; OKAMOTO, S; WATANABE, R; YAJIMA, T; IWAO, Y; YAMASAKI, R; NAKAZATO, T; SATO, N; IGUSHI, T; NAGAYAMA, N; HIBI, T; IKEDA, Y. Dose-adjusted preemptive therapy for cytomegalovirus disease based on real-time polymerase chain reaction after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* **29: 777-782, 2002.**

MUSSI-PINHATA MM, YAMAMOTO AY, FIGUEIREDO LT, CERVI MC, DUARTE G. Congenital and perinatal cytomegalovirus infection in infants born to mothers infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr.* **1998 Feb;132(2):285-90.**

MUSTAFA, M.M. Cytomegalovirus infection and disease in the immunocompromised host. *Ped. Infect. Dis. J.* **13: 249-59, 1994.**

MYERS, J.B., D.AMSTERDAM. The laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections. *Immunol. Invest.* **26(3), 383-394, 1997.**

NELSON, C.T.; DEMMLER, G.J. Cytomegalovirus infection in the pregnant mother, fetus and newborn infant. *Clin Perinatol*, **24: 151-60, 1997.**

NICHOLS, W.G., BOECKH, M. Recent advances in the therapy and prevention of CMV infections. *Journal of Clinical Virology*, **16: 25-40, 2000.**

NICOLL S; BRASS A; CUBIE HÁ. Detection of herpes viruses in clinical samples using real-time PCR. *Journal of Virological Methods* **96: 25-31, 2001.**

NITSCHKE A; STEUER N; SCHMIDT CA; LANDT O; SIEGERT W. Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. *Clin Chem* **45: 1932-1937, 1999.**

NIUBÓ, J.; PEREZ, J.L.; MARTINEZ-LACASA, J.T.; GARCIA, A.; ROCA, J.; FABREGAT, J.; GIL-VERNET, S. AND MARTIN, R. Association between quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. *Diagn. Microbiol. Infec. Dis.* **24: 19-24, 1996.**

OLIVE, D.M.; SIMSEK, M.; AL-MUFTI, S. Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* **27: 1238-1242, 1989.**

OSAROGIAGBON, RU; DEFOR, TE; WEISDORF, MA; ERICE, A; WEISDORF, DJ. CMV antigenemia Following Bone Marrow Transplantation: Risk Factors and Outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*; **6(3): 280-288, 2000.**

PANNUTI CS; KALLÁS EG; MUCCIOLI C; ROLAND RK; FERREIRA EC; BUENO MHS; DO CANTO CLM; VILAS BOAS LS AND BELFORT, R. Cytomegalovirus Antigenemia in Acquired Immunodeficiency Syndrome Patients With Untreated Cytomegalovirus Retinitis. *Am J of Ophthalmology* **122: 847-852, 1996.**

PANNUTI CS; VILAS BOAS LS; AMATO NETO, V. *et al.* Detecção de anticorpos IgM nas infecções primárias e secundárias pelo citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante renal. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1987; 29: 317-22.

PANNUTTI, C.S. – Citomegalia. In: Ferreira, A. W.; Ávila, S.L.M. eds. **Diagnóstico Laboratorial das principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes, 2^a. edição, Editora Guanabara Koogan, Cap. 5, p. 68-73, 2001.**

PANNUTTI, C.S. Infecção por CMV. Revisão e Ensaio. *Pediat (S.Paulo)*, 6: 144-153, 1984.

PEGGS, K.S., PREISER, W., KOTTARIDIS, P.D., MCKEAG, N., BRINK, N.S., TEDDER, R.S., GOLDSTONE, A.H., LINCH, D.C., MACKINNON, S. Extended routine polymerase chain reaction surveillance and pre-emptive antiviral therapy for cytomegalovirus after allogeneic transplantation. *British Journal of Haematology*, 111: 782-790, 2000.

PILLAY, D; ALI, A.A.; LUI, SF; KOPS, E; SWNY P; GRIFFITHS, P.D. The prognosis significance of positive CMV cultures during surveillance of renal transplant recipients. *Transplantation*, 56: 103-8, 1993.

PORTAN-JORDAN K; ROSEMBERG EI; KEISER JF; GROSS JD; ROSS AM; NASSIM S; GARRET CT. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false-positives caused by contamination with fragmented DNA. *Journal of Medical Virology* 30: 850-91, 1990.

PREISER W; BRÄUNINGER S; SCHWERDTFEGER R; AYLIFFE U; GARSON JA; BRINK NS; FRANCK S; DOERR HW, RABENAU HF. Evaluation of diagnostic methods for the detection of cytomegalovirus in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Journal of Clinical Virology* 20, 59-70, 2001.

PRZEPIORKA,D.; WEISDORF, D.; MARTIN, P. ET AL. Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant*; 15: 825-828, 1995.

RAWLINSON, W.D. Diagnosis of Human Cytomegalovirus Infection and Disease. *Pathology* 31, p. 109-115, 1999.

RAZONABLE RR, BROWN RA, WILSON J *et al.* The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation* **73: 968-73, 2002.**

Recommendations of CDC, the Infectious Diseases Society of America, and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*; **6: 659, 2000.**

REUSSER, P. Challenges and options in the management of viral infections after stem cell transplantation. *Support Care Cancer* **10: 197-203, 2002.**

REUSSER, P. The challenge of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation: epidemiology, prophylaxis and therapy. *Bone Marrow Transplant*; **18(Suppl. 2): 107-109, 1996.**

REUSSER, P.; EINSELE, H.; LEE, VOLIN, L.; ROVIRA, M.; ENGELHARD, D.; ENGELHARD, D.; FINKE, J.; CORDONNIER, C.; LINK, H.; LJUNGMAN, P. Randomized multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for preemptive therapy of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **99 (4): 1159-1164, 2002.**

REVELLO MG; ZAVATTONI, M; PERCIVALLE E; GROSSI P; GERNA G. Correlation between immunofluorescent detection of human cytomegalovirus immediate early antigens in polymorphonuclear leukocytes and viremia. *J Infect Dis* **160: 159-160, 1989.**

RIBBERT, H. Veber protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Negeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zentralbl Allg Pathol*, **15: 945-948, 1904.**

RILEY, JR., H.D. History of the Cytomegalovirus. *Southern Medical Journal*, February, **1997.** <http://www.sma.org/smj/97feb4.htm>

RINGDEN, O; LONNQVIST, B; ASCHAN, J; SUNDBERG, B. Foscarnet prophylaxis in marrow transplant recipients (letter). *Bone Marrow Transplantation*; **4: 713, 1989.**

ROBERTS, TC; BULLER, RS; GAUDREAULT-KEENER, M; STERNHELL, KE; GARLOCK, K.; SINGER, GG; BRENNAN, DC AND STORCH, G. Effects of Storage Temperature and time on qualitative and Quantitative Detection of Cytomegalovirus in Blood Specimens by Shell Vial Culture and PCR. *J Clin Microbiol*, **35 (9), p.2224-2228, 1997.**

- ROIZMAN, B. Redefining Virology. **Science**, 288(5475): 2373-2376, 2000.
- ROWE WP, HARTLEY JW, WATERMAN S *et al.* Cytopathogenic agent resembling salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. **Proc Soc Exp Biol Med**, 92: 418-424, 1956.
- RUBIN, R.H. Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. **Rev Infec Dis** 12(suppl 7): 754-766, 1990.
- RUBIN, R.H. Infectious disease complication in renal transplantation. **Kidney Int.** 44: 221-236, 1993.
- RUBIN, R.H. Preemptive therapy in immunocompromised hosts. **N. Engl. J. Med.** 324: 1057-1059, 1991.
- SAIKI, R.K; SCHARF, S.; FALOONA, F.; ERLICH, H.A. Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle-cell anemia. **Science** 230: 1350-1354, 1985.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual.** (ed2). Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- SAWYER LA. Antibodies for the prevention and treatment of viral diseases. **Antiviral Res.** 2000 Aug;47(2):57-77. Review.
- SCHMIDT, G.M.; HORAK, D.A.; NILAND, J.C.; DUNCAN, S.R.; FORMAN, S.J.; ZAIA, J.A. A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplants. **N. Engl. J. Med.** 324: 1005, 1991.
- SHEEP, D.H.; DANDLIKER, P.S.; MIRANDA, P. *et al.* Activity of 9-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethoxymethyl] guanine in the treatment of cytomegalovirus pneumonia. **Ann Intern Med** 103: 368-373, 1985.
- SHIBATA, D.; MARTIN, W.J.; APPLEMAN, M.D.; CAUSEY, D.M.; LEEDOM, J.M.; ARNHEIM, N. Detection of Cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood of Patients Infected with Human Deficiency Virus. **J Infect Dis** 158: 1185-1192, 1988.
- SIA, I.G. & PATEL, R. New Strategies for Prevention and Therapy of Cytomegalovirus Infection and Disease in Solid-Organ Transplant Recipients. **Clinical Microbiology Reviews**, 13: 83-121, 2000.

SMITH MG, VELLIOS F. Inclusion disease or generalized salivary gland virus infection. *Arch Pathol*, **50: 862-884, 1950.**

SMITH MG. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, **92: 418-424, 1956.**

SOLANO S, MUÑOZ I, GUTIÉRREZ A, FARGA A, PRÓSPER F, GARCÍA-CONDE J, NAVARRO D, GIMENO C. Qualitative Plasma PCR Assay (AMPLICOR CMV Test) versus pp65 Antigenemia Assay for Monitoring Cytomegalovirus Viremia and Guiding Preemptive Ganciclovir Therapy in Allogeneic Stem Cell Transplantation. *J Clin Microbiol* **39 (11): 3938-3941, 2001.**

SPECTOR, S.A.; RUA, J.A.; SPECTOR, D.H. MCMILLAN, R. Detection of human cytomegalovirus in clinical specimens by DNA-DNA hybridization. *J. Infect. Dis.* **150: 121, 1984.**

STENBERG, R.M.; THOMSEN, D.R.; STINSKI, MF. Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *J. Virol* **49(1):190-199, 1984.**

STINSKI, MF. Cytomegalovirus and its replication. In: Fields, BN; Knipe, DM – *Virology*, **2 ed., New York, Raven Press Ltda, p. 1959-1980, 1990.**

STOCCHI R; SZYDLO R; CRADDOCK C et al. A comparison of prophylactic vs pre-emptive ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after T-depleted volunteer unrelated donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **23: 705-709, 1999.**

STOCCHI, R; WARD, KN; FANIN, R; BACCARANI, M; APPERLEY, JF. Management of human cytomegalovirus infection and disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica* **84: 71-79, 1998.**

STRAUS, S.E. - Introduction to *herpesviridae*. In: Mandel, G.L.; Douglas Jr, R.G.;10 Bennett, J.E. **Principles and Practice of Infectious Diseases, 3ed., New York, Churchill Livingstone: 1139-1144, 1990.**

SUASSUNA JH; LEITE LL & VILLELA LH. Prevalence of cytomegalovirus infection in different patient groups of an urban university in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **28: 105-108, 1995.**

SUASSUNA, J.H.R.; MACHADO, R.D. Diagnóstico das Infecções por Citomegalovírus (CMV) em Pacientes com Deficiência Imunológica. *Revista da Associação de Medicina do Brasil*, **38(1): 33-47, 1992.**

SWEET, C. AND SMITH, H. The pathogenicity of viruses. In: **Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th edn., Vol.4** (Collier, L.S. and Timbury, M.C., Eds.), pp. **105-130.** Edward Arnold, London, UK, 1990.

SWEET, C. The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microbiology Reviews* **23: 457-482, 1999.**

TEGTMEIER, G.E. Posttransfusion cytomegalovirus infections. *Arch Pathol Lab Med*; **113: 236-245, 1989.**

THE, T.H.; VAN DEN BERG, A.P.; HARMSSEN, M.C.; VAN DER BIJ, W. VAN SON, W.J. The cytomegalovirus antigenemia assay: a plea for standardization. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **99: 25-29, 1995.**

THE, T.H.; VAN DER BIJ, W., VAN DER BERG, A.P.; VAN DER GIESSEN, M; WEITS, J.; SPRENGER, H.G. VAN SON, W.J. Cytomegalovirus Antigenemia. *Rev. Infect. Dis.* **12(7): 737-744, 1990.**

THE, T.H.; VAN DER PLOEG, M.; VAN DER BERG, A.P.; VLIEGER, 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* **54(2): 193-198, 1992.**

THOMAS, ED; STORB, R; CLIFT, RA; FEFER, A; JOHNSON, FL; NEIMAN, PE; LERNER, KG; GLUCKSBERG, H; BUCKNER, CD. Bone Marrow Transplantation (second of two parts). *N Engl J Med*, v. **292**, p. **895-902, 1975.**

VALTEAU D; HARTMAN O; BENHAMOU E; CAILLAUD JM; BRUGIÈRES L; BEAUJEAN F; PATTE C; FLAMANT F; LEMERLE J. Nonbacterial nonfungal interstitial pneumonitis following autologous bone marrow transplantation in children treated with high-dose chemotherapy without total-body irradiation. *Transplantation* **45: 737-40, 1988.**

VAN DEN BERG, AP; KLOMPMAKER, IJ; HAAGSMA, EB; SCOLTEN-SAMPSON, A.; BIJLEVEL, CMA; SCHIRM, J.; VAN DER GIESSEN, M.; SLOOFF, MJH; THE, TH. Antigenemia in the Diagnosis and Monitoring of Active Cytomegalovirus Infection after Liver Transplantation. *J Infect Dis* **164: 265-270, 1991.**

