

SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA 823

**CITOMEGALOVIRUS EM TRANSPLANTADOS RENAI:
DIAGNÓSTICO PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E
IMPACTO CLÍNICO**

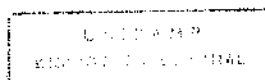
Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Doutor em Clínica Médica

Campinas

-1993-



Aos meus pais,

Ao Fernando,

Aos meus filhos, Daniel e Maria Laura.

AGRADECIMENTOS

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, orientador deste trabalho, pelo apoio, confiança, estímulo e amizade.

Ao Prof. Dr. Claudio Lúcio Rossi, pela ajuda inestimável em todas as fases de realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Gentil Alves Filho, pelas facilidades oferecidas na Disciplina de Nefrologia da FCM da UNICAMP, durante toda a realização desse trabalho.

Aos meus colegas da Disciplina de Medicina Interna e Semiologia, pelo apoio e solidariedade.

À Disciplina de Hematologia e Hemoterapia do Departamento de Clínica Médica da FCM da UNICAMP, pelas facilidades oferecidas durante a realização desse trabalho.

À Seção de Informática do HEMOCAMP, em especial ao Estefane Garcia, pela colaboração técnica prestada.

À Cármen Lúcia Rodrigues Arruda, pela ajuda incansável e amiga na elaboração das tabelas, gráficos, diagramação e impressão final deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Carvalho Ramos, pela amizade e assessoria na análise estatística.

À Equipe do Laboratório da Unidade de Pesquisa em Virologia da FMRP, especialmente à Dra. Aparecida Yulie Yamamoto e às biólogas Rita Helena Carlucci e Miyoco Abe Owa.

A todos os funcionários, docentes, residentes e equipe técnica da enfermagem, envolvidos com o transplante renal, da Disciplina de Nefrologia da FCM da UNICAMP.

A todos os funcionários e ao pessoal que trabalha nos laboratórios da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da FCM da UNICAMP, que muito gentilmente me receberam .

Aos pacientes, pela colaboração.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Fernando, pelo incentivo constante e apoio irrestrito.

À minha amiga, Silvia Regina Pérغامo de Miranda, pela digitação desta tese e competente e inestimável ajuda técnica.

ÍNDICE

	Pág
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	23
CASUÍSTICA E MÉTODOS	24
CASUÍSTICA	24
MÉTODOS	28
RESULTADOS	43
DISCUSSÃO	75
CONCLUSÕES	88
RESUMO	89
SUMMARY	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXOS	106
ANEXO I	106
ANEXO II	145

INTRODUÇÃO

1. Histórico

A primeira fase da história do conhecimento sobre citomegalovírus foi originada exclusivamente de dados obtidos através de estudos histopatológicos. O dado fundamental foi a observação de células grandes com inclusões nucleares em diversos órgãos de crianças que morreram devido a várias síndromes clínicas e não específicas. Esses achados foram responsáveis pela designação do termo "Doença de Inclusão Citomegálica" mesmo antes do agente causal ser isolado (151, 152, 153, 154). Jesionek e Kiolemenoglou (61a) foram os primeiros a descrever as características das células citomegálicas no rim, fígado e pulmões em material obtido na necrópsia de um natimorto. Células semelhantes foram observadas por Ribbert (108a). A observação de que as inclusões intranucleares presentes nas chamadas células citomegálicas eram similares às inclusões vistas nas lesões de pele causadas por herpes vírus, tiveram como consequência a sugestão da etiologia viral para esse fenômeno. Desse modo, de uma fase puramente de patologia descritiva, passou-se lentamente para uma segunda fase em que a ênfase dos trabalhos foi dada no estudo do vírus responsável pelas lesões (151).

Em 1926, Cole e Kuttner (25a) usando material de glândulas salivares descreveram a transmissão do CMV em cobaia, sugeriram que este agente possuía características de vírus e que sua infecção seria espécie-específica.

Devido à infecção, em glândulas salivares, comum a animais e a seres humanos, o citomegalovírus nessa época ficou conhecido como "vírus da glândula salivar". A primeira evidência de que o vírus de glândula salivar era relativamente comum e provavelmente seria responsável por manifestações clínicas, surgiu com o trabalho de Farber e Wolbach (39a), que demonstraram células citomegálicas com inclusões intra-nucleares em 12% de 183 crianças que faleceram por uma variedade de doenças não relacionadas entre si. Em 1954, Margaret Smith (130a), usando a infecção de glândula salivar de camundongo como modelo conseguiu isolar o vírus em cultura de tecidos. Em 1956 e 1957 foram publicados diversos trabalhos por Smith (130b), Rowe (111a) e Weller (154a), sobre o isolamento de um vírus dos tecidos de crianças com manifestações clínicas de infecção provável pelo CMV (151). A partir destes estudos, uma estirpe de CMV humano (AD 169), foi adaptada ao laboratório, replicando em culturas de fibroblastos humanos, sendo caracterizada a sua

infecção pela presença de lesões focais constituídas por células gigantes, contendo inclusões intranucleares, idênticas àsquelas observadas nos materiais procedentes de pacientes.

Em 1960, com o enorme progresso nos procedimentos cirúrgicos para transplantes renais e cardíacos, a infecção pelo CMV passa a ser reconhecida como uma entidade de grande importância clínica (114). Nessa ocasião também, Weller e colegas sugeriram o nome citomegalovirose em substituição aos termos doença de inclusão citomegálica e vírus de glândulas salivares, buscando um nome para refletir as alterações celulares produzidas por esse vírus nos tecidos. Durante essa terceira fase o CMV foi pela primeira vez reconhecido como o principal agente patógeno em hospedeiros com comprometimento do sistema imune, particularmente aqueles receptores de transplante. Além disso foi identificado como o causador de síndrome de mononucleose heterófila negativa em indivíduos normais e naqueles receptores de transfusões sanguíneas.

No final da década dos anos 70, as indicações que o impacto da infecção por CMV nos transplantes eram tão significantes, que sob os auspícios do "National Institute of Health" (NIH) dos Estados Unidos da América foi organizado um grupo de estudo para avaliar o problema e propor medidas que pudessem contribuir para manter a infecção sob controle (114). A década seguinte representou a quarta fase da história da infecção pelo CMV, que foi marcada pela Conferência Internacional na Philadelphia e o início do uso de medidas para o controle do CMV com agentes antivirais e intervenções imunológicas.

Os conhecimentos atuais mostram que a importância clínica dessa virose transcende sua ação direta nas síndromes infecciosas e indicam que seus efeitos indiretos, provavelmente mediados pela liberação de citocinas, na patogênese da rejeição de enxertos e lesão pulmonar, têm papel preponderante.

Atualmente tem início a quinta fase de investigação sobre CMV que certamente será marcada por avanços no entendimento de aspectos moleculares da infecção e pelo controle clínico dessa virose nos grupos de risco (114).

2. Características do vírus e sua replicação celular

Características morfológicas e estruturais:

O CMV pertence ao gênero β -Herpes vírus da família Herpesviridae. Estudos por microscopia eletrônica mostram que a sua ultra-estrutura é semelhante à de outros Herpes vírus, sendo considerado o maior membro desta família com diâmetro de aproximadamente 200nm. O vírion consiste de um núcleo de 64nm envolto por um capsídeo de forma icosaédrica, contendo 162 capsômeros e medindo 100nm. Possui ainda envelope pleomórfico e complexo, que consiste de pelo menos 6 glicoproteínas, sendo 3 achadas em grande quantidade e consideradas como as maiores constituintes, com peso molecular de 140,000, 62,000, e 57,000 daltons. Estas glicoproteínas possuem sítios antigênicos para anticorpos neutralizantes (137).

O genoma viral é composto de DNA (ácido desoxirribonucleico) de cadeia dupla contendo 240 Kilobases, o qual codifica 33 proteínas estruturais e um número indefinido de proteínas não estruturais, incluindo duas ligadas à molécula de DNA com peso molecular de 150,000 e 49,000 daltons, uma DNA polimerase e proteínas precoces imediatas de PM de 62,000 a 72,000 daltons. Algumas destas proteínas são conhecidas por serem imunogênicas e desencadearem resposta humoral específica.

Características físico-químicas:

O CMV é considerado um dos vírus mais termolábeis sendo totalmente inativado a 56°C por 30 minutos, pelo pH menor que 5, pela exposição ao éter a 20% por 2 horas e pela luz ultra-violeta por 5 minutos.

A infectividade do CMV é melhor preservada por estocagem em diluente 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 (151).

Replicação viral do CMV:

O CMV tem por característica a replicação lenta em cultura celular e também no hospedeiro infectado, onde pode manter a infecção por períodos prolongados e após, permanecer em estado latente.

Após a adsorção do vírus, provavelmente através de receptores específicos na membrana celular, este penetra no interior da célula por fusão do seu envelope com a membrana celular. Desnuda o capsídeo no citoplasma e o genoma viral inicia a sua replicação no núcleo da célula.

Ao se multiplicar, o CMV cumpre os processos de transcrição e replicação no núcleo celular, utilizando as enzimas transcricionais da célula parasitada do hospedeiro, no processo de síntese do RNA mensageiro, ocorrendo em três ciclos que determinam as etapas da replicação viral.

A replicação viral começa aproximadamente 12 horas após a infecção. Suas três fases têm períodos interdependentes e são denominadas: precoce imediata, precoce e tardia. Baseia-se esta divisão no aparecimento sequencial de classes diferentes de proteínas virais específicas.

O período imediato ou alfa ocorre geralmente entre 2 a 4 horas após a infecção, sendo caracterizado pela transcrição de segmentos específicos do genoma e pela produção de proteínas chamadas precoces imediatas, com pesos moleculares de 75,000, 72,000 e 68,000 daltons. A expressão destas proteínas é essencial na transcrição do DNA do vírus e para a fase seguinte da replicação. Trabalhos mostram que em infecções abortivas somente esta classe de proteínas é demonstrada e que a sua expressão ocorre na ausência de replicação viral completa.

O período seguinte tem duração de 24 horas ou mais, sendo chamado precoce ou beta, caracterizado pela transcrição e replicação contínua de grande parte do DNA viral. Proteínas necessárias à replicação do genoma, como a DNA polimerase são sintetizadas nesta fase.

O período tardio ou gama ocorre de 36 a 48 horas após a infecção. São produzidas nesta fase proteínas estruturais do vírus e nela ocorre a montagem e a liberação dos novos vírions (4, 83, 137).

3. Patogênese das infecções por CMV

Como acontece com outros herpes virus, a infecção primária pelo CMV é frequentemente seguida por infecção persistente e/ou recorrente. A infecção recorrente é em geral causada pela reativação do vírus latente. A reinfecção também ocorre, provavelmente devido às características de diversidade antigênica do CMV. Na grande maioria dos casos, a infecção pelo CMV é subclínica. No entanto, sob certas condições específicas, como aquelas encontradas em pacientes com deficiência imunológica ou em crianças com infecções congênitas, a apresentação clínica pode ser grave e muitas vezes conduzir à morte (58).

Entre os pacientes que apresentam elevado risco de contrair doença disseminada por CMV, incluem-se pacientes submetidos a transplante de rins, fígado, medula ou coração, portadores de síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) e aqueles submetidos a quimioterapia antineoplásica, especialmente para tratamento de linfomas e leucemias (92). Um dos fatores que mais têm contribuído para o aumento de ocorrência de infecções por CMV é sem dúvida o emprego cada vez mais comum de medicamentos imunossupressores (58).

4. Epidemiologia e incidência das infecções pelo CMV

Através de estudos soroepidemiológicos demonstrou-se que a infecção pelo CMV ocorre praticamente em todas as regiões do mundo. A prevalência de anticorpos aumenta com a idade, atingindo níveis máximos após 25 anos. Existe uma nítida relação entre a prevalência de anticorpos numa determinada população adulta e seu nível sócio-econômico. Em populações de alto nível sócio-econômico, a prevalência tem variado

nos diversos países estudados, de 40 a 60%, enquanto em populações de nível sócio-econômico mais baixo, a prevalência é maior, variando de 80 a 100% (58, 92).

A análise de estudos correlacionando idade e prevalência da infecção, sugerem 2 períodos de aumento da infecção. O primeiro é o período perinatal e o segundo ocorre durante os anos de maturidade sexual. As fontes de infecção para o período perinatal são o canal do parto (cervix uterino), leite materno (135), banco de leite e outra criança contaminada (berçários, creches e membros da família). As fontes de infecção durante o período de maturidade sexual ocorrem através de contatos heterossexuais e homossexuais (58).

Crianças infectadas com o CMV conservam o vírus no trato respiratório e trato urinário por longos períodos. O mecanismo exato de transmissão do vírus entre crianças não é conhecido. Parece que é necessário contato íntimo para a contaminação ocorrer (5). Durante a vida adulta, indivíduos com sorologia positiva, na família e no local de trabalho, são fontes insignificantes de transmissão da infecção porque usualmente não excretam o vírus na urina ou no trato respiratório. Um recente avanço no entendimento da epidemiologia da infecção pelo CMV foi a documentação da transmissão sexual do vírus e o reconhecimento de sua importância com o aparecimento da AIDS (Síndrome de Imunodeficiência Adquirida).

Várias evidências, diretas e indiretas, documentam bem a transmissão heterossexual do CMV: síndrome da mononucleose símile-CMV foi descrita em indivíduos parceiros sexuais de pessoas com a síndrome, encontro de altas taxas de infecção cervical em mulheres sexualmente ativas, maior prevalência de infecção pelo CMV em mulheres com grande número de parceiros sexuais, com início de atividade sexual em idade precoce e encontro de cepas idênticas de CMV isoladas de parceiros sexuais.

Tanto o cervix uterino, como o semen são importantes reservatórios de CMV para a transmissão da infecção durante atividade heterossexual (51). A imunologia da infecção nos órgãos sexuais não é bem entendida. Uma vez o cervix uterino tornando-se acometido, a infecção pode se cronificar e parece que existe maior prevalência desta, em

peessoas com múltiplos parceiros sexuais, entre as mais jovens e entre as mulheres em estágios avançados de gravidez.

Atualmente há evidências epidemiológicas e biológicas de que o CMV pode ser transmitido por atividade homossexual. Drew e colaboradores (31a) encontraram prevalência de sorologia positiva para CMV em 94% dos homens homossexuais atendidos em São Francisco ("Sexual Transmitted Disease Clinic"), enquanto em um grupo controle de heterossexuais, a prevalência foi de somente 54%. Dados semelhantes foram relatados em Houston, Alemanha e Holanda (58).

Ao lado de várias formas de infecção natural, o CMV pode ser transmitido iatrogenicamente, através de transfusões de sangue (44, 123, 146) ou do transplante de órgãos (114, 115, 116, 117, 118, 145). A grande maioria de casos pós-transfusionais, cerca de 90%, são assintomáticos. Entretanto algumas vezes podem apresentar-se como uma síndrome mononucleose símile. A transmissão iatrogênica através de transplante de órgãos, parece estar associada à presença de infecção latente nos órgãos transplantados.

O CMV é o agente infeccioso mais frequente em transplantados de órgãos, afetando pelo menos 2/3 desses indivíduos, não importando se o órgão transplantado é rim, medula óssea, fígado, coração, coração-pulmão ou pâncreas-rim. As razões para essa alta prevalência de infecção são devidas a 2 importantes peculiaridades do CMV: capacidade de permanecer latente por longo período e à propriedade de reativar-se sob certas condições especiais. Os mais potentes ativadores do CMV em estado latente são o uso de terapia imunossupressora e a rejeição do órgão transplantado (114, 115, 116, 117, 118, 145).

Existem 3 padrões epidemiológicos da infecção por CMV em receptores de órgãos transplantados: infecção primária, reativação da infecção pré-existente e reinfecção (115). A infecção primária ocorre quando um indivíduo soronegativo para o CMV se infecta com o vírus presente na forma latente, em células de um doador soropositivo. Em transplantes renais a fonte de infecção em 80 a 90% dos casos é o rim do doador soropositivo. Nos restantes 10 - 20% a fonte de infecção ocorre a partir do uso de derivados de sangue de doadores soropositivos para o CMV. Estudos realizados principalmente no hemisfério norte mostram que aproximadamente 90% dos receptores de rins de doadores cadáveres

soropositivos desenvolvem evidências laboratoriais de infecção ativa pelo CMV após o transplante. No entanto, essa taxa cai para 70% quando o órgão é de doador vivo soropositivo (118). A incidência de doença sintomática e a gravidade dos sintomas não parecem diferir se a fonte de infecção primária é o órgão transplantado ou derivados do sangue.

Dados recentes mostram que nem todos os indivíduos soropositivos que doam rins ou outros órgãos transmitem para os respectivos receptores o CMV. Quando rins de um mesmo cadáver soropositivo são doados para dois receptores soronegativos, ou os dois receptores são infectados ou os dois não desenvolvem a infecção. Infelizmente, até o momento, não existem marcadores para prever quando um doador soropositivo será capaz de infectar o receptor soronegativo (19, 20, 21, 22, 142).

O segundo padrão epidemiológico de apresentação da infecção por CMV é o de reativação viral. Dessa forma, o receptor de transplante, previamente infectado pelo CMV (soropositivo antes do transplante), sofre reativação do vírus latente, após o transplante. O conjunto de dados da literatura aponta que todos os pacientes soropositivos para o CMV antes do transplante, mostrarão alguma evidência de reativação viral (sorológica e/ou virológica) após o transplante, se forem conduzidos estudos exaustivos.

O terceiro padrão epidemiológico de apresentação do CMV é chamado de reinfecção, no qual um indivíduo soropositivo recebe um órgão de um doador soropositivo (mas apresentando uma cepa do vírus diferente daquela do doador) e o vírus ativado é o procedente da cepa doada (55).

Estudos feitos por Fryd e colaboradores (41), nos Estados Unidos, mostraram que receptores soropositivos de transplante renal que receberam órgãos de doadores soropositivos tiveram pior evolução do que os que receberam de doadores soronegativos. Também há evidências de que pacientes com reinfecção são mais sintomáticos do que aqueles que apresentam reativação da infecção pré-existente.

A incidência de doença sintomática é diferente nessas 3 formas de apresentação da infecção por CMV. Pelo menos 2/3 dos pacientes com infecção primária desenvolvem sintomas. Por outro lado, menos de 20% dos que apresentam reativação viral endógena

tornam-se sintomáticos. Cerca de 40% dos que desenvolvem reinfecção tornam-se sintomáticos (16, 100). Portanto, a evidência de doença sintomática numa dada população de receptores de transplante é determinada pela incidência de sorologia positiva de ambos, doadores e receptores. Crianças apresentam menor incidência de sorologia positiva para CMV e conseqüentemente maior risco que adultos para desenvolver doença sintomática. Adultos de classes socio-econômicas baixas mostram elevada incidência de sorologia positiva para o CMV e por isso menores possibilidades de desenvolver doença sintomática.

Evidências de replicação viral e sintomas clínicos nos transplantados são vistos dentro de 1 a 4 meses após a cirurgia. Os 3 modos de transmissão anteriormente descritos incluem mais que 95% das infecções por CMV em transplantes de órgãos. Ocasionalmente um indivíduo soronegativo poderá desenvolver infecção primária pelo CMV, meses após o transplante, infectado por via sexual ou por uso de transfusão de sangue. Deve ser enfatizado que a transmissão do CMV entre pacientes e pessoal médico nas unidades de diálise e de transplante parece não ocorrer (115).

5. Quadro Clínico

Admite-se que a maioria das infecções adquiridas pelo CMV seja totalmente assintomática ou com manifestações clínicas incharacterísticas. Quando estas infecções se expressam clinicamente, o fazem apresentando um quadro clínico similar ao da mononucleose (mononucleose símile). Ocorre principalmente em adultos, caracterizando-se como quadro febril prolongado, geralmente com mais de 10 dias de duração, astenia, sudorese e hepatoesplenomegalia em cerca de 50% dos casos. Linfonodomegalia e exsudato amigdaliano são pouco encontrados, ao contrário do que se verifica na mononucleose infecciosa provocada pelo vírus Epstein-Barr. Icterícia e exantema máculo papular podem ser eventualmente observados. Polirradiculoneurite, encefalite, pneumonia intersticial, anemia hemolítica, púrpura trombocitopênica, miocardite e outras alterações clínicas podem ocorrer mais raramente. Quanto a exames laboratoriais, chama atenção o leucograma, com linfocitose e grande número de linfócitos

atípicos. As enzimas hepáticas (TGO e TGP) costumam encontrar-se elevadas em aproximadamente 80% dos casos (5, 92, 152, 153).

A infecção primária ou recorrente pelo CMV aumenta muito a morbidade e a mortalidade em pacientes imunocomprometidos (93, 104, 111). Os grupos populacionais de maior risco para adquirir doença grave por CMV são transplantados, pacientes com câncer submetidos à quimioterapia e portadores da AIDS. Com o aumento da prevalência de AIDS, a infecção por CMV transformou-se em um grave problema de saúde pública em vários países do mundo. Devido à profunda e complexa deficiência imunológica causada pelo HIV, o CMV frequentemente causa doença disseminada nesse grupo de doentes. Além disso, coinfeção entre CMV e outros patógenos é muito comum em pacientes com AIDS.

Por outro lado, em transplantados, pacientes com câncer e outros grupos de imunossuprimidos, a frequência e gravidade da infecção, bem como a 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 a incompatibilidade nos antígenos de histocompatibilidade, da natureza e duração da quimioterapia e do regime de imunossupressão empregados (54). Nessas populações, a doença comumente se apresenta com sinais de síndrome de mononucleose, já descrita previamente. O achado principal é febre de duração variável. Em ordem decrescente de frequência 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 frequentemente que leucocitose, juntamente com anemia e trombocitopenia. Após a síndrome de mononucleose, a pneumonia é a mais frequente manifestação do CMV em pacientes imunossuprimidos. É mais prevalente e grave entre os recipientes de transplante de medula óssea, com taxas de mortalidade maiores que 40%. Pneumonite pode acompanhar a síndrome de mononucleose ou aparecer isoladamente. A pneumonia pode evoluir para resolução espontânea ou para agravamento progressivo, culminando com insuficiência respiratória e morte. A infecção concomitante por fungos, bactérias Gram negativas e/ou *Pneumocystis carinii* é comum. Hepatite com hepatomegalia, anormalidade de testes de função hepática e icterícia são observados em 7 a 16% dos receptores de transplantes renais de acordo com estudos realizados nos Estados Unidos. Geralmente a doença melhora espontaneamente

dentro de 1 mês ou um pouco mais. Coriorretinite secundária ao CMV é outra entidade clínica cuja frequência tem aumentado em pacientes imunossuprimidos, especialmente portadores de AIDS. Pode ser unilateral ou bilateral e frequentemente subclínica. Quando sintomática, caracteriza-se por borramento da visão, diminuição da acuidade visual e escotomas. Seu curso pode ser progressivo e irreversível. O envolvimento do trato gastrointestinal pelo CMV que era relativamente raro no passado, vem gradativamente ganhando importância, principalmente nos pacientes com AIDS. As manifestações clínicas dependem do nível e grau de comprometimento do trato gastrointestinal e da ocorrência ou não de infecções concomitantes. O colon é o local mais frequentemente acometido (39), seguido pelo esôfago, reto e intestino delgado. A colite por CMV é caracterizada por diarreia líquida, com ou sem sangramento, e com características inflamatórias. Esta condição é geralmente agravada pela presença de outras infecções ou tumores.

O diagnóstico clínico da infecção pelo CMV é extremamente difícil de ser firmado e depende, em última análise de confirmação laboratorial. Quadros febris não infecciosos, como rejeições de transplantes, reação do enxerto ao hospedeiro e efeitos colaterais de certos medicamentos podem ser confundidos ou até ocorrerem em associação com a citomegalovirose.

6. Diagnóstico laboratorial

Do ponto de vista médico é importante diagnosticar a infecção pelo CMV e a seguir analisar os dados clínicos e laboratoriais apresentados pelo paciente. A partir do conjunto desses dados deve-se identificar se a infecção é ou não acompanhada de manifestações significativas, que caracterizam a doença pelo CMV.

Os métodos diagnósticos utilizados para detecção do citomegalovírus podem ser agrupados em 5 categorias: exames citológicos e histopatológicos, isolamento do vírus, sorológicos, identificação de antígenos virais, identificação de ácidos nucleicos (23, 92, 139).

1. Exames citológicos e histopatológicos

1.a. Citologia

As técnicas citológicas para identificação do CMV podem ser realizadas em lavados, secreções, aspirados e "imprints" de tecidos. O diagnóstico baseia-se no encontro de inclusões citoplasmáticas no material examinado. A sensibilidade das técnicas citológicas é muito baixa e tem pouca utilidade na prática clínica (31).

1.b. Histologia

A grande vantagem dessa técnica é seu baixo custo, a simplicidade e a disponibilidade quase universal do equipamento requerido para sua realização. O achado de células com inclusões típicas permite, muitas vezes, atribuir ao CMV a disfunção ou lesão do órgão estudado. No entanto esse método não é muito sensível, inclusive quando a observação é realizada por patologistas experientes. Mesmo com a ausência de células contendo inclusões citoplasmáticas ou nucleares no material estudado, não é possível excluir infecção e doença por CMV (31).

2. Isolamento do vírus

2.a. Cultura convencional

O CMV pode ser isolado de materiais biológicos variados: urina, saliva, secreções cervicais, semen, leite, sangue, lavados e aspirados de órgãos e homogenados de tecidos sólidos. Por ser um vírus labil, 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 CMV em cultura é demorado.

O CMV demonstra seu efeito citopático *in vivo* predominantemente em células epiteliais. No entanto, *in vitro* reproduz-se apenas em determinadas células diplóides humanas, principalmente fibroblastos. Estes podem ser cultivados a partir de prepúcio e pulmões embrionários humanos. Atualmente são disponíveis comercialmente uma grande variedade de linhagens celulares de fibroblastos.

Após inoculação, três ou mais semanas podem ser necessárias para que o CMV possa ser identificado pelo seu efeito citopático característico ou com auxílio da técnica de imunofluorescência. Após inoculação o CMV adsorve-se à célula, penetrando no núcleo. O processo de multiplicação viral é demorado envolvendo a expressão de uma sequência de genes e a síntese das proteínas correspondentes. Somente após completar um ciclo completo (96 horas) é que serão formadas partículas de CMV capazes de invadir as células vizinhas. Como é necessário um razoável número de células infectadas para se ter efeito citopático visível e sugestivo de positividade da cultura, esse método pode demorar 30 dias para a obtenção do resultado. O isolamento deve ser confirmado pela técnica de imunofluorescência, utilizando-se anticorpos policlonais ou monoclonais específicos (30, 31, 92, 139).

2.b. Métodos rápidos de isolamento viral

A adsorção viral às células de cultura pode ser facilitada por centrifugação a baixa velocidade, sonicação do espécime clínico antes da inoculação ou pela adição de dexametasona ao meio de cultura. Posteriormente, usando-se anticorpos monoclonais contra os antígenos precoces imediatos do vírus pode-se ter a conclusão do exame entre 24-48 horas, utilizando-se a técnica de imunofluorescência ou imunoperoxidase. Estas técnicas revelam a ligação dos anticorpos monoclonais às proteínas precoces, expressas nos núcleos das células infectadas. Dependendo do anticorpo utilizado, a sensibilidade do teste é superior ao método de cultura convencional. Atualmente, a técnica mais usada utiliza monocamadas de fibroblastos cultivadas sobre lamínulas de vidro em placas (shell vials),

com pequenos volumes de meio de cultura. Após o período necessário para a expressão dos antígenos precoces, a lâmina é retirada da placa, fixada e incubada com os anticorpos monoclonais anti-proteína nuclear precoce e o sistema é revelado pelas técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase.

Os resultados dessa identificação rápida comparados àqueles da cultura clássica são variáveis e não concordantes. Estas discrepâncias certamente ocorrem devido às diferenças metodológicas empregadas. A utilização das técnicas de cultura rápida representa um grande avanço no diagnóstico da infecção pelo CMV (1, 27, 46, 75, 76, 144).

3. Métodos Sorológicos

Detectam anticorpos produzidos contra o CMV e em geral não apresentam grande complexidade de execução. O requisito principal para a obtenção de resultados positivos é a capacidade do paciente apresentar resposta imunológica humoral adequada contra o CMV. Desse modo, uma limitação importante desses métodos aparece quando ocorre redução na resposta imune, como pode acontecer em pacientes com imunodeficiências. Outro problema a ser considerado é a elevada prevalência de infecção pelo CMV. Por exemplo, no Brasil praticamente 90% dos indivíduos adultos apresentam anticorpos circulantes contra o CMV (92). Além disso, a dificuldade em diagnosticar infecções em indivíduos intensamente imunodeficientes é limitação importante das técnicas sorológicas, pois na prática clínica é fundamental o diagnóstico e a terapêutica precoces (139).

A grande utilidade e aplicação dos métodos sorológicos ocorre na fase de preparação para transplante de órgãos. Pacientes que não tiveram contato com o CMV apresentam risco de desenvolver infecções primárias. Pacientes com contato prévio com o vírus desenvolvem infecções secundárias, que podem ser reativações ou reinfecções. As infecções primárias tendem a ser graves com maior incidência da complicação mais temida que é a pneumonite. As reativações tendem a ser benignas e as reinfecções apresentam gravidade intermediária (22, 64, 95, 130, 143).

Os principais métodos sorológicos utilizados para o diagnóstico das infecções pelo CMV podem ser divididos em clássicos e modernos (23, 85, 139).

Os métodos clássicos não discriminam anticorpos IgM e IgG e dentre estes são mais comuns: neutralização viral e fixação complemento.

Os métodos modernos por sua vez discriminam anticorpos IgM e IgG sendo mais comumente utilizados os de imunofluorescência, radioimunoensaio e imunoenaios enzimáticos.

A neutralização viral foi a primeira técnica com aplicação clínica no diagnóstico de CMV. É um método difícil e apresenta leitura demorada pois é necessário incubar o soro em teste com uma amostra do vírus e após isso, cultivá-lo. Devido à demora no cultivo celular, a neutralização viral vem sendo abandonada como método diagnóstico.

A fixação de Complemento (FC) para diagnóstico da infecção pelo CMV é uma técnica muito difundida em nosso meio. Apresenta como principais vantagens a facilidade de execução, disponibilidade de antígenos no comércio e amplo espectro de reatividade cruzada entre cepas diferentes de CMV (84, 152, 153). Um aumento do título inicial, de quatro vezes ou mais em soros pareados, é considerado evidência de infecção ativa. A principal desvantagem da técnica é sua baixa sensibilidade.

Entre os métodos modernos destacam-se a imunofluorescência indireta (IFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA), e o radioimunoensaio (RIA).

1. Imunofluorescência indireta (IFI): Possui sensibilidade adequada além de detectar diferentes classes de imunoglobulinas (108). A especificidade da IFI para IgG pode ser comprometida pelos receptores para a porção Fc de imunoglobulinas, induzidos pelo CMV nas células utilizadas como substrato na reação. As porções Fc de moléculas de imunoglobulina presentes no soro testado podem interagir com esses receptores, ocasionando resultados falso-positivos. Uma modificação técnica para superar esse problema é a utilização da IFI com anticomplemento. Nessa situação, o complemento é incubado com o soro do paciente. Somente imunoglobulinas que se ligaram especificamente (pela porção Fab e não via receptor Fc) ao seu antígeno, são capazes de ativar o

complemento. O anticorpo fluorescente secundário é dirigido contra o complemento ao invés da imunoglobulina. Portanto, a fluorescência só será observada onde houve reação específica.

A IFI para anticorpos IgM por outro lado não sofre a interferência causada pelos receptores Fc. A expectativa para a detecção de IgM era de que pudesse permitir diagnóstico de infecção primária. No entanto, a IgM se eleva tanto em infecções primárias como em reativações ou reinfeção e persiste por período prolongado (4 meses). Além disso, merece ser ressaltado que a detecção de IgM pode revelar falsos positivos quando existe a presença de fator reumatóide nos soros testados, sendo necessária a adsorção desses soros com latex visando minorar este problema. Assim, a IFI é um método simples, com aplicação clínica confiável e com razoável sensibilidade e especificidade.

2. Imunoensaios de ligação

Radioimunoensaio (RIA)

Imunoensaio enzimático (ELISA)

Ambos utilizam os mesmos princípios analíticos mudando apenas o tipo de substância reveladora empregada na leitura. Os RIA utilizam substâncias radioativas. Para o ELISA emprega-se uma enzima (28). O antígeno purificado é imobilizado numa placa de plástico, onde o soro a ser testado é adicionado. Se na amostra existirem anticorpos contra o antígeno imobilizado, ocorrerá a ligação entre os 2 imunorreagentes. A seguir o sistema é lavado, removendo-se os anticorpos não ligados. Na etapa seguinte, adiciona-se à placa um conjugado (anti-imunoglobulina humana marcada com uma enzima). Finalmente, adiciona-se um substrato que sofre a ação da enzima produzindo um produto colorido que pode ser detectado visualmente ou por fotometria. A técnica permite detectar quantitativamente diferentes classes de imunoglobulinas, possuindo boa sensibilidade e especificidade.

Entre os imunoensaios de desenvolvimento mais recentes podem ser destacados: o imunoensaio com partículas de latex, que é um dos mais promissores testes sorológicos por ter elevada sensibilidade e especificidade e ser rápido, o imunoensaio fluorescente em fase

sólida, com desempenho bom em relação aos outros testes já citados, porém o que limita seu uso é o alto custo do equipamento necessário para sua realização (8), e finalmente o ensaio com antígeno imobilizado em membrana (CMV CUBE). Este teste é rápido, com leitura visual de bom rendimento, porém de alto custo (81).

4. Identificação de antígenos virais

Estes testes podem ser realizados a partir de preparações citológicas ou cortes de tecidos. Após fixar a preparação, é usado um anticorpo monoclonal anti-antígeno precoce imediato do CMV, como anticorpo primário. Em geral o anticorpo secundário é um anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo (porque a maioria dos anticorpos monoclonais são produzidos em células desta espécie). Em geral, o anticorpo secundário é conjugado a uma sonda enzimática ou fluorescente. A leitura, dependendo do conjugado, é feita no microscópio apropriado, observando a presença do substrato enzimático ou de fluorescência no núcleo das células infectadas. O tempo total do exame é inferior a 6 horas e a sensibilidade da técnica é boa. No entanto, os resultados da literatura em relação a esse exame são discrepantes, provavelmente devido às diferentes procedências dos anticorpos monoclonais usados nessa metodologia. Esses anticorpos monoclonais devem diferir quanto à capacidade de reconhecer o CMV nas amostras clínicas examinadas (3, 6, 11, 43, 45, 52, 127, 148).

5. Identificação de ácidos nucleicos

5.a. Hibridização de DNA

O desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante com a conseqente clonagem e caracterização do CMV, tornou possível a detecção do CMV em amostras biológicas por meio de hibridização com sondas específicas para o CMV. Os métodos de diagnóstico com base na hibridização de DNA apresentam vantagens significativas sobre as técnicas clássicas, entre as quais, destacam-se a precocidade no diagnóstico, sensibilidade

e especificidade. Embora represente um grande avanço na metodologia diagnóstica do CMV, essa técnica apresenta inconvenientes devido à complexidade envolvida na sua realização e a utilização de isótopos radioativos. Além disso, embora sensível, estima-se que sejam necessárias 30000 a 40000 partículas de vírus presentes na amostra para a detecção ser conseguida sem ambiguidades (2, 24, 47, 66, 134).