- VAN DER BIJ, W., VAN SON, W.J., VAN DER BERG, A.P.M., TEGZESS, A.M., TORENSMA, R. THE, T.H. Cytomegalovirus (CMV) Antigenemia: Rapid Diagnosis and Relationship with CMV-Associated Clinical Syndromes in Renal Allograft Recipients. *Transplant. Proc.* **21(1): 2061-2064, 1989.**
- VAN DER BIJ, W.; SCHIRM, J.; TORENSMA, R.; J. VAN SON, W.; TEGZESS, A.M. AND HAUW THE, T. Comparison between Viremia and Antigenemia for Detection of Cytomegalovirus in Blood. *J Clin Microbiology* **26 (12): 2531-2535, 1988a.**
- VAN DER BIJ, W.; TORENSMA, R.; VAN SON, W.J.; TEGZESS, A.M. THE, T.H. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. *J. Med. Virol.* **25, 179-188, 1988b.**
- VAN DER MEER, JTM; DREW, WL; BOWDEN, RA; GALASSO, GJ; GRIFFITHS, PD; JABS, DA; KATLAMA, C; SPECTOR, AS, WHITLEY, RJ. Summary of the International Consensus Symposium on Advances in the Diagnosis, Treatment and prophylaxis of Cytomegalovirus Infection. *Antiviral Research* **32: 119-140, 1996.**
- VERHEYDEN J. P.H.: Evolution of therapy for cytomegalovirus infection. *Rev. Infect. Dis.* **10 (suppl. 3), S477-S489, 1988.**
- VERONESI, R., D.M., D.C. Citomegalia. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*, **8 ed.: 206-211, 1991.**
- VILMER, C.; PÉROL, Y. Manifestations cutanées des infections à cytomegalovirus. *Ann Dermatol Vénérolog*; **111: 119-125, 1984.**
- WELLER, T.H. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations (First of two parts). *N. Engl. J. Med.* **285: 203-214, 1971.**
- WELLER, T.H. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations (Second of two parts). *N. Engl. J. Med.* **285: 267-274, 1971.**
- WELLER, T.H.; HANSHAW, J.B.; SCOTH, D.E. Serological differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* **12: 130-132, 1960.**
- WELLER, H.; MACAULEY, J.C.; CRAIG, J.M.; WIRTH, P. - Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illness resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **94: 4-12, 1957.**

WINGARD JR; SOSTRIN MB; VRIESENDORP HM; MELLITS ED; SANTOS GW; FULLER DJ; BRAINE HG; YEAGER AM; BURNS WH; SRAL R. Interstitial pneumonitis following autologous bone marrow transplantation. *Transplantation* **46: 61-5, 1988.**

WINSTON, D.J. HO, G.; BARTONI, R.N.; MOND, C.; EBELING, D.F.; BUHLES, W.C.; CHAMPLIN, R.E. Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients: results of a placebo-controlled, double-blind trial. *Ann. Int. Med.* **118: 179-184, 1993.**

WINSTON, DJ & GALE, RP. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection and disease after bone marrow transplantation in the 1990s. *Bone Marrow Transplantation*; **8: 7-11, 1991.**

WINSTON, DJ; HO, WG; CHAMPLIN, RE. Cytomegalovirus infections after allogeneic bone marrow transplantation. *Rev Infect Dis* **12 (Suppl. 7): S776-792, 1990.**

XU, W.; SUNDQVIST, V.A.; BRYTTING, M. AND LINDE, A. Diagnosis of cytomegalovirus infections using polymerase chain reaction, virus isolation and serology. *Scandinavian Journal of Infections Disease*, **25: 311-316, 1993.**

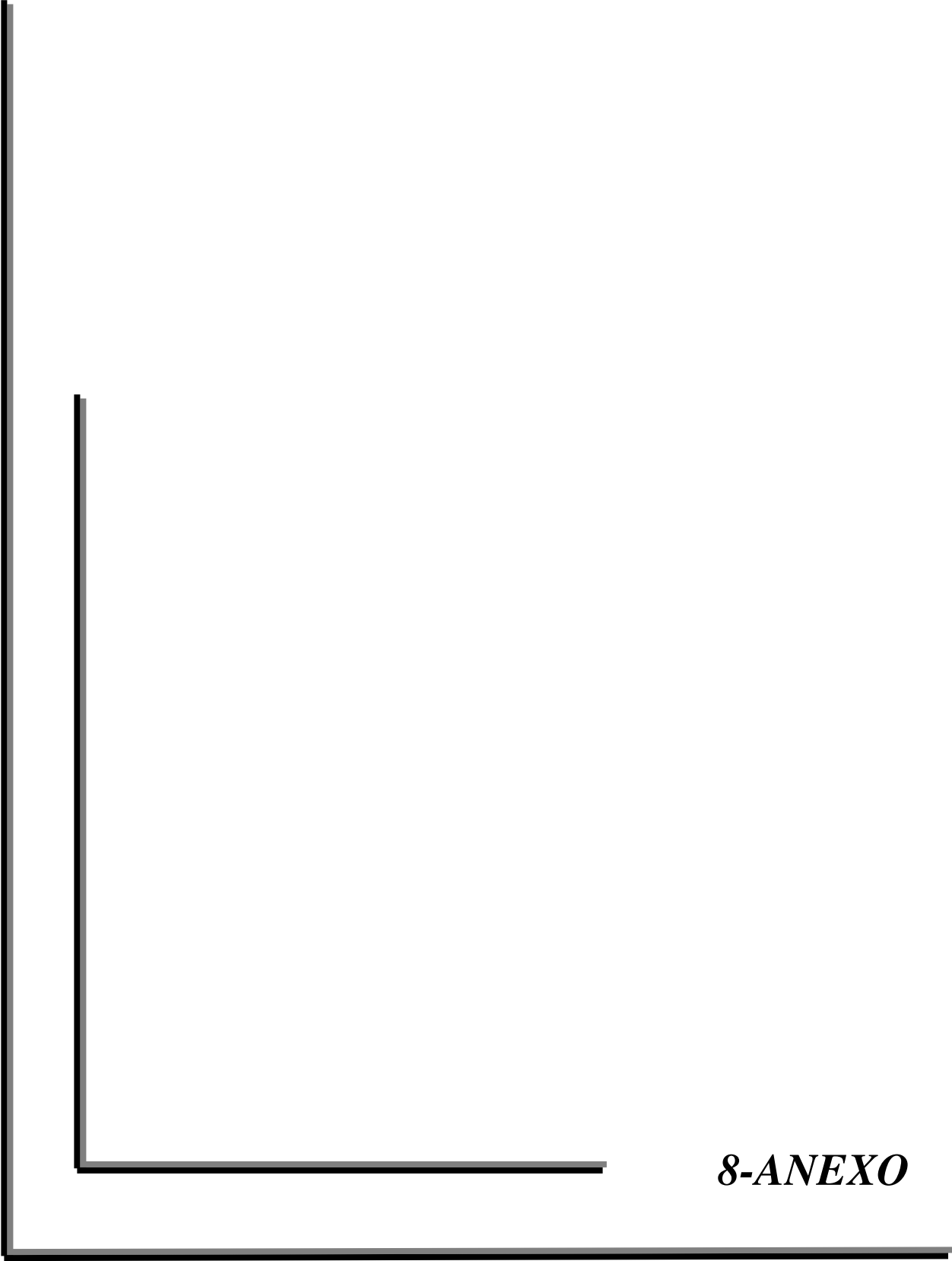
YAKUSHIJI K; GONDO H; KAMEZAKI K et al. Monitoring of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation: comparison of an antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant* **29: 599-606, 2002.**

YUEN, K-M; LO, SK-F; CHIU, EK-W; WONG, SS-Y; LAU, Y-U; LIANG, R; CHAN, T-K; NG M-H. Monitoring of Leukocyte Cytomegalovirus DNA in Bone Marrow Transplant Recipients by Nested PCR. *J Clin Microbiol* **33 (10): 2530-2534, 1995.**

ZAIA, J.A. Cytomegalovirus Infections. In: Thomas, E.D.; Blume, K.G.; Forman, S.J. **Hematopoietic Cell Transplantation. Seconde Edition: Blackwell Science; 1999. chapter 51, p. 560-583.**

ZAIA, J.A. Epidemiology and pathogenesis of cytomegalovirus disease. *Semin Hematol*, **27: 5-10, 1990.**

ZAIA, J.A.; FORMAN, S.J. Cytomegalovirus infection in bone marrow transplant recipient. *Infect Dis Clin North Am*, **9: 879-900, 1995.**



8-ANEXO

**ANEXO A-APROVAÇÃO DESTE PROTOCOLO DE PESQUISA PELO COMITÊ
DE ÉTICA DA FCM/UNICAMP.**



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**
☒ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas-S.P.
☎ 0 XX 19 7888936
fax 0 XX 19 7888925
☒ cep@head.fcm.unicamp.br

PARECER: N° 085/99

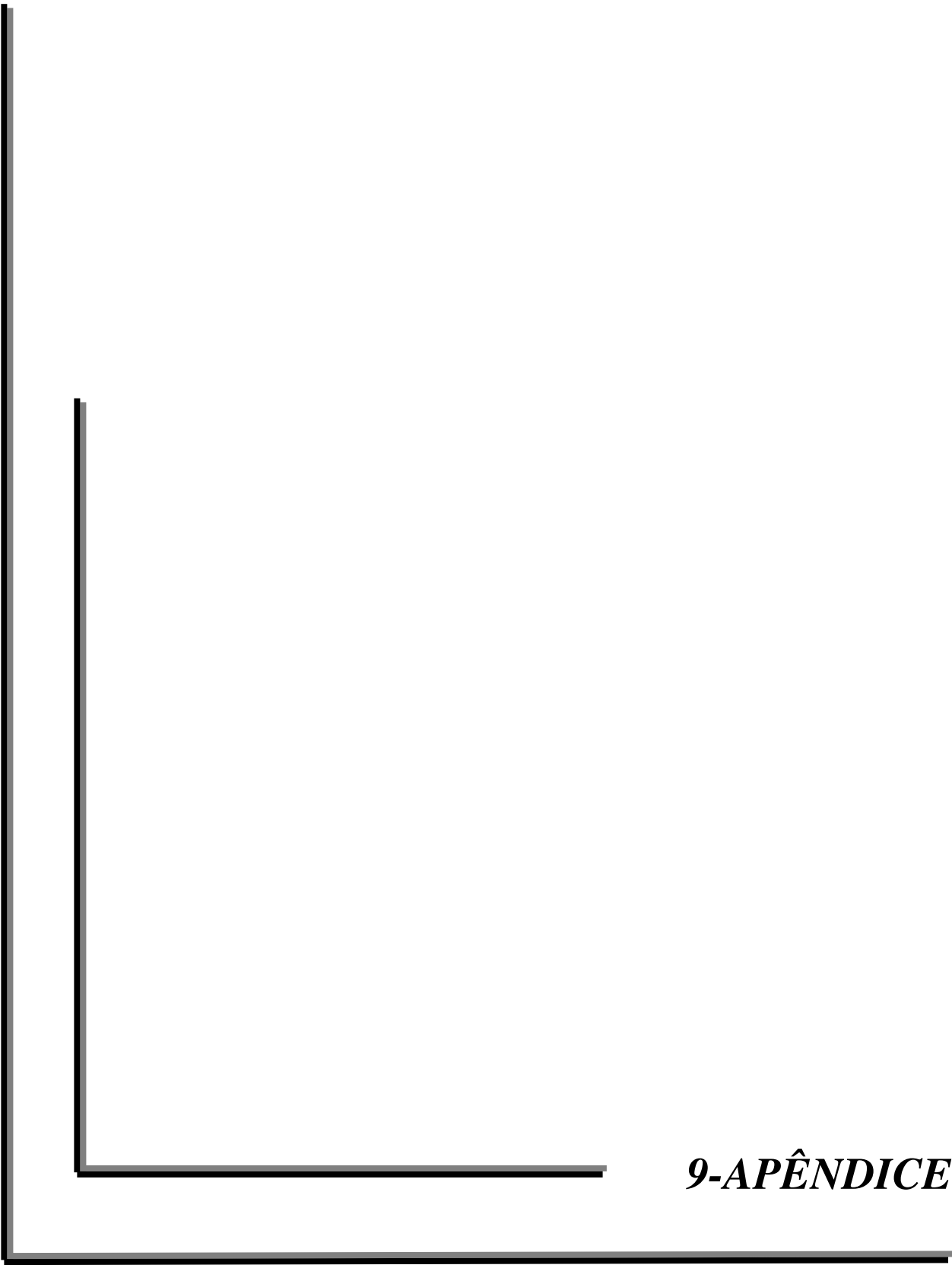
P. DE PESQUISA: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ANTIGENEMIA, NESTED PCR E SOROLOGIA (ELISA), NO DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS EM TRANSPLANTADOS DE MEDULA ÓSSEA

PESQUISADOR: Sandra Helena Alves Bonon

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado os termos do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

Em agosto/1999


**Prof. Dr. FORTUNATO ANTONIO BADAN PALHARES
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP**



9-APÊNDICES

APÊNDICE A-CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____ aceito colaborar com um estudo que está sendo realizado na Universidade Estadual de Campinas, para a pesquisa do Citomegalovírus Humano. Para isso, sei que colherão uma amostra de sangue (4-8 ml) para a realização da pesquisa.

Estou ciente que poderei desistir de participar deste estudo a qualquer hora, e que isto em nada irá prejudicar o meu tratamento.

Qualquer esclarecimento, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa - FCM/UNICAMP pelo telefone (019) 3788-7232.

Campinas, _____ de _____ de _____.

Paciente: _____
(responsável)

Médico: _____

APÊNDICE B-CARACTERÍSTICAS DOS DOADORES RELACIONADOS AO ESTUDO E RESULTADOS DOS TESTES DE SOROLOGIA IGM/IGG - HCMV, ANTIGENEMIA E PCR DUPLA REALIZADOS NO PRÉ-TRANSPLANTE.

n	INICIAIS	SEXO	IDADE	IgM-CMV PRÉ-TRANSPLANTE	IgG-CMV PRÉ-TRANSPLANTE	PCR 1	DATA PCR 1	AGM 1	DATA AGM 1
1	R.C.S.A	F	35	NR	R	NEGATIVO	24/07/1998	NEGATIVO	24/07/1998
2	S.M.A	F	21	NR	R	NEGATIVO	30/07/1998	NEGATIVO	30/07/1998
3	C.H.T.	F	17	NR	R	NEGATIVO	06/08/1998	NEGATIVO	06/08/1998
4	V.S.R.	F	30	NR	R	NEGATIVO	13/08/1998	NEGATIVO	13/08/1998
5	M.D.Q.	M	35	NR	R	NEGATIVO	31/08/1998	NEGATIVO	31/08/1998
6	J.D.M.	M	58	NR	R	NF	NF	NF	NF
7	I.F.N.	M	17	NR	R	NEGATIVO	10/09/1998	NEGATIVO	10/09/1998
8	A.S.I.	M	5	NR	R	NEGATIVO	17/09/1998	NEGATIVO	17/09/1998
9	V.H.M.	M	14	NR	NR	NEGATIVO	22/10/1998	NEGATIVO	22/10/1998
10	C.D.F.	M	20	NR	R	NEGATIVO	29/10/1998	NEGATIVO	29/10/1998
11	N.D.C	F	19	NR	R	NF	NF	NF	NF
12	R.C.	M	58	NR	R	NEGATIVO	19/11/1998	NEGATIVO	19/11/1998
13	A.R.F.M.	F	4	NR	NR	NF	NF	NF	NF
14	A.R.B.	M	24	NR	R	NEGATIVO	28/01/1999	NF	NF
15	M.F.S.	F	20	NR	R	NEGATIVO	28/01/1999	NF	NF
16	M.C.S.C.	M	17	NR	R	NEGATIVO	08/02/1999	NF	NF
17	G.R.	F	20	NR	R	NEGATIVO	11/02/1999	NEGATIVO	11/02/1999
18	J.A.F.	M	57	NR	R	NEGATIVO	18/02/1999	NF	NF
19	S.L.K.C.	M	15	NR	NR	NEGATIVO	08/03/1999	NEGATIVO	08/03/1999
20	A.P.G.	F	20	NR	R	NF	NF	NF	NF
21	R.V.S.	M	23	NR	NR	NF	NF	NF	NF
22	B.S.	M	38	NR	R	NEGATIVO	14/05/1999	NF	NF

n	INICIAIS	SEXO	IDADE	IgM-CMV PRÉ- TRANSPLANTE	IgG-CMV PRÉ- TRANSPLANTE	PCR 1	DATA PCR 1	AGM 1	DATA AGM 1
23	E.B.S.	F	33	NR	R	NEGATIVO	20/05/1999	NEGATIVO	20/05/1999
24	W.M.	M	29	NR	R	NF	NF	NF	NF
25	M.B.	F	6	NR	NR	NF	NF	NF	NF
26	J.R.P.	M	14	NR	NR	NEGATIVO	08/06/1999	NEGATIVO	08/06/1999
27	C.P.	F	58	NR	R	NF	NF	NF	NF
28	F.B.	M	18	NR	R	NF	NF	NF	NF
29	K.S.B.	F	24	NR	R	NEGATIVO	24/06/1999	NEGATIVO	24/06/1999
30	M.F.M.R.	F	40	NR	R	NEGATIVO	08/07/1999	NEGATIVO	08/07/1999
31	P.M.	M	39	NR	R	NF	NF	NF	NF
32	S.L.S.	M	37	NR	R	NEGATIVO	05/08/1999	NEGATIVO	05/08/1999
33	A.R.	M	56	NR	R	NEGATIVO	12/08/1999	NEGATIVO	12/08/1999
34	J.A.S.S.	M	18	NR	NR	NEGATIVO	19/08/1999	NEGATIVO	19/08/1999
35	C.M.R.	M	19	NR	NR	NEGATIVO	26/08/1999	NEGATIVO	26/08/1999
36	A.S.P.	F	10	NR	R	NEGATIVO	02/09/1999	NF	NF
37	E.S.M.	M	8	NR	R	NEGATIVO	09/09/1999	NEGATIVO	09/09/1999
38	N.ER.P.	F	9	NR	R	NF	NF	NF	NF
39	G.A.M.	F	12	NR	R	NEGATIVO	30/09/1999	NEGATIVO	30/09/1999
40	D.C.S.F.	F	16	NR	R	NEGATIVO	07/10/1999	NEGATIVO	07/10/1999
41		M	34	NR	R	NF	NF	NF	NF
42		F	11	NR	R	NF	NF	NF	NF
43		F	43	NR	R	NF	NF	NF	NF
44	R.B.	M	30	NR	R	NEGATIVO	11/11/1999	NEGATIVO	11/11/1999
45		M	13	NR	R	NF	NF	NF	NF
46		M	38	NR	R	NF	NF	NF	NF

n	INICIAIS	SEXO	IDADE	IgM-CMV PRÉ- TRANSPLANTE	IgG-CMV PRÉ- TRANSPLANTE	PCR 1	DATA PCR 1	AGM 1	DATA AGM 1
47	R.S.C.	M	5	NR	R	NF	NF	NF	NF
48		F	39	NR	R	NF	NF	NF	NF
49	N.R.S.	F	39	NR	R	NEGATIVO	13/01/2000	NEGATIVO	13/01/2000
50	R.P.R.	F	27	NR	R	NEGATIVO	20/01/2000	NEGATIVO	20/01/2000
1		M	37	NR	R	NF	NF	NF	NF
52	E.R.S.	F	32	NR	R	NEGATIVO	10/02/2000	NEGATIVO	10/02/2000
53		M	13	NR	R	NF	NF	NF	NF
54	C.R.S.	M	35	NR	R	NEGATIVO	23/03/2000	NEGATIVO	23/03/2000
55	S.P.	M	50	NR	R	NEGATIVO	20/04/2000	NEGATIVO	20/04/2000
56	A.E.	M	16	NR	R	NEGATIVO	04/05/2000	NEGATIVO	04/05/2000
57	E.L.E.	M	22	NR	R	NEGATIVO	04/05/2000	NEGATIVO	04/05/2000
58	M.D.N.	M	35	NR	R	NEGATIVO	01/06/2000	NEGATIVO	01/06/2000
59	M.I.M.S.	F	35	NR	R	NEGATIVO	08/06/2000	NEGATIVO	08/06/2000
60	K.S.M.	F	29	NR	R	NEGATIVO	08/08/2000	NEGATIVO	08/08/2000
61	S.F.C.L.	F	33	NR	R	NEGATIVO	17/08/2000	NEGATIVO	17/08/2000
62	J.M.R.	M	57	NR	R	NEGATIVO	12/09/2000	NEGATIVO	12/09/2000
63	E.B.	M	18	NR	NR	NEGATIVO	05/10/2000	NEGATIVO	05/10/2000
64	E.P.	M	33	NR	R	NEGATIVO	03/10/2000	NEGATIVO	03/10/2000
65	S.F.	M	27	NR	NR	NEGATIVO	17/10/2000	NEGATIVO	17/10/2000
66	R.L.A	M	20	NR	NR	NEGATIVO	09/11/2000	NEGATIVO	09/11/2000
67	A.F.B.F.	F	43	NR	R	NEGATIVO	23/11/2000	NF	NF
68	F.S.N.	M	22	NR	NR	NEGATIVO	30/11/2000	NEGATIVO	30/11/2000
69	J.S.S.	F	30	NR	R	NF	NF	NF	NF

Legenda: n – número do doador; M – sexo masculino; F – sexo feminino; NR – não-reagente; R – reagente; NF – não feito.

APÊNDICE C-CARACTERÍSTICAS DETALHADAS DOS 69 PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO.

N.	Iniciais	Grupo	Idade/ SexoR	Doença de Base	Data do TMO	Tipo de Enxerto	Sorologia Receptor	Sorologia Doador	Idade/ SexoD	GVHD agudo	Prof. CMV	Dia início Infecção HCMV/2PCR+	Dia início Infecção HCMV/AGM+	Doença HCMV Dia início sintomas
01	R.S.S. A.	A	38/F	LMC	24/07/98	MO	IgG -	IgG +	35/F	Não	38	46	115	Não
02	J.A.S.	B	27/M	AA	30/07/98	MO	IgG +	IgG +	21/F	Não	NF	11	25	Não
03	K.C.T.	A	21/F	LMA	07/08/98	MO	IgG +	IgG +	17/F	Não	24			Não
04	R.S.R.	A	21/M	LMC	13/08/98	MO	IgG +	IgG +	30/F	Não	34			Não
05	M.F.M	A	43/F	LMC	27/08/98	CPP	IgG +	IgG +	35/M	Não	15		131	Não
06	L.B.M	A	44/F	LMC	03/09/98	MO	IgG +	IgG +	58/M	Não	40	55	55	Sim/81
07	E.F.N.	B	16/M	AA	10/09/98	MO	IgG +	IgG +	17/M	Não	NF	40	68	Sim/40
08	A.S.I.	A	14/M	LMC	17/09/98	MO	IgG +	IgG +	5/M	Não	39		63	Não
09	L.G.M	B	18/M	AA	22/10/98	MO	IgG -	IgG -	14/M	Não	NF			Não
10	P.C.F.	B	29/M	AA	29/10/98	MO	IgG +	IgG +	20/M	Não	NF		103	Não
11	N.D.C.	A	17/F	LMC	12/11/98	MO	IgG +	IgG +	19/F	Não	34	33	33	Não
12	P.C.	B	53/M	AA	19/11/98	MO	IgG +	IgG +	58/M	Não	NF		26	Não
13	T.F.M.	B	10/M	LMA	23/12/98	MO	IgG +	IgG -	4/F	Não	NF			Não
14	K.G.B.	A	19/F	SM	28/01/99	CPP	IgG +	IgG +	24/M	Não	24	33	33	Sim/33
15	C.R.S.	A	12/F	LMC	28/01/99	MO	IgG +	IgG +	20/F	Não	25	81	81	Não
16	M.T.S. C.	B	14/M	LMC	08/02/99	MO	IgG +	IgG +	17/M	Não	NF			Não
17	G.A.R.	B	41/M	LMC	11/02/99	MO	IgG +	IgG +	20/F	Sim	NF	33	40	Não
18	J.A.F.	A	49/M	LMC	18/02/99	MO	IgG +	IgG +	57/M	Não	25	143		Não
19	H.L.K. C.	B	12/M	LMA	26/02/99	MO	IgG -	IgG -	15/M	Não	NF	16	25	Não
20	E.G.	A	30/M	LMC	15/04/99	CPP	IgG +	IgG +	20/F	Não	38	46		Não
21	V.S.	A	25/F	LMC	06/05/99	CPP	IgG +	IgG -	23/M	Não	19	54	82	Não
22	L.S.O.	A	35/M	LMA	13/05/99	MO	IgG +	IgG +	38/M	Não	25	17	17	Não

N.	Iniciais	Grupo	Idade/ SexoR	Doença de Base	Data do TMO	Tipo de Enxerto	Sorologia Receptor	Sorologia Doador	Idade/ SexoD	GVHD agudo	Prof. CMV	Dia início Infecção HCMV/2PCR+	Dia início Infecção HCMV/AGM+	Doença HCMV Dia início sintomas
23	M.B.S.	A	31/M	LMC	20/05/99	MO	IgG +	IgG +	33/F	Não	25	90		Não
24	F.A.M	A	39/M	LMA	27/05/99	CPP	IgG +	IgG +	29/M	Não	18			Não
25	A.B.	B	07/M	LLA	31/05/99	MO	IgG -	IgG -	6/F	Não	NF			Não
26	I.R.P.	B	13/M	LLA	07/06/99	MO	IgG -	IgG -	14/M	Não	NF			Não
27	P.P.S.	A	47/M	LMC	10/06/99	MO	IgG +	IgG +	58/F	Não	19	12	54	Não
28	F.C.B.	B	13/M	AA	23/06/99	MO	IgG +	IgG +	18/M	Não	NF	27	27	Não
29	R.S.B.	A	28/M	LMC	24/06/99	MO	IgG +	IgG +	24/F	Não	32			Não
30	J.A.J.R.	A	32/M	LLA	08/07/99	CPP	IgG +	IgG +	40/F	Não	18	33		Não
31	J.M.O.	A	39/M	LMC	12/07/99	CPP	IgG +	IgG +	39/M	Não	21	17		Não
32	B.C.S.D.	B	32/F	AA	05/08/99	MO	IgG +	IgG +	37/M	Sim	NF	12	29	Sim/46
33	J.L.R.	A	43/M	LMC	12/08/99	MO	IgG +	IgG +	56/M	Não	40			Não
34	A.V.S.S.	B	26/F	AA	19/08/99	MO	IgG +	IgG -	18/M	Não	NF	47	67	Sim/89
35	A.M.R.	A	21/M	LMC	26/08/99	MO	IgG +	IgG -	19/M	Não	32		61	Não
36	L.S.P.	A	8/M	LMA	02/09/99	MO	IgG +	IgG +	10/F	Não	33	33		Não
37	E.S.M.	A	13/M	LMC	09/09/99	MO	IgG -	IgG +	8/M	Não	21			Não
38	R.G.R.P.	B	03/F	LMA	24/09/99	MO	IgG +	IgG +	9/F	Sim	NF	6		Não
39	G.A.M.	A	10/F	LLA	30/09/99	CPP	IgG +	IgG +	12/F	Não	22			Não
40	A.C.S.F.	B	12/F	AA	07/10/99	MO	IgG +	IgG +	16/F	Não	NF	7	75	Não
41	G.E.C.B	A	53/M	LMC	14/10/99	CPP	IgG +	IgG +	34/M	Não	25			Não
42	D.A.M.	A	15/F	LMC	18/10/99	CPP	IgG +	IgG +	11/F	Não	21		99	Não
43	E.P.S.	A	42/F	LMA	28/10/99	MO	IgG +	IgG +	43/F	Não	21	72	40	Não