5.b. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Finalmente, com a introdução da amplificação de DNA por meio da reação em cadeia catalisada pela polimerase (PCR), a detecção do CMV foi levada a efeito em amostras contendo pequeno número de partículas do vírus. A amplificação gênica pela reação em cadeia catalisada pela polimerase ("polymerase chain reaction - PCR") é um método recentemente introduzido em biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas (119). Basicamente esse procedimento permite a amplificação de um fragmento específico de DNA escolhido pelo investigador, cuja concentração final excede em milhares de vezes à do restante do DNA presente na amostra analisada (132). Todos os métodos anteriormente empregados no estudo de um determinado fragmento de DNA tinham como objetivo comum aumentar a sensibilidade da detecção do fragmento alvo, que está presente em baixa concentração na amostra. Contrastando com essa orientação, a PCR é capaz de aumentar significativamente o número do fragmento gênico escolhido por meio da síntese enzimática de numerosas cópias (10^5 - 10^6) do fragmento original (18, 26, 37, 38, 97, 99, 124).

De fato, é possível conseguir expressiva amplificação do fragmento de DNA originário de uma única partícula viral (107). De maneira sucinta, esse procedimento consiste em repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de dois "primers" com orientações opostas, isto é, dois segmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos com sequências complementares às duas extremidades do fragmento alvo, e levados a efeito por uma reação enzimática mediada pela polimerase de atividade em elevadas temperaturas ("Taq polimerase"). Cada ciclo de reação de amplificação é constituído por três fases distintas:

1. separação das hélices do DNA a ser amplificado;
2. ligação complementar entre os "primers" e o DNA e
3. 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 no ciclo precedente. Assim, o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial, o que faculta no final de 30 ciclos um aumento da ordem de 10^6 cópias, partindo-se de uma única célula.

Embora este teste seja extremamente sensível, algumas considerações devem ser ressaltadas. Em primeiro lugar essa propriedade faz com que a contaminação da amostra por produtos de amplificações prévias possa conduzir a resultados falso positivos. Para se evitar esse problema são necessários procedimentos especiais no laboratório (72). Além disso, merece ser destacado que trata-se de uma reação enzimática e várias substâncias presentes no material examinado podem inibir a reação, levando a resultados falso negativos (12, 69).

A análise de amostras microbiológicas para a detecção de agentes infecciosos inclui-se entre as mais promissoras aplicações da PCR. A elevada sensibilidade da PCR permite a detecção de quantidades reduzidas de partículas virais (DNA ou RNA), facilitando assim o diagnóstico de indivíduos doentes mas com pequeno número de células infectadas, o que, com os métodos classicamente empregados, seria de difícil concretização. A amplificação gênica vem sendo utilizada na detecção do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV) e é mais sensível que os métodos sorológicos habituais. Além do HIV, numerosos outros vírus podem ser detectados pela PCR, como papilomavírus, vírus da hepatite B, rinovírus e HTLV-I. Adicionalmente, algumas bactérias patogênicas de difícil identificação pelos métodos microbiológicos rotineiros também são suscetíveis de detecção pela PCR (158).

Tabela 1 - Relação de alguns agentes infecciosos detectados pela PCR (26).

Agente	Referência
Citomegalovirus	29, 125
HIV	25, 35, 74, 77, 91, 133, 138
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	36, 87, 125, 129
virus da hepatite B	68, 88, 96, 141
virus do papiloma	34, 78, 82
HTLV I	73, 106
<i>Toxoplasma gondii</i>	13, 53
<i>Trypanosoma cruzi</i>	86
<i>Chlamidia trachoma</i>	32
Rinovirus	42
<i>Rickettsia rickettsii</i>	157
virus Epstein-Barr	120
<i>Borrelia burgdorferi</i> (Lyme disease)	98
virus respiratório sincial	159
<i>Herpes simplex</i>	7, 102, 112
Parvovirus B19	158
virus do sarampo	61
Mycoplasma	9
<i>Neisseria meningitidis</i>	71
<i>Pneumocystis carinii</i>	148
Rotavirus	156

Vários relatos recentes da literatura mostram que a PCR pode ser extremamente útil na detecção de infecção pelo CMV em transplantados e em recém-nascidos, utilizando-se como substrato sangue ou urina (14, 29, 49, 59, 62, 63, 89, 90, 105, 113, 126, 131, 147).

7. CMV e transplantes renais no Brasil

No Brasil existem poucos trabalhos a respeito da infecção pelo CMV em transplantes renais. Estes relatos foram conduzidos, em sua maioria, com o emprego unicamente de métodos sorológicos, o que limita as informações obtidas. Nem todos estes trabalhos foram prospectivos e em nenhum foi levado a efeito métodos novos de detecção sorológica como ELISA ou ensaios com antígeno imobilizado em membrana.

Pannuti e colaboradores em 1978 (94) estudaram prospectivamente 33 pacientes submetidos a transplante renal na UTR do HC.FMUSP através da dosagem de anticorpos (fixação complemento) em amostras seriadas de soro. Observou que 22 destes pacientes (66,6%) apresentaram evidência sorológica de infecção pelo CMV, após a cirurgia.

Ianhez e colaboradores em 1984 (60) analisaram os casos de infecção pelo CMV que ocorreram em 636 pacientes submetidos a transplante renal, na unidade de transplante renal da clínica urológica do HC da FMUSP (janeiro de 1965 a dezembro de 1982). As reações sorológicas para o diagnóstico da infecção pelo CMV foram feitas pela técnica da fixação de complemento (FC) e/ou pela técnica de imunofluorescência indireta (IF). Observaram 35 pacientes com infecção por CMV e em outros 16 casos o CMV foi encontrado na necrópsia. A partir desses dados, os autores concluíram que, em nosso meio, a infecção por CMV nos transplantados renais é pouco frequente e de pequena gravidade, contrariando os dados da literatura mundial.

Pannuti e colaboradores em 1987 (93) acompanharam 27 pacientes submetidos a transplante renal na Unidade de transplante renal do HC da FMUSP, no período de 1972 a 1974. Empregou-se para a detecção de anticorpos da classe IgG a técnica da fixação de complemento (FC) e para a detecção de anticorpos IgM, a técnica de imunofluorescência

(IFIgM); servindo como fonte de antígeno a amostra AD169 do CMV mantida em culturas de células diplóides de fibroblastos. Num período de acompanhamento que variou de 28 a 425 dias (média de 115 dias) após transplante, observou-se que 20 dos 27 pacientes (74,1%) apresentaram evidências sorológicas de infecção pelo CMV. Essa alta incidência de infecção por CMV está de acordo com as taxas observadas por numerosos investigadores que estudaram prospectivamente pacientes submetidos a transplante renal. No entanto, o impacto clínico desta infecção não foi avaliado.

Suassuna e colaboradores em 1990 (140) estudaram prospectivamente 19 pacientes submetidos a transplante renal no Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), durante 8 meses em 1985. A detecção de CMV foi feita por isolamento viral e sorologia (FC e IFI). Dos 19 pacientes seguidos, 9 (48%) desenvolveram infecção por CMV e 5 (26%) apresentaram manifestações clínicas.

OBJETIVOS

Devido ao exposto e à escassez de dados sobre a infecção pelo CMV em transplantados renais no Brasil, os objetivos deste trabalho foram:

1. Tendo em vista a importância da detecção precoce da infecção, implantar e padronizar um método rápido de diagnóstico, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e comparar os resultados com aqueles obtidos com IFI e ELISA.
2. Estudar prospectivamente um grupo de transplantados renais em seguimento no Hospital de Clínicas da UNICAMP e determinar a incidência da infecção e doença pelo CMV.
3. Verificar o impacto clínico causado pela infecção por CMV nos transplantados renais aqui estudados.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Casuística

Foram estudados prospectivamente 37 pacientes submetidos a transplante renal na Disciplina de Nefrologia da FCM da UNICAMP e seus respectivos doadores, no período de outubro/1990 a setembro/1992. A idade dos pacientes na época do transplante variou de 10 anos a 49 anos (média = 29,7 anos), sendo 26 do sexo masculino e 11 do sexo feminino. Em relação aos doadores, 33 (89%) foram doadores vivos, familiares dos pacientes e 4 (11%) foram doadores cadáveres. A idade média dos doadores foi de 37,9 anos.

O esquema de imunossupressão padronizado no setor de transplante renal do Hospital de Clínicas da UNICAMP seguiu os seguintes parâmetros:

A administração de drogas imunossupressoras para pacientes com doador vivo relacionado, foi iniciada 2 dias antes do transplante. Para aqueles com sistema HLA do tipo I (idênticos) foi iniciado Prednisona via oral na dosagem de 2mg/kg/dia, com redução gradual a partir do 1º dia de pós operatório. No final do 1º mês a dosagem era de 30mg por dia e no final do 2º mês, 20 mg por dia até atingirem a dosagem de manutenção de 10mg/dia no final do 3º mês. Outra droga utilizada foi a Azathioprina na dosagem de 3mg/kg/dia, iniciada 2 dias antes do transplante. Para aqueles pacientes com sistema HLA tipo II (parcialmente idênticos) foram administrados o mesmo esquema anterior, além de Ciclosporina na dosagem de 5mg/kg/dia.

O esquema de drogas para pacientes receptores de órgãos de doador cadáver foi iniciado no dia pré-transplante com prednisona e Azathioprina, nas dosagens já descritas, além de Ciclosporina, na dosagem de 7mg/kg/dia com redução gradual. Todos os transplantados receberam no dia do transplante, Metilprednisolona (500mg) em infusão endovenosa antes da cirurgia.

Os episódios de rejeição aguda foram inicialmente tratados com "pulsos" de metilprednisolona na dosagem de 500mg/dia durante 3 dias. Após 2 "pulsos", se o episódio de rejeição persistisse, era realizada terapêutica com OKT3 (anticorpo-antilinfocitário) durante 10 dias (1 frasco EV/dia) com suspensão de Azathioprina e Ciclosporina que eram reintroduzidas no 8º dia de uso do OKT3.

Os critérios para inclusão dos pacientes nesse estudo foram: 1) sobrevivência do paciente e do rim transplantado de pelo menos 4 semanas, 2) imunossupressão mantida, 3) disponibilidade de amostras seriadas adequadas de sangue e urina para a realização dos testes sorológicos e de biologia molecular. Foram colhidos sangue e urina antes da cirurgia, de 43 pacientes, porém só 37 preencheram os critérios acima. Os 37 pacientes selecionados para esse estudo foram seguidos prospectivamente por um período próximo a 12 meses após o transplante, com exceção do nº 4. No dia anterior à cirurgia foram colhidas amostras de sangue e urina do receptor e de seu respectivo doador. A intervalos regulares, geralmente mensais, durante as consultas clínicas ao Ambulatório de Nefrologia da FCM da UNICAMP, foram colhidas pela autora, amostras de sangue e urina. O acompanhamento clínico obedeceu à rotina estabelecida no serviço de Nefrologia da FCM da UNICAMP.

Todos os pacientes (receptores de rim) que participaram desse trabalho e seus doadores foram informados sobre os procedimentos a serem adotados e concordaram com a sua realização. Nos casos de doador cadáver (2), a família concordou com a colheita do material necessário ao estudo.

A Tabela II mostra os dados clínicos dos transplantados renais e de seus respectivos doadores.

Tabela II. Dados clínicos dos transplantados renais e de seus respectivos doadores.

Receptor	Sexo	Idade (anos)	Diagnóstico causa IRC	Transfusões antes TX	Doador (parentesco)	Idade (anos)	HLA
1. AJS	M	39	I	sim	irmão	38	I
2. MAL	M	10	esclerose glomerular difusa	sim	mãe	32	II
3. TSR	F	42	pielonefrite crônica	sim	irmão	35	II
4. RAR	M	11	pielonefrite crônica	sim	mãe	30	II
5. JNC	M	27	D. Alport	sim	mãe	54	II
6. FNN	M	21	GN esclerosante	sim	irmão	32	I
7. LJA	M	30	síndrome nefrótica	sim	irmão	29	II
8. AMR	F	44	I	sim	irmã	45	I
9. MMK	M	18	esclerose glomerular focal	sim	mãe	50	II
10. JRSS	M	21	I	sim	pai	48	II
11. TF	F	34	GNC	sim	irmão	22	I
12. DAM	M	44	I	sim	cadáver	16	
13. DGA	M	42	I	sim	cadáver	16	
14. JJP	M	37	I	sim	irmão	23	II
15. VBA	F	50	I	sim	filho	31	II
16. OB	M	32	I	sim	mãe	56	II
17. CDF	M	21	I	sim	mãe	47	II
18. RPA	M	25	I	sim	irmão	29	II

Continuação - Tabela II

Receptor	Sexo	Idade (anos)	Diagnóstico causa IRC	Transfusões antes TX	Doador (parentesco)	Idade (anos)	HLA
19. ESP	M	28	GN membrano proliferativa	sim	irmão	35	II
20. JVF	M	49	I	sim	irmão	37	I
21. ASI	M	31	GN proliferativa focal	sim	irmão	28	I
23. JMF	M	36	I	não	irmã	45	I
24. CSB	F	32	nefropatia diabética	sim	pai	62	II
25. GCS	M	27	GNC	sim	irmã	29	II
26. MGS	F	18	pielonefrite crônica	sim	mãe	36	II
27. JBF	M	36	I	sim	irmão	34	II
29. GCS	M	34	GNC	sim	mãe	53	II
30. RP	M	21	I	sim	pai	39	II
31. AS	M	25	pielonefrite crônica	sim	mãe	47	II
32. MFA	F	33	nefropatia lúpica	sim	mãe	56	II
35. PSBD	M	38	nefropatia diabética	sim	irmã	40	II
37. JAL	M	33	I	não	irmão	26	II
38. MHC	F	23	síndrome nefrótica	sim	pai	50	II
39. ISO	F	35	GN lúpica	sim	irmão	47	II
41. IEP	M	23	GN membrano proliferativa tipo I	sim	irmã	37	II
42. LA	F	12	pielonefrite crônica	sim	cadáver	10	
43. JCO	M	18	D. Berger (clínico)	sim	cadáver	10	

IRC - Insuficiência renal crônica

GNC - Glomerulonefrite crônica

GN - Glomerulonefrite

I- Indeterminada

Métodos

Neste trabalho foram levados a efeito dois tipos de métodos para o diagnóstico de CMV: técnica sorológica para detecção de anticorpos da classe IgG e IgM contra o CMV tanto por ELISA como por Imunofluorescência indireta; e a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de partículas virais na urina. O resultado da amplificação da PCR foi analisado através de visualização direta em gel de agarose a 2%, por meio de hibridização com a técnica de "Southern blot" e pela técnica de "Dot-blot", após hibridização com sonda homóloga, marcada com ^{32}P .

A. DETECÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS NA URINA PELA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Para a PCR foram colhidas amostras de urina que foram armazenadas a -70°C até sua utilização.

A técnica empregada neste trabalho para detecção de partículas virais pela PCR foi adaptada dos relatos clássicos e pioneiros da literatura sobre o assunto (28, 126).

A detecção de partículas de CMV pela PCR em amostras de urina, particularmente em pacientes submetidos a transplantes renais e em recém-nascidos, aparentemente muito sensível, correlaciona-se bem com a cultura viral, além de permitir elevado grau de simplicidade no preparo da amostra (28, 126).

A.1. Iniciadores ("primers")

Em seu conjunto foram utilizados nesse trabalho três pares de iniciadores (Tabela III), com o objetivo de amplificar regiões distintas do genoma do vírus. Essas regiões foram escolhidas porque são relativamente conservadas nas diversas cepas de vírus, e são específicas para o CMV, pois não amplificam DNA de outros herpes-virus. A descrição

desses "primers" e as referências bibliográficas em que foram utilizados encontram-se na Tabela III.

Tabela III. Iniciadores utilizados para amplificação de partículas de CMV (28, 126, 136).

"Primer"/Sonda	Sequência 5' - 3'	número de bases	tamanho do produto	*localização no genoma CMV
"Primer"-MIE4	CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAGCC	25	435 pb	731-755
"Primer"-MIE5	CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG	25		1165-1150
Sonda-MIE	CAGGCTATTGTAGCCTACACTTTGG	25		900-925
"Primer"-LA1	CACCTGTCACCGCTGCTATATTTGC	25	400 pb	2101-2125
"Primer"-LA6	CACCACGCAGCGGCCCTTGATGTTT	25		2500-2476
Sonda-LA	GTCGCCTGCACTGCCAGGTGCTTCG	25		2301-2325
"Primer"-IE1	CCACCCGTGGTGCCAGCTCC	20	159 pb	referências
"Primer"-IE2	CCCGCTCCTCCTGAGCACCC	20		126 e 136
Sonda-IE	CTGGTGTCACCCCCAGAG	18		

MIE - Major Immediate-early antigen region of CMV strain Towne

LA - late antigen region of CMV strain AD169

IE - Immediate-early antigen.

* expressa como número do nucleotídeo; os nucleotídeos são numerados em sequência dentro de cada gene.

A.2. Preparo da amostra

Em todos os experimentos foram utilizadas amostras de urina sem nenhum tratamento prévio. Na fase inicial de padronização também foram testadas amostras de urina aquecidas a 95°C por 5 minutos, após purificação do DNA utilizando "Gene Clean" (segundo instruções do fabricante - BIO 101, EUA) ou DNA extraído com guanidina e precipitado com etanol (121).

A.3. Reação de amplificação

A reação em cadeia da polimerase seguiu o método descrito por Demmler (28) e Shibata (126), com algumas modificações.

A mistura da reação consistiu de um volume total de 100 μ l, contendo 2 μ l da amostra, solução tampão para a enzima Taq polimerase (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5mM MgCl₂, 0,01% gelatina), 100pm de cada primer, 200 μ M da mistura de nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) e água. O volume de amostra foi escolhido após numerosos testes com volumes variáveis de 0,5 a 10 μ l.

As reações da PCR (Polymerase Chain Reaction) foram efetuadas em aparelho ciclador de temperatura "DNA Thermal Cycler" Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA).

Inicialmente as amostras foram aquecidas a 94°C por 6 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que pudesse interferir com a reação enzimática. Posteriormente, 2,5 unidades de Taq polimerase foram adicionadas à mistura. Ao volume final foram acrescentados 20 μ l de óleo mineral, para impedir evaporação.

As condições de reação consistiram de 40 ciclos de variações de temperatura. Cada ciclo consistia de desnaturação a 94°C por 90 segundos, anelamento a 55°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 120 segundos. No último ciclo foi levado a efeito um período de extensão mais longo de 7 minutos.

Em todas as reações realizadas foram usados controles negativos e positivos. Como controle positivo, usou-se CMV cepa AD169 oriundo de cultura celular e como controle negativo amostras de água.

Os seguintes cuidados especiais foram tomados para se evitar contaminação das amostras durante a reação (72):

- As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em sala diferente (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.

- Foi utilizada sempre a mesma pipeta para a amostra contendo o vírus CMV (controle positivo). Essa pipeta não foi usada para se processar nenhuma outra amostra.

- Antes da abertura de tubos de microcentrífuga era efetuada rápida centrifugação para concentrar o líquido contido no tubo, na região inferior e evitar sua dispersão por aerossol.

- Todo material plástico usado era novo e não autoclavado, pois no procedimento de esterilização por autoclave poderia ocorrer contaminação por partículas previamente amplificadas.

- Máscaras e luvas foram utilizadas durante todo o procedimento.

A.4. Detecção do fragmento amplificado

A.4.1. Eletroforese em agarose

O material amplificado foi visualizado diretamente após eletroforese em gel de agarose 2%. O gel foi preparado em tampão TBE (Tris 0,089M, borato 0,089M, EDTA 0,01M pH 7,5) e após eletroforese a 100V por 2 horas, corado com brometo de etídio, os fragmentos foram visualizados em luz ultra-violeta e fotografado pelo sistema Polaroid.

A.4.2. Fixação do DNA amplificado em filtros de nylon como "Dot-blot"

Foram utilizados 50 μ l do DNA amplificado para cada amostra, acrescidos de 350 μ l de solução de NaOH 0,4N e EDTA 25mM. Após homogeneização vigorosa, a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi aquecida a 95°C por 2 minutos e colocada em gelo até ser aplicada em uma membrana de nylon por sucção à vácuo, no sistema de "dot-blot", com posterior fixação por aquecimento a 80°C por 2 horas.

A.4.3. Fixação do DNA por meio de "Southern blot"

Após eletroforese em gel de agarose a 2%, o material foi transferido para filtros de nylon pelo método de transferência alcalina (121). O tampão alcalino de transferência era constituído por: NaOH 0,5N, 1,5N NaCl.

A transferência foi feita pelo método "seco", isto é, sobre o gel foi colocado o filtro de nylon, papel de filtro e papel toalha. O único tampão utilizado foi aquele contido no próprio gel. O tempo de duração da transferência foi ao redor de 12 horas, o que resultava em transferência total do DNA da agarose para o filtro. Após a transferência a membrana era neutralizada por 2 minutos em tampão 0,45M NaCl, 0,5M Tris-HCl pH 7,5. Após secagem, o DNA era estabilizado pelo aquecimento a 80°C por 2 horas.

A.4.4. Marcação das sondas com isótopos radioativos

A reação de marcação dos oligonucleotídeos foi realizada em solução contendo 10pmoles da sonda, 5 unidades de T4 polinucleotídeo quinase (USB), 8 μ l de ³²P ATP Amersham (5000 Ci/mmol; 10 μ Ci/ μ l), em tampão 50mM Tris-HCl pH 7,6; 10mM MgCl₂; 0,5mM DTT (dilitreititol); 0,1mM espermidina; 0,1mM EDTA, com volume final de 50 μ l (modificado de Sambrook *et al.*, 1989). A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas, parando-se a reação com 100 μ l de TNE (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA). Fez-se 1 extração v:v com fenol/clorofórmio e 1 extração v:v com clorofórmio. Após

purificação em coluna de Sephadex G50, a eficiência da marcação foi avaliada pela leitura da radioatividade em solução obtida pela diluição de 1ul de sonda em 3ml de líquido de cintilação (contador de cintilação líquida LS 5000 TA-Beckman).

A.4.5. Pré-hibridização e hibridização

Os procedimentos para os filtros obtidos por "Dot blot" ou "Southern blot" foram idênticos.

Pré-hibridização:

Os filtros foram colocados no interior de um recipiente plástico flexível contendo 10 ml de tampão de hibridização (concentração final: 5X SSPE*, 5X Denhardt's** e 0,5% SDS) e incubados por 2 horas à temperatura de 42°C.

* SSPE 20X: 175,3g NaCl, 27,6g NaH₂PO₄H₂O, 7,4g EDTA para 1000ml de água.

** Denhardt's 50X: 5g Ficoll 400, 5g polivinilpyrrolidone, 5g BSA (bovine serum albumine) para 500ml de água.

*** SDS: Duodecil sulfato de sódio

Hibridização:

Após a pré-hibridização, as sondas previamente marcadas foram adicionadas a recipientes plásticos, após desnaturação por 2 minutos a 95°C, e incubadas por 16 horas à temperatura de 42°C. Foram realizadas 3 lavagens, sendo as 2 primeiras em temperatura ambiente, por 5 e 15 minutos, em solução contendo 2X SSPE, 0,1% SDS. A seguir, foi realizada a última lavagem à temperatura de 65°C por 10 minutos com solução contendo 5X SSPE, 0,15% SDS. Após a hibridização os filtros foram secos e expostos em filme de raio X em intervalos variados de 4 a 12 horas, a -70°C, com a utilização de intensificadores de imagens para autorradiografia.

B. MÉTODOS SOROLÓGICOS

Para as reações sorológicas foram colhidos 8ml de sangue em tubo estéril seco. Após a separação dos soros, os mesmos foram armazenados a -20°C até sua utilização.

B.1. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

B.1.1. Determinação de IgM anti-CMV por ELISA:

As determinações de anticorpos IgM anti-CMV por ELISA foram realizadas utilizando-se kits comerciais "ETI-CYTOK-M reverse (Sorin Biomedica, Itália) baseados na captura de anticorpos da classe IgM, segundo as especificações do fabricante.

Resumidamente, 100 μ l de amostras de soros diluídas a 1:101, foram adicionadas a orifícios de placas de ELISA, sensibilizados com anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-IgM humana. Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas 4 vezes com solução salina tamponada com fosfatos (SST), contendo Tween 20 (TW). A seguir, concentrações apropriadas de antígeno de CMV e conjugado (anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-CMV marcado com peroxidase) foram misturados, e 100 μ l dessa solução foram adicionados aos orifícios e as placas foram deixadas em repouso por 1 hora a 37°C. As placas foram então lavadas com SST-TW, como já descrito, e 100 μ l do sistema substrato (tetrametilbenzidina-peróxido de hidrogênio) foram adicionados aos orifícios. Trinta minutos após a adição do sistema substrato, as reações foram bloqueadas adicionando-se aos orifícios 200 μ l de ácido sulfúrico 1N. As absorbâncias das reações foram lidas a 450, 630nm, utilizando-se uma leitora de ELISA (ETI-SYSTEM READER, SORIN BIOMEDICA, 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.

B.1.2. Determinação de IgG anti-CMV por ELISA:

As determinações de anticorpos IgG anti-CMV por ELISA foram realizadas utilizando-se kits comerciais da marca Sorin, segundo as especificações do fabricante. Resumidamente, 100 μ l de amostras de soros diluídas a 1/505 foram adicionados a orifícios de placas de ELISA, sensibilizados com antígeno de CMV (AD 169). Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas 4 vezes com SST-TW. A seguir, 100 μ l da diluição apropriada do conjugado (IgG de cabra anti-IgG humana marcada com peroxidase) foram adicionados aos orifícios e as placas foram deixadas em repouso, por 1 hora, a 37°C. As placas foram então lavadas com SST-TW, como já descrito, e 100 μ l do sistema substrato (tetrametilbenzidina-peróxido de hidrogênio) foram adicionados aos orifícios. Trinta minutos após a adição do sistema substrato, as reações foram bloqueadas adicionando-se aos orifícios 200 μ l de ácido sulfúrico 1N. As absorbâncias das reações foram lidas a 450, 630nm, utilizando-se uma leitora de placas de ELISA. Todas as reações foram realizadas em duplicata e a média das DO foram consideradas. Em cada ensaio, uma curva padrão contendo diferentes concentrações de soros padrões com concentrações conhecidas de anticorpos anti-CMV, expressos em Unidades/ml (U/ml) foi incluída. As absorbâncias das reações foram convertidas automaticamente em U/ml através de um programa específico (ETI-SYSTEM SOFTWARE). Amostras com atividade específica maiores que 5 U/ml foram consideradas reagentes. Todas as amostras de soro de cada paciente, sempre foram testadas simultaneamente, na mesma placa de ELISA, para minimização das variações inter-ensaio.

B.2. Imunofluorescência indireta

Segundo técnica descrita por Reynolds *et al*, 1979 (108).

B.2.1. Cultivo de células:

Utilizou-se linhagem celular diplóide de fibroblastos humanos: células prepuciais (PF), doadas pelo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. As células foram cultivadas em meio EAGLE com sais de EARLE contendo 1% de L-glutamina e 10% (meio de crescimento) e 2% (meio de manutenção) de soro fetal bovino (SIGMA, EUA), inativado

pelo calor. Foi adicionado também 2% de uma solução de antibióticos (Penicilina 100 U/ml e estreptomicina 0,1mg/ml) e também bicarbonato de sódio 8,4% para ajuste do pH do meio para 7,2.

As colônias de células foram mantidas em frascos plásticos com tampa selada, a 37°C, em estufa comum.

B.2.2. Fonte de antígeno:

A estirpe AD 169 do CMV, doada pelo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, foi utilizada como fonte de antígeno.

B.2.3. Efeito citopático:

Após inoculação do vírus, as colônias celulares infectadas foram observadas diariamente em microscópio invertido Zeiss. A presença de infecção por CMV foi detectada pelo aparecimento do efeito citopático característico (CP). Quando esse efeito era evidente, as células se tornavam globosas, tendendo a destacar-se da parede do frasco. Acometendo 70 a 100% das células, estas eram colhidas para o preparo das lâminas.

B.2.4. Preparo das lâminas com o antígeno:

As células infectadas pelo CMV AD 169 foram removidas do frasco por EDTA-tripsinização, formando uma suspensão com o meio de cultivo. Estas células foram misturadas com células não infectadas na proporção de 3:1 (as células não infectadas participam como controle interno do teste). Após centrifugadas e lavadas com solução salina tamponada com fosfato (SST) por 3 vezes, 1 gota desse material (cerca de 10 microlitros) correspondendo a aproximadamente 40 células/campo foi aplicada sobre áreas circulares previamente demarcadas sobre a superfície ("spots") das lâminas de microscopia.

Após a secagem as lâminas foram fixadas em acetona gelada por 10 minutos, sendo estocadas a -70°C até o seu uso.

B.2.5. Procedimento do teste:

Os soros a serem testados foram previamente inativados a 56°C por 30 minutos e diluídos 1/10 em solução salina tamponada com fosfato (SST) e a seguir foram adicionados 10 μl a cada "spot". As lâminas assim preparadas foram incubadas a 37°C , por 45 minutos, em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com SST por 10 minutos duas vezes e secadas sob jato de ar quente. A seguir, acrescentou-se aos "spots" uma gota de anti-IgM ou anti-IgG humanas, marcadas com conjugado de isotiocionato de fluoresceína (Dakopatts Fitc - conjugated rabbit anti-human IgM, Dinamarca ou Biolab-Mérieux-globulina anti-IgG humana ligada à fluoresceína para técnicas de IFI, França), diluídos em SST, contendo 1 mg % de Azul de Evans.

As lâminas foram deixadas em câmara úmida a 37°C , durante 45 minutos e a seguir lavadas 2 vezes com SST, como já descrito, e 1 vez durante 1 minuto com água destilada. Após as lavagens, foram secadas sob jato de ar quente e montadas com lamínula e glicerina tamponada. A leitura do teste foi realizada em microscópio de fluorescência Leitz com lâmpada de mercúrio.

Para afastar a possibilidade de resultado falso positivo ocasionado pela presença eventual do fator reumatóide (anticorpos IgM contra anticorpos IgG) nos soros testados, as amostras IgM positivas foram adsorvidas com suspensão de partículas de látex sensibilizadas com IgG humana (látex Fr Labtest, EUA, sistemas para diagnóstico Ltda). Foram considerados positivos apenas os soros que após esta adsorção apresentaram imunofluorescência específica na diluição maior ou igual a 1:10.

Sempre foram utilizados nos testes, soros controles positivo e negativo para IgM e IgG, com títulos conhecidos, doados pelo Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

B.2.6. Interpretação do teste:

1. Foi considerada reação positiva para IgG ao observar-se: fluorescência difusa no citoplasma e núcleo celular (verde maçã-brilhante) e/ou fluorescência linear de membrana citoplasmática com destaque na área perinuclear. Foram considerados positivos os soros que apresentaram fluorescência específica, nas diluições maiores ou iguais a 1/16, conforme figuras 1 e 2.

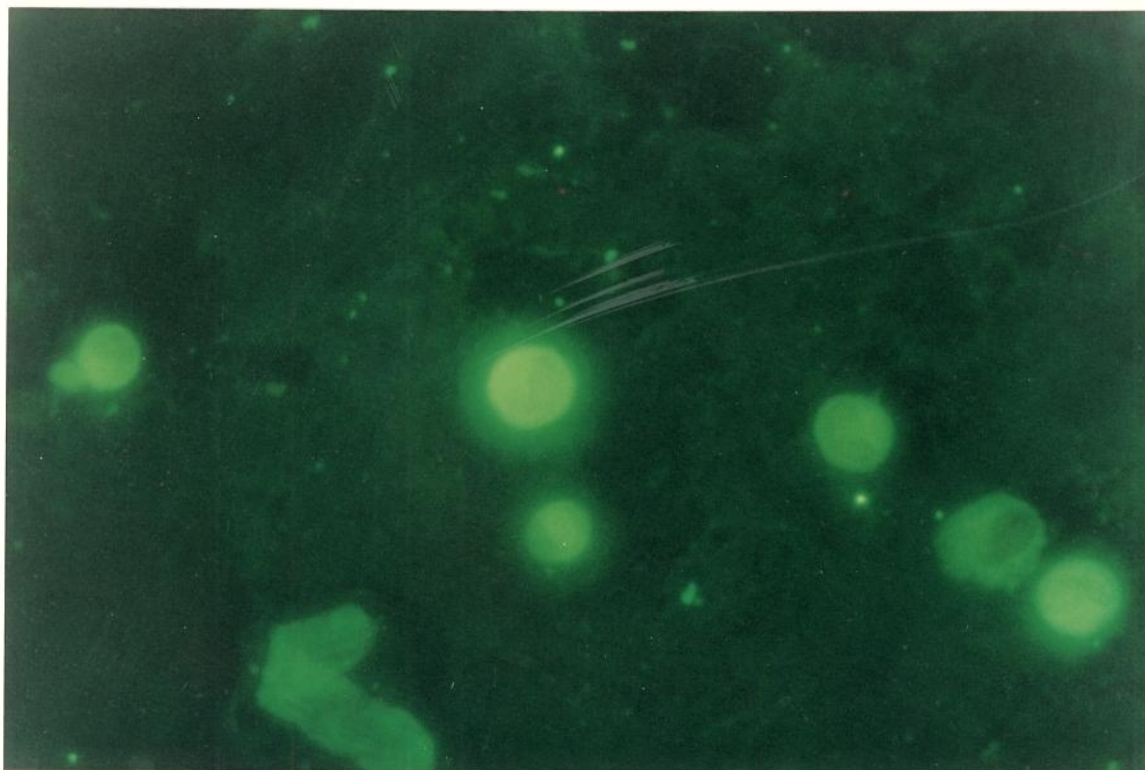


Figura 1 - Fibroblastos humanos infectados com CMV 169 e não infectados, na proporção de 3:1.
Imunofluorescência positiva para IgG (padrão difuso).

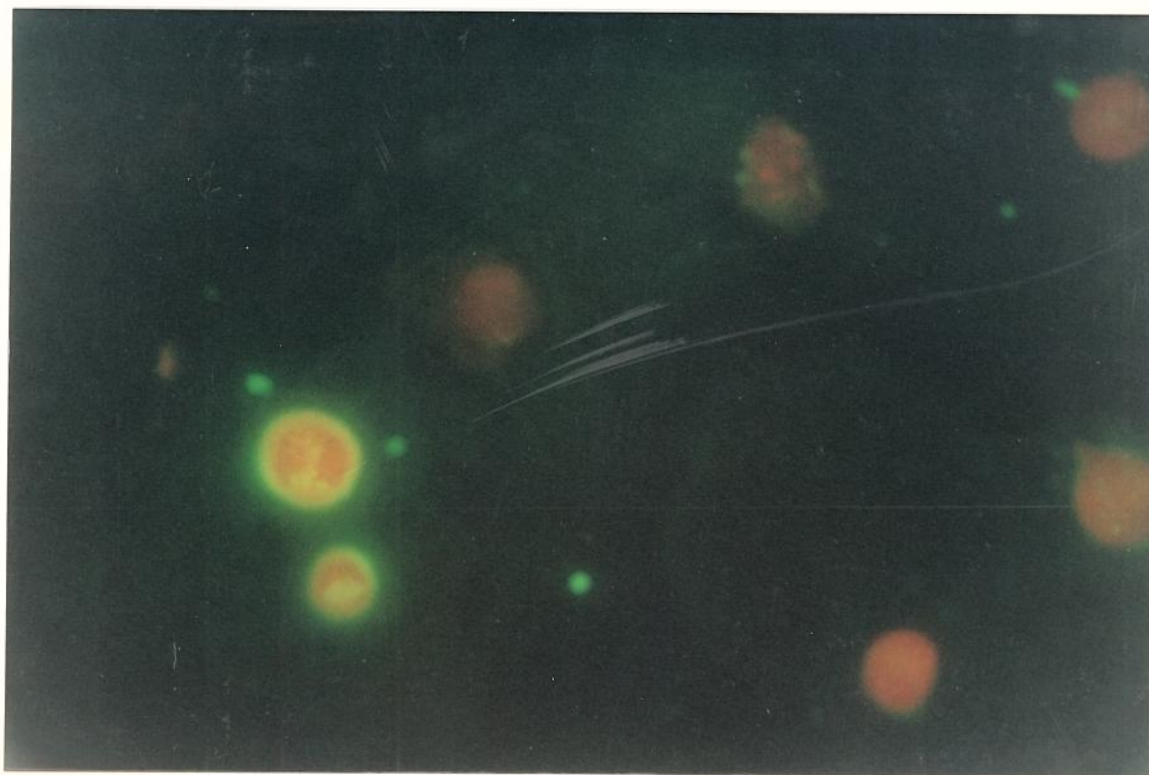


Figura 2 - Fibroblastos humanos infectados com CMV AD 169 e não infectados na proporção 3:1.
Imunofluorescência positiva para IgG (padrão de membrana).