N.	Iniciais	Grupo	Idade/ SexoR	Doença de Base	Data do TMO	Tipo de Enxerto	Sorologia Receptor	Sorologia Doador	Idade/ SexoD	GVHD agudo	Prof. CMV	Dia início Infecção HCMV/2PCR+	Dia início Infecção HCMV/AGM+	Doença HCMV Dia início sintomas
44	A.B.	A	34/M	LMC	11/11/99	MO	IgG +	IgG +	30/M	Não	27	68	68	Não
45	J.B.M.C.	A	17/M	LMC	18/11/99	MO	IgG +	IgG -	13/M	Não	39	60	133	Não
46	L.C.S.	A	40/M	LMC	18/11/99	CPP	IgG +	IgG +	38/M	Não	18			Não
47	L.R.S.C.	B	03/M	LMC	23/11/99	MO	IgG +	IgG +	5/M	Sim	NF	85		Não
48	D.R.C.L.	A	32/M	LMC	25/11/99	MO	IgG -	IgG +	39/F	Sim	32	88		Não
49	V.R.S.	A	52/M	LMA	13/01/00	MO	IgG+	IgG+	39/F	Não	25	33	61	Não
50	R.P.R.R.	B	24/F	LMC	20/01/00	MO	IgG+	IgG+	27/F	Não	NF	67	5	Não
51	O.P.	A	31/F	LMC	03/02/00	CPP	IgG+	IgG+	37/M	Não	25	0		Não
52	E.S.	A	33/M	LMA	10/02/00	MO	IgG+	IgG+	32/F	Não	45	117	61	Não
53	C.H.F.B.	A	21/M	LMA	17/02/00	CPP	IgG+	IgG+	13/M	Não	21	47	33	Não
54	A.A.S.	A	29/M	LMC	23/03/00	MO	IgG+	IgG+	35/M	Não	21	89		Não
55	M.A.O.	A	43/F	LMC	20/04/00	CPP	IgG+	IgG+	50/M	Sim	25	60	105	Não
56	A.S.E.	B	24/M	AA	04/05/00	MO	IgG+	IgG+	16/M	Não	NF		98	Não
57	M.A.A	A	31/F	LMC	04/05/00	CPP	IgG+	IgG+	22/M	Sim	21	63		Não
58	R.D.N.	A	35/M	LMC	01/06/00	MO	IgG+	IgG+	35/M	Não	40		68	Não
59	A.R.M.	B	36/M	AA	08/06/00	MO	IgG+	IgG+	35/F	Não	NF	40	61	Não
60	R.J.C.	A	43/M	LMC	08/08/00	MO+C PP	IgG+	IgG+	33/F	Não		105		Não
61	K.B.S.	A	32/M	LMC	10/08/00	CPP	IgG+	IgG+	29/F	Não	19	20	67	Não
62	L.R.	A	30/F	LMC	14/09/00	CPP	IgG-	IgG+	57/M	Não	27	54		Não
63	F.B.	A	20/M	LMA	05/10/00	MO	IgG+	IgG-	18/M	Não	26	68	131	Não
64	E.P.	A	30/M	LMC	05/10/00	CPP	IgG+	IgG+	33/M	Sim	25	21	21	Não
65	R.J.F.	B	30/M	LMA	19/10/00	CPP	IgG+	IgG-	27/M	Não	32	7	12	Não

N.	Iniciais	Grupo	Idade/ SexoR	Doença de Base	Data do TMO	Tipo de Enxerto	Sorologia Receptor	Sorologia Doador	Idade/ SexoD	GVHD agudo	Prof. CMV	Dia início Infecção HCMV/2PCR+	Dia início Infecção HCMV/AG M+	Doença HCMV Dia início sintomas
66	W.L.A.	B	27/M	AA	09/11/00	MO	IgG+	IgG-	20/M	Não	NF	21	21	Não
67	L.R.B.	A	40/M	LMC	23/11/00	MO	IgG+	IgG+	43/F	Não	25	26		Não
68	R.J.S.N	B	23/M	LMC	30/11/00	MO	IgG-	IgG-	22/M	Não	NF	0		Não
69	J.C.S.T.	B	42/F	AA	21/12/00	MO	IgG+	IgG+	30/F	Sim	NF	49	56	Sim/66

Legenda: F – feminino; M – masculino; LMC – leucemia mielóide crônica; LMA – leucemia mielóide aguda; AA – anemia aplástica; SMD – síndrome mielodisplásica; MO – medula óssea; CPP – células periférica primordial; IgG – imunoglobulina da classe G (do CMV); NF – não fez; Prof. – profilaxia universal com ganciclovir; DECH – doença do enxerto contra o hospedeiro (ou GVHD).

APÊNDICE D-RESULTADOS DOS TESTES DE DETECÇÃO DE INFECÇÃO ATIVA PELO HCMV NOS PACIENTES ESTUDADOS E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.

Tempo em Dias Pós – Transplante

Paciente	Sorologia Pré-tx (D/R)	PCR positivas	AGM positivas (n. cels.+)	Profilaxia	Sorologia IgM/IgG-HCMV pós-tx	Manifestações clínicas compatíveis com HCMV
1	+/-	46, 59, 108, 111, 136	115 (12)	38	Infecção primária sem soroconversão	Não
2	+/+	11, 25, 40, 59, 90, 133	25 (4)			Não
3	+/+	32, 84, 116		24		Não
4	+/+	26, 78, 108		34		Não
5	+/+	62, 105, 131	139 (5)	15		Não
6	+/+	44, 63, 72, 79, 98, 103, 133, 146	55 (3), 72 (20), 79 (12), 146 (1)	40	dia 98 - IgM+	Sim Dia 81 – febre Dia 88 – febre, inapetência, epigastralgia; Dia 89 – EDA – gastrite e duodenite enantematosa, sugerindo infecção específica ou GVHD. Biópsia – laudo confirmou infecção por HCMV na região pilórica; Dia 320 – uveíte (HCMV ocular) – DOENÇA TARDIA POR HCMV
7	+/+	0, 40, 61, 68, 75, 82, 95, 117, 124, 131, 139, 145	68 (26), 75 (20), 95 (17), 117 (2), 124 (5), 131 (10), 145 (82)			Sim. Dia 40 - Sintomas de HCMV ocular dia 304 – coriorretinite por HCMV DOENÇA TARDIA POR HCMV
8	+/+	62	62 (8)	39		Não
9	-/-					Não
10	+/+	0, 103	103 (5)			Não
11	+/+	19, 33, 53	33 (8), 53 (3)	34	dia 79-aumento dos títulos de IgG	Não
12	+/+	26	26 (2)			Não
13	-/+					Não

Paciente	Sorologia Pré-tx (D/R)	PCR positivas	AGM positivas (n. cels.+)	Profilaxia	Sorologia IgM/IgG-HCMV pós-tx dia 82 - IgM+	Manifestações clínicas compatíveis com HCMV
14	+/+	33, 40, 47, 54, 60, 68, 75, 82, 91, 99, 103, 143, 153	33 (5), 47 (5), 54 (16), 60 (9), 68 (20), 75 (41), 82 (500), 91 (58)	24		Sim Dia 33 – sintomatologia gástrica EDA – esofagite erosiva e gastrite específica Dia 96 – EDA – gastrite específica
15	+/+	81, 84, 89, 96	81 (196), 84 (200), 89 (200)	25		Não
16	-/-					Não
17	+/+	33, 40	40 (12)			Não
18	+/+	143, 150		25	dia 125 - aumento dos títulos de IgG	Não
19	+/+	16, 25, 30, 37	25 (107), 30 (109, 37 (68)			Não
20	+/+	46, 53, 76, 88, 95, 102, 117		38		Não
21	-/+	14, 54, 68, 75, 82, 89, 98, 105, 114, 130, 135, 142, 149	82 (4), 114 (5)	19		Não
22	+/+	17, 59, 75, 80, 94, 101, 108, 143	17 (9)	25		Não
23	+/+	80, 90, 101, 118		25		Não
24	+/+	10, 25		18		Não
25	-/-					Não
26	-/-					Não
27	+/+	12, 21, 33, 54, 61, 81, 90, 95, 129	54 (5), 61 (7), 129 (132)	19		Não
28	+/+	27, 35, 37, 41, 71, 85	27 (1), 35 (3)			Não
29	+/+	5, 61, 82, 103		32		Não
30	+/+	33, 46, 48, 69, 83		18	dia 63 - IgM+	Não

Paciente	Sorologia Pré-tx (D/R)	PCR positivas	AGM positivas (n. cels.+)	Profilaxia	Sorologia IgM/IgG- HCMV pós-tx	Manifestações clínicas compatíveis com HCMV
31	+/+	3, 17, 24, 42, 58, 63		21		Não
32	+/+	12, 29, 46, 51, 58, 72, 79, 88, 93	29 (50), 51 (3), 72 (150)		dia 58 - IgM+;	Sim Dia 46 – vômitos, epigastralgia. Dia 51 – EDA – 3 úlceras gástricas Dia 58 – diarreia, dor abdominal. Dia 70 – colonoscopia - processo inflamatório crônico de mucosa colônica. Biópsia - Ausente inclusão citomegálica o que não exclui a presença de infecção por HCMV. Biópsia revisada e não conclusiva de HCMV. Conclusão: GVHD.
33	+/+	47, 68		40		Não
34	-/+	5, 47, 56, 61, 75, 80	67 (50), 75 (19)		dia 113 - aumento dos títulos de IgG	Sim Dia 89 - pancitopenia. Evoluiu com epigastralgia e febre. Dia 100 – EDA: pangastrite grave específica Biópsia – compatível Evoluiu para choque séptico e óbito
35	-/+	19, 61	61 (15)	32		Não
36	+/+	33, 42, 47		33		Não
37	+/+	5, 40		21		Não
38	+/+	-1, 6, 13, 20, 27				Não
39	+/+	0, 17		22		Não
40	+/+	0, 7, 12, 96, 116, 159	96 (2), 116 (3), 159 (5)		dia 150 - aumento dos títulos de IgG	Não
41	+/+	107		25		Não
42	+/+	57, 79, 99, 128	99 (2)	21	dia 128 - aumento dos títulos de IgG	Não
43	+/+	40, 98, 105, 112, 129, 150	40 (20), 105 (9), 112 (9), 129 (4)	21		Não
44	+/+	68, 78, 133, 140	68 (17), 78 (17), 140 (1)	27	dia 34 - aumento dos títulos de IgG	Não
45	-/+	60, 66, 74, 83, 126, 133	133 (213)	39		Não

Paciente	Sorologia Pré-tx (D/R)	PCR positivas	AGM positivas (n. cels.+)	Profilaxia	Sorologia IgM/IgG-HCMV pós-tx	Manifestações clínicas compatíveis com HCMV
46	+/+	47, 67, 111, 126		18		Não
47	+/+	85, 92				Não
48	+/-	88, 95, 109		32		Não
49	+/+	33, 47, 56, 61, 82, 96, 152	61 (3), 82 (10)	25	dia 96 - IgM+ dia 96 - aumento dos títulos de IgG	Não
50	+/+	5, 21, 67, 76	5 (4), 67 (8)			Não
51	+/+	0, 7, 35, 68, 103		25	dia 68 - aumento dos títulos de IgG	Não
52	+/+	61, 117, 127, 148, 152	61 (11)	45		Não
53	+/+	33, 47, 54, 61, 68, 82, 96, 103	33 (5), 47 (3), 54 (15), 68 (5), 75 (10), 82 (43), 96 (4), 103 (6)	21		Não
54	+/+	33, 44, 89, 96, 103, 110, 117, 124, 152		21	dia 89 - aumento dos títulos de IgG	Não
55	+/+	14, 60, 67, 84, 105	105 (1)	25	dia 119 - aumento dos títulos de IgG	Não
56	+/+	98	98 (10)		dia 98 - aumentos dos títulos de IgG	Não
57	+/+	63, 70, 82, 89, 103, 110, 125, 139, 145, 152		21	dia 96 - IgM+	Não
58	+/+	68, 82, 139	68 (93)	40		Não
59	+/+	40, 47, 61, 68, 84	61 (13)			Não
60	+/+	20, 25, 39, 46, 60, 67, 74, 81, 88, 95, 120, 125, 132	67 (5), 74 (20), 81 (95), 88 (5), 95 (3)	19		Não
61	+/+	63, 105, 119, 126, 138		27		Não
62	+/-	0, 33, 54, 61, 82, 89		26	Infecção primária sem soroconversão	Não

Paciente	Sorologia Pré-tx (D/R)	PCR positivas	AGM positivas (n. cels.+)	Profilaxia	Sorologia IgM/IgG-HCMV pós-tx	Manifestações clínicas compatíveis com HCMV
63	-/+	25, 39, 68, 75, 124, 131, 138, 147, 152	131 (13), 138 (2), 152 (7)	25		Não
64	+/+	5, 21, 26, 36, 41, 61, 70, 77	21 (92), 26 (40), 36 (44), 70 (1)	32		Não
65	-/+	7, 12, 18, 28, 54, 75, 112	18 (24), 54 (1)			Não
66	-/+	21, 28, 33, 35, 124, 133, 140, 152	21 (5), 28 (3), 31 (21)			Não
67	+/+	14, 26, 40, 89, 117, 124, 131, 138, 145		25		Não
68	-/-	0, 7, 19, 35, 103, 112, 119, 126, 138, 145, 154			Infecção primária sem soroconversão	Não
69	+/+	49, 56, 63	56 (52)			Sim. Dia 66 – dor abdominal e diarreia. Dia 70 – Óbito. Necrópsia: Causa do Óbito: Broncopneumonia bilateral relacionado com citomegalovirose em pulmão e glândula submandibular. Hepatite e Esofagite atribuídas ao Herpes simples.

Legenda: D – doador; R – receptor; IgM – imunoglobulina da classe M (do HCMV); IgG – imunoglobulina da classe G (do HCMV); EDA – endoscopia digestiva alta.

APÊNDICE E - RESULTADOS DOS TESTES SOROLÓGICOS -IgM E IgG anti - HCMV POR ELISA NOS PACIENTES RELACIONADOS AO ESTUDO.

n	Paciente	TMO	IgGDo0	IgGRe0	IgG1	DATA IgG1	IgM1	DATA IgM1	IgG2	DATA IgG2	IgM2	DATA IgM2
1	RSSA	24/7/1998	R	NR	NR	31/8/1998	NR	31/8/1998	NR	21/9/1998	NR	21/9/1998
2	JAS	30/7/1998	R	R	R	8/9/1998	NR	8/9/1998	0,7	28/9/1998	NR	28/9/1998
3	KCT	7/8/1998	R	R	R	6/8/1998	NR	6/8/1998	1,55	8/9/1998	NR	8/9/1998
4	RSR	13/8/1998	R	R	14,66	13/8/1998	NR	13/8/1998	20,67	15/10/1998	NR	15/10/1998
5	MFQM	27/8/1998	R	R	R	27/8/1998	NR	27/8/1998	>35	28/9/1998	NR	28/9/1998
6	LBM	3/9/1998	R	R	5,68	9/9/1998	NR	3/9/1998	13,29	28/9/1998	NR	28/9/1998
7	EFN	10/9/1998	R	R	1,95	14/9/1998	NR	10/9/1998	1,22	19/10/1998	NR	15/10/1998
8	ASI	17/9/1998	R	R	1,95	17/9/1998	NR	17/9/1998	2,42	29/10/1998	NR	13/10/1998
9	LGM	22/10/1998	NR	NR	NR	22/10/1998	NR	22/10/1998	NR	17/11/1998	NR	17/11/1998
10	PCF	29/10/1998	R	R	1,1	5/11/1998	NR	29/10/1998	1,2	24/11/1998	NR	24/11/1998
11	NDC	12/11/1998	R	R	8,91	17/11/1998	NR	12/11/1998	8,15	15/12/1998	NR	15/12/1998
12	PC	19/11/1998	R	R	>35	24/11/1998	NR	19/11/1998	3,1	15/12/1998	NR	15/12/1998
13	TFM	23/12/1998	NR	R								
14	KGB	28/1/1999	R	R	1,8	28/1/1999	NR	28/1/1999	3	30/9/1999	NR	30/3/1999
15	CRS	28/1/1999	R	R	6	28/1/1999	NR	28/1/1999	5,2	18/4/1999	NR	18/4/1999
16	MTSC	8/2/1999	R	R								
17	GAR	11/2/1999	R	R	R	11/2/1999	NR	11/2/1999	4,3	9/3/1999	NR	9/3/1999
18	JAF	18/2/1999	R	R	3,8	18/2/1999	NR	18/2/1999	3,9	23/3/1999	NR	23/3/1999
19	HLKC	26/2/1999	NR	NR								
20	EG	15/4/1999	R	R	1,7	15/4/1999	NR	15/4/1999	2,4	18/5/1999	NR	18/5/1999
21	VS	6/5/1999	NR	R	1,1	6/5/1999	NR	6/5/1999	1	1/6/1999	NR	1/6/1999
22	LSO	13/5/1999	R	R	3	13/5/1999	NR	13/5/1999	5,73	8/6/1999	NR	8/6/1999
23	MBS	20/5/1999	R	R	1,2	20/5/1999	NR	20/5/1999	1,6	22/6/1999	NR	22/6/1999
24	FAM	27/5/1999	R	R	14,1	8/6/1999	NR	1/6/1999	17,65	22/6/1999	NR	22/6/1999
25	AB	31/5/1999	NR	NR								
26	IRP	7/6/1999	NR	NR								
27	PPS	10/6/1999	R	R	3,6	15/6/1999	NR	15/6/1999	3,4	20/7/1999	NR	20/7/1999
28	FCB	23/6/1999	R	R								
29	RSB	24/6/1999	R	R	3,9	24/6/1999	NR	24/6/1999	3,4	27/7/1999	NR	24/7/1999
30	JAJR	8/7/1999	R	R	12,8	3/8/1999	NR	3/8/1999	20,85	9/9/1999	R	9/9/1999
31	JMO	12/7/1999	R	R	33,09	22/7/1999	NR	12/7/1999	5,3	10/8/1999	NR	10/8/1999
32	BCSDV	5/8/1999	R	R	11,51	5/8/1999	NR	5/8/1999	5,99	2/9/1999	NR	2/9/1999
33	JLR	12/8/1999	R	R	2,4	12/8/1999	NR	12/8/1999	3,3	21/9/1999	NR	21/9/1999
34	AVSS	19/8/1999	NR	R	8,9	19/8/1999	NR	19/8/1999	9,1	28/9/1999	NR	28/9/1999
35	AMR	26/8/1999	NR	R	1,69	31/8/1999	NR	26/8/1999	1,7	28/9/1999	NR	28/9/1999
36	LSP	2/9/1999	R	R	3,7	2/9/1999	NR	2/9/1999	3,3	5/10/1999	NR	5/10/1999
37	ESM	9/9/1999	R	NR	1,5	9/9/1999	NR	9/9/1999	1,2	19/10/1999	NR	19/10/1999
38	RGRP	24/9/1999	R	R								
39	GAM	30/9/1999	R	R	1,6	30/9/1999	NR	30/9/1999	4,7	23/11/1999	NR	23/11/1999
40	ACSF	7/10/1999	R	R	6,02	14/10/1999	NR	7/10/1999	5,5	9/11/1999	NR	9/11/1999
41	GECB	14/10/1999	R	R	7,18	14/10/1999	NR	14/10/1999	2,1	16/11/1999	NR	16/11/1999
42	DAM	18/10/1999	R	R	>35	19/10/1999	NR	19/10/1999	5,9	30/11/1999	NR	30/11/1999
43	EPS	28/10/1999	R	R	>35	11/11/1999	NR	11/11/1999	31,2	23/11/1999	NR	23/11/1999

APÊNDICE E - RESULTADOS DOS TESTES SOROLÓGICOS -IgM E IgG anti - HCMV POR ELISA NOS PACIENTES RELACIONADOS AO ESTUDO.

IgG3	DATA IgG3	IgM3	DATA IgM3	IgG4	DATA IgG4	IgM4	DATA IgM4	IgG5	DATA IgG5	IgM5	DATA IgM5	IgM	Aumento IgG
NR	19/10/1998	NR	19/10/1998	NR	26/11/1998	NR	26/11/1998	NR	15/12/1998	NR	15/12/1998		
0,84	28/10/1998	NR	28/10/1998	R	28/9/1998	NR	28/9/1998	0,26	17/12/1998	NR	17/12/1998		
1,26	28/9/1998	NR	28/9/1998	0,8	12/11/1998	NR	17/11/1998	4,8	15/12/1998	NR	15/12/1998		
30,34	7/12/1998	NR	7/12/1998	20,19	17/1/1999	NR	7/1/1999	NF	NF	NF	NF		
>35	28/10/1998	NR	28/10/1998	>35	24/11/1998	NR	26/11/1998	>35	14/1/1999	NR	14/1/1999		
11,24	5/11/1998	NR	5/11/1998	6,83	10/12/1998	R	10/12/1998	7,36	5/1/1999	NR	5/1/1999	SIM	
1,8	17/11/1998	NR	17/11/1998	2,16	5/1/1999	NR	5/1/1999	7,2	2/2/1999	NR	2/2/1999		
2,95	17/12/1998	NR	17/12/1998	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		
NR	14/1/1999	NR	14/1/1999	NR	4/2/1998	NR	4/2/1998	NF	NF	NF	NF		
1,3	26/1/1999	NR	26/1/1999	1,3	9/2/1999	NR	9/2/1999	1,8	4/3/1999	NR	4/3/1999		
8,9	12/1/1999	NR	12/1/1999	93	2/2/1999	NR	2/2/1999	NF	NF	NF	NF		SIM
NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		
4,3	20/4/1999	R	20/4/1999	4	25/5/1999	R	25/5/1999	4	29/6/1999	R	29/6/1999	SIM	
16,6	16/3/1999	NR	16/3/1999	>20	20/4/1999	NR	20/4/1999	18,9	25/5/1999	NR	25/5/1999		
NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		
4,4	20/4/1999	NR	20/4/1999	4,2	25/5/1999	NR	25/5/1999	31,25	22/6/1999	NR	22/6/1999		SIM
4,7	22/6/1999	NR	22/6/1999	5,7	13/7/1999	NR	13/7/1999	6,7	10/8/1999	NR	10/8/1999		
0,9	13/7/1999	NR	13/7/1999	1,9	24/8/1999	NR	24/8/1999	1,9	28/9/1999	NR	28/9/1999		
2,6	13/7/1999	NR	13/7/1999	2,9	12/8/1999	NR	12/8/1999	2,9	28/9/1999	NR	28/9/1999		
7,2	17/8/1999	NR	17/8/1999	7,4	16/9/1999	NR	16/9/1999	7,2	14/10/1999	NR	14/10/1999		
NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF						
3,5	3/8/1999	NR	3/8/1999	3,9	24/8/1999	NR	24/8/1999	3,8	28/9/1999	NR	28/9/1999		
7,1	24/8/1999	NR	24/8/1999	6,6	28/9/1999	NR	28/9/1999	7,8	26/10/1999	NR	26/10/1999		
26,7	14/10/1999	R	14/10/1999	>20	4/11/1999	NR	4/11/1999	25,46	25/11/1999	NR	25/11/1999	SIM	
9,1	14/9/1999	NR	14/9/1999	11,1	14/10/1999	NR	14/10/1999	NF	NF	NF	NF		
9,5	5/10/1999	R	5/10/1999	5,6	9/11/1999	R	9/11/1999	7,1	11/1/2000	R	11/1/2000	SIM	
3,9	4/11/1999	NR	4/11/1999	3,9	4/11/1999	NR	4/11/1999	4,1	7/12/1999	NR	7/12/1999		
15,8	19/10/1999	NR	19/10/1999	19,9	4/11/1999	NR	4/11/1999	171,8	30/11/1999	NR	30/11/1999		SIM
2,5	14/10/1999	NR	14/10/1999	2,7	16/11/1999	NR	16/11/1999	NF	NF	NF	NF		
3,9	9/11/1999	NR	9/11/1999	3,4	7/12/1999	NR	7/12/1999	3,4	11/1/2000	NR	11/1/2000		
1,6	9/11/1999	NR	9/11/1999	1,4	7/12/1999	NR	7/12/1999	1,4	18/1/2000	NR	18/1/2000		
NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		
10,8	4/1/2000	NR	4/1/2000	12,2	1/12/2000	NR	1/12/2000	43,9	15/3/2000	NR	15/3/2000		SIM
7,2	14/12/1999	NR	14/12/1999	6	15/2/2000	NR	15/2/2000	7,67	14/3/2000	NR	14/3/2000		
6	11/1/2000	NR	11/1/2000	5,8	1/2/2000	NR	1/2/2000	>35	22/2/2000	NR	22/2/2000		SIM
31,8	25/1/2000	NR	25/1/2000	33,7	22/2/2000	NR	22/2/2000	68,7	21/3/2000	NR	21/3/2000		

APÊNDICE E - RESULTADOS DOS TESTES SOROLÓGICOS -IgM E IgG anti - HCMV POR ELISA NOS PACIENTES RELACIONADOS AO ESTUDO.