2. Foi considerada reação positiva para IgM a presença de fluorescência nítida e brilhante disposta predominantemente na membrana celular dos fibroblastos, abrangendo todo seu contorno formando uma linha contínua (Figura 3).

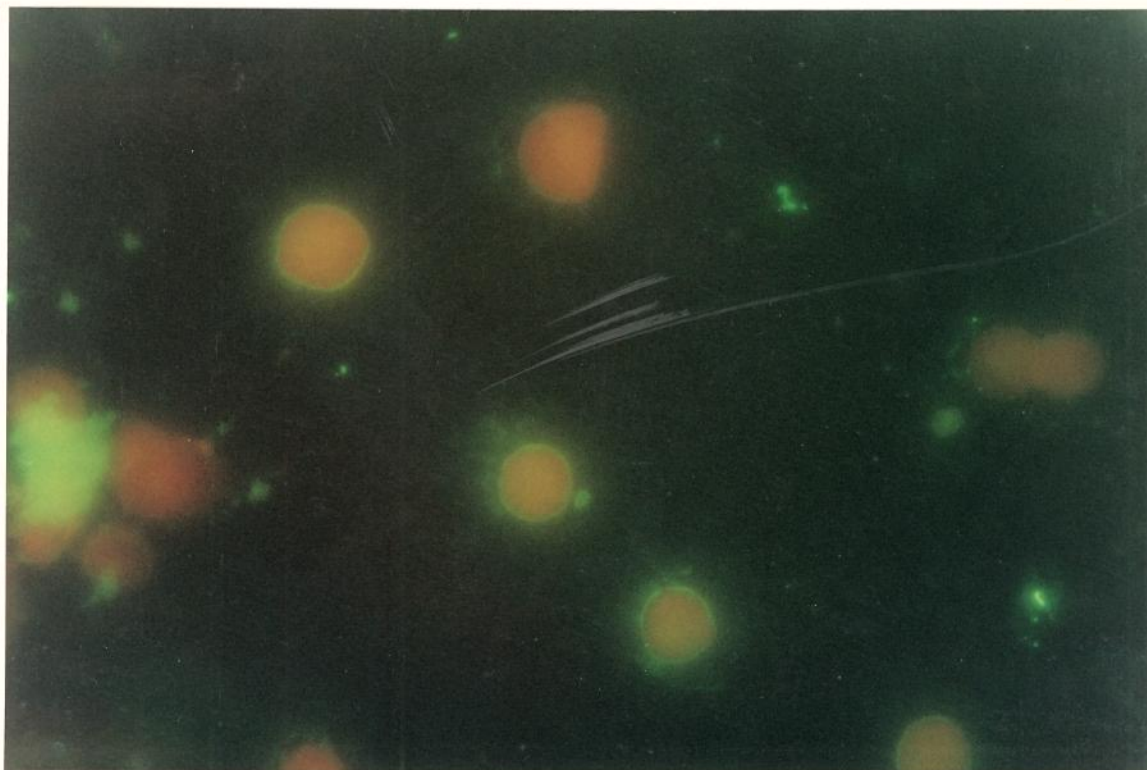


Figura 3 - Fibroblastos humanos infectados com CMV AD 169 e não infectados na proporção 3:1.
Imunofluorescência positiva para IgM.

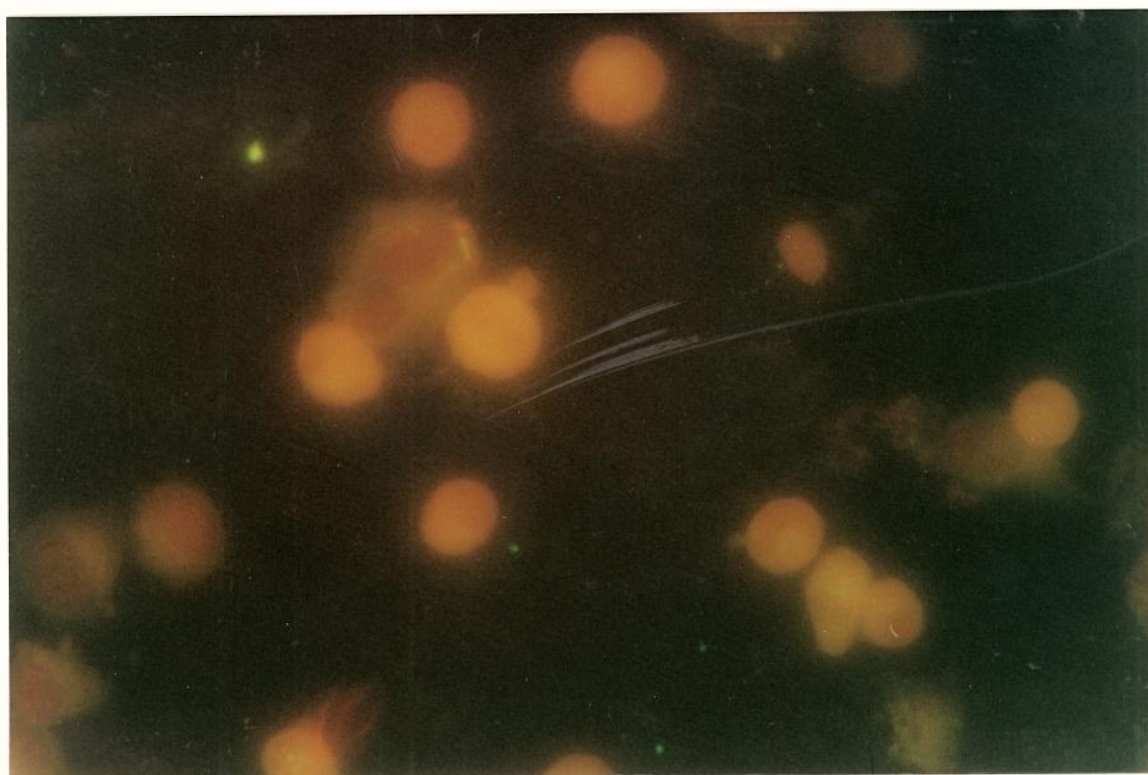


Figura 4 - Fibroblastos humanos infectados com CMV AD 169 e não infectados na proporção 3:1.
Imunofluorescência negativa para IgM.

C. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com a aplicação do programa SYSTAT.

Nas análises paramétricas de variância, com correção de Bonferroni, o nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS

Infecção pelo citomegalovírus

Os critérios para detecção de infecção ativa pelo CMV seguiram aqueles reconhecidos pela maioria dos trabalhos da literatura nessa área (16, 41, 55, 57, 60, 90, 100, 117, 118, 128, 140). Desse modo, a presença de pelo menos um dos itens abaixo foi considerada como indicativa da infecção ativa pelo CMV: 1. Positividade nos testes sorológicos em paciente com testes negativos antes do transplante (soroconversão); 2. teste positivo para detecção de anticorpos da classe IgM contra o CMV por ELISA e/ou imunofluorescência indireta em paciente anteriormente com testes negativos para essa classe de anticorpos; 3. aumento de quatro vezes ou mais do título de anticorpos da classe IgG contra o CMV, detectados por ELISA e/ou imunofluorescência indireta; 4. uma ou mais reações de PCR positivas para CMV na urina (virúria).

Para a caracterização de provável doença por CMV, além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas acima, fazia-se necessária a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo CMV: 1. febre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ no mínimo durante 3 dias; 2. leucopenia definida por uma leucometria menor que 4000 leucócitos por mm^3 ; 3. hepatite caracterizada por um aumento de duas vezes o valor máximo normal de alanina-aminotransferase (ALT); 4. pneumonite manifesta por infiltrado intersticial pulmonar e/ou sintomas respiratórios acompanhados de hipoxemia (após excluir a possibilidade de hipervolemia); 5. disfunção renal com aumento de creatinina sérica em 1 mg/dl e 6. dores mioarticulares.

I. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

I.1. Detecção direta do fragmento amplificado e "Southern blot":

A detecção direta do fragmento amplificado foi sempre inequívoca no controle positivo (cultura de vírus - cepa AD 169 CMV) com todos os pares de "primers" utilizados. O par de "primers" MIE4 e MIE5 foi aquele em que o rendimento da reação, e portanto a nitidez do resultado foi sempre melhor. A Figura 5A representa a visualização da eletroforese do produto da reação em um controle e várias amostras de urina. O fragmento amplificado é claramente visível no controle (2) e na amostra 5. A hibridização do fragmento observado com uma sonda (oligonucleotídeos) específica para a região do CMV

amplificado mostrou, como esperado, reação positiva nas amostras em que o fragmento era visível (Figura 5B).

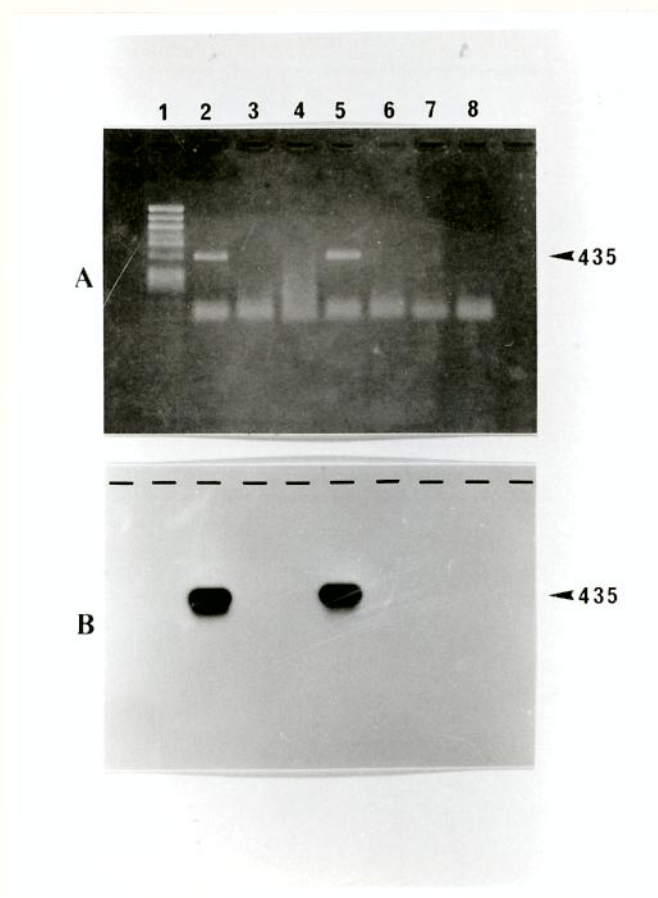


Figura 5 - A. Eletroforese em agarose 2%. 1. Marcador ØX174 HaeIII; 2. controle positivo - vírus; 3. controle negativo - água; 4 a 8 amostras de urina de transplantados renais. Observar positividade na amostra 5.

B. Autorradiografia das amostras representadas em A, transferidas para um filtro de nylon e hibridizadas com sondas específicas para o CMV ("Southern blot"). Observar que as amostras positivas correspondem as da figura A.

No entanto, uma importante limitação do procedimento de observação direta foi notado durante o desenvolvimento desse trabalho: em algumas amostras não eram observados fragmentos amplificados à visualização direta, mas a hibridização mostrava resultado positivo. Este fato, já reconhecido em outros relatos da literatura (29), indica que algumas vezes o rendimento da reação da PCR não é suficiente para a visualização do fragmento, mas existe amplificação de partículas virais. A Figura 6 ilustra um caso em que este fato ocorreu. Devido a estes achados, neste trabalho optamos por analisar todas as amostras pelo método de "dot-blot" e hibridização com sondas marcadas com isótopos radioativos.

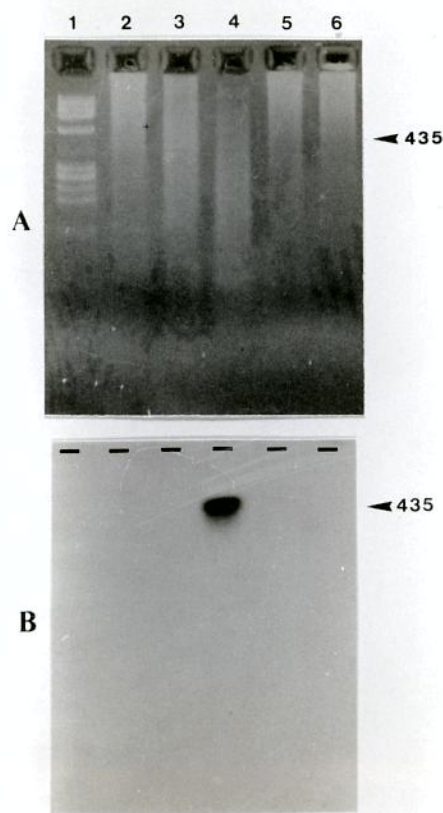


Figura 6 - A. Eletroforese em agarose 2%. 1. Marcador ØX174 HaeIII ; 2 a 6 amostras de urina de transplantados renais. Observar que nenhuma das amostras apresenta banda característica do fragmento amplificado.

B. Autorradiografia das amostras representadas em A, transferidas para um filtro de nylon e hibridizadas com sondas específicas para o CMV ("Southern blot"). Observar que a amostra de nº 4 apresenta resultado positivo, embora fosse negativa na visualização direta do gel.

I.2. Detecção de partículas virais pelo método de "dot-blot" e hibridização com sondas específicas:

Em todos os filtros sempre havia um controle positivo e um negativo. Os pares de "primers" MIE4/MIE5 e IE1/IE2 foram mais nítidos e inequívocos. Os resultados positivos foram claramente observados e praticamente não visulizamos reação de fundo ("background") significativa. A Figura 7 demonstra uma autorradiografia da hibridização alelo-específica. Desse modo, foram consideradas positivas as amostras que mostraram hibridização com pelo menos uma das três sondas utilizadas. Todas as amostras foram testadas em duplicata, com pelo menos dois pares de "primers" (em geral, MIE4/MIE5 e IE1/IE2).

Adicionalmente, foram analisadas amostras de 20 indivíduos controles (pessoal técnico e médico do Hospital), e em todas o resultado foi negativo.

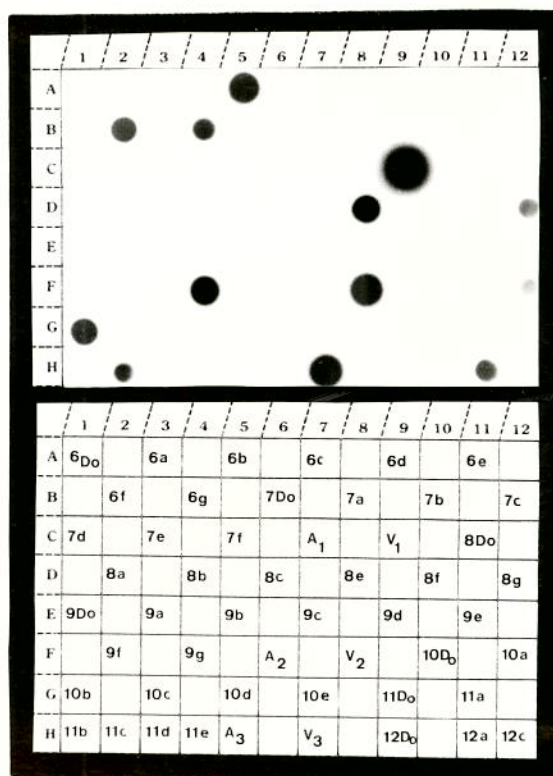


Figura 7. Acima. Hibridização alelo-específica. Abaixo. Mapa de localização referente à autorradiografia acima, com o posicionamento das amostras fixadas em filtro de nylon e hibridizadas com sonda específica para CMV. 6 a 12. amostras; A1, A2, A3 - água, controle negativo; V1, V2, V3 - vírus, controle positivo; Do. doador; a. amostras colhidas antes do transplante; b a g. amostras colhidas mensalmente após o transplante. Observar que os controles positivos V1, V2 e V3 são claramente positivos, assim como as amostras dos pacientes 6f, 10b, 11c, 9g, 6g, 6b, 8e e 12a. As amostras 8g e 10a foram consideradas, nesse experimento, como não conclusivas, e repetições posteriores mostraram que eram positivas.

A Tabela IV mostra o conjunto de resultados positivos obtidos através da reação em cadeia da polimerase, no grupo de transplantados renais estudados prospectivamente.

Tabela IV. Resultados positivos da reação em cadeia da polimerase (PCR) no grupo de transplantados renais.

Paciente	Tempo (meses) após o transplante com reação positiva
R1	8º mês
R3	1º, 2º, 3º, 9º mês
R4	pTX
R5	6º mês
R6	1º, 3º, 5º, 6º mês
R8	3º, 6º mês
R9	7º mês
R10	pTX, 2º mês
R11	2º mês
R12	pTX, 3º, 4º, 5º, 7º mês
R13	2º, 3º, 4º, 5º, 6º mês
R15	1º, 2º, 3º, 4º mês
R16	4º mês
R17	pTX, 5º mês
R21	2º, 3º, 6º, 8º mês
R23	pTX, 3º, 4º, 8º mês
R24	pTX, 1º mês
R25	3º mês
R29	pTX
R31	3º, 5º mês
R35	pTX
R39	pTX, 3º, 5º mês
R42	pTX, 1º, 6º mês
R43	3º mês

pTX - pré-transplante

R - receptor

Estes resultados permitem identificar infecção pelo CMV em 24 transplantados dos 37 estudados (64,86%). Em nenhum dos doadores foi detectado partícula viral na urina (CMV), através da reação em cadeia da polimerase.

Observa-se que 10 pacientes já apresentavam virúria antes do transplante e que a maior incidência de infecção ocorreu nos primeiros 4 meses que se seguiram ao transplante.

II. Detecção de anticorpos contra o CMV pelo método de ELISA

A Tabela V mostra os resultados do método ELISA, para imunoglobulinas da classe IgG e IgM no grupo de transplantados renais estudados prospectivamente e de seus respectivos doadores. Em seu conjunto os resultados mostram que 34 receptores, dos 37 estudados, eram soropositivos antes do transplante (91,89%) e que 32 doadores dos 35 estudados eram soropositivos (91,42%) antes do transplante.

Critério suficiente para indicar infecção ativa por CMV pela análise dos resultados encontrados para imunoglobulinas da classe IgM foi observado em 7 pacientes, dos 37 estudados (18,91%); e pela análise de imunoglobulinas da classe IgG em 16 pacientes dos 37 estudados (43,24%).

Combinando-se os resultados para as duas classes de imunoglobulinas foi possível dados indicativos de infecção em 19 pacientes dos 37 estudados (51,35%).

Tabela V. Resultados de sorologia - ELISA no grupo de transplantados renais e respectivos doadores.

Amostras	Doador	A	B	C	D	E	F	G
Pacientes								
1. IgG	36,89	30,26		100,00	97,63	96,00	100,00	
IgM	-	-		-	-	-	-	
2. IgG	27,80	28,50	33,50	100,00	135,00	80,50	74,00	80,00
IgM	-	-	-	-	-	-	-	-
3. IgG	10,00	32,50	27,00	28,00	38,00	32,00	40,00	42,00
IgM	-	-	-	-	-	-	-	-
4. IgG	-	1,12	2,49					
IgM	-	-	±					
5. IgG	12,00	13,00	7,00	> 100,00	100,00	76,50	63,5	
IgM	-	-	-	-	-	-	-	
6. IgG	8,00	13,00	11,00	9,00	9,00	9,50	9,50	13,00
IgM	-	-	-	-	-	-	-	-
7. IgG	46,51	178,12	111,20	107,08	116,24	226,00	335,00	
IgM	-	-	-	-	-	-	-	
8. IgG	100,00	99,84	37,81	173,94	204,18		200,60	204,18
IgM	-	-	-	+	+	+	+	-
9. IgG	23,00	35,00	33,00	36,50	42,00	54,43	57,52	31,59
IgM	-	-	-	-	-	-	-	-
10. IgG	6,90	17,69	20,03	19,69	17,79	16,77	15,30	
IgM	-	-	-	-	-	-	-	
11. IgG	11,00	40,00	28,00	32,00	22,00	33,00		
IgM	-	-	-	-	-	-		
12. IgG	20,58	20,68		39,79	50,20	45,64	38,41	42,87
IgM	-	-		+	+	+	+	+
13. IgG	20,58	0,64	3,63	200,00	184,46	176,44	191,14	179,10
IgM	-	-	+	+	+	+	+	+
14. IgG	25,00	30,00	30,00	350,00	450,00	310,00		
IgM	-	-	-	-	-	-		
15. IgG	17,18	87,27	69,65	164,32	143,27	170,90	159,80	156,00
IgM	-	-	-	-	-	-	-	-
16. IgG	33,00	6,045	38,58	44,85	48,00	65,00		
IgM	-	-	-	-	-	-		
17. IgG	31,07	16,18	16,27	16,18	20,21			
IgM	-	-	-	-	-			
18. IgG	-	16,97	33,79	60,22	53,39	55,10	53,64	42,93
IgM	-	-	-	-	-	-	-	-
19. IgG	22,00	80,00	75,00	30,00	300,00	310,00	250,00	250,00
IgM	-	-	-	-	-	-	-	-
20. IgG	57,00	24,00	30,00	66,00	67,00	42,00		
IgM	-	-	-	-	-	-		
21. IgG	15,00	27,00	23,00	21,00	19,00	16,00	35,00	
IgM	-	-	-	-	-	-	-	

Contin. Tabela V

Amostras	Doador	A	B	C	D	E	F	G
Pacientes								
23. IgG	40,25	8,73	31,73	39,18	101,68	26,38		
IgM	-	-	-	-	-	-		
24. IgG	6,12	130,00	300,00	1000,00	800,00	1000,00		
IgM	-	-	-	-	-	-		
25. IgG	17,00	37,00	41,00	48,00		62,00	62,00	
IgM	-	-	-	-		-	-	
26. IgG	2,42	1,36	2,10	1,19	3,09	1,19		
IgM	-	-	-	-	-	-		
27. IgG	64,00	71,00	60,00	60,00	80,00			
IgM	-	-	-	-	-			
29. IgG	65,62	35,94	28,74	30,33	37,11	42,07		
IgM	-	-	-	-	-	-		
30. IgG	133,00	9,02	82,84	68,10	70,32			
IgM	-	-	+	+	+			
31. IgG	7,01	18,27	38,77	26,77	35,81	11,45	10,23	10,35
IgM	-	-	+	+	-	-	-	-
32. IgG	110,00	48,38	77,25	219,00	145,00	66,75		
IgM	-	-	-	-	-	-		
35. IgG	33,45	18,85	15,78	25,30	258,55			
IgM	-	-	-	+	+			
37. IgG	49,74	22,50	38,50	63,52	234,60	233,50	425,33	
IgM	-	-	-	-	-	-	-	
38. IgG	49,31	127,00	190,00	197,00				
IgM	-	-	-	-				
39. IgG	61,27	44,95	19,18	158,15	234,00			
IgM	-	-	-	-	-			
41. IgG	5,68	5,77	5,77	5,22	5,61			
IgM	-	-	-	-	-			
42. IgG	25,62	38,40	83,55	268,65				
IgM	-	-	-	-				
43. IgG	25,62	33,90	98,78	197,17				
IgM	-	-	-	-				

Resultados de IgG expressos em U/ml. Valores > 5 U/ml foram considerados reagentes.

Resultados de IgM (qualitativo).

± sorologia duvidosa

- sorologia negativa

+ sorologia positiva

A, B, C, D, E, F, G - amostras seriadas de soros dos transplantados colhidas desde antes da cirurgia (A) até o seguimento final (G).

III. Detecção de anticorpos contra o CMV por imunofluorescência indireta (IFI)

A Tabela VI demonstra os resultados do método de IFI para imunoglobulinas da classe IgG e IgM no grupo de transplantados renais estudados prospectivamente. Os respectivos doadores eram soropositivos (100%) para IgG antes do transplante e nenhum deles apresentou sorologia positiva para imunoglobulinas da classe IgM.

Tabela VI. Resultados de sorologia - IFI no grupo de transplantados renais.

Amostras Pacientes	A	B	C	D	E	F	G	H
1. IgG	64		256	64	256	1000		
IgM	-		-	-	-	-		
2. IgG	1000	256	1000	1000	1000	1000	> 4000	
IgM	-	-	-	-	-	-	-	
3. IgG	256	256	1000	256	1000	1000	1000	256
IgM	-	-	-	-	-	-	-	-
4. IgG	256	256						
IgM	-	-						
5. IgG	> 4000	256	> 4000	1000	> 4000	> 4000	> 4000	256
IgM	-	-	-	-	-	-	-	-
6. IgG	256	256	256	256	256	256	256	256
IgM	-	-	-	-	-	-	-	-
7. IgG	1000	256	1000	256	256	256	1000	
IgM	-	-	-	-	-	-	-	
8. IgG	256	256	256	1000	256	1000	1000	
IgM	-	-	-	-	-	-	-	
9. IgG	64	64	64	64	64	64	1000	
IgM	-	-	-	-	-	-	-	
10. IgG	256	64	256	64	64	64		
IgM	-	-	-	-	-	-		
11. IgG	64	64	64	64	64			
IgM	-	-	-	-	-			
12. IgG	1000		1000	1000	1000	1000		
IgM	-		-	-	-	-		
13. IgG	256	256	1000	1000	1000	256	256	
IgM	-	-	+	+	+	-	-	
14. IgG	1000	1000	1000	1000	256			
IgM	-	-	+	+	-			
15. IgG	256	1000	1000	1000	1000	1000	1000	
IgM	-	-	-	-	-	-	-	
16. IgG	64	256	256	256	256	256		
IgM	-	-	-	-	-	-		
17. IgG	16	16	256	256	256	256		
IgM	-	-	-	-	-	-		
18. IgG	256	256	256	1000	256	256	256	
IgM	-	-	-	-	-	-	-	
19. IgG	> 4000	> 4000	> 4000	256	64	256	256	
IgM	-	-	-	+	+	-	-	
20. IgG	1000	1000	1000	1000	1000			
IgM	-	-	-	-	-			
21. IgG	64	64	64	64	64	64	64	
IgM	-	-	-	-	-	+	-	

Contin. Tabela VI

Amostras	A	B	C	D	E	F	G	H
Pacientes								
23. IgG	256	256	256	1000	1000			
IgM	-	-	-	-	-			
24. IgG	4000	1000	1000	1000	4000			
IgM	-	+	-	-	-			
25. IgG	1000	256	256		256	1000	1000	
IgM	-	-	-		-	-	-	
26. IgG	256	64	64	256	256	64		
IgM	-	-	-	-	-			
27. IgG	1000	1000	1000	1000				
IgM	-	-	+	+				
29. IgG	> 4000	1000	1000	1000	1000	1000		
IgM	-	-	-	+	-	-		
30. IgG	1000	1000	1000	1000				
IgM	-	+	+	+				
31. IgG	256	256	256	256	256	256	256	
IgM	-	-	-	-	-	-	-	
32. IgG	1000	1000	256	1000	1000			
IgM	-	-	-	-	-			
35. IgG	1000	1000	> 4000	> 4000				
IgM	-	-	-	+				
37. IgG	256	> 4000	> 4000	> 4000	256	1000		
IgM	+	-	-	-	-	-		
38. IgG	1000	4000	4000					
IgM	-	-	+					
39. IgG	1000	1000	1000	1000				
IgM	-	-	-	+				
41. IgG	64	256	64	256				
IgM	-	-	-	-				
42. IgG	64	256	> 4000					
IgM	-	-	-					
43. IgG	64	256	1000					
IgM	-	-	-					

Resultados de IgG expressos em título (recíproca da diluição mais alta em que se observou resultado positivo). Resultados de IgG + se título ≥ 16 , resultados - se título < 16 . Resultados de IgM + se título ≥ 10 , resultados - se título < 10 .

Segundo os dados obtidos a partir da imunofluorescência indireta é possível concluir que a totalidade da população de receptores de transplante renal estudada era soropositiva antes do transplante.

Resultados indicativos de infecção ativa por CMV pela análise das imunoglobulinas da classe IgM foram observados em 11 pacientes dos 37 estudados (29,72%); e pela análise de imunoglobulinas da classe IgG em 11 pacientes dos 37 estudados (29,72%).

A combinação dos dois resultados faculta a detecção de infecção ativa por CMV em 20 pacientes dos 37 estudados (54,05%).

Os gráficos de nº 1 a 37 representam a evolução sorológica e do PCR de cada paciente, durante todo o período de estudo (Anexo 1).

Resultados Gerais e comparativos

A Tabela VII ilustra todos os resultados obtidos com os 3 testes utilizados nesse estudo, para diagnóstico da infecção por CMV, comparando-os em todos os períodos de tempo.

Tabela VII - Resultados de sorologia (ELISA e IFI) e PCR (virúria) indicativos de infecção ativa pelo CMV nos transplantados renais.

Pacientes	Sorologia (ELISA) Doador / Receptor	PCR pré TX	Tempo pós transplante (meses)				
			PCR	ELISA		IFI	
			Virúria	IgM	IgG	IgM	IgG
1	+/+	-	8	-	-	-	8
2	+/+	-	-	-	4	-	9
3	+/+	-	1, 2, 3, 9	-	-	-	-
4	-/-	+	-	1	-	-	-
5	+/+	-	6	-	2, 3, 4, 6	-	2, 4, 6
6	+/+	-	1, 3, 5, 6	-	-	-	-
7	+/+	-	-	-	-	-	-
8	+/+	-	3, 6	1, 2, 3, 4	1, 2, 3, 4, 6	-	-
9	+/+	-	7	-	-	-	7
10	+/+	+	2	-	-	-	-
11	+/+	-	2	-	-	-	-
12	+/+	+	3, 4, 5, 7	2, 3, 4, 5, 7	-	-	-
13	+/-	-	2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6	SC (2)	2, 3, 4	-
14	+/+	-	-	-	2, 4, 10	2, 4	-
15	+/+	-	1, 2, 3, 4	-	-	-	-
16	+/+	-	4	-	2, 4, 6, 10	-	2, 4, 6, 10
17	+/+	+	5	-	-	-	5, 9, 10, 11
18	-/+	-	-	-	-	-	-
19	+/+	-	-	-	3, 4	3, 4	-
20	+/+	-	-	-	-	-	-
21	+/+	-	2, 3, 6, 8	-	-	8	-
23	+/+	+	3, 4, 8	-	3, 4	-	-
24	+/+	+	1	-	3, 6, 7	1	-
25	+/+	-	3	-	-	-	-
26	-/-	-	-	-	-	-	-
27	+/+	-	-	-	-	2, 7	-
29	+/+	+	-	-	-	7	-
30	+/+	-	-	5, 9, 11	5, 9, 11	5, 9, 11	-
31	+/+	-	3, 5	3, 4	-	-	-
32	+/+	-	-	-	4	-	-
35	+/+	+	-	4, 5	5	5	4, 5
37	+/+	-	-	-	3, 5, 6	-	1, 2, 3
38	+/+	-	-	-	-	6	5, 6
39	+/+	+	3, 5	-	5	5	-
41	+/+	-	-	-	-	-	-
42	+/+	+	1, 6	-	6	-	6
43	+/+	-	3	-	3	-	3

SC soro conversão - sorologia negativa + sorologia positiva

Tomados em conjunto, os resultados desse trabalho indicam que em 18 pacientes (48,64%), a detecção de partículas virais na urina foi concomitante a evidências sorológicas de infecção ativa pelo CMV (ELISA e/ou IFI). Em 6 pacientes somente foram obtidos resultados positivos pela reação em cadeia da polimerase. Em todos aqueles pacientes que apresentaram IgM positivo para CMV pelo método ELISA, a PCR também foi positiva, exceto para um único paciente (nº 30). Em contraste, dos 11 pacientes que apresentaram IgM positivo para CMV pelo método de IFI somente em 6 houve concomitância com PCR positiva. Cinco pacientes não apresentaram, por nenhum dos testes, evidências de infecção ativa pelo CMV (pacientes 7, 18, 20, 26 e 41).

Assim, os resultados em seu conjunto permitem concluir que em 32 pacientes dos 37 estudados (86,48%) foram detectadas evidências de infecção ativa por CMV por pelo menos um dos testes utilizados nesse trabalho. Destes a PCR facultou a detecção de infecção pelo CMV mais precocemente que os demais, além de permitir o reconhecimento da infecção em um número maior de pacientes que os testes sorológicos .

Gráfico 38

**Frequência de diagnóstico inicial da
infecção ativa por CMV pelo método de PCR,
em relação ao período de seguimento, no transplante renal**

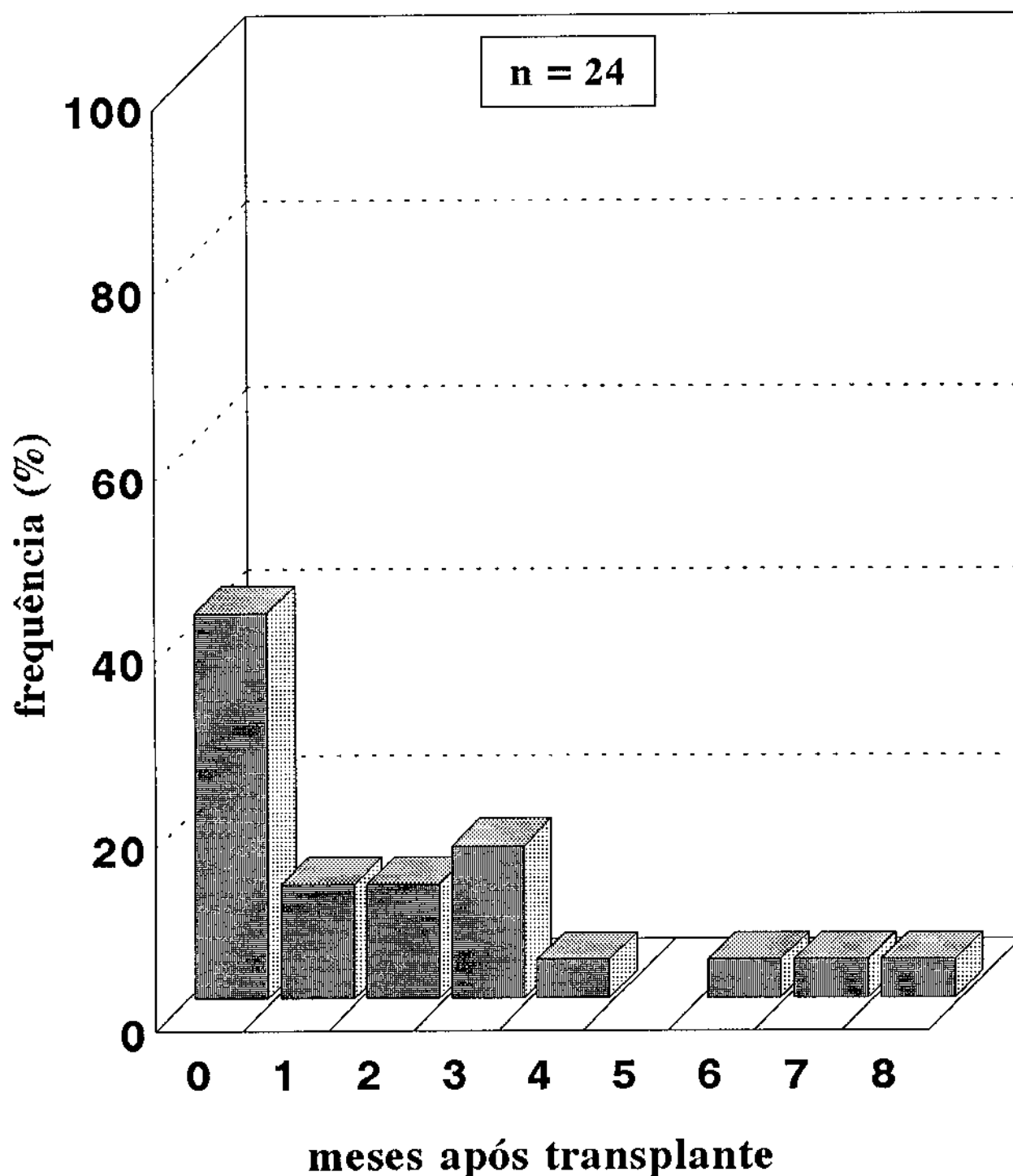


Gráfico 39

**Frequência de diagnóstico inicial da
infecção ativa por CMV pelo método de ELISA,
em relação ao período de seguimento, no transplante renal**

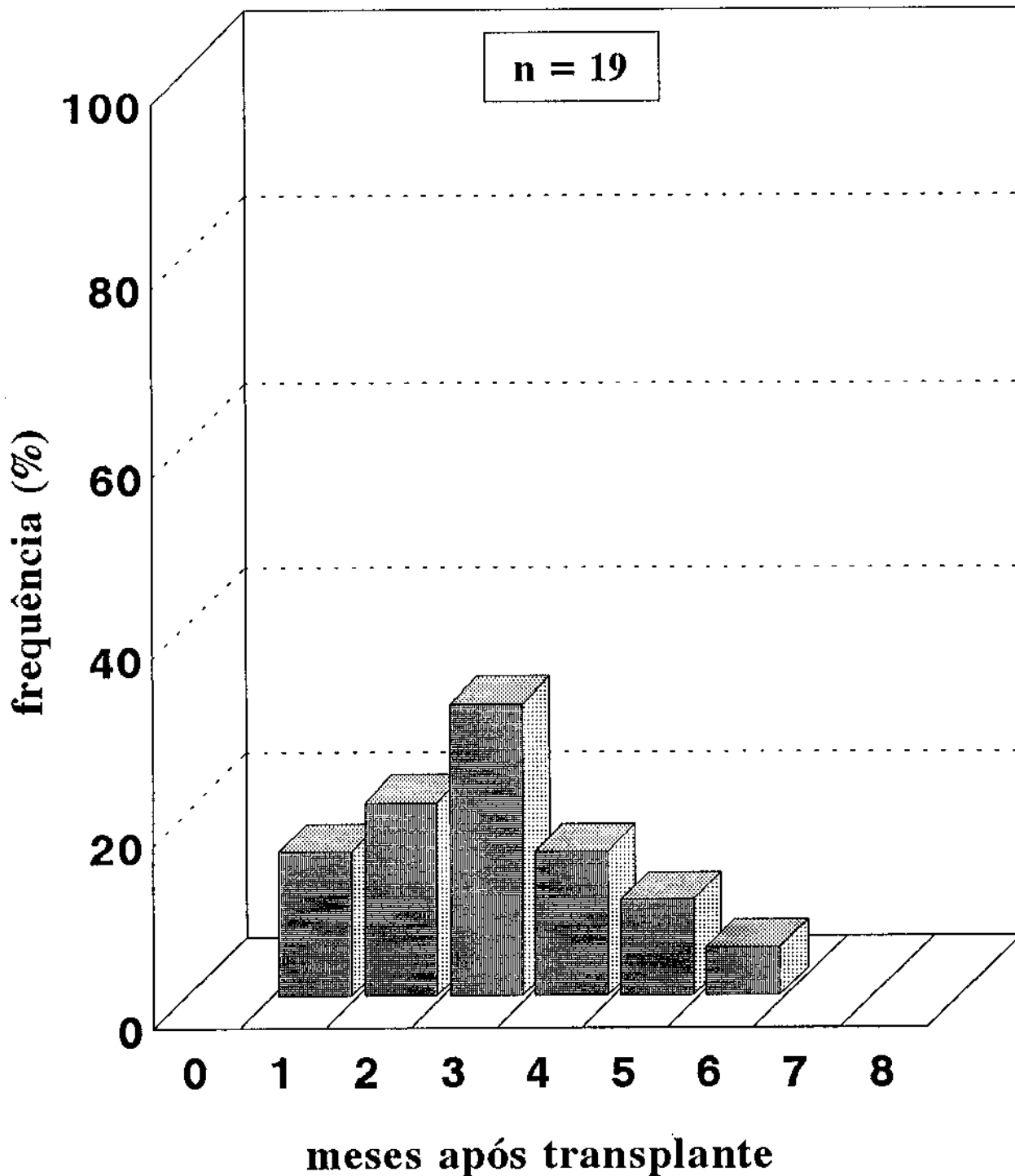
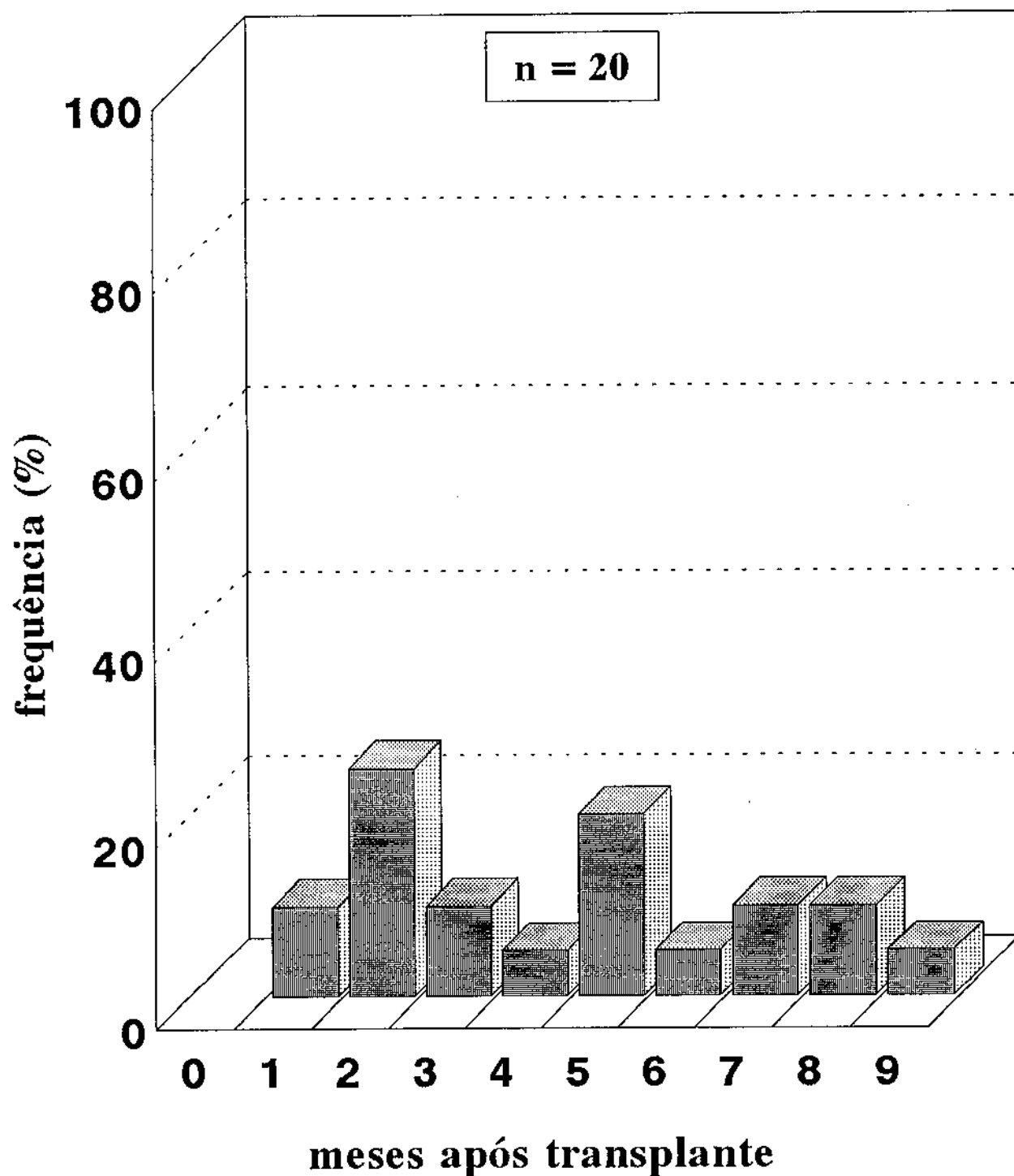


Gráfico 40

**Frequência de diagnóstico inicial da
infecção ativa por CMV pelo método de IFI,
em relação ao período de seguimento, no transplante renal**



Segundo os dados obtidos pela utilização de pelo menos um dos três testes (PCR, ELISA, IFI) para diagnóstico da infecção ativa pelo CMV, que podem ser observados esquematicamente nos Gráficos 38, 39 e 40, concluímos que, em relação apenas aos casos positivos, o diagnóstico inicial da infecção ativa pelo CMV foi possível de ser estabelecido até o 3º mês após o transplante em 83,33% dos pacientes com emprego da PCR, em 68,42% com ELISA e em 45,00% com IFI.

As Tabelas de números VIII a XIII apresentam comparações dois a dois entre as três técnicas de detecção da infecção pelo CMV levados a efeito nesse trabalho. Os resultados positivo (+) ou negativo (-) foram considerados de acordo com os critérios anteriormente descritos.

Tabela VIII: Comparação entre os resultados obtidos por meio da PCR e aqueles obtidos pela detecção de anticorpos da classe IgG contra o CMV pelo método de ELISA.

		PCR		Total
		+	-	
ELISA IgG	+	12	4	16
	-	12	9	21
Total		24	13	37

Estes resultados mostram que 64,86% das amostras foram reagentes por PCR e 43,24% por ELISA-IgG. A copositividade entre ELISA-IgG e PCR foi de 50% e a conegatividade entre ELISA-IgG e PCR foi de 69,23%.

O valor preditivo (+) da ELISA-IgG para PCR foi de 75% e o valor preditivo (-) da ELISA-IgG para PCR foi de 42,85%. A concordância entre os dois testes foi de 56,75%.

Tabela IX: Comparação entre os resultados obtidos por meio da PCR e aqueles obtidos pela detecção de anticorpos da classe IgM contra CMV por ELISA.

		PCR		Total
		+	-	
ELISA IgM	+	6	1	7
	-	18	12	30
Total		24	13	37

Analizando os resultados, observamos que 64,86% das amostras foram reagentes por PCR e 18,91% por ELISA-IgM.

A copositividade da ELISA-IgM para a PCR foi de 25% e a conegatividade da ELISA-IgM para PCR foi de 92,30%.

O valor preditivo (+) da ELISA-IgM para PCR foi de 85,71% e o valor preditivo (-) da ELISA-IgM para PCR foi de 40%. A concordância entre os dois testes foi de 48,64%.

Tabela X: Comparação entre os resultados obtidos por meio da PCR e aqueles obtidos pela detecção de anticorpos da classe IgG contra CMV por IFI.

		PCR		Total
		+	-	
IFI-IgG	+	8	3	11
	-	16	10	26
Total		24	13	37

Analisando os resultados, observamos que 64,86% das amostras foram reagentes por PCR e 29,72% por IFI-IgG.

A copositividade da IFI-IgG para a PCR foi de 33,33% e a conegatividade da IFI-IgG para PCR foi de 76,92%.

O valor preditivo (+) da IFI-IgG para PCR foi de 72,72% e o valor preditivo (-) da IFI-IgG para PCR foi de 38,46%. A concordância entre os dois testes foi de 48,64%.

Tabela XI: Comparação entre os resultados obtidos por meio da PCR e aqueles obtidos pela detecção de anticorpos da classe IgM contra o CMV por IFI.

		PCR		Total
		+	-	
IFI-IgM	+	6	5	11
	-	18	8	26
Total		24	13	37

Analisando os resultados, observamos que 64,86% das amostras foram reagentes por PCR e 29,72% por IFI-IgM.

A copositividade da IFI-IgM para a PCR foi de 25% e a conegatividade da IFI-IgM para PCR foi de 61,53%.

O valor preditivo (+) da IFI-IgM para PCR foi de 54,54% e o valor preditivo (-) da IFI-IgM para PCR foi de 30,76%. A concordância entre os dois testes foi de 37,83%.

Tabela XII: Comparação entre os resultados obtidos por meio da detecção de anticorpos da classe IgG contra o CMV por IFI-IgG e pela detecção de anticorpos da classe IgG contra o CMV por ELISA.

		ELISA-IgG		Total
		+	-	
IFI-IgG	+	7	4	11
	-	9	17	26
Total		16	21	37

Analisando os resultados, observamos que 43,24% das amostras foram reagentes por ELISA-IgG e 29,72% por IFI-IgG.

A copositividade da IFI-IgG para a ELISA-IgG foi de 43,75% e a conegatividade da IFI-IgG para ELISA-IgG foi de 80,95%.

O valor preditivo (+) da IFI-IgG para ELISA-IgG foi de 63,63% e o valor preditivo (-) da IFI-IgG para ELISA-IgG foi de 65,38%. A concordância entre os dois testes foi de 64,86%.

Tabela XIII: Comparação entre os resultados obtidos por meio da detecção de anticorpos da classe IgM contra o CMV por IFI e pela detecção de anticorpos da classe IgM contra o CMV por ELISA.

		ELISA-IgM		Total
		+	-	
IFI-IgM	+	3	8	11
	-	4	22	26
Total		7	30	37

Analisando os resultados, observamos que 18,91% das amostras foram reagentes por ELISA-IgM e 29,72% por IFI-IgG.

A copositividade da IFI-IgM para a ELISA-IgM foi de 42,85% e a conegatividade da IFI-IgM para ELISA-IgG foi de 73,33%.

O valor preditivo (+) da IFI-IgM para ELISA-IgM foi de 27,27% e o valor preditivo (-) da IFI-IgM para ELISA-IgM foi de 84,61%. A concordância entre os dois testes foi de 67,56%.

Impacto clínico da infecção por CMV:

O anexo II apresenta resumidamente dados da evolução clínica dos 37 pacientes transplantados renais durante o período de seguimento, após o transplante. 32 pacientes apresentaram evidências laboratoriais, por pelo menos um dos testes (PCR, ELISA, IFI), de infecção ativa pelo CMV (como demonstra a Tabela VII). A maioria desses pacientes apresentou complicações clínicas e laboratoriais (anexo II). Por outro lado, os 5 pacientes (7, 18, 20, 26, 41) que não apresentaram por nenhum dos 3 testes evidências de infecção ativa pelo CMV, não tiveram problemas clínicos relevantes e apenas os pacientes 7 e o 18 receberam "pulsos" de corticóides uma vez, devido a episódios de rejeição celular aguda no 7º dia pós-transplante. Além disso, esses 5 pacientes mantêm função renal preservada.

Dois pacientes morreram nesse período (pacientes 4 e 11), e ambos apresentavam partículas virais na urina detectadas pela PCR. Perderam o enxerto os pacientes 12, 32, 37 e 42 e todos apresentavam evidências de infecção ativa pelo CMV. Dos 32 pacientes, com evidências laboratoriais de infecção ativa pelo CMV, 16 deles (50%) (6, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 23, 24, 29, 30, 31, 35, 37, 39, 42) apresentaram quadro clínico sugestivo de doença pelo CMV, coincidentemente com os testes alterados.

A Tabela XIV destaca as manifestações clínicas apresentadas por esses 16 pacientes, com provável doença pelo CMV e mostra o funcionamento do enxerto no final do período de seguimento.

Tabela XIV. Manifestações clínicas e funcionamento do enxerto dos 16 pacientes com provável doença por CMV.

Paciente	Sinais, sintomas e alterações laboratoriais	Tempo pós-transplante de início do quadro clínico (dias)	Funcionamento do enxerto
6	febre, mialgias e tosse	150	funcionante
10	aumento dos níveis de creatinina sérica, sem evidências de rejeição celular aguda	60	funcionante
12	febre, queda estado geral, disúria, sem confirmação de infecção do trato urinário	210	perdeu enxerto
13	febre a esclarecer, leucopenia (3000) e esplenomegalia	30	funcionante
14	poliadenomegalia axilar	13	funcionante
16	febre, mialgias, dor de garganta	300	alterado
17	aumento dos níveis de creatinina sérica, sem confirmação de rejeição celular aguda	150	alterado
23	hepatite e leucopenia	90	funcionante
24	febre, dispnéia e infiltrado intersticial pulmonar	30	alterado
29	leucopenia mantida, apesar de diminuição da dose de azathioprina	90	funcionante
30	febre e coriza	330	funcionante
31	febre e tosse, sem comprometimento pulmonar	45	funcionante
35	febre, mialgia, fraqueza geral e sangramento digestivo alto	150	perdeu enxerto
37	febre alta, dor torácica e infiltrado pulmonar à esquerda	30	funcionante
39	febre, mialgia e fraqueza geral	45	funcionante
42	febre sem foco, prolongada	30	perdeu enxerto

Função renal preservada se creatinina sérica < 2mg/dl

Função renal alterada se creatinina sérica ≥ 2mg/dl

Pela análise da Tabela XIV podemos observar que o dado clínico predominante nesses pacientes com provável doença pelo CMV foi o de Síndrome Febril (70%). O início dos sintomas ocorreu principalmente a partir do primeiro mês após a cirurgia, até o 5º mês (81% dos casos). Somente 3 pacientes apresentaram manifestações clínicas tardias em relação ao transplante (19%).

Tabela XV. Episódios de rejeição celular aguda ocorridos nos transplantados e a função renal do enxerto após período de seguimento prospectivo.

Pacientes	Número de episódios de rejeição	Creatinina Sérica (mg/dl)	Função do enxerto
1	0	0,80	F
2	2	2,60	NF
3	0	1,00	F
4*	0	4,95	NF / PE
5	0	1,30	F
6	0	1,00	F
7	1	1,70	F
8	0	0,80	F
9	1	1,00	F
10	2	1,51	F
11*	2	6,48	NF
12	2	5,89	NF
13	1	1,50	F
14	0	1,21	F
15	1	1,00	F
16	2	2,15	NF
17	1	2,20	NF
18	1	0,90	F
19	3	2,54	NF
20	0	1,20	F
21	1	1,20	F
23	0	1,50	F
24	3	2,05	NF
25	0	1,40	F
26	0	1,60	F
27	0	2,54	NF
29	1	1,20	F
30	1	1,20	F
31	0	0,74	F
32	2	5,95	NF / PE
35	0	1,20	F
37	3	11,00	NF / PE
38	1	2,20	NF
39	1	1,20	F
41	0	1,20	F
42	3	8,20	NF / PE
43	0	1,00	F

* pacientes que morreram

PE - perdeu enxerto

F - funcionante (creatinina sérica < 2mg/dl)

NF - não funcionante (creatinina sérica ≥ 2mg/dl)

A análise estatística dos dados apresentados mostra que existe correlação significativa entre número de episódios de rejeição e níveis de creatinina sérica (coeficiente de correlação de 0,95, análise de variância com correção de Bonferroni $p = 1,9 \times 10^{-5}$).

A análise do número de pesquisas positivas para o CMV pela PCR e os níveis de creatinina, por outro lado, não mostraram níveis significativos de correlação (coeficiente de correlação de -0,15; análise de variância com correção de Bonferroni $p = 0,94$). Esses cálculos indicam que na população estudada a ocorrência de infecção ativa pelo CMV não se correlaciona de modo estatisticamente significativo com a perda do enxerto.

DISCUSSÃO

O citomegalovirus é um dos mais importantes agentes infecciosos que acometem pacientes transplantados e é responsável pela significativa morbidade e mortalidade apresentada pelos receptores de órgãos. Com o advento de drogas eficazes para o tratamento das infecções causadas pelo CMV, o diagnóstico precoce da infecção com o objetivo de reduzir seu impacto clínico tornou-se imperativo (16, 17, 33, 40, 41, 50, 100, 110, 115, 116, 117, 118, 128, 145).

A aplicação da reação em cadeia da polimerase, no diagnóstico da infecção pelo CMV, representou avanço tecnológico significativo para o diagnóstico precoce dessa condição. A PCR introduzida por Saiki e colaboradores, em 1985 (119), para amplificação seletiva de sequências de ácido nucleico tem mostrado grande utilidade em um número cada vez maior de situações clínicas, incluindo o diagnóstico de doenças infecciosas variadas.

O presente trabalho representa o primeiro estudo realizado na América do Sul em que a PCR é empregada para o diagnóstico da infecção pelo CMV em transplantados renais. Nossos resultados mostraram que com a utilização de pelo menos dois pares de "primers" é possível padronizar um teste de realização rápida com possível aplicação clínica. Importa ressaltar que esta técnica facultou a identificação de partículas virais em 64,86% dos pacientes estudados e que, 10 deles já excretavam o vírus na urina mesmo antes do transplante.

Os dois trabalhos pioneiros com o emprego da PCR para o diagnóstico precoce da infecção por CMV foram os de Demmler e colaboradores (29) e o de Shibata e colaboradores (126), ambos publicados simultaneamente em 1988, no *Journal of Infectious Diseases*. Demmler e colaboradores analisaram um grupo de recém nascidos levando a efeito a amplificação do DNA viral do CMV a partir de amostras de urina sem nenhum preparo prévio. Foram usados dois diferentes pares de "primers" que amplificam regiões dos antígenos imediatos principais (MIE) e área dos antígenos tardios (LA), ambas críticas para a replicação do CMV. O material amplificado foi detectado por meio de sondas radioativas e "dot-blot". A comparação com resultados de cultura de vírus revelou que esse procedimento foi 100% específico e 100% sensível. O valor preditivo negativo do teste foi de 100%. Shibata e colaboradores usaram pares de "primers" da região de antígenos

imediatos do genoma do CMV (IE) e como substrato, DNA extraído de células do sangue periférico de pacientes portadores de síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). Conclui-se que a PCR era mais sensível do que a cultura viral clássica para CMV. A detecção foi rápida e também conduzida por meio de sondas radioativas e "dot-blot".

No presente trabalho tentamos inicialmente realizar a detecção do fragmento amplificado pela visualização direta. As vantagens desse procedimento são óbvias, tanto do ponto de vista de rapidez e praticidade, quanto do ponto de vista econômico. No entanto, nossos resultados evidenciaram que algumas vezes, com a metodologia utilizada, não existe banda visível à eletroforese, mas ocorre detecção de fragmentos de DNA com hibridização por sondas radioativas. Desse modo, todo procedimento de detecção foi conduzido com a utilização de sondas radioativas. É possível, como demonstra trabalho recente da literatura, que o emprego de "primers" internos ("nested PCR") possibilite a detecção direta do fragmento amplificado (101).

A utilização na PCR de amostras de urina sem tratamento prévio oferece vantagens significativas em relação aos complexos e demorados procedimentos para extração de DNA. Durante a padronização da metodologia nossos testes iniciais com misturas de urina com extrato de cultura de vírus mostraram que a detecção pela PCR era facilmente obtida, como relatado anteriormente por Demmler e colaboradores (29). Entretanto, alguns investigadores recentemente relataram possível atividade inibitória da urina sobre a PCR. Khan e colaboradores (69) demonstraram que uréia presente na urina apresenta potente atividade inibitória para a reação da PCR e provavelmente seja seu principal constituinte inibitório. A natureza dessa atividade inibitória não é conhecida, embora seja amplamente reconhecido que a uréia é um potente inibidor de ligações não covalentes e talvez possa agir diretamente na polimerase, ou possivelmente interfira com o pareamento dos "primers" por ocasião da reação em cadeia da polimerase. Entre os procedimentos que podem ser utilizados para minimizar os problemas de inibição durante a reação de PCR, podemos destacar: diluição da urina para reduzir a concentração de uréia (29), ultrafiltração para remover inibidores de baixo peso molecular, o uso de resinas tipo "glass beads" ou "glassmilk" (12) para adsorver o DNA e a precipitação com polietilenoglicol, para concentrar CMV (70).

A análise dos nossos resultados sugere que, em pelo menos um caso, possivelmente a presença de inibidores tenha interferido no resultado da PCR. O paciente nº 30 apresentou evidências sorológicas claras de infecção ativa por CMV, no entanto, a PCR foi repetidamente negativa. As tentativas de purificar a urina com resinas do tipo "Gene clean" ou precipitação com propileno glicol não mudaram os resultados. Importa lembrar também que metabólitos de medicamentos excretados na urina, potencialmente poderiam interferir com a reação. Em seu conjunto, esses possíveis fatores inibitórios poderiam ser responsáveis por ocasionais resultados negativos inesperados. No entanto, esses casos foram poucos e não são suficientes para representar obstáculo ao uso direto da urina na detecção de partículas virais. Além disso, a utilização de pequenos volumes de urina, diluídos em volume relativamente grande de reação (100µl) elimina consideravelmente esse tipo de problema. Assim, em seu conjunto, os dados desse trabalho aliados aos relatos da literatura mostram que a PCR é bastante sensível e específica para detecção de CMV na urina. Adicionalmente, os cuidados tomados para evitar contaminação revelaram-se extremamente úteis para prevenir resultados falsos positivos.

Os dados de Rowley e colaboradores (113) e Chen e colaboradores (17) sugerem que a PCR só é capaz de detectar DNA viral em pacientes com infecção ativa e não se revela positiva em indivíduos soropositivos saudáveis ou em pacientes transplantados com sorologia positiva mas sem evidências de infecção ativa. Os resultados desse trabalho são comparáveis aos de Olive e colaboradores (90) que utilizaram a mesma metodologia em transplantados renais, tanto em relação à frequência de detecção de partículas virais na urina como na comparação com os resultados sorológicos (ELISA). Além disso, esses autores compararam os resultados obtidos através da PCR com os de cultura viral, concluindo que a PCR é mais sensível que a cultura na detecção de virúria nesses pacientes.

Importa ressaltar que outros trabalhos da literatura confirmam a noção que os resultados obtidos pela PCR são tão sensíveis quanto a cultura de vírus (59, 63, 103, 113) ou a detecção de antígenos precoces ("early antigens") por anticorpos monoclonais (147). No presente trabalho a detecção de partículas virais na urina foi conduzida simultaneamente com a realização de dois testes sorológicos para detecção de anticorpos contra o CMV - ELISA e IFI. Ambos permitem a discriminação de anticorpos em classes de imunoglobulinas IgG ou IgM, o que muito auxilia na interpretação dos resultados.

Em geral a detecção de anticorpos contra o CMV em pacientes que pela primeira vez entram em contato com esse vírus pode ser efetuada em poucas semanas após a infecção e persiste indefinidamente. A presença pregressa de anticorpos confere certo grau de proteção contra subsequente doença por CMV, mas não protege contra reativação endógena do vírus latente ou de reinfeção por cepa exógena.

Duas importantes razões para o uso clínico de testes sorológicos detectores de anticorpos contra o CMV incluem a identificação de indivíduos susceptíveis à infecção primária e rastreamento de doadores de sangue e órgãos, pelo risco da transmissão acarretada por portadores do CMV latente.

Entre os primeiros estudos com IFI para CMV é relevante o de Hanshaw e colaboradores (56), que aplicaram este método para detecção de imunoglobulinas específicas no soro de 50 pacientes, entre os quais, 24 portadores de infecção congênita. O antígeno foi preparado a partir de células infectadas com o CMV AD169 e foi observado correlação significativa entre os resultados do teste com o quadro clínico de crianças sintomáticas, que apresentavam excreção urinária do vírus. A partir desses estudos iniciais a IFI para CMV passou a ter aplicação na rotina diagnóstica.

A partir da década de 80, foi introduzido o método imunoenzimático - ELISA - para diagnóstico da infecção pelo CMV. Esse tipo de reação sorológica mostrou-se mais sensível e específica quando comparada às aquelas previamente utilizadas (4, 28, 84, 85).

Os resultados do presente trabalho com o método de ELISA mostraram que 34 receptores dos 37 estudados eram soropositivos (91,89%) bem como 32 doadores dos 35 estudados (91,42%) antes do transplante; não muito diferentes daqueles segundo a técnica de IFI que revelou que 100% da população de receptores renais e de respectivos doadores eram soropositivos em relação ao CMV, antes do transplante. Relatos da literatura mostram que a técnica de ELISA tem menor probabilidade de interferência por reações cruzadas ou por oscilações de resultados (4, 28, 84, 85).

Esses resultados são compatíveis com dados da literatura que apontam prevalências de infecção pelo CMV com variação entre 80 a 100% quando populações de reduzido nível sócio-econômico são analisadas.

Tabela XVI. Prevalência de anticorpos ao CMV em populações adultas de diferentes regiões geográficas (58).

Localização	% anticorpos ao CMV
Lyon (França)	40
Freiburg (Alemanha)	42
St. Gallen (Suíça)	45
Albany (EUA)	45
Melbourne (Austrália)	54
Houston (EUA)	79
Buenos Aires (Argentina)	81
Hong Kong (China)	94
Sendai (Japão)	96
Manila (África)	100
Marrocos (África)	98
Entebbe, Uganda (África)	100

As prevalências de anticorpos contra o CMV são menores na Europa e partes da América do Norte quando comparadas àquelas de países em desenvolvimento como a África, sudeste Asiático e América do Sul, como está demonstrado na Tabela XVI.

A determinação do "status" sorológico do receptor de transplante é importante na distinção subsequente entre infecção primária da secundária além de fornecer dados para a escolha de doadores de órgãos e sangue.

Nossos resultados mostram que somente o paciente de nº 13 soronegativo em relação ao CMV, se encontrava sob risco de contrair após o transplante infecção primária pelo CMV pois seu doador (cadáver) era soropositivo em relação ao CMV.

Embora uma comparação exata entre o trabalho apresentado aqui e os anteriormente relatados seja dificultada pelos diferentes métodos utilizados, podemos ressaltar que em linhas gerais nossos resultados não são significativamente diferentes dos descritos em estudos anteriores.

Tomados em conjunto o diagnóstico de infecção ativa por CMV (IgG e/ou IgM) foi semelhante quando a análise foi levada a efeito por ELISA (51,35%) ou IFI (54,05%). A detecção de anticorpos da classe IgM foi observada em número maior de pacientes com o emprego da IFI (29,72%) do que com a técnica de ELISA (18,91%). As explicações para esse fato não são claras, mas uma possibilidade seria a maior susceptibilidade da reação de IFI quanto a interferências por outros anticorpos, não obstante o pré-tratamento com partículas de latex.

Os resultados desse trabalho, em suporte a dados publicados previamente, mostram que a análise sorológica pode fornecer dados significativos, desde que os testes sejam realizados em amostras seriadas iniciando-se previamente ao transplante. No entanto, é importante citar que uma limitação relevante desse método em transplantados renais é a significativa imunossupressão a que estes pacientes são submetidos, o que pode interferir na produção de imunoglobulinas e resultar em dados incorretos.

A análise conjunta dos três métodos aqui utilizados é complexa pois devem ser levadas em consideração as limitações inerentes a cada um deles. Desse modo, em concordância com os trabalhos de Olive e colaboradores (90) a reação em cadeia da polimerase foi o teste que em maior número de pacientes (64,86%) foi capaz de identificar infecção ativa pelo CMV. A PCR mostrou-se capaz de detectar presença de partículas virais na urina em pacientes sem evidências sorológicas de infecção ativa pelo CMV.

Em 18 pacientes dos 37 estudados (48,64%) a detecção de partículas virais na urina, pela PCR ocorreu juntamente com evidências sorológicas de infecção ativa pelo CMV em pelo menos um dos testes sorológicos. Em 6 pacientes (3, 6, 10, 11, 15, 25)

(16,21%) somente a PCR foi capaz de identificar infecção ativa pelo CMV. Todos os pacientes em que a detecção de IgM foi positiva pelo método ELISA, também apresentaram PCR com resultados positivos, exceto o paciente nº 30. Por outro lado dos 11 pacientes que apresentaram IgM positiva para CMV pelo método de IFI, a PCR foi positiva em 6. A pouca concordância entre os resultados da detecção de IgM por imunofluorescência indireta em relação a PCR ou ao ELISA sugere que possam ter ocorrido resultados falso positivos, apesar da adsorção por latex. A detecção de IgM é considerada uma indicação mais confiável de replicação viral do que variações significativas de IgG. Assim, observamos que houve excelente correlação entre os dados do teste ELISA e aqueles da PCR, indicando que ambos os testes foram concordantes, nesses casos, na detecção do CMV. Merece menção o caso nº 30, que apresentou reações sorológicas francamente positivas por IgM tanto com ELISA como IFI mas a PCR foi repetidamente negativa. Como referido anteriormente, uma possibilidade seria a inibição da reação enzimática por substâncias presentes na urina (12, 69, 70). Além disso, é possível que, com os "primers" utilizados nesse trabalho a excreção de pequeno número de partículas virais não seja detectada. Aparentemente esse problema poderia ser solucionado com duas reações de PCR sendo a segunda com "primers" internos ("nested PCR") (101).

Essas considerações são válidas também em relação aos casos 29 e 35 que apresentaram resultados positivos antes do transplante e repetidos testes negativos após esse procedimento. Importa ressaltar ainda que a PCR foi capaz de detectar presença de infecção pelo CMV mais precocemente que os testes sorológicos aqui utilizados. Além da PCR, outros testes capazes desta detecção precoce são: cultura de tipo "shell vials" com identificação de antígenos precoces por anticorpos monoclonais ("early antigens") (1, 27, 43, 52, 75, 76, 127).

A análise final revelou que em 32 transplantados (86,48%) houve evidências de infecção ativa pelo CMV por pelo menos um dos testes utilizados nesse trabalho. Além disso, são relevantes os dados aqui obtidos da elevada prevalência de virúria detectada pela PCR, em pacientes renais crônicos, antes do transplante. É reconhecido que pacientes submetidos a diálise crônica são susceptíveis a infecção pelo CMV sendo aparentemente, essa prevalência mais elevada na população brasileira do que na de países do hemisfério norte (2). Estes dados sugerem que estudos posteriores devem ser levados a efeito, para

investigação das consequências clínicas dessa infecção em pacientes submetidos a diálises crônicas no Brasil.

Em conformidade com os dados discutidos anteriormente, apenas para efeito de ilustração, podemos conduzir análise comparativa entre os três testes por nós utilizados nesse trabalho, tomando a PCR como teste básico de referência ou padrão. Assim, na Tabela XVII, estão relacionados a concordância, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo de cada um dos testes em relação à PCR.

Tabela XVII. Análise comparativa dos testes sorológicos (ELISA e IFI) com a PCR.

	Concordância	Valor preditivo +	Valor preditivo -
ELISA-IgG	56,75%	75,00%	42,85%
ELISA-IgM	48,64%	85,71%	40,00%
IFI-IgG	48,64%	72,72%	38,46%
IFI-IgM	37,83%	54,54%	30,76%

A medida mais simples de qualidade de um teste diagnóstico é a fração dos casos em que o teste concorda com o "padrão". Essa medida é comumente chamada acurácia. Apesar da tendência em aceitar alta acurácia como bom atributo de um teste diagnóstico, esse número pode ser enganoso. Se somente 5% dos pacientes tivessem a doença em questão (CMV), mesmo sem a realização do teste diagnóstico, se considerássemos sistematicamente que em todos os casos a doença estivesse ausente, estaríamos certos em 95% das vezes, ou seja, teríamos 95% de acurácia. Mesmo em situações de maior prevalência da doença (como é o caso da prevalência alta de CMV no Brasil), a acurácia é um índice muito limitado. A acurácia não se modifica com o número de falso positivos ou falso negativos. Essas limitações sugerem a necessidade de introduzir outros índices: o valor

preditivo positivo e o valor preditivo negativo para a avaliação de um teste diagnóstico. Os valores preditivos positivos e negativos têm grande interesse clínico, embora possam sofrer alterações drásticas com as variações na prevalência da doença (15).