n	Paciente	TMO	IgGDo0	IgGRe0	IgG1	DATA IgG1	IgM1	DATA IgM1	IgG2	DATA IgG2	IgM2	DATA IgM2
44	AB	11/11/1999	R	R	3	11/11/1999	NR	11/11/1999	30,28	14/12/1999	NR	14/12/1999
45	JBMC	18/11/1999	R	NR	1,58	25/11/1999	NR	18/11/1999	4,28	14/12/1999	NR	14/12/1999
46	LCS	18/11/1999	R	R	1,35	25/11/1999	NR	18/11/1999	1,29	14/12/1999	NR	14/12/1999
47	LRSC	23/11/1999	R	R								
48	DRCLT	25/11/1999	R	NR	NR	25/11/1999	NR	25/11/1999	1,05	23/12/1999	NR	23/12/1999
49	VRS	13/1/2000	R	R	8,9	13/1/2000	NR	13/1/2000	8,9	15/2/2000	NR	15/2/2000
50	RPRR	20/1/2000	R	R	8,38	27/1/2000	NR	20/1/2000	11	22/2/2000	NR	22/2/2000
51	OP	3/2/2000	R	R	5,3	3/2/2000	NR	3/2/2000	5,1	9/3/2000	NR	9/3/2000
52	ES	10/2/2000	R	R	6,93	10/2/2000	NR	10/2/2000	20,44	9/3/2000	NR	9/3/2000
53	CHFB	17/2/2000	R	R	10,5	17/2/2000	NR	17/2/2000	9,7	14/3/2000	NR	14/3/2000
54	AAS	23/3/2000	R	R	3,42	30/3/2000	NR	23/3/2000	5,26	25/4/2000	NR	25/4/2000
55	MAO	20/4/2000	R	R	16,59	20/4/2000	NR	20/4/2000	8,36	23/5/2000	NR	23/5/2000
56	ASE	4/5/2000	R	R	2,72	4/5/2000	NR	4/5/2000	7,35	18/5/2000	NR	18/5/2000
57	MAA	4/5/2000	R	R	16,48	4/5/2000	NR	4/5/2000	11,69	6/6/2000	NR	6/6/2000
58	RDN	1/6/2000	R	R	15,58	8/6/2000	NR	1/6/2000	21,3	8/8/2000	NR	8/8/2000
59	ARM	8/6/2000	R	R	4,22	8/6/2000	NR	8/6/2000	5,59	11/7/2000	NR	11/7/2000
60	KBS	10/8/2000	R	R	9,25	17/8/2000	NR	10/8/2000	9,49	12/9/2000	NR	12/9/2000
61	RJC	17/8/2000	R	R	29,34	17/8/2000	NR	17/8/2000	23,3	5/9/2000	NR	5/9/2000
62	LR	14/9/2000	R	NR	NR	14/9/2000	NR	14/9/2000	0,57	17/10/2000	NR	17/10/2000
63	FB	5/10/2000	NR	R	0,91	5/10/2000	NR	5/10/2000	1,11	5/10/2000	NR	5/10/2000
64	EP	5/10/2000	R	R	7,95	5/10/2000	NR	5/10/2000	9,41	5/10/2000	NR	5/10/2000
65	RJF	19/10/2000	NR	R	0,87	19/10/2000	NR	19/10/2000	1,21	28/11/2000	NR	28/11/2000
66	WLA	9/11/2000	NR	R	25,85	9/11/2000	NR	9/11/2000	29,89	9/11/2000	NR	9/11/2000
67	LRDB	23/11/2000	R	R	12,21	30/11/2000	NR	23/11/2000	10,77	6/2/2001	NR	6/2/2001
68	RJSN	30/11/2000	NR	NR	0,25	30/11/2000	NR	30/11/2000	1,3	19/12/2000	NR	19/12/2000
69	JCST	21/12/2000	R	R	R	8/2/2001	NR	8/2/2001	25,56	15/2/2001	NR	15/2/2001

APÊNDICE E - RESULTADOS DOS TESTES SOROLÓGICOS -IgM E IgG anti - HCMV POR ELISA NOS PACIENTES RELACIONADOS AO ESTUDO.

IgG3	DATA IgG3	IgM3	DATA IgM3	IgG4	DATA IgG4	IgM4	DATA IgM4	IgG5	DATA IgG5	IgM5	DATA IgM5	IgM	Aumento IgG
31,68	18/1/2000	NR	18/1/2000	>35	22/2/2000	NR	22/2/2000	31,68	30/3/2000	NR	13/4/2000		SIM
2,51	25/1/2000	NR	25/1/2000	2,14	22/2/2000	NR	22/2/2000	2,09	28/3/2000	NR	28/3/2000		SOROCONV.
0,93	18/1/2000	NR	18/1/2000	0,95	15/2/2000	NR	15/2/2000	1,12	14/3/2000	NR	14/3/2000		
3,67	20/1/2000	NR	20/1/2000	0,13	22/2/2000	NR	22/2/2000	7,27	25/4/2000	NR	25/4/2000		
18	14/3/2000	NR	14/3/2000	175	18/4/2000	R	18/4/2000	175	16/5/2000	R	16/5/2000	SIM	SIM
12,68	21/3/2000	NR	21/3/2000	8,31	18/4/2000	NR	18/4/2000	7,68	9/5/2000	NR	9/5/2000		
27,76	11/4/2000	NR	11/4/2000	35,2	16/5/2000	NR	16/5/2000	52,25	29/6/2000	NR	29/6/2000		SIM
12,11	11/4/2000	NR	11/4/2000	10,04	9/5/2000	NR	9/5/2000	NF	NF	NF	NF		
19,84	11/4/2000	NR	11/4/2000	14,7	9/5/2000	NR	9/5/2000	9,5	29/6/2000	NR	29/6/2000		
4,05	23/5/2000	NR	23/5/2000	16,49	20/6/2000	NF	20/6/2000	86,3	18/7/2000	NR	18/7/2000		SIM
14,54	20/6/2000	NR	20/6/2000	>350,0	17/8/2000	NR	17/8/2000	NF	NF	NF	NF		SIM
14,31	10/8/2000	NR	10/8/2000	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		SIM
8,85	8/8/2000	R	8/8/2000	2,42	12/9/2000	R	12/9/2000	2,14	31/10/2000	R	31/10/2000	SIM	
NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		
3,65	8/8/2000	NR	8/8/2000	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		
6,68	10/10/2000	NR	10/10/2000	6,64	7/11/2000	NR	7/11/2000	6,26	7/12/2000	NR	7/12/2000		
25,86	19/10/2000	NR	19/10/2000	31,54	21/11/2000	NR	21/11/2000	20,34	21/12/2000	NR	21/12/2000		
2,76	12/12/2000	NR	12/12/2000	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		
1,01	6/2/2001	NR	6/2/2001	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		
7,86	9/11/2000	NR	9/11/2000	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		
0,79	8/2/2001	NR	8/2/2001	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		
29,23	12/12/2000	NR	12/12/2000	13,44	13/3/2001	NR	13/3/2001	NF	10/4/2001	NF	10/4/2001		
13,7	6/3/2001	NR	6/3/2001	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF		
NR	24/4/2001	NR	24/4/2001	NF	NF	NF	NF	NF	9/1/2001	NF	9/1/2001		

APÊNDICE F-MODELOS DE RISCOS PROPORCIONAIS DE COX (“COX PROPORTIONAL HAZARDS MODELS”)

No **Grupo B** (Infecção ativa por HCMV detectada por PCR e/ou AGM), as variáveis preditoras que apresentaram p -valor ≤ 0.25 na análise univariada foram: idade D/R, sexo do receptor, sexoD/sexoR, IgG-HCMV pré-tx D/R. Após a modelagem, estas variáveis não apresentaram um modelo multivariado válido, porém, as variáveis sexo do receptor, idade do receptor e idade do doador (categorizadas em relação aos seus valores medianos), apresentaram um p -valor ≤ 0.05 na análise univariada. Os resultados dos modelos univariados significativos foram:

- ❖ **Sexo do Receptor:** O risco de um paciente do Grupo B do sexo masculino apresentar Infecção ativa por HCMV detectada por PCR e/ou AGM é 0.332 vezes (IC: 0.119 a 0.921) o risco de um indivíduo do sexo feminino (p -valor=0.0467).
- ❖ **Idade do Receptor:** O risco de um paciente do Grupo B e com idade em torno de 21 anos apresentar infecção por HCMV detectada por PCR e/ou AGM é 2.88 vezes (IC: 1.11 a 7.51) o risco de um indivíduo com idade ≤ 21 anos (p -valor=0.0266).
- ❖ **Idade do Doador:** O risco de um paciente do Grupo B e doador com idade > 18 anos apresentar infecção por HCMV detectada por PCR e/ou AGM é 3.14 vezes (IC: 1.22 a 8.12) o risco de um indivíduo com idade ≤ 18 anos (p -valor=0.0171).

No **Grupo B** (Infecção ativa por HCMV detectada por AGM), as variáveis preditoras que apresentaram p -valor ≤ 0.25 na análise univariada foram: idade do receptor, idade do doador e doença hematológica maligna não apresentaram um modelo multivariado válido. Os resultados dos modelos univariados foram:

- ❖ **Idade do receptor:** O risco de um paciente do Grupo B apresentar infecção ativa pelo HCMV detectada por AGM é multiplicado por 1.06 (IC: 1.02 a 1.11) a cada ano de idade (p -valor=0.0087).

- ❖ **Idade do doador:** O risco de um paciente do Grupo B e com doador de idade > 18 anos apresentar infecção ativa por HCMV detectada por AGM é 4.25 vezes (IC: 1.5 a 12) o risco de um indivíduo com doador de idade ≤ 18 anos (p -valor=0.00546).
- ❖ **Doença Hematológica Maligna:** O risco de um paciente do Grupo B com doença hematológica maligna apresentar infecção por HCMV detectada por AGM é 0.293 (IC: 0.0921 a 0.931) vezes o risco de um indivíduo com doença hematológica não-maligna (p -valor=0.0249).



ELSEVIER

www.elsevierhealth.com/journals/jinf

Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients

Sandra H.A. Bonon^a, Silvia M.F. Menoni^a, Cláudio L. Rossi^b,
Cármino A. De Souza^c, Afonso C. Vigorito^c, Daniel B. Costa^d,
Sandra C.B. Costa^{a,*}

^aDepartment of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), CP 6111, CEP 13081-970, Campinas, São Paulo, Brazil

^bDepartment of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), CP 6111, CEP 13081-970, Campinas, São Paulo, Brazil

^cBone Marrow Transplant Unit, Hemocenter, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), CP 6111, CEP 13081-970, Campinas, São Paulo, Brazil

^dDepartment of Internal Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA

Accepted 29 November 2003

KEYWORDS

Cytomegalovirus infection; PCR; Bone marrow transplantation

Summary Objectives. The aim of this study was to describe our experience in the control of active CMV infection following HSCT using two strategies of CMV infection treatment: ganciclovir universal prophylaxis at low doses and pre-emptive therapy with ganciclovir.

Methods. The surveillance was based on the monitoring of antigenaemia (AGM) and on a nested polymerase chain reaction (N-PCR) for the detection of CMV in both strategies. Forty-five recipients with malignant diseases and with a risk for CMV disease received universal prophylaxis (Group A). The non-treated group consisted of 24 patients, most of them with non-malignant diseases who did not receive universal prophylaxis (Group B).

Results. In Group A, the incidence of positive AGM was 51%, with a positive PCR of 68.9%. In Group B, the AGM positivity was 66.7% and that of N-PCR was 66.7%. CMV disease occurred in 6/55 patients (10.9%), with 2/36 (5.5%) from Group A and 4/19 (21%) from Group B. Two of these six patients (33.3%) died of CMV disease.

Conclusions. Our result suggests that AGM and N-PCR can be used as markers for assessing the monitoring and the introduction pre-emptive therapy. This approach could prove to be more cost-effective than ganciclovir universal prophylaxis for treating CMV infection.

© 2003 Published by Elsevier Ltd on behalf of The British Infection Society.

Introduction

Cytomegalovirus (CMV) infection after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) produces significant morbidity and mortality.^{1,2} Ganciclovir (GCV) has been established as an effective

*Corresponding author. Tel.: +55-019-3788-7734; fax: +55-019-3289-4107.

E-mail address: costa@fcm.unicamp.br

prophylactic agent for infection by CMV.^{3,4} Because of the high mortality rate associated with CMV disease, antiviral prophylaxis and pre-emptive therapy have been widely used after HSCT.

The use of GCV universal prophylaxis is very effective in reducing the incidence and severity of CMV disease. However, overall survival is not improved, perhaps because prolonged use of GCV causes neutropenia^{4,5} and hence susceptibility to bacterial infection.⁵ Another disadvantage is that some patients are exposed to the toxic side effects of GCV, although they will never develop CMV disease.⁵⁻⁷ Thus, it is important to discriminate patients with active CMV infection from those without such infection. Tests used for this purpose include the pp65 antigenaemia assay and DNA detection methods.⁸

The polymerase chain reaction (PCR) is a sensitive method for the detection of CMV DNA and active CMV infection, but is too sensitive for the exclusion of low-risk patients.⁹ The CMV antigenaemia assay is a rapid and quantitative method¹⁰ widely used as a guideline for starting pre-emptive therapy with ganciclovir.¹¹

In this study, we describe our experience with the use of low doses of ganciclovir universal prophylaxis and the application of antigenaemia (AGM) and nested polymerase chain reaction (N-PCR) for assessing when to introduce pre-emptive therapy in the control of active CMV infection or disease in HSCT.

Patients and methods

Patients. Sixty-nine myeloablative haematopoietic stem cell transplant recipients with HLA identical siblings, were selected at the Bone Marrow Transplant (BMT) unit of the university hospital. Patients who were positive or negative for IgG-CMV, as well as, positive or negative donors requiring allogeneic HSCT for a variety of conditions, were monitored prospectively for CMV infection from July 1998 to December 2000, using AGM and N-PCR. The patients did not receive CMV hyperimmunoglobulin. The blood products used were neither screened for CMV antibody nor filtered to deplete leukocytes, although all had been irradiated. The conditioning regimens and acute graft versus host disease (GVHD) prophylaxis were selected based on ongoing protocols at the university hospital. Acute GVHD was graded according to published criteria.¹² All patients received GVHD prophylaxis with cyclosporine (CSP) and methotrexate (MTX), and were tested for underlying diseases using established

institutional protocols. Two different groups of patients were analyzed. The patients were selected based on ongoing protocols of universal ganciclovir prophylaxis at the referring institution's BMT unit and were not randomized. Group A patients (38 adults and seven children) had haematological malignancies and received ganciclovir universal prophylaxis, whereas Group B consisted of 13 adults with aplastic anaemia and 10 children (seven with malignant disease and three with aplastic anaemia) who did not receive ganciclovir prophylaxis. The patient's characteristics, the pre-transplant conditioning regimens and the prophylaxis for GVHD disease are shown in Table 1. The patients were followed from day 0 until day 150 after the transplant. Blood was collected weekly for AGM and N-PCR. The protocol was designed in accordance with the requirements for research involving human subjects in Brazil, and was approved by the Institutional Ethics Committee.