Em seu conjunto, a análise comparativa das técnicas sorológicas em relação a PCR nesse grupo de pacientes, permite concluir que em relação aos índices concordância, valor preditivo positivo e negativo, o método de ELISA seria superior à IFI. Em apoio a essa conclusão o trabalho de Chou, 1990 (23) fornece dados semelhantes quanto à sorologia.

Impacto clínico do CMV nos transplantados renais

A observação de células de inclusão citomegálica em pulmão e outros tecidos originários de pacientes que morreram por pneumonia após transplante renal, por Kanich e colaboradores (67), foi o primeiro relato associando infecção por CMV e manifestações clínicas em receptores de transplante. Desde então, essa associação tem sido confirmada e em nosso estudo uma elevada incidência de infecção por CMV (86,48%) foi observada, causando manifestações clínicas em 40,62% dos receptores de rim.

O citomegalovirus é o agente infeccioso mais importante nos transplantados de órgãos. Os mais potentes reativadores da infecção latente pelo CMV são a terapia imunossupressora (que tem particular efeito na imunidade mediada por célula) e a rejeição do órgão transplantado (115). A reativação do vírus latente tem papel fundamental na patogenicidade do CMV em receptores de órgãos. O local de permanência do vírus durante a fase de latência não é conhecido, embora dados epidemiológicos demonstrem claramente a transmissão do CMV após transplante de órgãos (65) ou após transfusão de produtos sanguíneos contendo leucócitos viáveis (123). Além disso, é conhecido que durante infecção sistêmica pelo CMV, os granulócitos, linfócitos e monócitos abrigam o vírus (122). Rubin e colaboradores (115) acreditam que não exista tecido ou célula especial que abrigue o CMV em estado latente, mas sim que o vírus permanece presente em vários locais podendo ser reativado por estímulos diversos. O principal fator exógeno que influencia a reativação viral é o tipo e a intensidade da terapia imunossupressora para controle da rejeição do órgão transplantado (115). Os corticosteróides têm efeito muito pequeno na

reativação do CMV latente. Entre as drogas imunossupressoras usadas para controle da rejeição, aparentemente a ciclosporina tem pouca ação na reativação de vírus latente, mas por outro lado, apresenta importante efeito no hospedeiro, bloqueando a resposta imunológica contra a replicação viral. A globulina antilinfocitária por sua vez apresenta maior ação na reativação do vírus latente. Assim, é previsível que a combinação de globulina antilinfocitária e ciclosporina seja particularmente perigosa em termos da infecção pelo CMV pois combina uma droga que atua na reativação do vírus e outra que interfere no controle da infecção viral pelo receptor de órgão transplantado.

Após a ativação do CMV latente, mesmo antes das manifestações clínicas, pode ser demonstrado infecção de leucócitos circulantes, particularmente dos granulócitos. Entre os linfócitos, a maioria dos acometidos são aqueles pertencentes a subpopulações caracterizadas pelos antígenos CD4. A interação entre o CMV e seu hospedeiro apresenta dois aspectos importantes. O primeiro é que o CMV causa anormalidade metabólica nos linfócitos e monócitos, que os impede de produzir e de responder a estímulos de algumas citocinas, como as interleucinas 1 e 2. O segundo é a supressão do funcionamento normal de linfócitos T citotóxicos. Desse modo, essa interação resulta em alteração na relação de células T circulantes, com redução da população CD4+ e aumento da população CD8+, que se correlaciona com uma diminuição global da imunidade celular (109, 111).

Também uma possível alteração na resposta humoral seria originada pela infecção por CMV, devido à produção de imunoglobulinas da classe IgM com propriedades linfocitotóxicas (115).

A recente demonstração de relação entre CMV e o complexo de histocompatibilidade maior (MHC), apresenta importância única para os receptores de transplante (10). Aparentemente existem sequências homólogas e reatividade imunológica cruzada entre CMV e antígeno de histocompatibilidade do tipo DR3. Desse modo uma resposta imunológica dirigida especificamente contra o vírus poderia produzir lesão no enxerto devido à reação homóloga com o complexo de histocompatibilidade maior.

No presente trabalho as possíveis consequências da infecção pelo CMV nos transplantados renais foram agrupadas em três categorias: 1) Síndromes infecciosas

produzidas pela ação direta do vírus; 2) Infecções bacterianas ou oportunistas consequentes à imunossupressão em que a ação direta do vírus no sistema imunológico poderia ter contribuição significativa; 3) Disfunção do enxerto que poderia estar associada à infecção pelo CMV (115). Pela análise da Tabela XIV podemos observar que dentre os pacientes com possível doença por CMV, o dado clínico predominante foi febre (70% dos pacientes). Outras manifestações clínicas relevantes incluem as apresentadas pelo paciente nº 23: hepatite com sorologia negativa para vírus da hepatite A, B e C e leucopenia. Nos pacientes nºs 24 e 37 foram reconhecidos febre com infiltrado pulmonar de padrão intersticial. O paciente nº 11 conjuntamente com infecção ativa pelo CMV apresentou septicemia por *E. coli* com hemoculturas positivas. Em dois pacientes, nºs 10 e 17, houve comprometimento da função renal, sem confirmação de rejeição celular aguda pela biópsia do enxerto.

Em consonância com os dados prévios da literatura, nossos dados mostram que nesse grupo de pacientes, soropositivos para o CMV antes do transplante, as manifestações clínicas não foram tão graves (22, 58) e tiveram resolução espontânea exceto no caso de nº 24 que evoluiu para óbito. Merece menção que nos transplantes de medula óssea ou de coração, as manifestações clínicas causadas pelo CMV são extremamente mais graves.

A incidência de doença por CMV em 43,24% observada no grupo de pacientes aqui estudados é compatível com aquelas registradas na literatura: Hibberd (1992) - 36% (57), Marsano (1990) - 42,85% (79), Peterson (1980) 31% (100), Rubin (1977) - 38% (117). No Brasil, o estudo de Ianhez e colaboradores (1984) (60) encontrou doença por CMV em 5,3% de seus pacientes com base em diagnóstico levado a efeito por métodos sorológicos exclusivamente (fixação de complemento e IFI). Por outro lado, os dados de Suassuna e colaboradores (1990) (140), com a utilização de cultura de vírus e métodos sorológicos (fixação de complemento e IFI) evidenciaram doença por CMV em 26% dos pacientes analisados. Esses dois últimos estudos, em concordância com nosso trabalho, também apresentaram predomínio absoluto de doadores vivos relacionados ao receptor. Provavelmente as diferenças entre os valores observados são devidas a fatores metodológicos. O primeiro trabalho citado foi feito de maneira retrospectiva e o diagnóstico conduzido com base em método sorológico reconhecidamente pouco confiável. Desse modo, muitos quadros clínicos de infecção não foram detectados ou foram atribuídos a outros fatores. A prevalência de doença por CMV observada em nosso grupo de pacientes

foi pouco maior que aquela observada por Suassuna e colaboradores (1990). Possíveis causas para essa discrepância seriam a elevada sensibilidade da PCR na detecção de virúria, o maior tempo de seguimento dos pacientes aqui descrito e o esquema de terapia imunossupressora mais agressiva em nossa casuística que nas anteriores.

Desse modo, nossos dados indicam que a doença por CMV é frequente em nossa região com incidência similar à relatada em outros países. Importa ressaltar que apenas um paciente em nossa casuística apresentava risco de contrair infecção primária pelo CMV: nº 13, porque possuía reações sorológicas e PCR negativas antes do transplante e recebeu rim de doador cadáver que mostrava reações sorológicas para CMV positivas. A infecção foi confirmada, no primeiro mês após o transplante, por detecção de IgM (ELISA) e a partir do segundo mês, por virúria (PCR) que persistiu até o final do seguimento. Concomitantemente houve aparecimento de febre persistente, leucopenia, esplenomegalia e tosse seca que motivaram internação para investigação pormenorizada. Dados da literatura em relação à infecção primária pelo CMV em transplantados indicam que a intensidade das manifestações clínicas nessa situação é em geral maior que na reativação ou reinfecção viral (48, 64, 80, 93, 130, 150).

É interessante notar que o paciente nº 12 foi o receptor do outro rim do mesmo doador cadáver. Este paciente apresentava sorologia positiva antes do transplante, portanto podia ser acometido de reativação viral ou reinfecção por uma nova cepa de vírus. Curiosamente antes do transplante foi detectado nesse paciente excreção de partículas virais na urina pela PCR, resultados que não se repetiram nos dois meses após o transplante. A partir do terceiro mês a reação de PCR passou novamente a ser positiva, embora as reações sorológicas permanecessem inalteradas em relação a títulos de IgG (ELISA e IFI), porém com surgimento de IgM por ELISA a partir de dois meses e meio após o transplante, persistindo até o final do seguimento. Embora não exista comprovação laboratorial, seria possível especular que nesse caso, como ocorreu no trabalho de Chou (19), poderia ter ocorrido reinfecção pela nova cepa do vírus presente no rim do doador.

Como amplamente reconhecido na literatura, o efeito da infecção por CMV sobre a função renal é assunto controverso e ainda sem conclusões definidas. Simmous e colaboradores em 1970 (128) foram os primeiros a sugerir que a infecção por CMV teria

papel preponderante no comprometimento da função do rim transplantado. Após esta publicação vários estudos confirmaram impacto importante do CMV na sobrevida do enxerto, dados que, no entanto, não foram confirmados em investigações semelhantes. Aparentemente esses efeitos poderiam ser potencializados pelo tipo de compatibilidade entre doador e receptor (10), pelo uso de globulina antilinfocitária (57) ou pela infecção primária por CMV (109). Também é aventada a possibilidade da lesão glomerular que acontece em recipientes de transplantes renais poder estar associada à infecção pelo CMV, principalmente em consequência das modificações nas subpopulações de linfócitos T (redução de CD4 e aumento de CD8), possivelmente provocadas pelo CMV (108, 115).

Em nossa casuística, dos 32 pacientes que apresentaram evidências laboratoriais de infecção ativa pelo CMV, 13 (40,62%) estavam com função renal comprometida após 1 ano do transplante. Destes, 5 perderam o enxerto, 2 morreram e 3 estão submetidos a hemodiálise ou diálise peritoneal. Cinco pacientes (n^{os} 7, 18, 20, 26, 41) não apresentaram por nenhum dos testes evidências de infecção ativa pelo CMV e em nenhum deles houve problemas clínicos relevantes, e mantendo todos função renal preservada 1 ano após o transplante. Estes dados, principalmente pelo número limitado de pacientes estudados, não mostraram diferenças estatisticamente significantes, entretanto sugerem uma tendência a maior frequência de complicações no grupo de pacientes portadores de infecção ativa pelo CMV.

O desenvolvimento de técnicas que possibilitam o diagnóstico rápido da infecção por CMV, como a PCR utilizada nesse trabalho, propiciam a implementação de medidas terapêuticas (uso de drogas antivirais específicas e imunoglobulina anti-CMV). Nossos dados também mostram que os testes sorológicos devem ser conduzidos de maneira seriada para que os resultados sejam informativos. A observação de que 43,24% dos pacientes apresentaram manifestações clínicas atribuíveis ao CMV indicam, em apoio a trabalho de Suassuna e colaboradores (1990) (140), que mesmo em nosso meio esse problema é significativo.

Em seu conjunto, os resultados deste trabalho, aliados àqueles da literatura, sugerem que a infecção por CMV é um problema relevante após o transplante renal, no Brasil.

CONCLUSÕES

- Foi estabelecido um método rápido de detecção de partículas virais do CMV na urina com o emprego da PCR, com o uso de três pares de "primers". Desse modo, foi possível identificar partículas virais na urina em 64,86% dos pacientes transplantados renais estudados prospectivamente. Além disso, foram identificadas partículas virais na urina em 10 pacientes antes do transplante. A PCR também foi capaz de detectar virúria em pacientes que não apresentavam evidências sorológicas de infecção ativa pelo CMV.

- A análise conjunta dos três testes utilizados neste trabalho, para detecção de infecção pelo CMV (PCR, ELISA, IFI), revelou que em 86,48% houve evidências de infecção ativa pelo CMV. A análise sorológica, com o emprego de ELISA ou IFI, pode fornecer informações significativas, desde que os testes sejam conduzidos de forma seriada, com início antes do transplante. A análise comparativa das técnicas sorológicas em relação à PCR, nesse grupo de pacientes, permite concluir que, em relação aos índices de concordância, valor preditivo positivo e negativo, o método ELISA seria superior à IFI.

- Em relação ao impacto clínico da infecção por CMV, no grupo de transplantados renais estudados, a incidência de doença por CMV ocorreu em 43,24% desses pacientes. Dos 32 pacientes que apresentaram evidências laboratoriais de infecção ativa pelo CMV, 13 (40,62%) estavam com a função renal comprometida (creatinina ≥ 2 mg/dl), um ano após o transplante. Desses, 5 perderam o enxerto, 2 morreram e 3 estão submetidos a diálise peritoneal ou hemodiálise. Os 5 pacientes que não apresentaram, por nenhum dos testes, evidências de infecção ativa pelo CMV não tiveram problemas clínicos relevantes e estão mantendo boa função renal (creatinina < 2 mg/dl) 1 ano após o transplante.

- Em seu conjunto, os dados deste trabalho, aliados àqueles da literatura, indicam que a infecção por CMV é um problema relevante após o transplante renal em populações brasileiras.

RESUMO

As complicações devidas à infecção por citomegalovírus representam um dos maiores problemas infecciosos observados em pacientes submetidos a transplantes em geral. Com o objetivo de avaliar a incidência e o impacto clínico da infecção por CMV em uma população de transplantados renais no Brasil foram estudados prospectivamente 37 pacientes submetidos a transplante renal no Hospital das Clínicas da UNICAMP, no período de Outubro de 1990 a Setembro de 1992. A identificação da infecção pelo CMV foi levada a efeito pela detecção direta de partículas virais na urina através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e por reações sorológicas - ELISA e imunofluorescência indireta. A PCR foi realizada com 3 pares de iniciadores ("primers"). O material amplificado foi fixado em filtros de nylon como "dot-blot" e as partículas virais foram identificadas por hibridização com oligonucleotídeos específicos para a região amplificada (sonda), marcados com ^{32}P por meio da T4 polinucleotídeo quinase. O material para análise foi obtido antes e em intervalos mensais após o transplante. Os resultados globais, agrupando sorologia e PCR mostraram 32 pacientes com evidências de infecção ativa pelo CMV entre 37 estudados (86,48%). Em 6 pacientes, só a PCR foi capaz de identificar infecção ativa. O diagnóstico foi mais precoce pela PCR do que pelas técnicas sorológicas. 10 pacientes já apresentavam virúria antes do transplante. A maior incidência de infecção ocorreu nos primeiros 4 meses que se seguiram ao transplante. Dos 32 pacientes com infecção ativa pelo CMV, 16 (50%) apresentaram manifestações clínicas sugestivas de serem secundárias à replicação viral (doença por CMV). Os 5 pacientes que não apresentaram, por nenhum dos testes, evidências de infecção ativa pelo CMV, não tiveram problemas clínicos relevantes no seguimento e mantiveram boa função renal. Em seu conjunto, nossos resultados sugerem que a infecção pelo CMV é uma complicação frequente em transplantados renais no Brasil e que poderia estar associada à maior frequência de complicações clínicas nesses pacientes. Adicionalmente, comprovou-se que a PCR é um método eficaz de detecção precoce dessa infecção.

SUMMARY

Cytomegalovirus in Renal Transplant Patients: Detection by Polymerase Chain Reaction (P.C.R.) and Clinical Impact

Cytomegalovirus (C.M.V.) is the single most important infections agent affecting recipients of organ transplant. To evaluate the incidence and the clinical impact of cytomegalovirus infection on renal transplant in Brazil, 37 patients who underwent renal allograft transplants were periodically screened for the presence of C.M.V. virus DNA in urine by using polymerase chain reaction (P.C.R.) and for the presence of IgM and IgG cytomegalovirus antibodies (ELISA and I.F.I.). The P.C.R. amplified products were detected by gel electrophoresis and by dot blot hybridization with oligonucleotide probes.

32 out 37 patients (86.48%) were found to be positive by at least one of the three methods. In 6 patients, P.C.R. was the only test to detect the C.M.V. infection. 10 patients had a positive result by P.C.R. before the transplantation. The diagnosis was made earlier by P.C.R. than by serologic tests. Active infection occurred more frequently in the first 4 months after transplantation. 16 out 32 patients (50.00%) with active infection by C.M.V. presented clinical manifestations of C.M.V. disease. 5 patients without evidences of active infection by the 3 tests have only minor clinical complications during followup.

Our results suggest that C.M.V. infection is a frequent problem in renal transplant patients in Brazil, with significant clinical complications. Moreover, we confirmed that P.C.R. is a very sensitive procedure to early detection of C.M.V. infection.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agha, SA; Coleman, JC; Selwyn, S; Mahmoud, LA & Abd-Elaal, AM. Combined use of sonication and monoclonal antibodies for the detection of early and late cytomegalovirus antigens in centrifugation cultures. **J Virol Methods** 22: 41-50, 1988.
2. Agha, SA; Mahmoud, LA; Archard, LC; Abd-Elaal, AM; Sehirjn, S; Mee, AD & Coleman, JC. Early Diagnosis of Cytomegalovirus Infection in Renal Transplant and Dialysis Patients by D.N.A. DNA Hybridization Assay. **J Medic Virol** 27: 252-257, 1989.
3. Aguado, S; Gomez, E; Rodriguez, A; Martinez, A; Ona, M & Alvarez-Graude, J. A prospective study on a rapid method for diagnosing cytomegalovirus infections in immunosuppressed patients. **Nephron** 53: 322-324, 1989.
4. Alford, CA & Britt, W. Cytomegalovirus. In: Fields, BN & Knipe, DN (ed.): **Virology**, 2.^a edition, Raven Press, Ltd, New York, 1990, p. 1981-2010.
5. Alford, CA; Stagno, S; Pass, RF & Britt, WJ. Congenital and Perinatal Cytomegalovirus Infections. **Rev Infect Dis** 12 (suppl 7): 745-753, 1990.
6. Alpert, G; Mazon , MC; Colimon, R & Plotkin, S. Rapid detection of human cytomegalovirus in the urine of humans. **J Infect Dis** 152: 631-633, 1985.
7. Aurelius, E; Johansson, B; Skoldenberg, B; Staland, A & Forsgren, M. Rapid diagnosis of Herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. **Lancet** 337: 189-192, 1991.
8. Beckwith, DG; Halstead, DC; Alpaugh, K; Schweder, A; Blount-Fronefield, DA & Toth, K. Comparison of a latex agglutination test with five other methods for determining the presence of antibody against cytomegalovirus. **J Clin Microbiol** 21: 328-331, 1985.
9. Bernet, C; Garret, M; de Barbeyrac, B; Beblar, C & Bonnet, J. Detection of Mycoplasma pneumoniae by using the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 27: 2492-2496, 1989.
10. Blanche, G; Josien, R; Douillard, D; Bignon, JD; Cesbron, A & Souillou, JP. The influence of HLA A-B.DR matching on cytomegalovirus disease after renal transplantation. **Transplantation** 54: 871-874, 1992.
11. Boppana, SB; Smith, RJ; Stagno, S & Britt, WJ. Evaluation of a microtiter plate fluorescent antibody assay for rapid detection of human cytomegalovirus infection. **J Clin Microbiol** 30: 721-723, 1992.
12. Buffone, GJ; Demmler, GJ; Schimbor, CM; Greer, J. Improved Amplification of Cytomegalovirus DNA from Urine after Purification of DNA with Glass Beads. **Clinic Chem** 37: 1945-1949, 1991.

13. Burg, JL; Grover, CM; Pouletty, PP & Boothroyd, JC. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 27: 1787-1792, 1989.
14. Cassol, SA; Poon, MC; Pal, R; Naylor, MJ; Culver-James, J. Bowen, TJ; Russel, JA; Krawetz, SA; T.Pon, R & I.Hoar, D. Primer-mediated enzymatic amplification of cytomegalovirus (CMV) DNA. **J Clin Invest** 83: 1109-1115, 1989.
15. Castelo Filho, A & Marcopito, LF. A interpretação de testes diagnósticos. **Rev Ass Med Brasil** 30: 64-66, 1984.
16. Chatterjee, SN & Jordan, GW. Prospective study of the prevalence and symptomatology of cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. **Transplantation** 28: 457-460, 1979.
17. Chen, YT; Mercer, GO; Cheigh, JS & Mouradian, JA. Cytomegalovirus Infection of Renal Allografts. **Transplantation** 53: 99-102, 1992.
18. Cherfas, J. Genes unlimited. **New Scientist** 126(14 April): 29-33, 1990.
19. Chou, S. Acquisition of donor strains of cytomegalovirus by renal-transplant recipients. **New Engl J Med** 314: 1418-1423, 1986.
20. Chou, S. Cytomegalovirus infection and reinfection transmitted by heart transplantation. **J Infect Dis** 155: 1054-1056, 1987.
21. Chou, S. Neutralizing antibody responses to reinfecting strains of cytomegalovirus in transplant recipients. **J Infect Dis** 160: 16-21, 1989.
22. Chou, S. Reactivation and recombination of multiple cytomegalovirus strains from individual organ donors. **J Infect Dis** 160: 11-15, 1989.
23. Chou, S. Newer Methods for Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. **Rev Infect Dis** 12 (suppl 7): 727-736, 1990.
24. Chou, S & Merigan, TC. Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization. **New Engl J Med** 308: 921-925, 1983.
25. Clewley, JP. The polymerase chain reaction, a review of the practical limitations for human immunodeficiency virus diagnosis. **J Virol Methods** 25: 179-188, 1989.
- 25a. Cole, R & Kuttner, AG. Filterable virus present in the salivary glands of guinea pigs. **J Exp Med** 44:855-873, 1926.

26. Costa, FF & Costa, SCB. Reação em cadeia da polimerase (PCR) princípios e aplicações clínicas. **Rev Bras Reumatologia** 32: 142-146, 1992.
27. Degirolami, PC; Dakos, J; Eichelberger, K; Mills, LS & DeLuca, AM. Rapid detection of cytomegalovirus in clinical specimens by immunofluorescent staining of shell vial cultures. **Am J Clin Pathol** 89: 528-532, 1987.
28. Demmler, GJ. Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of IgM class antibodies to cytomegalovirus. **J Infect Dis** 153: 1152-1155, 1986.
29. Demmler, GJ; Buffone, GJ; Schimbor, CM & May, RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by Using Polymerase chain Reaction DNA Amplification. **J Infect Dis** 158: 1177-1184, 1988.
30. Dolan, J; Briggs, JD & Clements, GB. Antibodies to cytomegalovirus in renal allograft recipients: correlation with isolation of virus. **J Clin Pathol** 42: 1070-1077, 1989.
31. Drew, WL. Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. **Rev Infect Dis** 10 (suppl 3): 468-476, 1988.
- 31a. Drew, WL; Mintz, L; Miner, RC; Sands, M; Ketterer, B. Prevalence of cytomegalovirus infection in homosexual men. **J Infect Dis** 143:188-192, 1981.
32. Dutilh, B; Bebear, C; Rodriguez, P; Vekris, A; Bonnet, J & Garret, M. Specific amplification of a DNA sequence common to all Chlamydia trachomatis serovars using the polymerase chain reaction. **Research Microbiol** 140: 7-16, 1989.
33. Editorial. Cytomegalovirus infection in allograft recipients. **Lancet** i: 303-304, 1989.
34. Editorial. Human papillomaviruses and the polymerase chain reaction. **Lancet** i: 1051-1052, 1989.
35. Edwards, JR; Wrich, PP; Cowan, MJ; Levy, J; Wara, D & Vyas, G. Polymerase chain reaction compared with concurrent viral cultures for rapid identification of human immunodeficiency virus infection among high-risk infants and children. **J Pediatrics** 115: 200-203, 1989.
36. Eisenach, KD; Cave, MD; Bates, JH & Crawford, JT. Polymerase chain reaction amplification of repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tuberculosis. **J Infect Dis** 161: 977-981, 1990.
37. Erlich, HA; Gelfand, DH & Saiki, RK. Specific DNA amplification. **Nature** 331: 461-462, 1988.

38. Erlich, HA; Gelfand, D & Sninsky, JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science** 252: 1643-1650, 1991.
39. Esforzado, N; Poch, E; Almirall, J; Bombi, JA; Lopez-Pedret, J & Revert, L. Cytomegalovirus colitis in chronic renal failure. **Clin Nephrology** 39: 275-278, 1993.
- 39a. Farber, S & Wolbach, SB. Intranuclear and cytoplasmic inclusion "protozoan-like bodies" in the salivary glands and others organs of infants. **Am J Pathol Child** 8:123-126, 1932.
40. Fiala, M; Payne, JE; Berme, TV; Moore, TC; Henle, W; Montgomerie, JZ; Chatterjee, SN & Guze, LB. Epidemiology of cytomegalovirus infection after transplantation and immunosuppression. **J Infect Dis** 132: 421-433, 1975.
41. Fryd, DS; Peterson, PK; Ferguson, RM; Simmons, RL; Balfour Jr, HH & Najarian, JS. Cytomegalovirus as a risk factor in renal transplantation. **Transplantation** 30: 436-439, 1980.
42. Gama, RE; Hughes, PJ; Bruce, CB & Stanway, G. Polymerase chain reaction amplification of rhinovirus nucleic acids from clinical material. **Nucl Acids Res** 16: 9346, 1988.
43. Gerna, G; Revello, MG; Percivalle, E & Morini, F. Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp 65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia. **J Clin Microbiol** 30: 1232-1237, 1992.
44. Gilbert, GL; Hudson, IL; Hayes, K & James, J. The neonatal cytomegalovirus Infection Study Group. Prevention of Transfusion acquired cytomegalovirus Infection in Infants by blood filtration to remove leucocytes. **Lancet** 1: 1228-1231, 1989.
45. Gleaves, CA; Hursh, DA & Myers, JD. Detection of human cytomegalovirus in clinical specimens by centrifugation culture with a non human cell line. **J Clin Microbiol** 30: 1045-1048, 1992.
46. Gleaves, CA; Smith, TF; Shuster, EA & Pearson, GR. Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. **J Clin Microbiol** 21: 217-221, 1985.
47. Gleaves, CA; Hursh, DA; Rice, DH & Myers, JD. Detection of cytomegalovirus from clinical specimens in centrifugation culture by in situ DNA hybridization and monoclonal antibody staining. **J Clin Microbiol** 27: 21-23, 1989.

48. Godeaut, E; Galezowski, N; Berche, P; Bonissol, C; Debure, A & Kreis, H. Cytomegalovirus infection in fifty-two renal transplant recipients. **Transplantation Proc** 19: 2131-2132, 1987.
49. Greenfield, C; Sinickas, V & Harrison, HC. Detection of cytomegalovirus by the polymerase chain reaction. **Med J Australia** 154: 383-385, 1991.
50. Griffiths, PD & Whitley, RJ. Viral infections in the immunocompromised host. **Curr Opin Infect Dis** 6: 417-421, 1993.
51. Griffiths, PD; Stagno, S; Pass, RF; Smith, RJ & Alford Jr, CA. Infection with cytomegalovirus during pregnancy: specific IgM antibodies as a marker of recent primary infection. **J Infect Dis** 145: 647-653, 1982.
52. Griffiths, PD; Stirk, PR; Ganczakowski, M; Panjwani, DD; Ball, MG; Balcklock, HA & Prentice, HG. Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients by detection of early antigen fluorescent foci. **Lancet** i: 1242-1245, 1984.
53. Grover, CM; Thulliez, P; Remington, JS & Boothroyd, JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital Toxoplasma infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. **J Clin Microbiol** 28: 2297-2301, 1990.
54. Grundy, JE. Virologic and Pathogenetic Aspects of Cytomegalovirus Infection. **Rev Infect Dis** 12 (suppl 7): 711-719, 1990.
55. Grundy, JE; Super, M; Sweny, P; Moorhead, J; Lui, SF; Berry, NJ; Fernando, ON & Griffiths, PD. Symptomatic cytomegalovirus infection in seropositive kidney recipients: reinfection with donor virus rather than reactivation of recipient virus. **Lancet** i: 132-135, 1988.
56. Hanshaw, JB; Steinfeld, HD & White, CJ. Fluorescent antibody test for cytomegalovirus macroglobulin. **New Engl J Med** 279: 566-570, 1968.
57. Hibberd, PL; Tolkoff-Rubin, NE; Cosimi, AB; Schooley, RT; Isaacson, D; Doran, M; Delvecchio, A; Delmonico, FL; Auchincloss Jr, H & Rubinn, RH. Symptomatic cytomegalovirus disease in the cytomegalovirus antibody seropositive renal transplant recipient treated with OKT3. **Transplantation** 53: 68-72, 1992.
58. Ho, M. Epidemiology of Cytomegalovirus Infections. **Rev Infect Dis** 12 (suppl 7): 701-710, 1990.
59. Hsia, K; Spector, D.H; Lawrie, J & Spector, S.A. Enzymatic Amplification of Human Cytomegalovirus Sequences by Polymerase chain Reaction. **J Clin Microbiol** 27: 1802-1809, 1989.

60. Ianhez, LE; Sarturi, PS; Paula, FJ & Sabbaga, E. Infecção por citomegalovirus pós transplante renal. **Rev Hosp Clin Fac Med SP** 39: 47-53, 1984.
61. Jackson, DP; Quirke, P & Lewis, F. Detection of measles virus RNA in paraffin embedded tissue. **Lancet** i: 1391, 1989.
- 61a. Jesionek, K & Kiolemenoglow. Uber einen Befund von protozoenartigen Geviden in den Organen eines hereditarleustiocen Fetus. **Muench Med Wochenschr** 51:904-1907, 1904.
62. Jiwa, NM; Raap, AK; van de Rijke, FM; Mulder, A; Weening, JJ; Zwaan, FE; The, TH & van der Ploeg, M. Detection of cytomegalovirus antigens and DNA in tissues fixed in formaldehyde. **J Clin Pathol** 42: 749-754, 1989.
63. Jiwa, NM; van Gemert, GW; Raap, AK; van de Rijke, FM; Mulder, A; Lens, PF; Salimans, MMM; Zuvaan, FE; Dorp, WV & 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.
64. Johnson, PC; Lewis, RM; Golden, DL; Oefinger, PE; van Buren, CT; Kerman, RH & Kahan, BD. The impact of cytomegalovirus infection on seronegative recipients treated with cyclosporine-prednisone immunosuppression. **Transplantation** 45: 116-121, 1988.
65. Kadereik, S; Michelson, S; Mougenot, B; Thibault, P; Verroust, PJ; Mignon, F; Colimon, R & Ronco, PM. Polymerase chain Reaction detection of cytomegalovirus genome in Renal biopsies. **Kidney Internat** 42: 1012-1016, 1992.
66. Kahan, BD & Launder, TA. Rapid detection of cytomegalovirus infection using a DNA probe. **Transplantation Proc** 17: 989-992, 1985.
67. Kanich, RE & Craighead, JE. Cytomegalovirus infection and cytomegalic inclusion disease in renal homotransplant recipients. **Am J Med** 40: 874-882, 1966.
68. Keller, GH; Huang, DP; Kwoshih, JW & Manak, MM. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction amplification and microliter sandwich hybridization. **J Clin Microbiol** 28: 1411-1416, 1990.
69. Khan, G; Kangro, G.K; Coates, PJ & Heath, RB. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. **J Clin Pathol** 44: 360-365, 1991.

70. Kimpton, CP; Corbitt, G & Morris, DJ. Comparison of polyethylene glycol precipitation and ultracentrifugation for recovery of cytomegalovirus from urine prior to detection of DNA by dot-blot hybridization. **J Virol Meth** 28: 141-146, 1990.
71. Kristiansen, BE; Ask, E; Jenkins, A; Fermer, C; Radstrom, P & Skold, O. Rapid diagnosis of Meningococcal meningitis by polymerase chain reaction **Lancet** 337: 1568-1569, 1991.
72. Kwok, S & Higuchi, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature** 339: 237-238, 1989.
73. Kwok, S; Ehrlich, G; Poiesz, B; Kalish, R & Sninsky, JJ. Enzymatic amplification of HTLV1 viral sequences from peripheral blood mononuclear cells and infected tissues. **Blood** 72: 1117-1123, 1988.
74. Laure, F; Rouzioux, C; Veber, F; Jacomet, C; Courgnaud, V; Blanche, S; Burgard, M; Griscelli, C & Brechot, C. Detection of HIV1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. **Lancet** i: 538-541, 1988.
75. Lee, PC & Halsworth, P. Rapid viral diagnosis in perspective. **British Med J** 300: 1413-1418, 1990.
76. Leland, D; Hansing, RL & French, MLV. Clinical experience with cytomegalovirus isolation using conventional cell cultures and early antigen detection in centrifugation-enhanced shell vial cultures. **J Clin Microbiol** 27: 1159-1162, 1989.
77. Lifson, AR; Stanley, M; Pane, J; O'Malley, PM; Wilber, JC; Stanley, A; Jeffery, B; Rutherford, GW; Sohmer, PR. Detection of human immunodeficiency virus DNA using the polymerase chain reaction in a well-characterized group of homosexual and bisexual men. **J Infect Dis** 161: 436-439, 1990.
78. Maitland, NJ; Bromidge, T; Cox, MF; Crame, IJ; Prime, SS & Sarlly, C. Detection of human papilloma virus genes in human oral tissue biopsies and cultures by polymerase chain reaction. **British J Cancer** 59: 698-703, 1989.
79. Marsano, L; Perrillo, RP; Flye, MW; Hanto, DH; Spitzer, ED; Thomas, JR; Murray, PR; Windus, DW; Brunt, EM & Storch, GA. Comparison of culture and serology for the diagnosis of cytomegalovirus infection in kidney and liver transplant recipients. **J Infect Dis** 161: 454-461, 1990.
80. Mathiesen, T; Brattstrom, C; Anderson, J; Linde, A; Ljungman, P & Wahren, B. Immunoglobulin G subclasses and lymphocyte stimulatory responses to cytomegalovirus in transplant patients with primary cytomegalovirus infections. **J Med Virol** 36: 65-69, 1992.

81. McHugh, TM; Casavant, CH; Wilber, JC & Stikes, DP. Comparison of six methods for the detection of antibody to cytomegalovirus. **J Clin Microbiol** 22: 1014-1019, 1985.
82. Melchers, W; Den Brule, AV; Walboomers, J; Bruin, M; Burger, M; Herbrink, P; Meijer, C; Lindeman, J & Quint, W. Increased detection rate of human papillomavirus in cervical scrapes by polymerase chain reaction as compared to modified fish and southern-blot analysis. **J Med Virol** 27: 329-335, 1989.
83. Merigan, TC & Resta, S. Cytomegalovirus: Where have we been and where are we going? **Rev Infect Dis** 12 (suppl 7): 693-700, 1990.
84. Miller, H; McCulloch, B; Landini, MP & Rossier, E. Comparison of immunoblotting with other serological methods and virus isolation for the early detection of primary cytomegalovirus infection in allograft recipients. **J Clin Microbiol** 27: 2672-2677, 1989.
85. Moore, DG; Davis, BG; Oefinger, PE & Carlson, J. Reactivity of serologic tests for the detection of antibody specific to cytomegalovirus. **Am J Clin Pathol** 83: 622-625, 1985.
86. Moser, DR; Kirchoff, LV & Donelson, JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 27: 1477-1482, 1989.
87. Noel, AB; Lecossier, D; Nassif, X; Gicquel, B; Frebault, VL & Hance, AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of *Mycobacterial* DNA in clinic samples. **Lancet** i: 1069-1071, 1989.
88. Norder, H; Hammas, B & Magnus, LO. Typing of hepatitis B virus genomes by a simplified polymerase chain reaction. **J Med Virol** 31: 215-221, 1990.
89. Olive, DM; Simsek, MAL & Mufti, S. Polymerase chain Reaction Assay for Detection of Human Cytomegalovirus. **J Clin Microbiol** 27: 1238-1242, 1989.
90. Olive, DM; Al-Mufti, S; Simsek, M; Fayez, H & Al Nakib, W. Direct Detection of Human Cytomegalovirus in Urine Specimens From Renal Transplant Patients Following Polymerase chain Reaction Amplification. **J Med Virol** 29: 232-237, 1989.
91. Ou, CY; Kwork, S; Mitchell, SW; Mack, DH; Sninsky, JJ; Krebs, JW; Fiorino, P; Warfield, D & Schochetman, G. DNA amplification for direct detection of HIV1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. **Science** 239: 295-297, 1988.
92. Pannuti, CS; VilasBoas, LS; Neto, VA; Angelo, MJO & Sabbaga, E. Detecção de anticorpos IgM nas infecções primárias e secundárias pelo citomegalovirus em pacientes submetidos a transplante renal. **Rev Inst Med Trop SP** 29: 317-322, 1987.