CMV antigenaemia (AGM) assay. The antigenaemia assay was done at least once a week after engraftment, as previously described,¹³ with some modifications.^{14,15} Briefly, EDTA-treated blood samples were fractionated by dextran sedimentation followed by erythrocyte lysis. The granulocytes were then centrifuged to prepare Cytospin slides (3×10^5 granulocytes per slide). The slides were air-dried and fixed with formaldehyde, then immunostained with monoclonal antibodies C10 and C11 (Clonab CMV; Biotest, Dreieich, Germany), and reacted with peroxidase-labeled anti-mouse conjugate (HRP, Biotest, Dreieich, Germany). The test was done in duplicate.

Nested polymerase chain reaction (N-PCR). CMV DNA in blood specimens was detected by nested-PCR using primers described by Demmler et al.¹⁶ and Shibata et al.⁹ Briefly, leukocytes remaining from the CMV antigenaemia assay were lysed and the DNA was precipitated. The primers were selected from the MIE region of CMV-AD169. The size of the PCR amplification products was 159 base pairs. The same protocol was used to amplify the human β -globin gene sequence to guarantee the quality of the extracted DNA.

Definitions. Active CMV infection was defined based on one or both of the following criteria: (1) one or more positive cells in the AGM assay, and (2) two or more consecutive positive N-PCR results. For the diagnosis of CMV disease, the active infection had to be accompanied by clinical symptoms and histopathological identification of CMV.¹⁷ Recurrence of CMV infection was defined as active CMV infection occurring after negative N-PCR and/or AGM assays following treatment of the initial

11. Gondo H, Minematsu T, Harada M, et al. Cytomegalovirus (CMV) antigenaemia for a rapid diagnosis and monitoring of CMV-associated disease after bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1994;**86**(1):130–137.
12. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995;**15**:825–828.
13. Van der Bij W, Schirm J, Torensma R, Van Son WJ, et al. Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J Clin Microbiol* 1988;**26**(12): 2531–2535.
14. Halwachs G, Zach R, Poggliitsch H, Holzer H, et al. A rapid immunocytochemical assay for CMV detection in peripheral blood of organ-transplanted patients in clinical practice. *Transplantation* 1993;**56**(2):338–342.
15. Pannuti CS, Kallás EG, Muccioli C, Roland RK, et al. Cytomegalovirus antigenemia in acquired immunodeficiency syndrome patients with untreated cytomegalovirus retinitis. *Am J Ophthalmol* 1996;**122**(6):847–852.
16. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, et al. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis* 1988;**158**: 1177–1184.
17. Ljungman P, Plotkin SA. Workshop on CMV disease; definition, clinical severity scores, and new syndromes. *Scand J Infect Dis* 1995;**99**:87–89.
18. Azevedo AM, Torquato JP, Vigorito AC, et al. Prophylaxis of cytomegalovirus infection with low-dose intravenous ganciclovir in allogeneic bone marrow transplant patients. *Br J Haematol* 1996;**93**(Suppl. 2):250.
19. Kaplan ED, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;**53**:457–481.
20. Altman DG, *Practical statistics for medical research*, 14. London: Chapman and Hall; 1991. pp. 410–411.
21. Chakrabarti S, Mackinnon S, Chopra R, et al. High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. *Blood* 2002;**99**:4357–4363.
22. Yakushiji K, Gondo H, Kamezaki K, et al. Monitoring of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation: comparison of an antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant* 2002;**29**:599–606.
23. Machado CM, Dulle FL, Vilas Boas LS, et al. CMV pneumonia in allogeneic BMT recipients undergoing early treatment or pre-emptive ganciclovir therapy. *Bone Marrow Transplant* 2000;**26**:413–417.
24. Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, et al. HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 1994;**83**:1971–1979.
25. Stocchi R, Szydlo R, Craddock C, et al. A comparison of prophylactic vs pre-emptive ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after T-depleted volunteer unrelated donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999;**23**:705–709.
26. Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 2003;**101**:407–414.
27. Hebart H, Müller C, Löffler J, et al. Monitoring of CMV infection: a comparison of PCR from whole blood, plasma-PCR, pp65-antigenemia and virus culture in patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1996;**17**:861–868.
28. Machado CM, Menezes RX, Macedo MCA, et al. Extended antigenemia surveillance and late cytomegalovirus infection after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 2001;**28**: 1053–1059.
29. Manteiga R, Martino R, Sureda A, et al. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided pre-emptive treatment with ganciclovir after allogeneic stem transplantation: a single-center experience. *Bone Marrow Transplant* 1998;**22**: 89–904.
30. Mori T, Okamoto S, Matsuoka S, et al. Risk-adapted pre-emptive therapy for cytomegalovirus disease in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000;**25**:765–769.
31. Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, et al. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood* 1996;**88**:4063–4071.
32. Razonable RR, Brown RA, Wilson J, et al. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation* 2002;**73**:968–973.
33. Gor D, Sabin C, Prentice HG, et al. Longitudinal fluctuations in cytomegalovirus load in bone marrow transplant patients: relationship between peak virus load, donor/recipient serostatus, acute GVHD and CMV disease. *Bone Marrow Transplant* 1998;**21**:597–605.
34. Gerna G, Baldanti F, Lilleri D, et al. Human cytomegalovirus immediate-early mRNA detection by nucleic acid sequence-based amplification as a new parameter for pre-emptive therapy in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000;**38**:1845–1853.
35. Hebart H, Wuchter P, Loccr J, et al. Evaluation of the Murex CMV DNA hybrid capture assay version 2.0 for early diagnosis of cytomegalovirus infection in recipients of an allogeneic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant* 2001;**28**: 213–218.
36. Ljungman P. Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2002;**118**: 44–57.
37. Peggs KS, Preiser W, Panagiotis D, et al. Extended routine polymerase chain reaction surveillance and pre-emptive antiviral therapy for cytomegalovirus after allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2000;**111**:782–790.
38. Humar A, Lipton J, Welsh S, et al. A randomized trial comparing cytomegalovirus antigenemia assay vs screening bronchoscopy for the early detection and prevention of disease in allogeneic bone marrow and peripheral blood stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2001;**28**:485–490.
39. Eid K, Miranda E, Vigorito A, et al. Critical analysis concerning the availability of full match sibling donors and feasibility of allogeneic bone marrow transplantation in Brazil. *Bone Marrow Transplant* 2002;**29**(Suppl. 2): S238.
40. Einsele H, Hebart H, Kauffmann-Schneider C, et al. Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection. *Bone Marrow Transplant* 2000;**25**:757–763.

Table 5 Clinical and laboratory features of CMV disease

Time after transplant (days)								
n	Status D/R	Underlying disease	Stem cell source	Group	Disease	Symptoms	N-PCR +	AGM + (no. of positive cells)
6	+/+	CML	BM	A	GI	81	55	55 (3)
7	+/+	AA	BM	B	CR	40	40	68 (26)
14	+/+	MDS	PB	A	GI	33	33	33 (5)
32 ^a	+/+	AA	BM	B	GI	46	12	29 (50)
34	-/+	AA	BM	B	GI	89	47	67 (50)
69 ^a	+/+	AA	BM	B	IP	70	49	56 (52)

D/R, donor/recipient; BM, bone marrow; PB, peripheral blood; CR, chorioretinitis; GIT, gastrointestinal tract (gastritis); IP, interstitial pneumonitis; N-PCR +, positive nested polymerase chain reaction; AGM +, positive antigenaemia.

^a Patients with acute GVHD.

that the techniques were equally suitable for active CMV infection and for controlling the efficacy of antiviral therapy in marrow transplant recipients. Whole blood is superior to plasma for the detection of active CMV infection by PCR assay, whereas peripheral blood leukocytes (PBL or 'buffy-coat') and peripheral blood mononuclear cells (PNMC) are equivalent.³² Several techniques are currently available for the early detection of CMV, including quantitative PCR,³³ the detection of mRNA³⁴ and a hybrid capture assay.³⁵ These techniques have not yet been adequately compared others currently available.³⁶

Late active CMV infection occurred in eight patients in the universal prophylaxis group and in one patient in the pre-emptive therapy group. A longer surveillance of CMV has been reported in only a few studies^{28,37} and the identification of a late active CMV infection generally only occurs if symptomatic.²¹ Since late active CMV infection predisposes to late CMV disease,²¹ it would be interesting to monitor patients at a higher risk for late disease, such as those with acute and chronic GVHD,³⁷ for an extended period. Depending on the patient risk profile, the incidence of late disease may be as high as 18% in surviving myeloablative transplanted patients 3 months after transplantation.²⁶ Pre-emptive therapy has the potential to minimize the occurrence of late CMV disease.³⁸ Despite the recurrence of CMV infection in our study, late CMV disease was not observed.

In Brazil, which has an unfavorable epidemiology for CMV,⁶ most patients depend on governmental support.³⁹ Thus, by using N-PCR^{9,16,40} and/or AGM,¹³⁻¹⁵ two sensitive, non-invasive and low-cost techniques for CMV detection, patients with a propensity for developing CMV disease can be readily identified and pre-emptive therapy instituted. This should allow early treatment prior to the development of significant clinical CMV disease, thereby avoiding the toxicity related to antivirals and the high cost of universal prophylaxis.

Acknowledgements

The authors thank Roberto Zulli for statistical analysis, Nicete Romano for secretarial assistance and Thelma Oliveira and Stephen Hyslop for revising the English.

References

1. Forman AJ, Zaia JA. Treatment and prevention of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: where do we stand? *Blood* 1994;**83**:2392–2398.
2. Reusser P. The challenge of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation: epidemiology: prophylaxis, and therapy. *Bone Marrow Transplant* 1996;**18**(Suppl. 2): 107–109.
3. Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA, et al. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1991; **235**(23):1601–1607.
4. Winston DJ, Winston GH, Kathy Bartony RN, et al. Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Ann Intern Med* 1993;**118**:179–184.
5. Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, et al. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med* 1993;**118**: 173–178.
6. Costa SCB, Miranda SRP, Alves G, et al. Detection of cytomegalovirus infections by PCR in renal transplant patients. *Braz J Med Biol Res* 1999;**32**:953–959.
7. Zaia JA. Cytomegalovirus infections. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, editors. *Hematopoietic cell transplantation*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science; 1999. p. 560–583. Chapter 51.
8. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998;**11**(3):533–554.
9. Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, et al. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988;**158**: 1185–1192.
10. Boeckh M, Bowden R, Goodrich JM, et al. Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1992;**80**: 1358–1364.

Table 4 Relationship between AGM and N-PCR during follow-up of 69 patients after HSCT

	AGM/N-PCR negative	Only AGM positive	Only N-PCR positive	AGM (+) before N-PCR (+)	N-PCR (+) before AGM (+)	AGM and N-PCR simultaneously positive
Group A (<i>n</i> = 45)	9 (20%)	5 (11.1%)	13 (28.9%)	4 (8.9%)	8 (17.8%)	6 (13.3%)
Group B (<i>n</i> = 24)	5 (20.8%)	3 (12.3%)	3 (12.3%)	1 (4.16%)	10 (41.6%)	2 (8.3%)
Total (<i>n</i> = 69)	14 (20.3%)	8 (11.6%)	16 (23.2%)	4 (5.8%)	18 (26%)	8 (11.6%)
<i>P</i> ^a	NS	NS	NS	NS	0.045	NS

(+)—positive.

^a Fisher test

favorable CMV serology in matched, unrelated donors (MUD)²⁵ and also in sibling-matched donors,³¹ thus indicating that pre-emptive therapy has the same impact as universal prophylaxis.

In our study, both N-PCR and AGM were equally effective in diagnosing CMV active infection and disease. Hebart et al.²⁷ compared CMV antigenaemia versus PCR of whole blood and plasma and showed

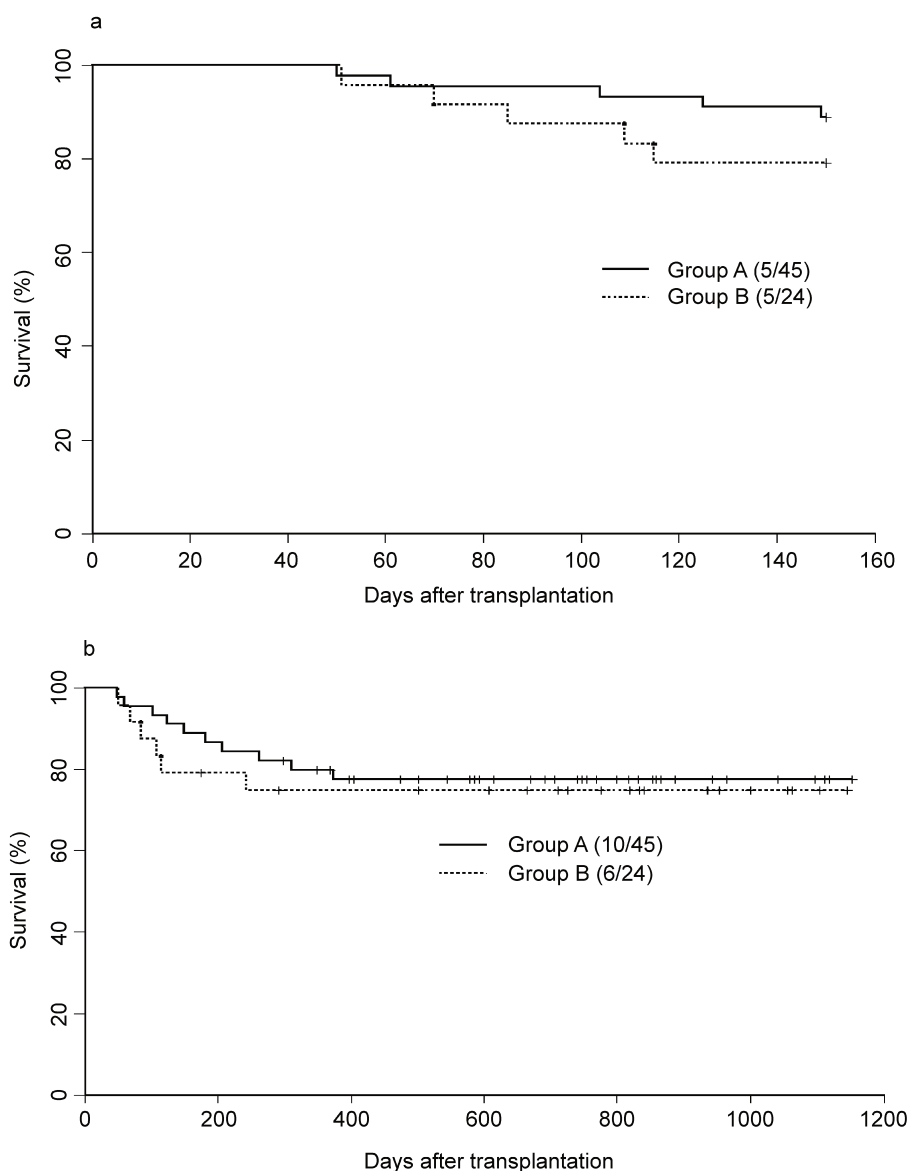


Figure 1 Kaplan-Meier product-limit estimates of the probability of survival during the first 150 days (a) and 1152 days (b) after transplantation.