93. Pannuti, CS. Infecção por citomegalovirus. **Pediat SP 6**: 144-153, 1984.
94. Pannuti, CS; Carvalho, RPS; Sabbaga, E & Angelo, MJO. Infecções por vírus do grupo Herpes em pacientes submetidos a transplante renal. **Rev Inst Med Tropical São Paulo 20 (6)**: 353-358, 1978.
95. Pass, RF; Griffiths, PD & August, AM. Antibody response to cytomegalovirus after renal transplantation: comparison of patients with primary and recurrent infections. **J Infect Dis 147**: 40-46, 1983.
96. Paterlini, P; Gerken, G; Nakajima, E; Terre, S; D'Errico, A; Grigioni, W; Nalpas, B; Franco, D; Wands, J; Kew, M; Pisi, E; Tiollais, P & Brechot, C. Polymerase chain reaction to detect hepatitis B virus DNA and RNA sequences in primary liver cancer from patients negative for hepatitis B surface antigen. **New Engl J Med 323**: 80-85, 1990.
97. Peake, I. The polymerase chain reaction. **J Clin Pathol 42**: 673-676, 1989.
98. Persing, DH; Telford III, SR; Spielman, A & Barthold, SW. Detection of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes dammini* ticks with polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol 28**: 566-572, 1990.
99. Peter, JB. The polymerase chain reaction: amplifying our options. **Rev Infect Dis 13**: 166-171, 1991.
100. Peterson, PK; Balfour Jr, HH; Marker, SC; Fryd, DS; Howard, RJ & Simmons, RL. Cytomegalovirus disease in renal allograft recipients: a prospective study of the clinical features, risk factors and impact on renal transplantation. **Medicine 59**: 283-300, 1980.
101. Porter-Jordan, K; Rosemberg, EI; Keiser, JF; Gross, JD; Ross, AM; Nassin, S & Garrett, CT. Nested Polymerase chain Reaction Assay for the Detection of Cytomegalovirus Overcomes False Positives Caused by Contamination with Fragmented DNA. **J Medic Virol 30**: 85-91, 1990.
102. Powell, KF; Anderson, NE; Frith, RW & Croxson, MC. Non-invasive diagnosis of Herpes simplex encephalitis. **Lancet 335**: 357-358, 1990.
103. Prosch, S; Kimel, V; Dawydowa, I & Kruger, DH. Monitoring of patients for cytomegalovirus after organ transplantation by centrifugation culture and PCR. **J Med Virol 38**: 246-251, 1992.
104. Rasmussen, L; Kelsall, D; Nelson, R; Carney, W; Hirsch, M; Winston, D; Preiksaitis, J & Merigan, TC. Virus specific IgG and IgM antibodies in normal and

immunocompromised subjects infected with cytomegalovirus. **J Infect Dis** 145: 191-199, 1982.

105. Ratnamohan, VM; Mathys, JM; McKenzie, A & Cunningham, AL. HCMV-DNA is detected more frequently than infectious virus in blood leucocytes of immunocompromised patients: a direct comparison of culture-immunofluorescence and PCR for detection of HCMV in clinical specimens. **J Med Virol** 38: 252-259, 1992.
106. Reddy, EP; Sandberg-Wollheim, M; Mettus, RV; Ray, E; Freitas, E & Koprowski, H. Amplification and molecular cloning of HTLV1 sequences from DNA of multiple sclerosis patients. **Science** 243: 529-532, 1989.
107. Reiss, J. The polymerase chain reaction and its potential role in clinical diagnosis and research. **J Int Med** 230: 391-395, 1991.
108. Reynolds, DW; Stagno, S & Alford, CA. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections. In: Lennette, EH & Schmidt, NJ (eds). **Diagnosis procedures for viral, Rickettsial and Chlamydial infections**. 5.^a edição, American Public Health Association, Inc, New York, pp. 399-439, 1979.
- 108a. Ribbert, H. Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. **Zentralbl Allg Pathol** 15:945-948, 1904.
109. Richardson, WP; Colvin, RB; Cheeseman, SH; Tolkoff-Rubin, NE; Herrp, JT; Cosimi, AB; Collins, AB; Hirsch, MS; McCluskey, RT; Russel, PS & Rubin, RH. Glomerulopathy associated with cytomegalovirus viremia in renal allografts. **New Engl J Med** 305: 57-63, 1981.
110. Rifkind, D; Goodman, N & Hill Jr, RB. The clinical significance of cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. **Ann Int Med** 66: 1116-1128, 1967.
111. Rook, AH; Interactions of Cytomegalovirus with the Human Immune System. **Rev Infect Dis** 10 (suppl 3): 460-467, 1988.
- 111a. Rowe, WP; Hartley, JW; Waterman, S; Turner, HC & Huebner, RJ. Cytopathogenic agent resembling salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. **Proc Soc Exp Biol Med** 92:418-4224, 1956.
112. Rowley, A; Whitley, RJ; Lakeman, FD & Wolinsky, SM. Rapid detection of Herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with Herpes simplex encephalitis. **Lancet** i: 440-441, 1990.

113. Rowley, AH; Wolinsky, SM; Sambol, SP; Barkholt, AE & Andersson, JP. Rapid Detection of Cytomegalovirus DNA and RNA in Blood of Renal Transplant Patients by in vitro Enzymatic Amplification. **Transplantation** 51: 1028-1033, 1991.
114. Rubin, RH. Introduction to the symposium. **Rev Infect Dis** 12 (suppl): 691-692, 1990.
115. Rubin, RH. Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. **Rev Infect Dis** 12 (suppl 7): 754-766, 1990.
116. Rubin, RH; Levin, M & Cohen, C. Summary of a workshop on cytomegalovirus infections during organ transplantation. **J Infect Dis** 139: 728-734, 1979.
117. Rubin, RH; Cosimi, AB; Tolkoff-Rubin, NE; Russell, PS & Hirsch, MS. Infections disease syndromes attributable to cytomegalovirus and their significance among renal transplant recipients. **Transplantation** 24: 458-464, 1977.
118. Rubin, RH; Tolkoff-Rubin, NE; Oliver, D; Rota, TR; Hamilton, J; Betts, RF; Pass, RF; Hillis, W; Szmunes, W; Farrell, ML & Hirsch, MS. Multicenter seroepidemiologic study of the impact of cytomegalovirus infection on renal transplantation. **Transplantation** 40: 243-249, 1985.
119. Saiki, RK; Scharf, S & Faloona, F. Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. **Science** 230: 1350-1354, 1985.
120. Saito, I; Servenius, B; Compton, T & Fox, RI. Detection of Epstein Barr virus DNA by polymerase chain reaction in blood and tissue biopsies from patients with Sjogren's syndrome. **J Exp med** 169: 2191-2198, 1989.
121. Sambrook, J; Fritsch, EF & Maniatis, T. **Molecular Cloning**. 2.^a edition. Cold Spring Harbor Laboratories, 1989.
122. Saltzman, RL; Quirk, MR & Jordan, MC. Disseminated CMV infection: Molecular analysis of virus and leukocyte interactions in viremia. **J Clin Invest** 81: 75-81, 1988.
123. Sayers, MH; Anderson, KC; Goodnough, LT; Kurtz, SR; Lane, TA; Pisciotto, P & Silberstein, LE. Reducing the Risk for Transfusion, transmitted Cytomegalovirus Infection. **Ann Internal Med** 116: 55-62, 1992.
124. Schochetman, G; Ou, CY & Jones WK. Polymerase chain reaction. **J Infect Dis** 158: 1154-1157, 1988.
125. Shankar, P; Manjunath, N; Mohan, KK; Prasad, K; Shriniwas, MB & Ahuja, GK. Rapid diagnosis of Tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. **Lancet** 337: 5-7, 1991.

126. Shibata, D; Martin, WJ; Appleman, MD; Causey, DM; Leedom, JM & Arnheim, N. Detection of Cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood of Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. **J Infect Dis** 158: 1185-1192, 1988.
127. Shuster, EA; Beneke, JS; Tegtmeyer, GE; Pearson GR; Gleaves, CA; Wold, AD & Smith, TF. Monoclonal antibody for rapid laboratory detection of cytomegalovirus infections: characterization and diagnostic application. **Mayo Clin Proc** 60: 577-585, 1985.
128. Simmons, RL; Lopez, C; Balfour Jr, III; Kalis, J; Rattazzi, LC & Najarian, JS. Cytomegalovirus: clinical virological correlations in renal transplant recipients. **Ann Surgery** 180: 623-634, 1974.
129. Sjobring, U; Mecklenburg, M; Andersen, AB & Mioner, H. Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis. **J Clin Microbiol** 28: 2200-2204, 1990.
130. Smiley, ML; Wlodaver, CG; grossman, RA; Barker, CF; Perloff, LJ; Tustin, NB; Starr, SE; Plotkin, SA & Friedman, HM. The role of pre-transplant immunity in protection from cytomegalovirus disease following renal transplantation. **Transplantation** 40: 157-161, 1985.
- 130a. Smith, MG. Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue culture. **Proc Soc Exp Biol Med** 86:435-440, 1954.
- 130b. Smith, MG. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. **Proc Soc Exp Biol Med** 92:424-430, 1956.
131. Smith, K & Dunstan, RA. PCR detection of cytomegalovirus: a review. **Brit J Haematol** 84: 187-190, 1993.
132. Sokol, DM, Demmler, GJ & Buffone, GJ. Rapid epidemiologic analysis of cytomegalovirus by using polymerase chain reaction amplification of the L.S. junction region. **J Clin Microbiol** 30: 839-844, 1992.
133. Sonnerborg, A; Abens, J; Johansson, B & Strannegard, O. Detection of human immunodeficiency virus 1 by polymerase chain reaction and virus cultivation. **J Med Virol** 31: 234-240, 1990.
134. Spector, SA; Rua, JA; Spector, DH & McMillan, R. Detection of human cytomegalovirus in clinical specimens by DNA-DNA hybridization. **J Infect Dis** 150: 121-126, 1984.
135. Stagno, S; Reynolds, D; Pass, RF & Alford, CA. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. **New Engl J Med** 302: 1073-1076, 1980.

136. Stenberg, RM; Thomsen, DR & Stinski, MF. Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. **J Virology** 49: 190-199, 1984.
137. Stinski, MF. Cytomegaloviruses and Its Replication. In: Fields, BN & Knipe, DN (ed.): **Virology**, 2.^a edition, Raven Press, Ltd, New York, 1990, p. 1959-1980.
138. Stoeckl, E; Barret, N; Heinz, FX; Banekovich, M; Stingl, G; Guggenberger, K; Dorner, F & Kunz, C. Efficiency of the polymerase chain reaction for the detection of human immunodeficiency virus type (HIV1) DNA in the lymphocytes of infected persons. **J Med Virol** 29: 249-255, 1989.
139. Suassuna, JHR & Machado, RD. Diagnóstico das infecções por citomegalovirus (CMV) em pacientes com deficiência imunológica. **Rev Assoc Med Brasil** 38: 33-47, 1992.
140. Suassuna, JHR; Ruzany, F; Souza, ERM; Sampaio, JC & Machado, RD. Correlações clínico virológicas nos quadros infecciosos causados por citomegalovirus em pacientes com transplantes renais. **Rev Microbiol SP** 21: 199-205, 1990.
141. Sumazaki, R; Motz, M; Wolf, H; Heinig, J; Jilg, W & Deinhardt, F. Detection of hepatitis B virus in serum using amplification of viral DNA by means of the polymerase chain reaction. **J Med Virol** 27: 304-308, 1989.
142. Sutherland, S; Bracken, P; Wreghitt, TG; O'Grady, C; Calne, RY & Williams, R. Donated organ as a source of cytomegalovirus in orthotopic liver transplantation. **J Med Virol** 37: 170-173, 1992.
143. Suwansirikul, S; Rao, N; Dowling, JN & Monto, H. Primary and secondary cytomegalovirus infection. **Arch Int med** 137: 1026-1029, 1977.
144. Swenson, P & Kaplan, MH. Comparison of two rapid culture methods for detection of cytomegalovirus in clinical specimens. **J Clin Microbiol** 25: 2445-2446, 1987.
145. Sweny, P. Infection in solid organ transplantation. **Curr Opin Infect Dis** 6: 412-416, 1993.
146. Tegtmeier, GG. Posttransfusion, Cytomegalovirus. **Arch Pathol Lab Med** 113: 236-245, 1989.
147. The, TH; van der Ploeg, M; van der Berg, AP; Vlieger, AM; van der Giessen, M & van Son, WJ. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes. A review of antigenemia assay and polymerase chain reaction. **Transplantation** 54: 193-198, 1992.

148. The, TH; Van der Bij, W; van den Berg, AP; van der Gessen, M; Weijs, J; Sprenger, HG & van Son, W. Cytomegalovirus Antigenemia. **Rev Infect Dis** 12 (suppl 7): 737-744, 1990.
149. Wakefield, AE; Guiver, L; Miller, RF & Hopkin, JM. DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Lancet** 337: 1378-1379, 1991.
150. Weir, MR; Henry, ML; Blackmore, M; Smith, J; First, R; Irwin, B; Shen, S; Genemans, G; Alexander, JW; Corry, RJ; Nghiem, DD; Ferguson, RM; Kittur, D; Shield, CF; Sommer, BG & Williams, GM. Incidence and morbidity of cytomegalovirus disease associated with a seronegative recipient receiving seropositive donor-specific transfusion and living related donor transplantation. **Transplantation** 45: 111-116, 1988.
151. Weller, TH. Cytomegaloviruses: The difficult years. **J Infect Dis** 122: 532-539, 1970.
152. Weller, TH. The Cytomegaloviruses: Ubiquitous agents with protean clinical manifestations (First of two parts). **New Engl J Med** 285: 203-214, 1971.
153. Weller, TH. The Cytomegaloviruses: Ubiquitous agents with protean clinical manifestations (Second of two parts). **New Engl J Med** 285: 267-274, 1971.
154. Weller, TH & Hanshaw, JB. Virologic and Clinical Observations on Cytomegalic Inclusion Disease. **New Engl J Med** 266: 1233-1244, 1962.
- 154a. Weller, TH; Macauley, JC; Craig, JM & Wirth, P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. **Proc Soc Exp Biol Med** 94:4-12, 1957.
155. White, TJ; Arnheim, N & Erlich, AA. The polymerase chain reaction. **Tech Focus** 5: 185-189, 1989.
156. Wilde, J; Yolken, R; Willoughby, R & Eiden, J. Improved detection of rotavirus shedding by polymerase chain reaction. **Lancet** 337: 323-326, 1991.
157. Wilson, KH; Blichington, R & Shah, P. Probe directed at a segment of *Rickettsia rickettsii* rRNA amplified with polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 27: 2692-2696, 1989.
158. Wright, PA & Wynford, TD. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? a critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. **J Pathol** 162: 99-117, 1990.

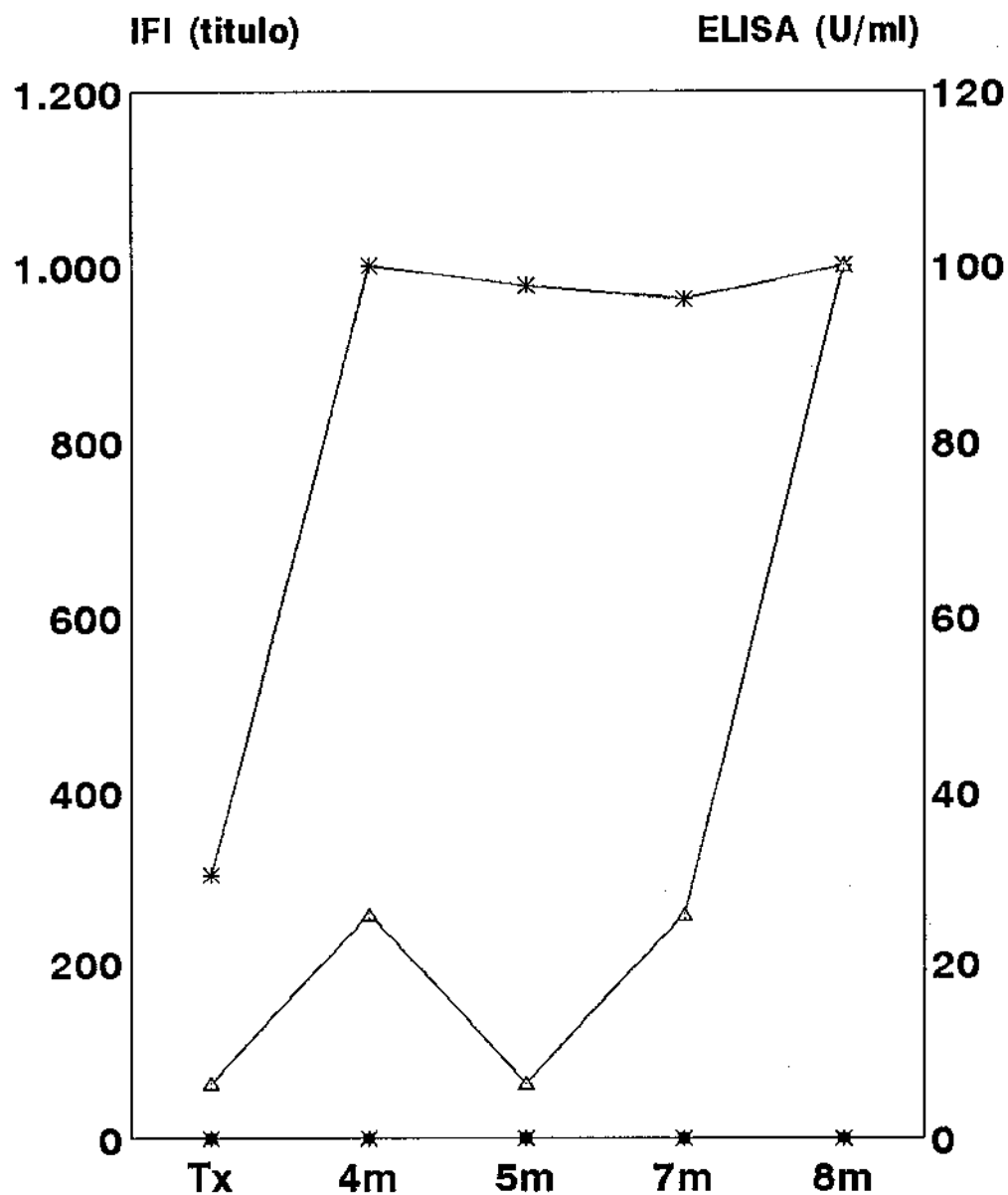
159. van Dyke, RB & Murphy, CM. Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by DNA-RNA hybridization. **J Clin Microbiol** **27**: 1739-1743, 1989.

ANEXOS

ANEXO I
GRÁFICOS DE Nº 1 A 37

Gráfico 1 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 1



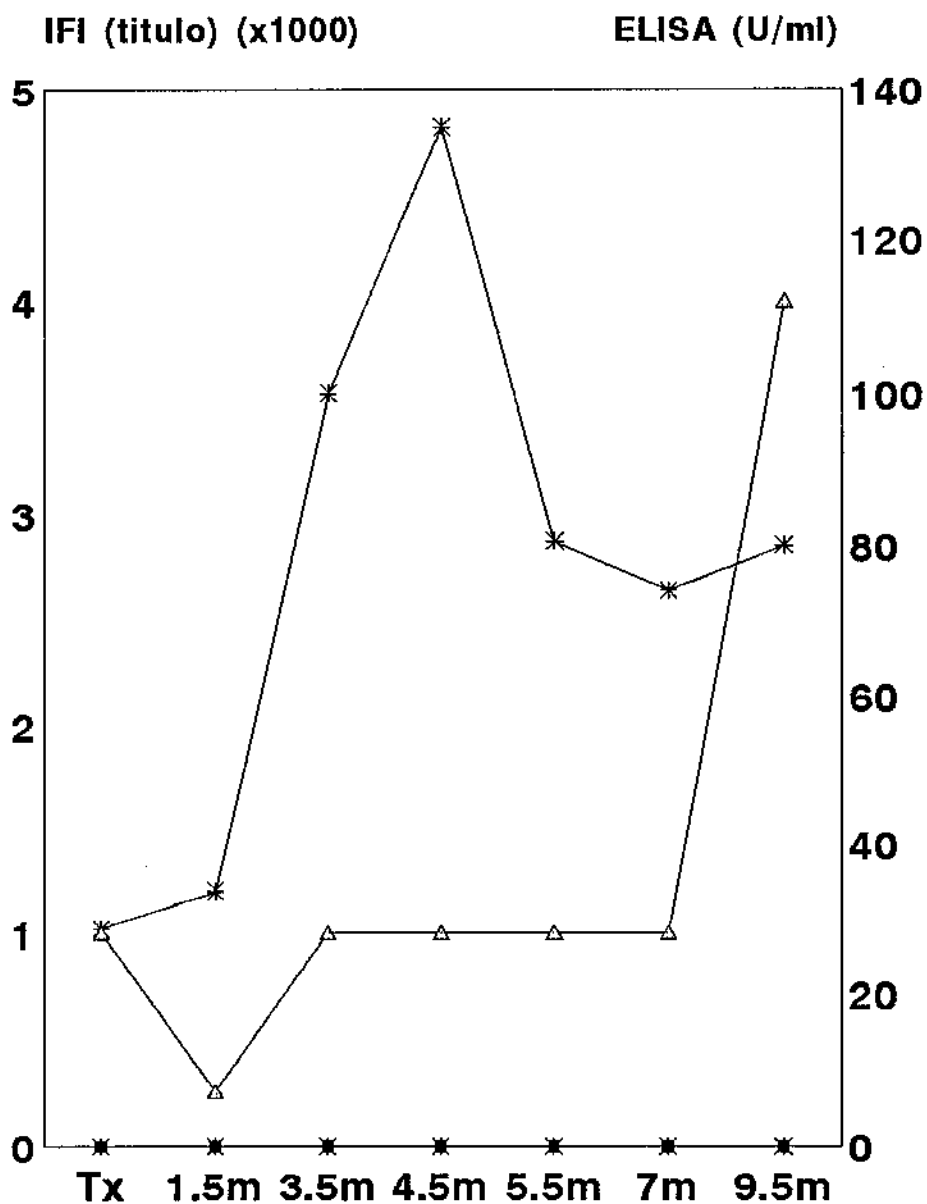
IFI-IgG	△	64	256	64	256	1.000
ELISA-IgG	*	30,26	100	97,63	96	100
IFI-IgM		-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-
PCR		-	-	-	-	+

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 2 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 2



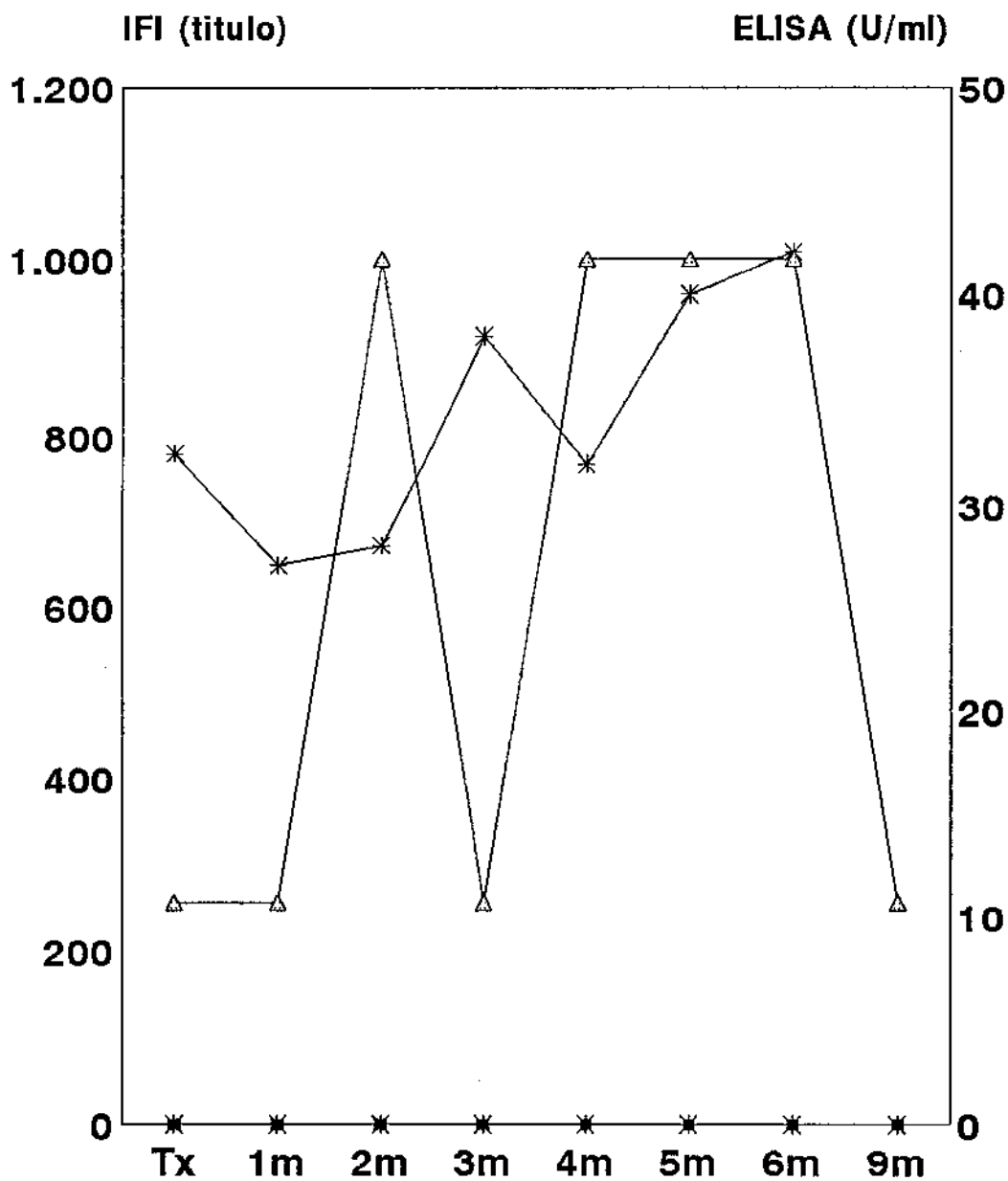
IFI-IgG	△	1	0,256	1	1	1	1	4
ELISA-IgG	*	28,5	33,5	100	135	80,5	74	80
IFI-IgM		-	-	-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-	-	-
PCR		-	-	-	-	-	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 3 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 3



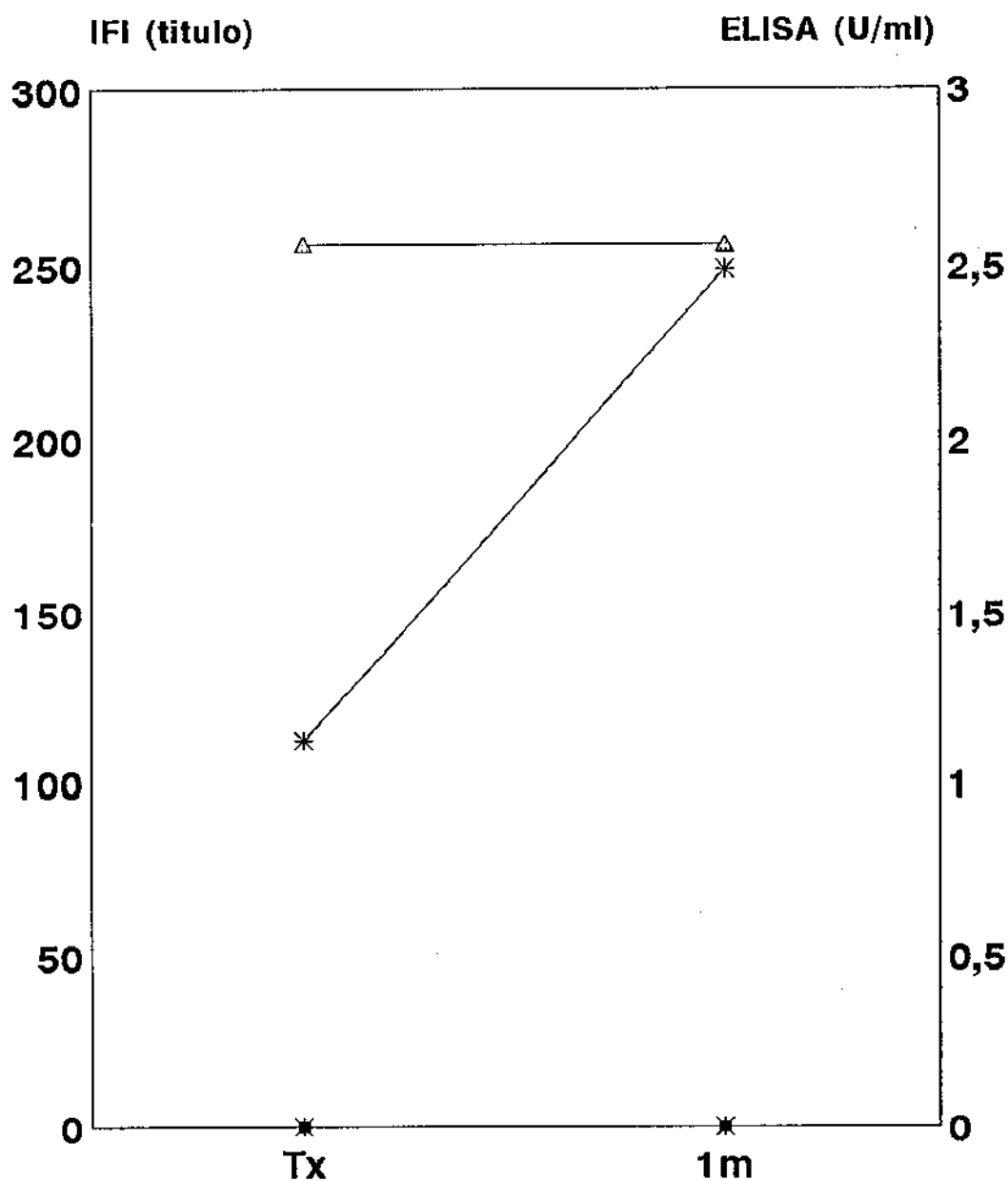
IFI-IgG	△	256	256	1.000	256	1.000	1.000	1.000	256
ELISA-IgG	*	32,5	27	28	38	32	40	42	
IFI-IgM		-	-	-	-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-	-	-	-
PCR		-	+	+	+	-	-	-	+

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 4 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 4



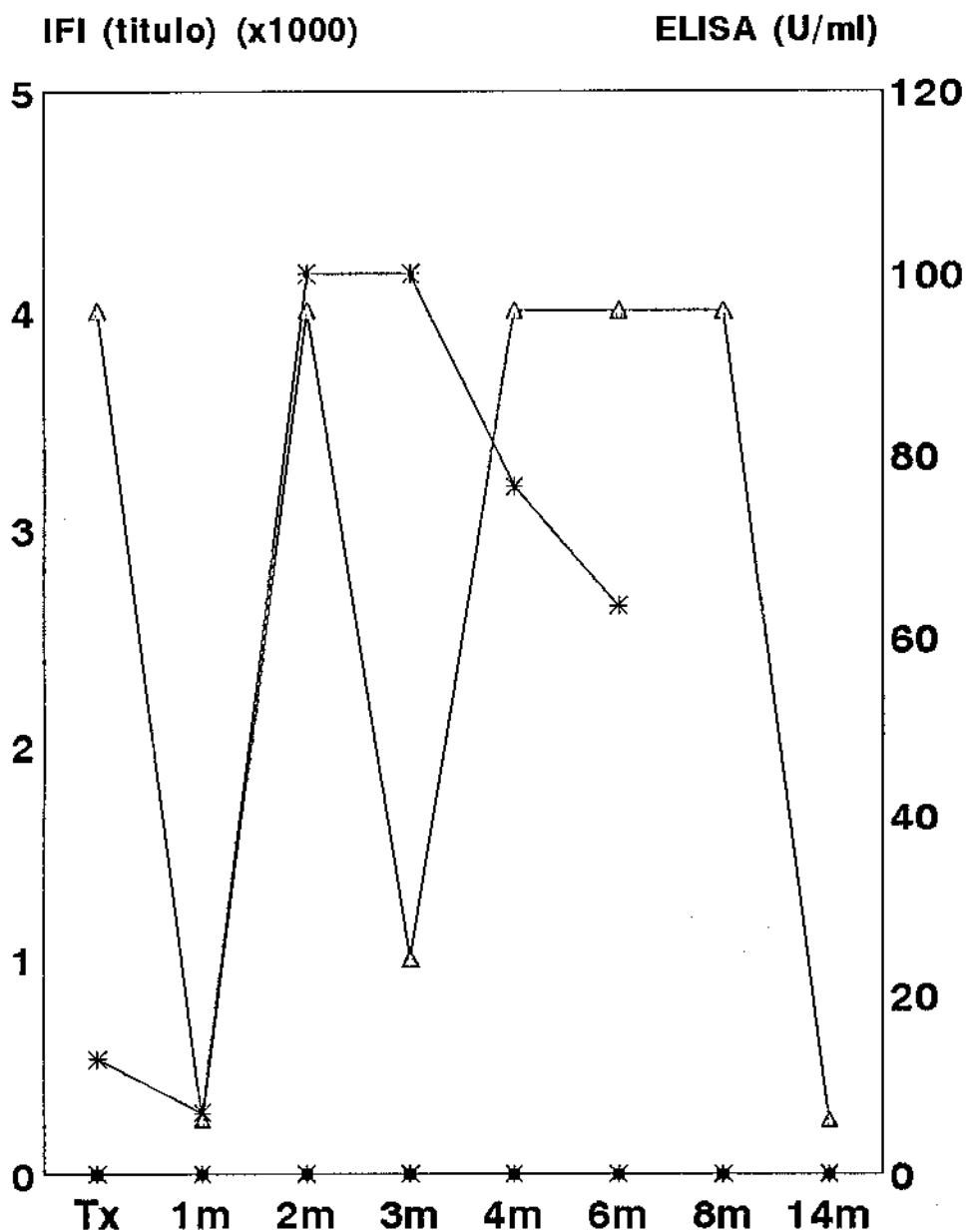
IFI-IgG	△	256	256
ELISA-IgG	*	-	-
IFI-IgM		-	-
ELISA-IgM		-	+
PCR		+	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 5 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 5



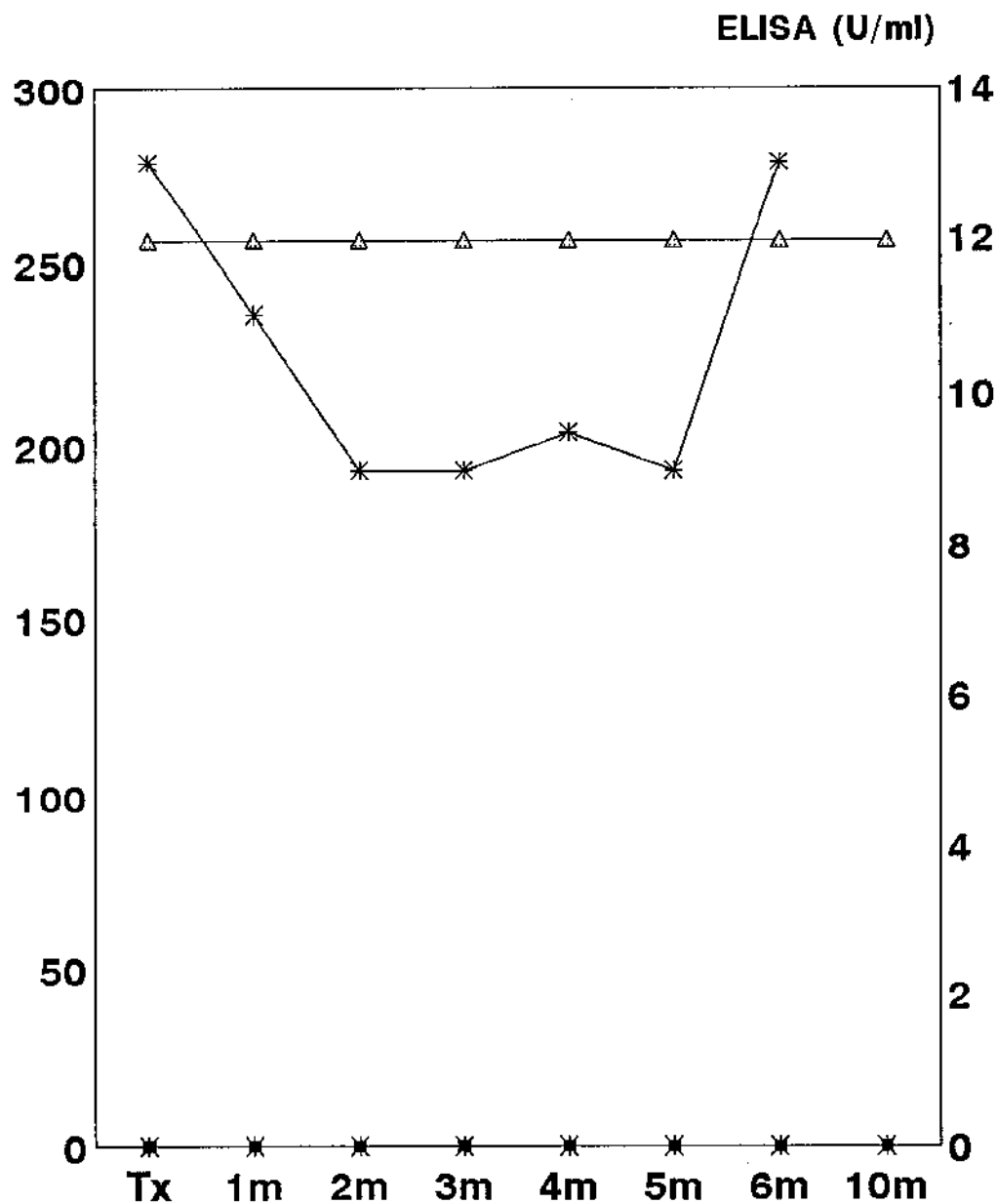
IFI-IgG	△	4	0,256	4	1	4	4	4	0,256
ELISA-IgG	*	13	7	100	100	76,5	63,5		
IFI-IgM		-	-	-	-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-	-	-	-
PCR		-	-	-	-	-	+	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 6 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 6



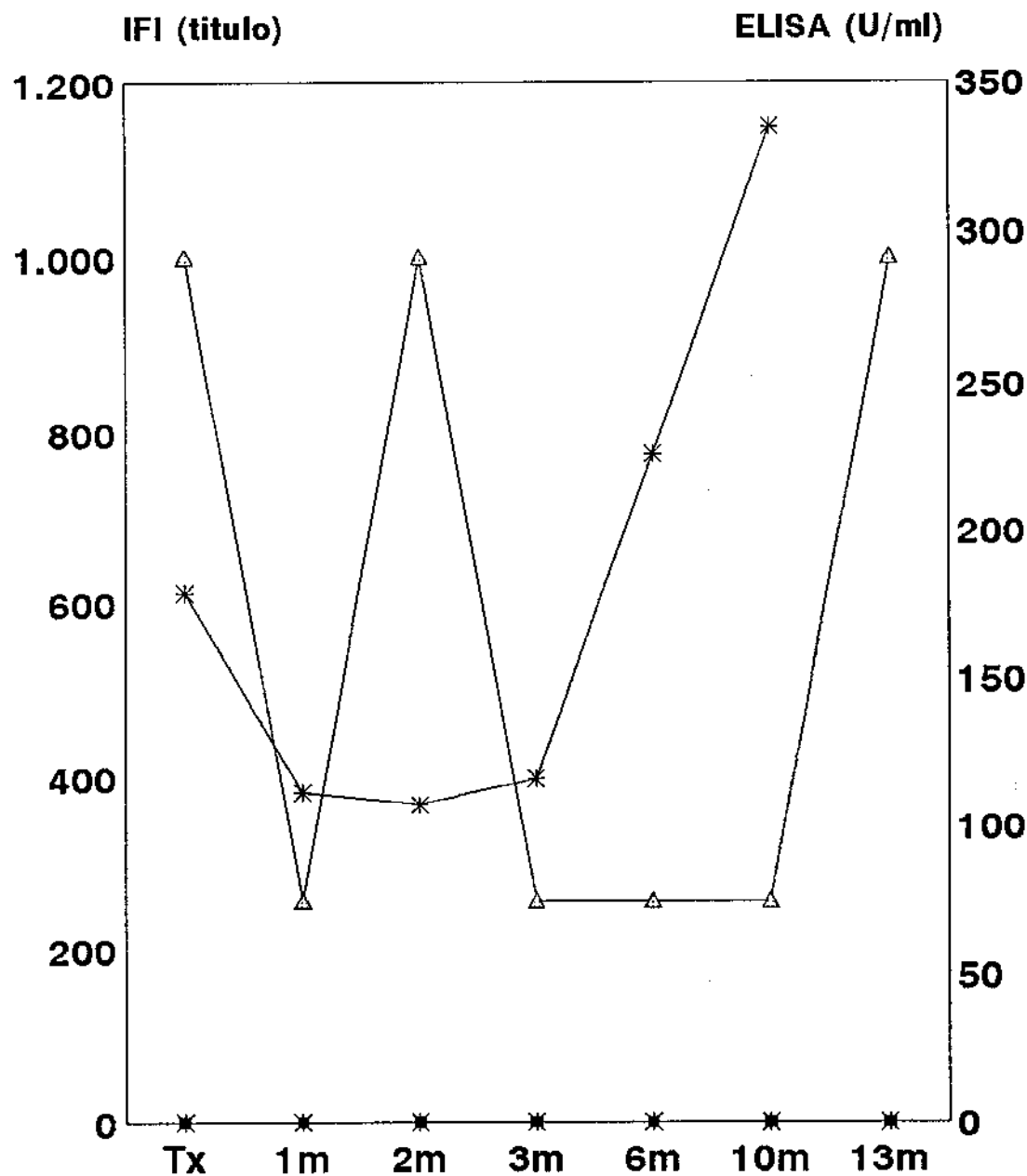
IFI-IgG	△	256	256	256	256	256	256	256
ELISA-IgG	*	13	11	9	9	9,5	9	13
IFI-IgM		-	-	-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-	-	-
PCR		-	+	-	+	-	+	+

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 7 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 7



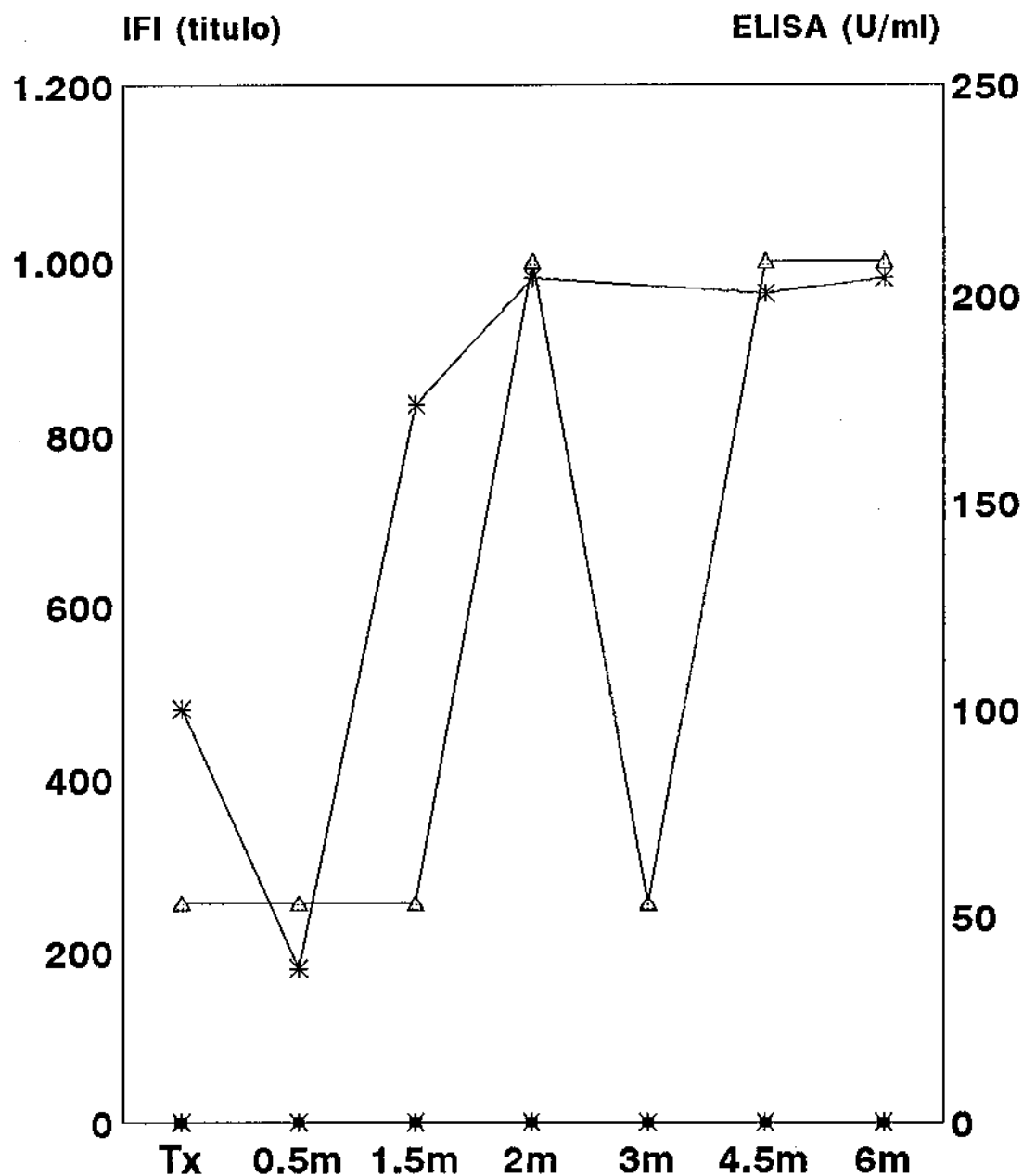
IFI-IgG	△	1.000	256	1.000	256	256	256	1.000
ELISA-IgG	*	178,12	111,2	107,08	116,24	226	335	
IFI-IgM		-	-	-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-	-	
PCR		-	-	-	-	-	-	

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 8 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 8



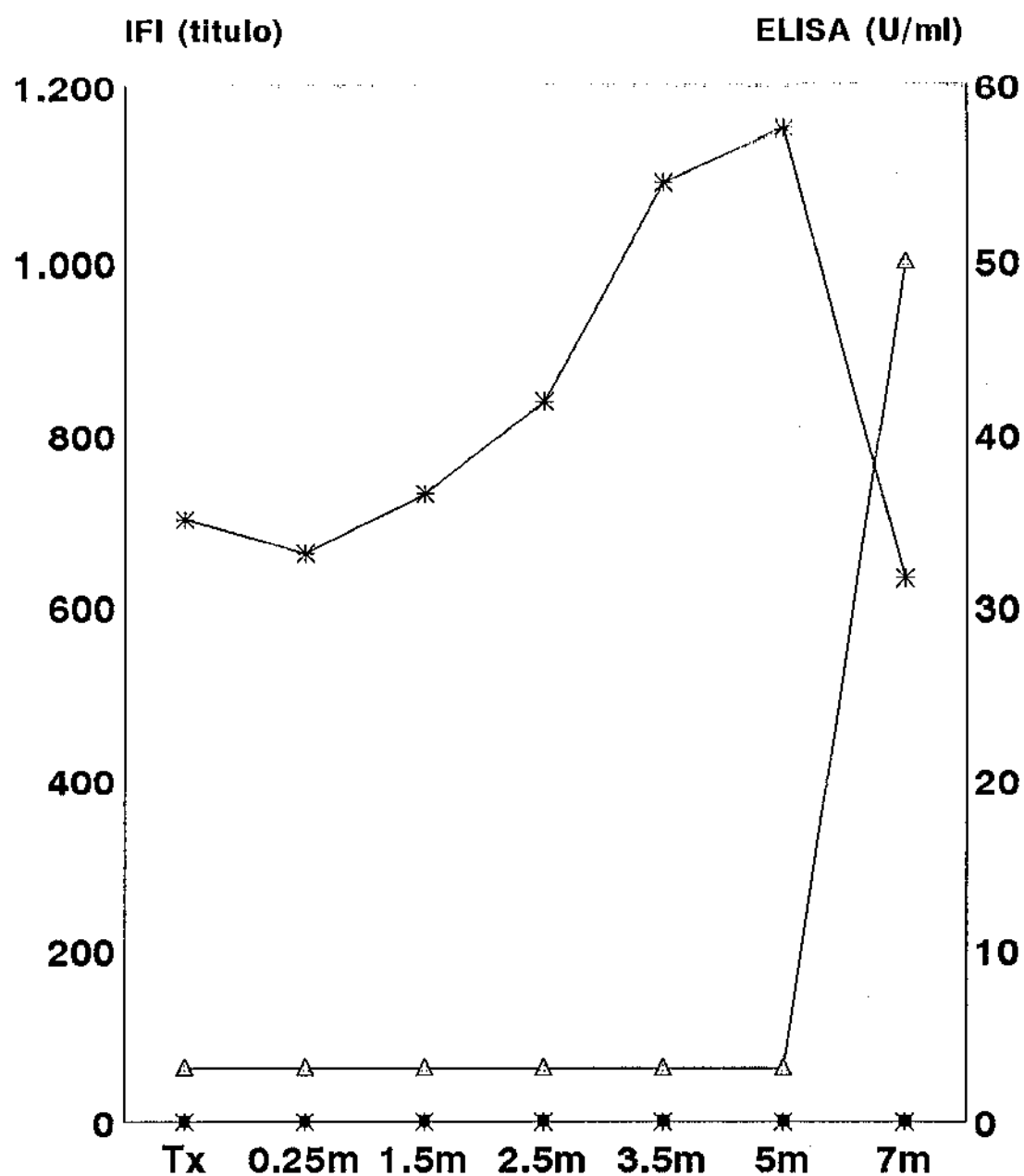
IFI-IgG $\triangle$	256	256	256	1.000	256	1.000	1.000
ELISA-IgG *	99,84	37,81	173,94	204,18		200,6	204,18
IFI-IgM	-	-	+	+	+	+	+
ELISA-IgM	-	-	+	+	+	+	-
PCR	-	-	-	-	+	-	+

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 9 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 9



IFI-IgG	△	64	64	64	64	64	64	1.000
ELISA-IgG	*	35	33	36,5	42	54,43	57,52	31,59
IFI-IgM		-	-	-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-	-	-
PCR		-	-	-	-	-	-	+

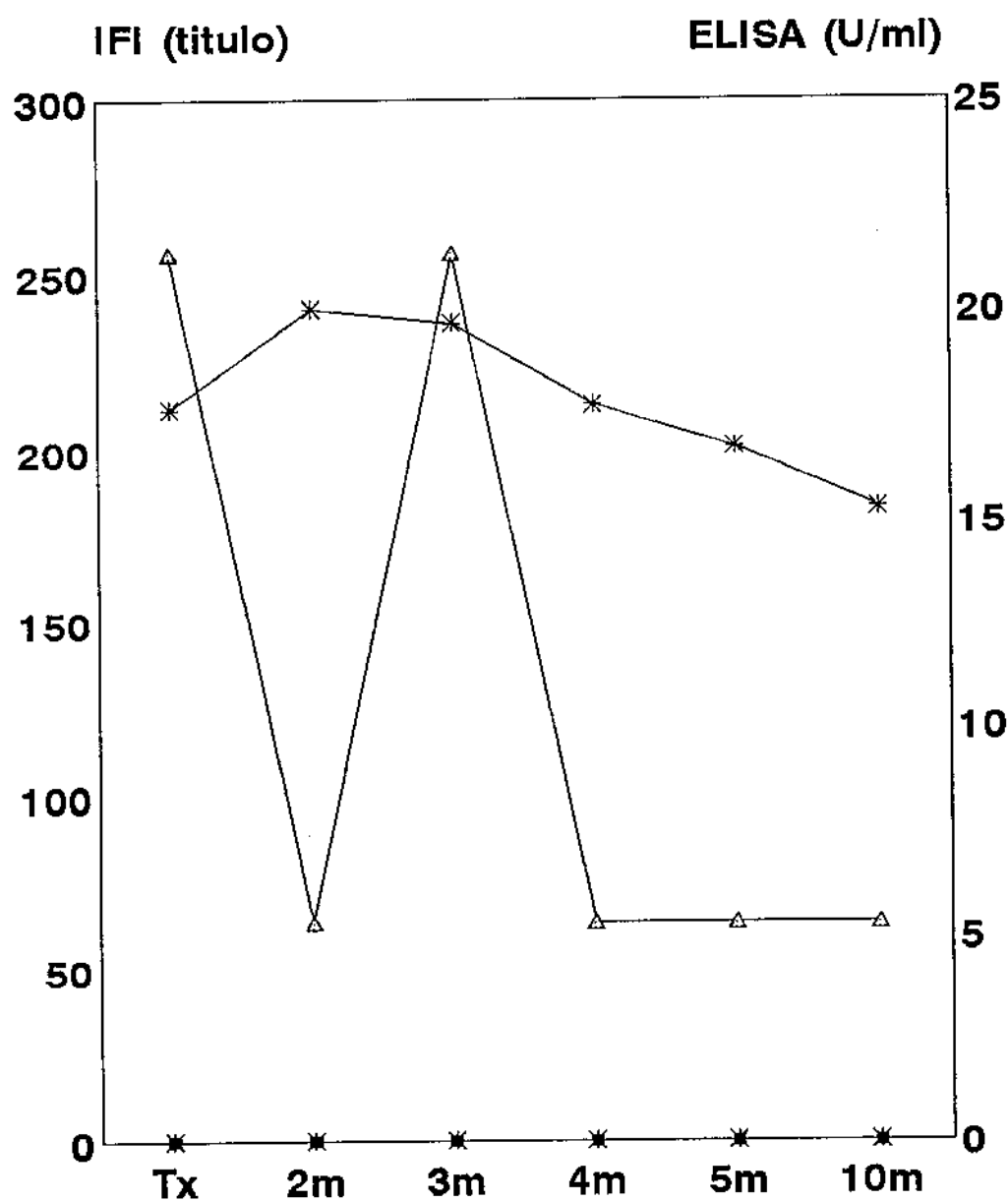
Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 10 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos

anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 10



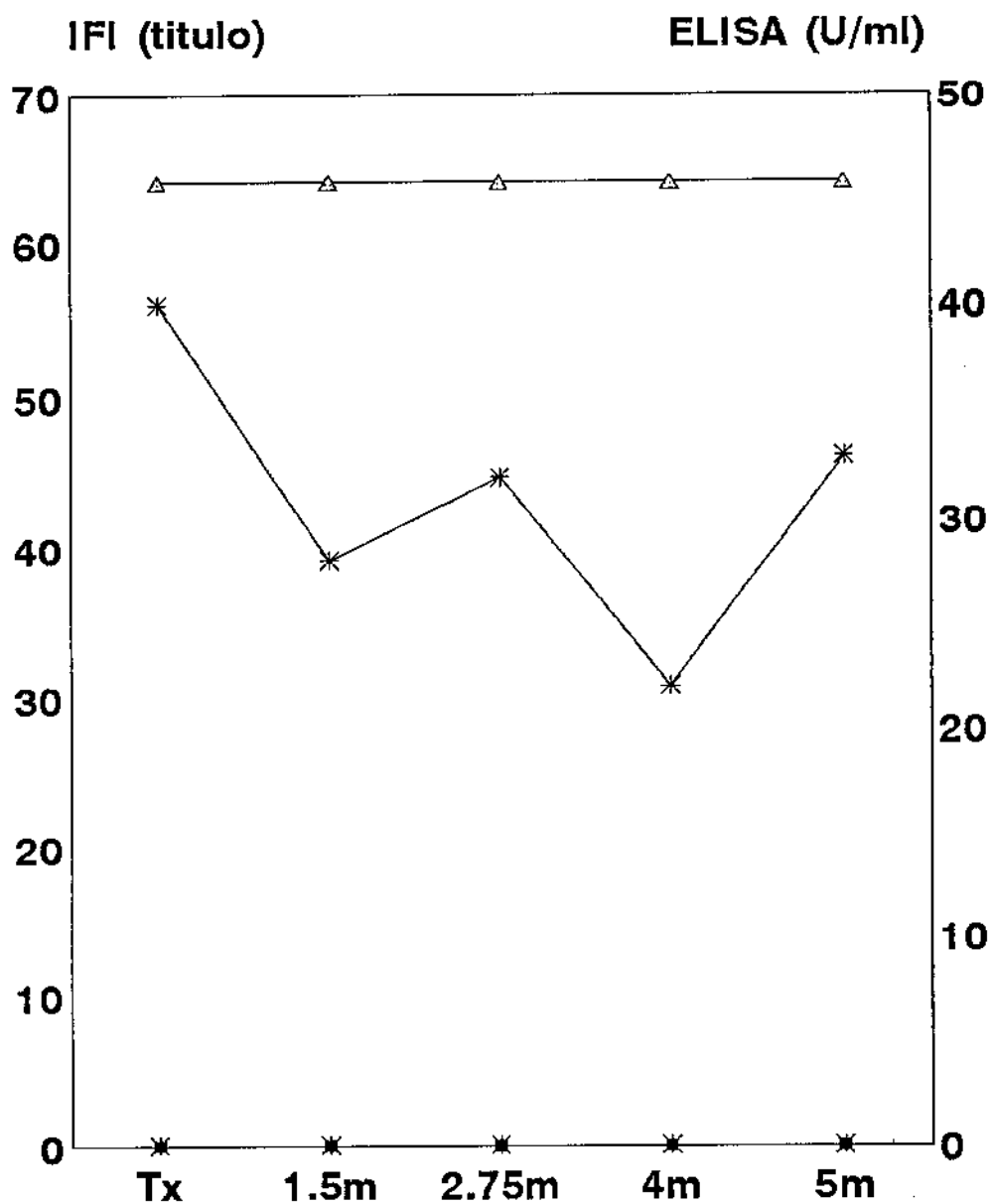
IFI-IgG	△	256	64	256	64	64	64
ELISA-IgG	*	17,69	20,03	19,69	17,79	16,77	15,3
IFI-IgM		-	-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-	-
PCR		+	+	-	-	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 11 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 11



IFI-IgG	△	64	64	64	64	64
ELISA-IgG	*	40	28	32	22	33
IFI-IgM		-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-
PCR		-	-	+	-	-

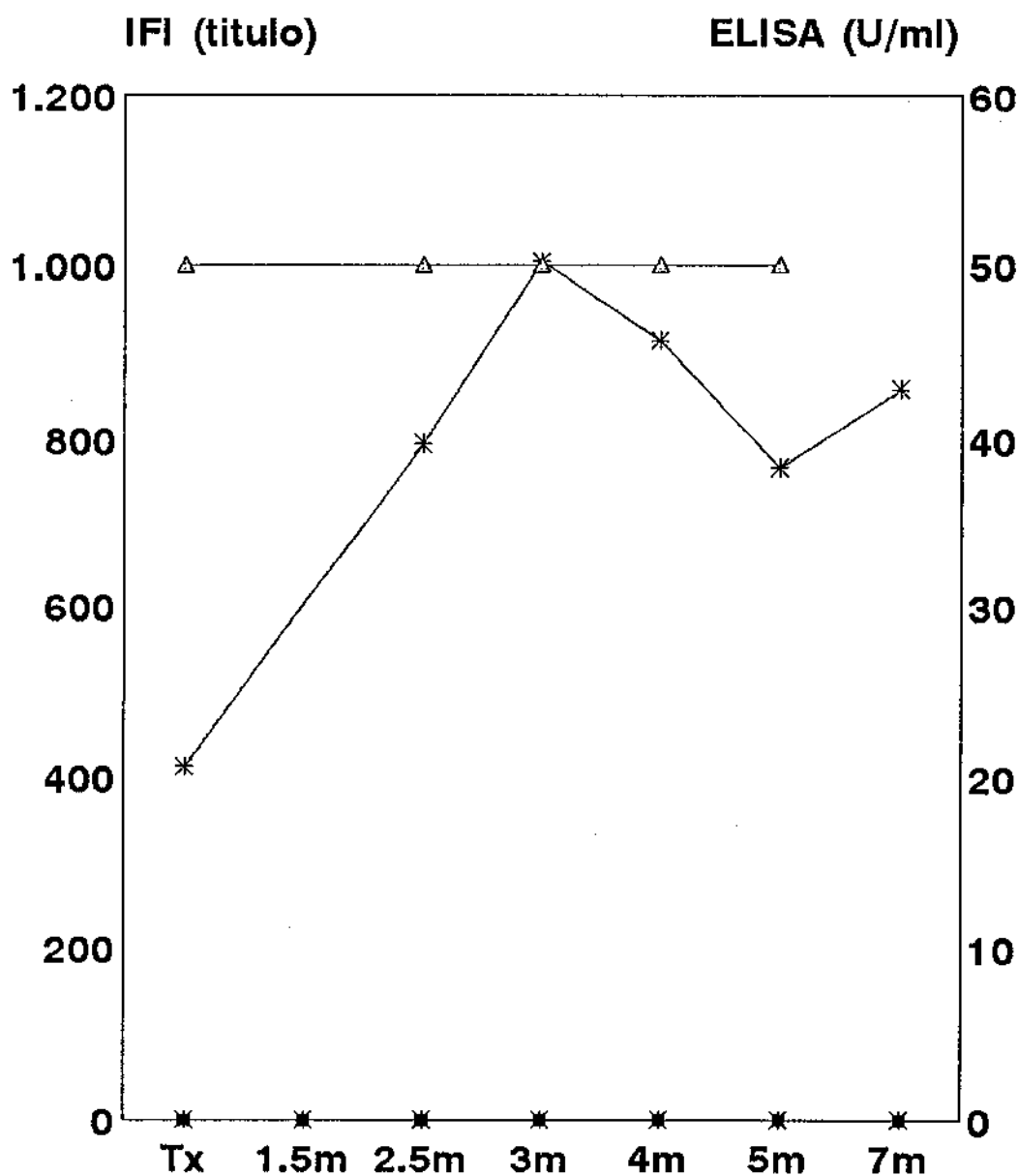
Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 12 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos

anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 12



IFI-IgG	△	1.000		1.000	1.000	1.000	1.000	
ELISA-IgG	*	20,68		39,79	50,2	45,64	38,41	42,87
IFI-IgM		-		-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-		+	+	+	+	+
PCR		+	-	-	+	+	+	+

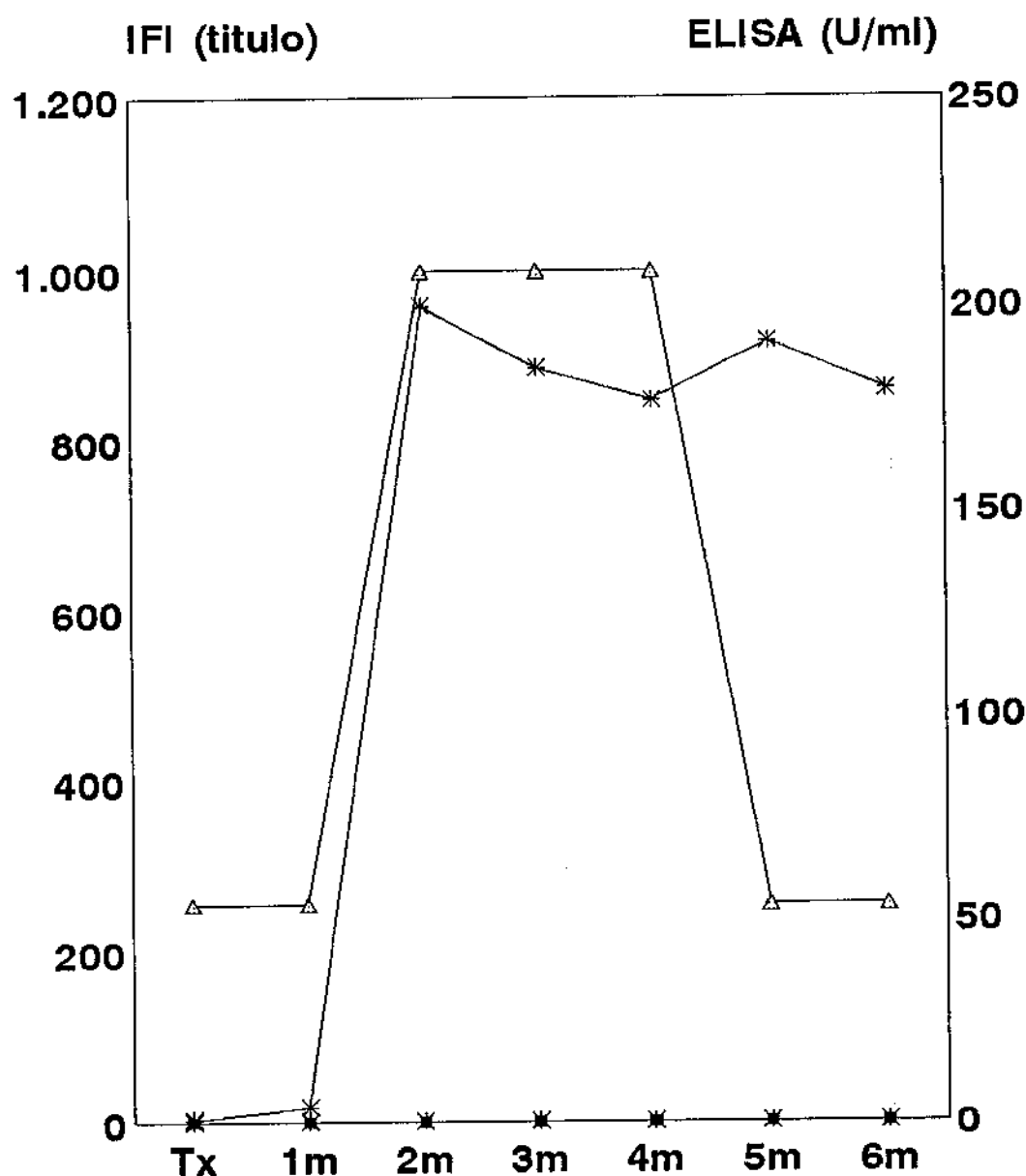
Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 13 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos

anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 13



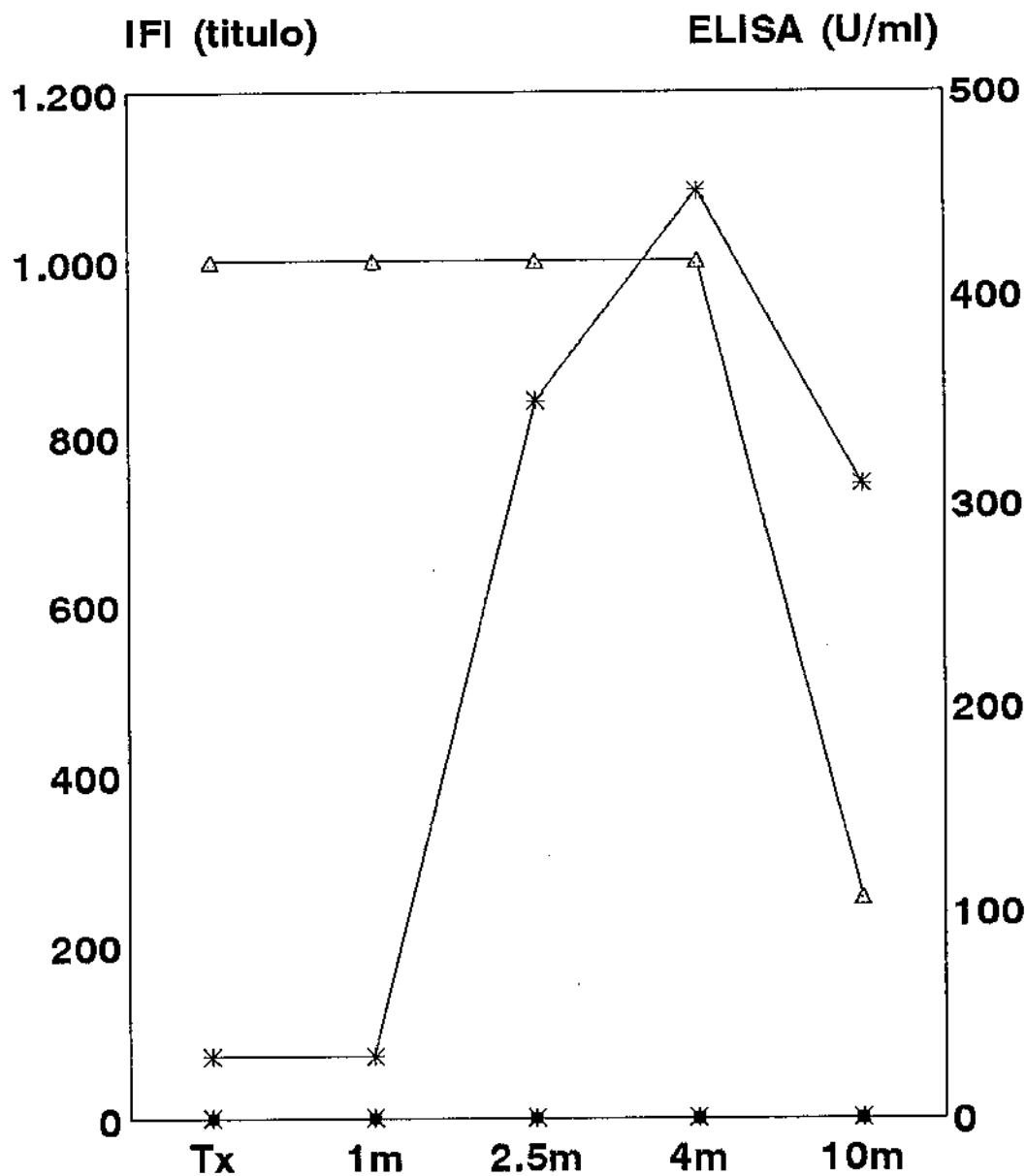
IFI-IgG	△	256	256	1.000	1.000	1.000	256	256
ELISA-IgG	*	-	-	200	184,46	176,44	191,14	179,11
IFI-IgM		-	-	+	+	+	-	-
ELISA-IgM		-	+	+	+	+	+	+
PCR		-	-	+	+	+	+	+

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 14 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 14