Table 3 Recipient (R) and donor (D) CMV serostatus and outcome (active CMV infection, recurrence, and disease) following allogeneic transplantation in Groups A and B

CMV serostatus	Active CMV infection n (%)	CMV recurrence, n (%)	CMV disease, n (%)
<i>Group A</i>			
D + /R +	29/37 (78.4)	5/29 (20.7)	2/37 (5.4)
D + /R -	4/5 (80)	0/4 (0)	0/5 (0)
D - /R +	3/3 (100)	1/3 (33.3)	0/3 (0)
<i>Group B</i>			
D + /R +	14/17 (93.3)	4/14 (21.4)	3/15 (20)
D - /R +	3/4 (75)	1/3 (33.3)	1/4 (25)
D - /R -	2/5 (40)	0/2 (0)	0/5 (0)

Fisher test— $p = \text{NS}$.

univariate analysis (Cox proportional hazards models), no significant risk factors for active CMV infection detected by AGM and/or N-PCR were identified in Group A. In Group B, sex of recipient, age of recipient, age of donor had a significant value ($P = 0.047$).

Survival and mortality. The survival rates for patients who received ganciclovir universal prophylaxis and those who received pre-emptive therapy were 88.9 and 79.2%, respectively, at day 150 and 77.5 and 74.8%, respectively, at day 1152 (Fig. 1(a) and (b)).

Causes of death. Ten patients died. Two of these from Group B (20%) died of CMV disease (one IP and the other GI). There were three deaths (30%) due to acute GVHD, two in Group A and one in Group B. Two deaths resulted from bacterial infection (one in each group), two from a relapse (one in each group) and one (Group A) from early disease progression.

Discussion

In populations with a high seroprevalence of CMV, where the maintenance of adequate stocks of CMV-seronegative products and the use of leukodepleted blood is expensive, the use of ganciclovir universal prophylaxis has been advocated for most patients with a positive serology and haematological neoplasias.¹⁸ Our BMT Unit started in 1993, when monitoring tests for CMV infection were unavailable. Ganciclovir universal prophylaxis was introduced because of an unfavorable epidemiology and a lack of tests. In 1998, appropriate tests became available but universal prophylaxis was maintained in order to assess its usefulness. The results described here summarize our experience in using these approaches in the context of financial constraints in a developing country, where the majority of patients and donors are CMV seropositive and there is a high risk of CMV infection.

The high incidence of active CMV infection detected by N-PCR and AGM in our patients was comparable to previous reports for HSCT.²¹⁻²³ Although the proportion of CMV seronegative donors or recipients was small, almost all of the positive N-PCR and AGM tests were from CMV seropositive patients in both therapy groups. In agreement with previous studies,^{24,25} detection of the onset of active CMV infection was delayed in the universal ganciclovir prophylaxis group compared to the pre-emptive group ($P = 0.007$). Laboratorial surveillance indicated that all patients with CMV disease were detected precociously but, despite preventive therapy, the overall incidence of CMV disease was 8.7%. This is comparable to recently reported incidences of 0-16%.²⁶⁻³⁰ Known risk factors for CMV disease, such as active CMV infection, acute GVHD and bone marrow source of transplant cells,⁷ were also present in our patients. All patients with CMV disease had at least one of these risk factors. No other risk factors were identified in either group. The organ most commonly affected with CMV disease was the gastrointestinal tract, as reported in other series,⁷ and is a problem in allogeneic bone marrow transplantation.

Although our groups were not randomized, they represented two populations with a high percentage of CMV seropositivity in adults and children. There was no significant difference in the rates of active CMV infection between the two groups. CMV disease was also not significantly different, even though there was a trend towards a higher percentage of affected patients in the pre-emptive group in which all diagnosed patients had severe aplastic anaemia.

The overall mortality was unaltered in both groups at day 1152 post-transplant. This could indicate that there was no superiority of universal prophylaxis when compared to pre-emptive therapy in highly seropositive populations for CMV. Similar results have been observed in patients with a more

analyzed using descriptive statistics (median and ranges for continuous variables and percentages for categorical variables). The probability of events (positive antigenaemia and positive N-PCR) and survival curves were analyzed using Kaplan-Meier product limit estimates.¹⁹ Univariate regression analysis was done using Cox proportional hazards regression models. The risk factors evaluated included stem cell source, age of donor, age and sex of recipient, sex of donor versus recipient, malignant disease, CMV prophylaxis, recipient-donor CMV serostatus, and acute GVHD. The sensitivity, specificity and positive and negative predictive values were as defined elsewhere.²⁰ A *P* value of <0.05 indicated statistical significance. All statistical analyzes was done using S-Plus 2000 software (Math Soft Inc.).

Results

Diagnosis of active CMV infection after transplantation. Fifty-five patients (79.7%) were infected during monitoring with N-PCR and AGM, with a total of 66 episodes of active CMV infection. These 55 CMV-infected patients are summarized in Table 2.

Recipient-donor serostatus and active CMV infection and recurrence. Table 3 shows the incidence of active CMV infection, of recurrence after stopping ganciclovir treatment, and of CMV disease based on CMV donor/recipient serostatus.

Relationship between AGM and N-PCR. The relationship between AGM and N-PCR of studied patients obtained at diagnosis are summarized in Table 4. In Group A, the positive predictive value of the AGM assay was 78.3% and the negative predictive value was 40.9%. In Group B, these values were 81.3 and 62.5%, respectively, using N-PCR as the reference standard. The sensitivity and specificity of the AGM assay were 58 and 64.3% in

Group A, and 82.3 and 62.5% in Group B, respectively.

CMV active infection and GVHD. When we paired the first positive N-PCR and/or AGM with the occurrence of acute GVHD grades II-IV, 9/9 patients with aGVHD had active CMV infection and 46/60 patients without a GVHD did not had active CMV infection. (*p* = NS).

Late active CMV infection and disease. Eleven patients in Group A and five patients in Group B with late active CMV infection were evaluated for late CMV disease because of a risk of CMV. Late CMV disease did not occur in these patients until 150 days after transplantation.

Incidence of CMV disease. Six out of 55 patients (10.9%) developed CMV disease. Two of these patients died by CMV disease (33.3%). In Group A, CMV disease occurred in 2/36 patients (5.5%) (days +33 and +81). These patients were affected by chronic myelogenous leukaemia (CML) and myelodysplastic syndrome (MDS) and presented CMV gastrointestinal (GI) disease. Both patients were successfully treated with GCV. In Group B, CMV disease occurred in 4/19 patients (21%) (days +40, +46, +70 and +89). These patients had severe aplastic anaemia; one developed CMV-retinitis, two had GI disease, and the fourth died from CMV-interstitial pneumonitis (IP). All six patients who developed CMV disease were CMV seropositive allogeneic HSCT recipients. The disease occurred within 100 days after the transplant, and N-PCR and AGM became positive prior to the development of CMV disease in a median time of 43.5 days (range 12-55) and 55.5 days (range 29-68), respectively. No late CMV disease occurred in any of the 69 patients (Table 5).

Risk factors for active CMV infection before day 150 after transplantation. The risk factors evaluated included stem cell source, age of donor, age and sex of recipient, sex of donor versus recipient, malignant disease, CMV prophylaxis, recipient-donor CMV serostatus and acute GVHD. Using

Table 2 Incidence of active CMV infection

	Group A	Group B	<i>P</i>
Patients, <i>n</i> (%)	45 (65.2)	24 (34.8)	-
Patients with active CMV infection by N-PCR and/or AGM (%)	36 (80.0)	19 (79.2)	NS ^a
Median time—days (range)	54 (0-145)	26 (0-103)	0.007 ^b
Positive N-PCR (%)	31 (68.9)	16 (66.7)	NS ^a
Median time—days (range)	54 (0-145)	24 (0-86)	0.004 ^b
Positive AGM (%)	23 (51.0)	16 (66.7)	NS ^a
Median time—days (range)	62 (17-131)	34 (5-103)	0.045 ^b

N-PCR, nested-PCR; AGM, antigenaemia; NS, not significant.

^a Fisher's exact test.

^b Wilcoxon test.

Table 1 Characteristics of the groups studied

Characteristic	Group A (n = 45)	Group B (n = 24)
Age—median in years (range)	31.6 (8-59)	20.9 (2-53)
Sex—male/female	30/15	18/6
<i>Underlying disease—n (%)</i>		
Malignant disease		
Acute lymphocytic leukaemia (ALL)	2 (4.4)	2 (8.3)
Acute myelogenous leukaemia (AML)	9 (20.0)	4 (16.6)
Chronic myelogenous leukaemia (CML)	33 (73.3)	5 (20.8)
Myelodysplastic syndrome (MDS)	1 (2.2)	-
Non-malignant disease		
Severe aplastic anaemia (SAA)	-	13 (54.0)
<i>Acute GVHD—n (%)</i>		
Grades 0-I	4 (11.0)	5 (26.0)
Grade II	41 (91.1)	19 (79.2)
Grade III	2 (4.5)	1 (4.1)
Grades III-IV	2 (4.5)	4 (16.7)
<i>Pretransplant CMV serostatus—n (%)</i>		
R - /D + , R + /D - , R + /D +	45 (100)	19 (79.2)
R - /D -	-	5 (20.8)
<i>Conditioning regimen—n (%)</i>		
Bu (16)/Cy (120)	41 (91.1)	12 (50.0)
Bu (16)/Cy (120) + VP-16 (40)	1 (2.2)	3 (12.5)
TBI (13.2 Gy) + Cy (120)	3 (6.7)	-
Cy (200)	-	8 (33.3)
TBI (13.2 Gy) + VP-16 (40)	-	1 (4.2)
<i>GVHD prophylaxis—n (%)</i>		
CSP/MTX	44 (97.8)	21 (87.5)
CSP/Pred	1 (2.2)	-
CSP	-	3 (12.5)
<i>Stem cell source</i>		
Bone marrow	26 (57.8)	23 (95.8)
Peripheral blood	18 (40.0)	1 (4.2)
Bone marrow + peripheral blood	1 (2.2)	-

Bu (16), busulfan (16 mg/kg); Cy (120/200), cyclophosphamide (120 and 200 mg/kg); VP-16, etoposide (40 mg/kg); GVHD, graft-versus-host disease; TBI, total body irradiation; CSP, cyclosporine; MTX, methotrexate; Pred, prednisone.

episode of infection. Late active CMV infections and diseases were defined as those occurring more than 100 days after transplant.

Ganciclovir universal prophylaxis. All patients in Group A received ganciclovir prophylaxis at a dose of 5 mg/kg i.v., once daily, three days per week, from the engraftment until day 75 after the transplant.¹⁸ CMV-seronegative patients and donors and patients with aplastic anaemia did not receive ganciclovir prophylaxis. This strategy was based on an established institutional protocol. When neutropenia occurred, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) was administered until the absolute neutrophil count was > 500 cells/ μ l.

Treatment of active CMV infection. Patients in Group A with proven active CMV infection received ganciclovir (5 mg/kg, i.v.) twice a day for 7 days followed by a maintenance dose of 5 mg/kg/day, i.v., three times a week for 4 weeks. Treatment was

restarted if active CMV infection remained detectable.

Ganciclovir pre-emptive therapy. Patients in Group B with proven active CMV infection received ganciclovir in the same dose as described above. Pre-emptive therapy was discontinued only after the end of the maintenance dose and if CMV infection was not detected.

Treatment of CMV disease. CMV disease was treated with ganciclovir (5 mg/kg, i.v.), twice a day for 21 days, followed by a maintenance dose of 5 mg/kg/day, i.v., three times a week for 4 weeks.

Statistical analysis. The proportions of patients within each characteristics and outcome group were compared by Fisher's test while comparisons of continuous variables were done with the Wilcoxon rank sum test. The status of the patients was monitored for up to 150 days after transplant or up to 1152 days for overall survival. All data were