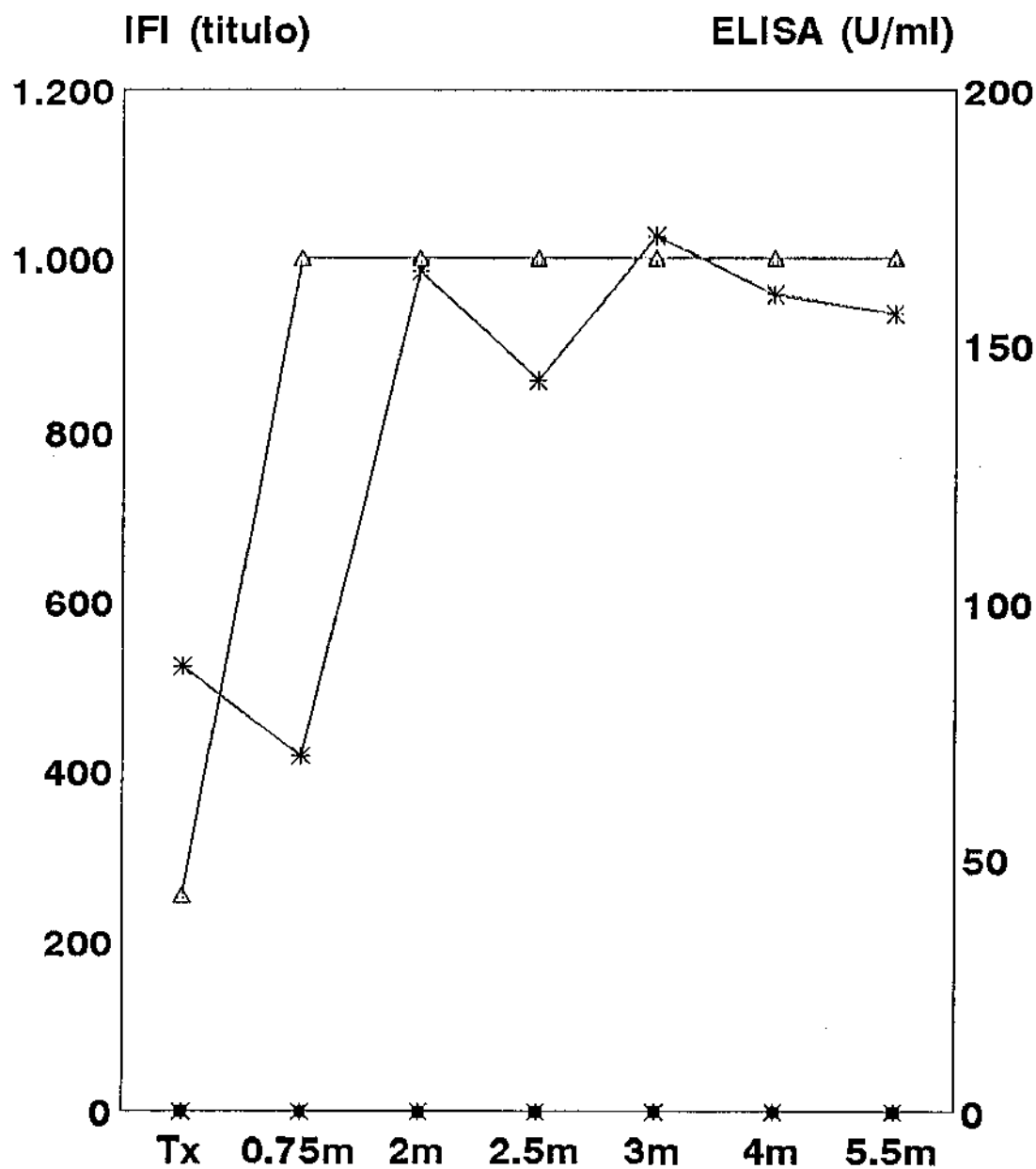
IFI-IgG	△	1.000	1.000	1.000	1.000	256
ELISA-IgG	*	30	30	350	450	310
IFI-IgM		-	-	+	+	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-
PCR		-	-	-	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 15 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 15



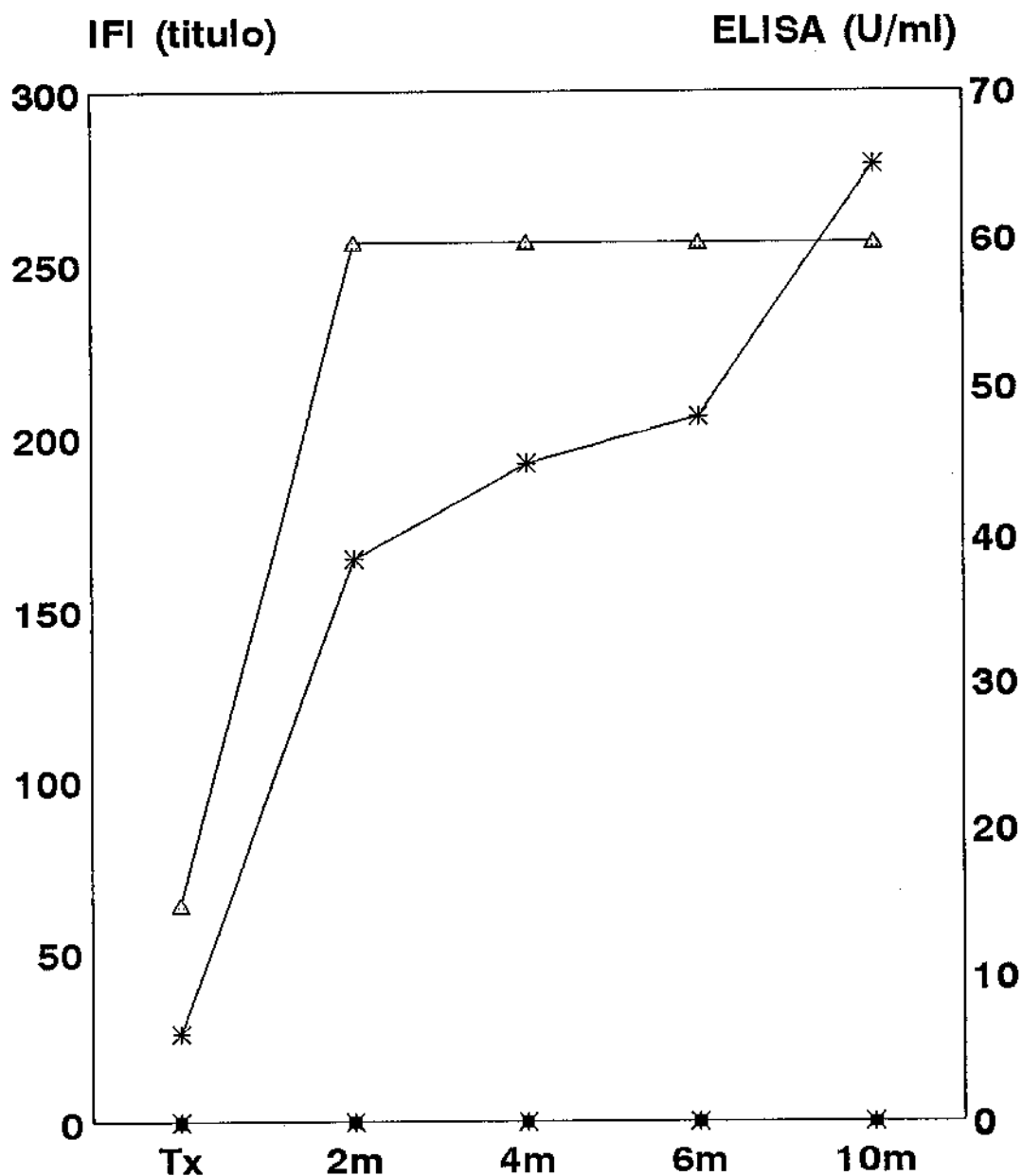
IFI-IgG	△	256	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
ELISA-IgG	*	87,27	69,65	164,32	143,27	170,9	159,8	156
IFI-IgM		-	-	-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-	-	-
PCR		-	+	-	+	+	+	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 16 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 16



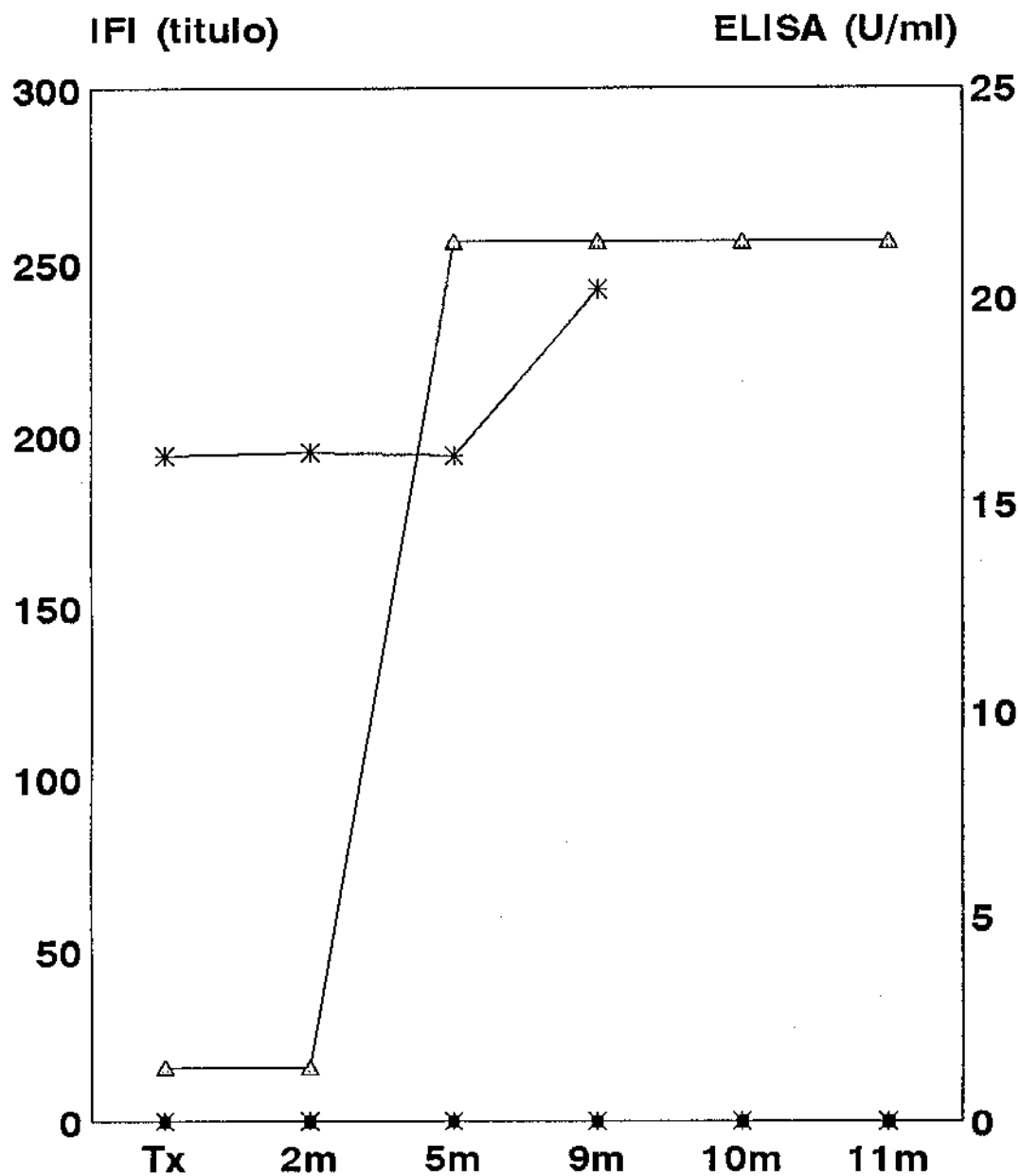
IFI-IgG $\triangle$	64	256	256	256	256
ELISA-IgG *	6,045	38,58	44,85	48	65
IFI-IgM	-	-	-	-	-
ELISA-IgM	-	-	-	-	-
PCR	-	-	+	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 17 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 17



IFI-IgG $\triangle$	16	16	256	256	256	256
ELISA-IgG *	16,18	16,27	16,18	20,21		
IFI-IgM	-	-	-	-	-	-
ELISA-IgM	-	-	-	-	-	-
PCR	+	-	+	-	-	-

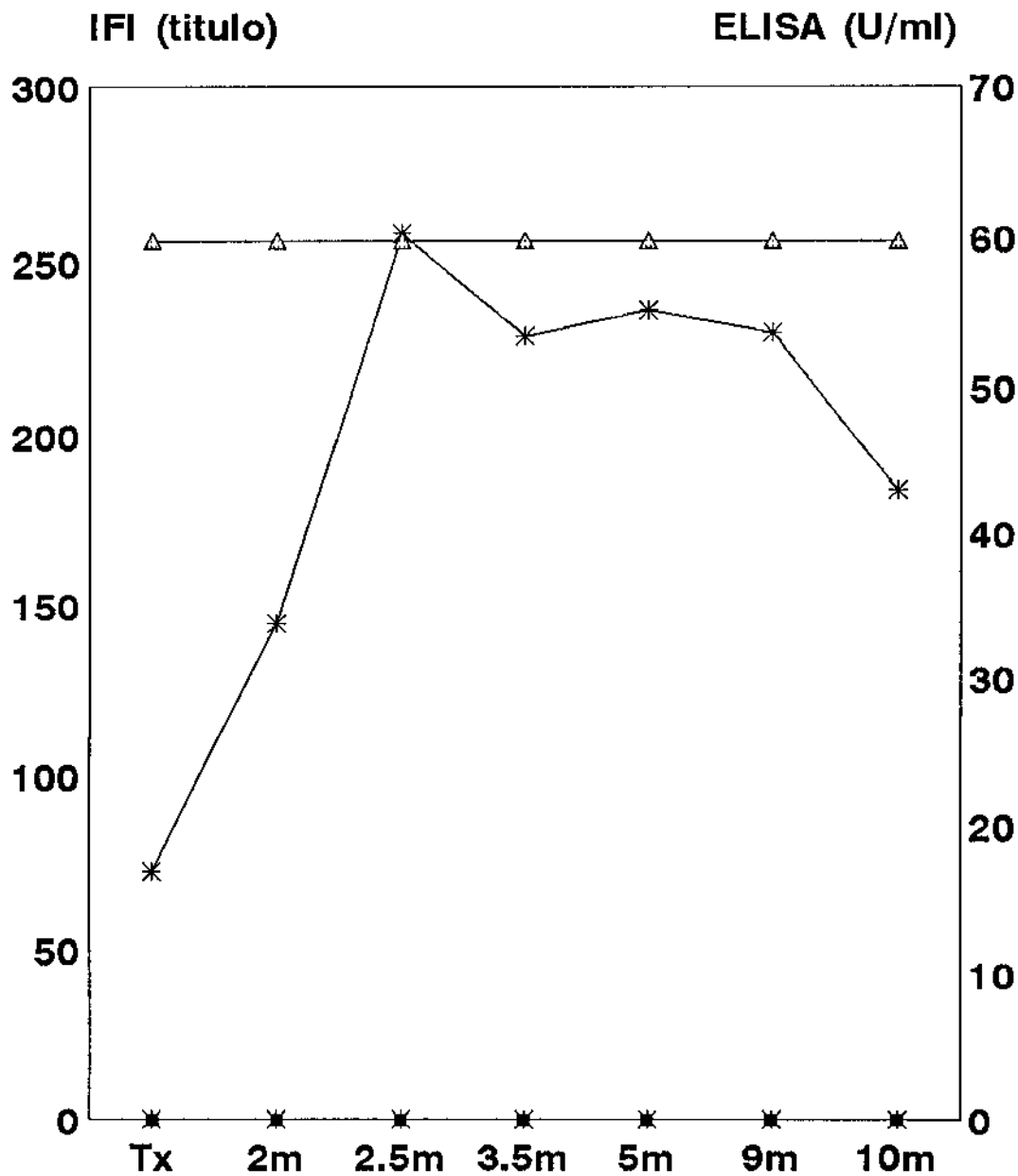
Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 18 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos

anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 18



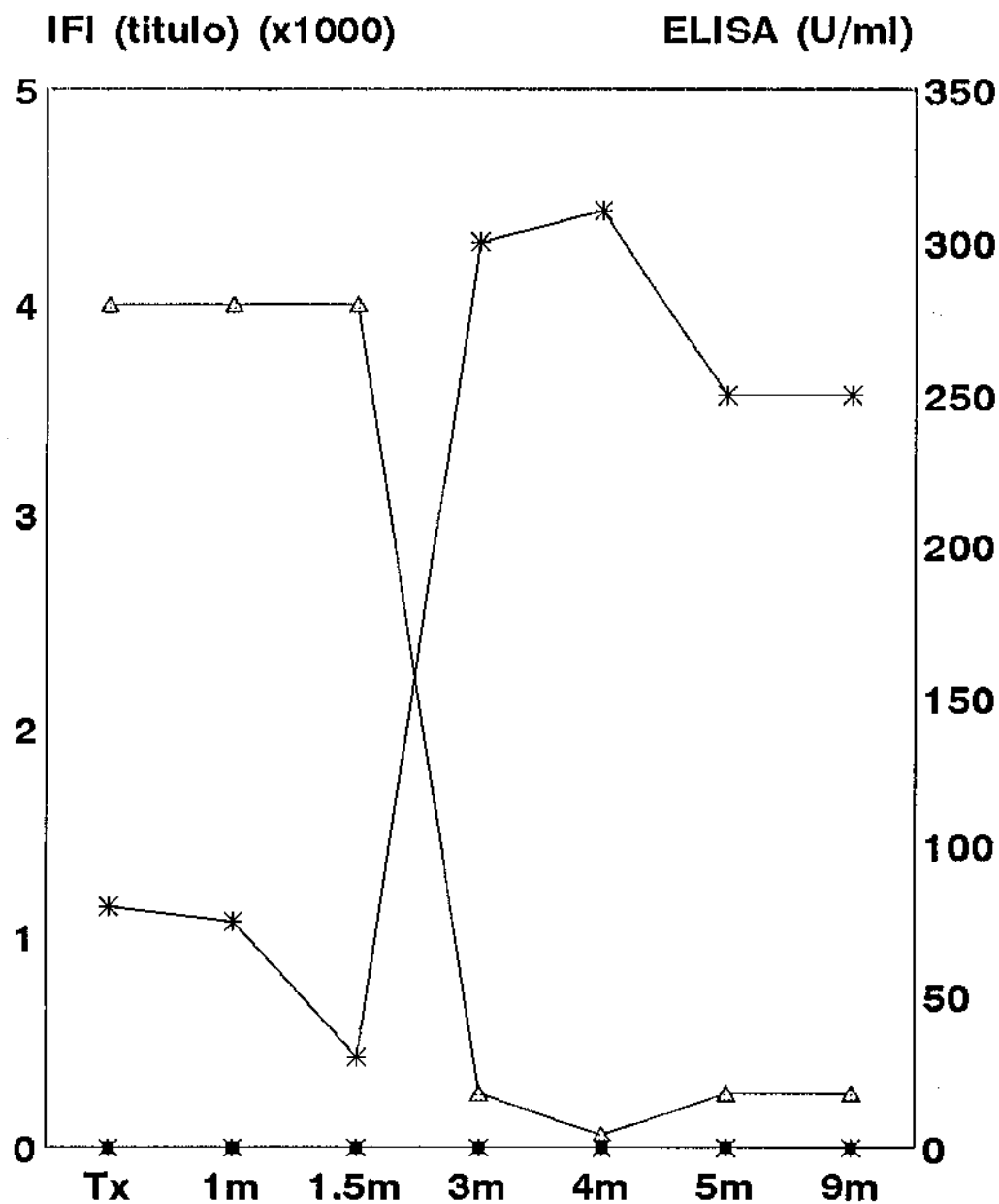
IFI-IgG	△	256	256	256	256	256	256	256
ELISA-IgG	*	16,97	33,79	60,22	53,39	55,1	53,64	42,93
IFI-IgM		-	-	-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-	-	-
PCR		-	-	-	-	-	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 19 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 19



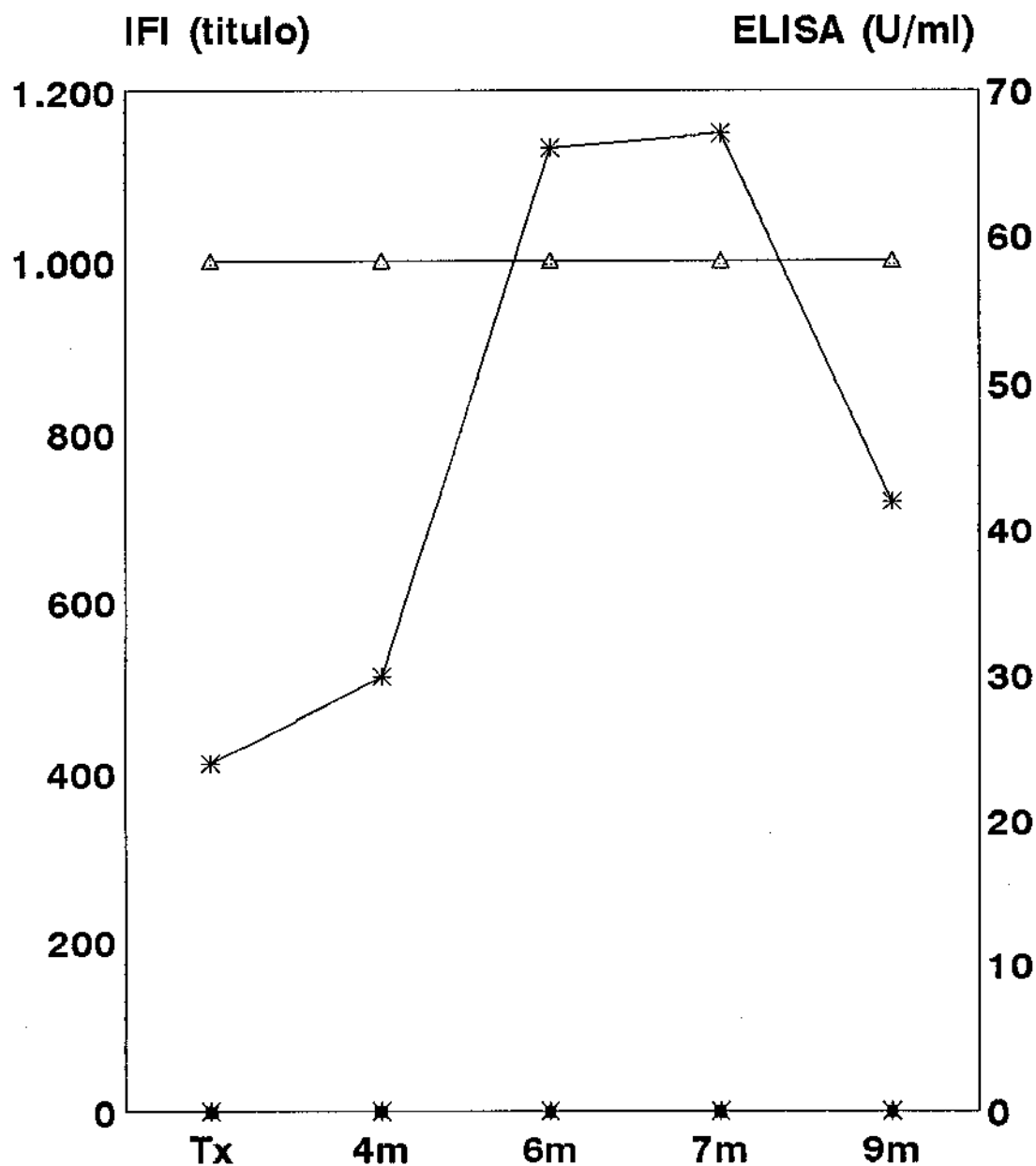
IFI-IgG	△	4	4	4	0,256	0,064	0,256	0,256
ELISA-IgG	*	80	75	30	300	310	250	250
IFI-IgM		-	-	-	+	+	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-	-	-
PCR		-	-	-	-	-	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 20 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 20



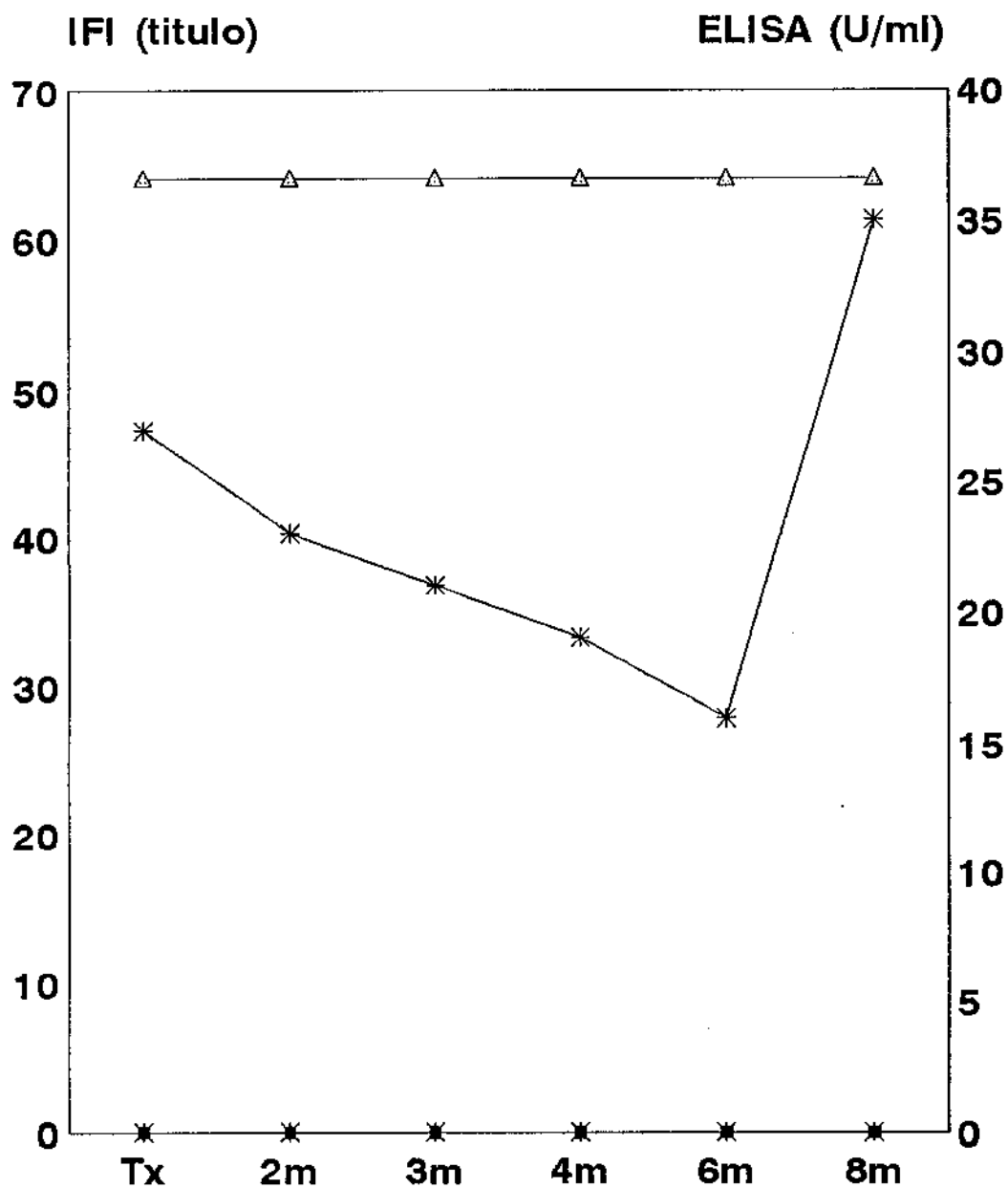
IFI-IgG	△	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
ELISA-IgG	*	24	30	66	67	42
IFI-IgM		--	--	--	--	--
ELISA-IgM		--	--	--	--	--
PCR		--	--	--	--	--

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 21 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 21



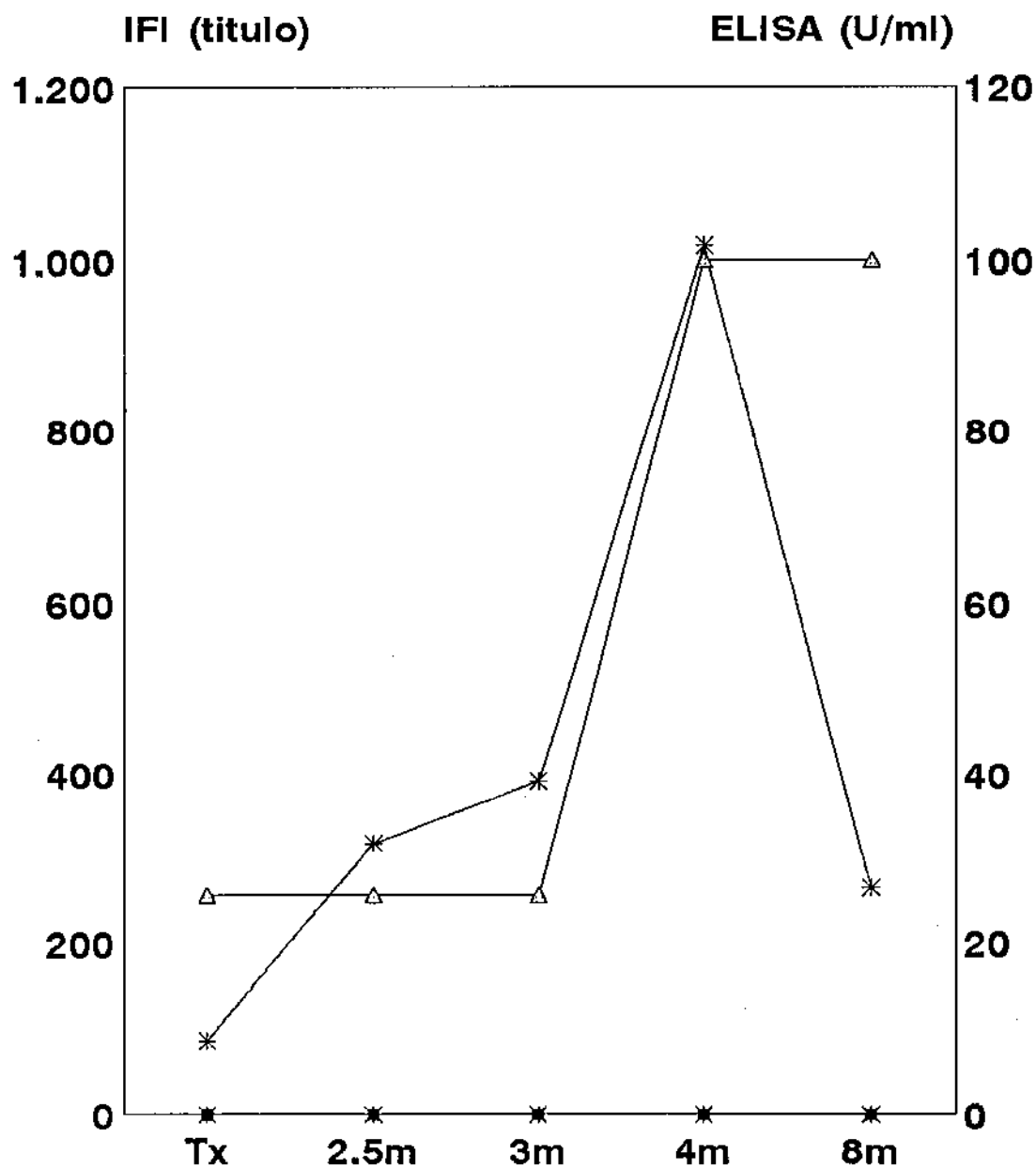
IFI-IgG	△	64	64	64	64	64	64
ELISA-IgG	*	27	23	21	19	16	35
IFI-IgM		-	-	-	-	-	+
ELISA-IgM		-	-	-	-	-	-
PCR		-	+	+	-	+	+

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 22 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 23



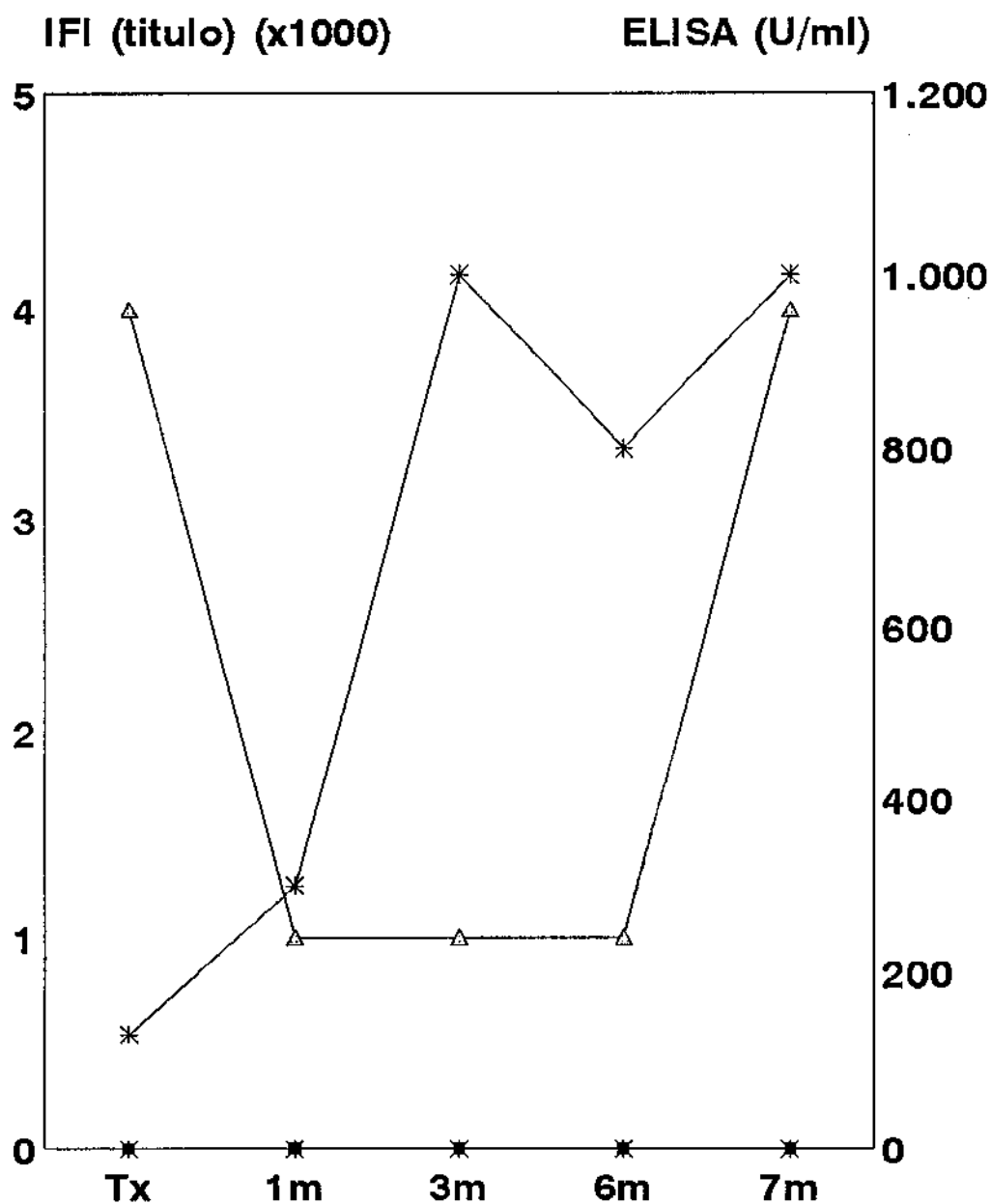
IFI-IgG	△	256	256	256	1.000	1.000
ELISA-IgG	*	8,73	31,73	39,18	101,68	26,38
IFI-IgM		-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-
PCR		+	-	+	+	+

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 23 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 24



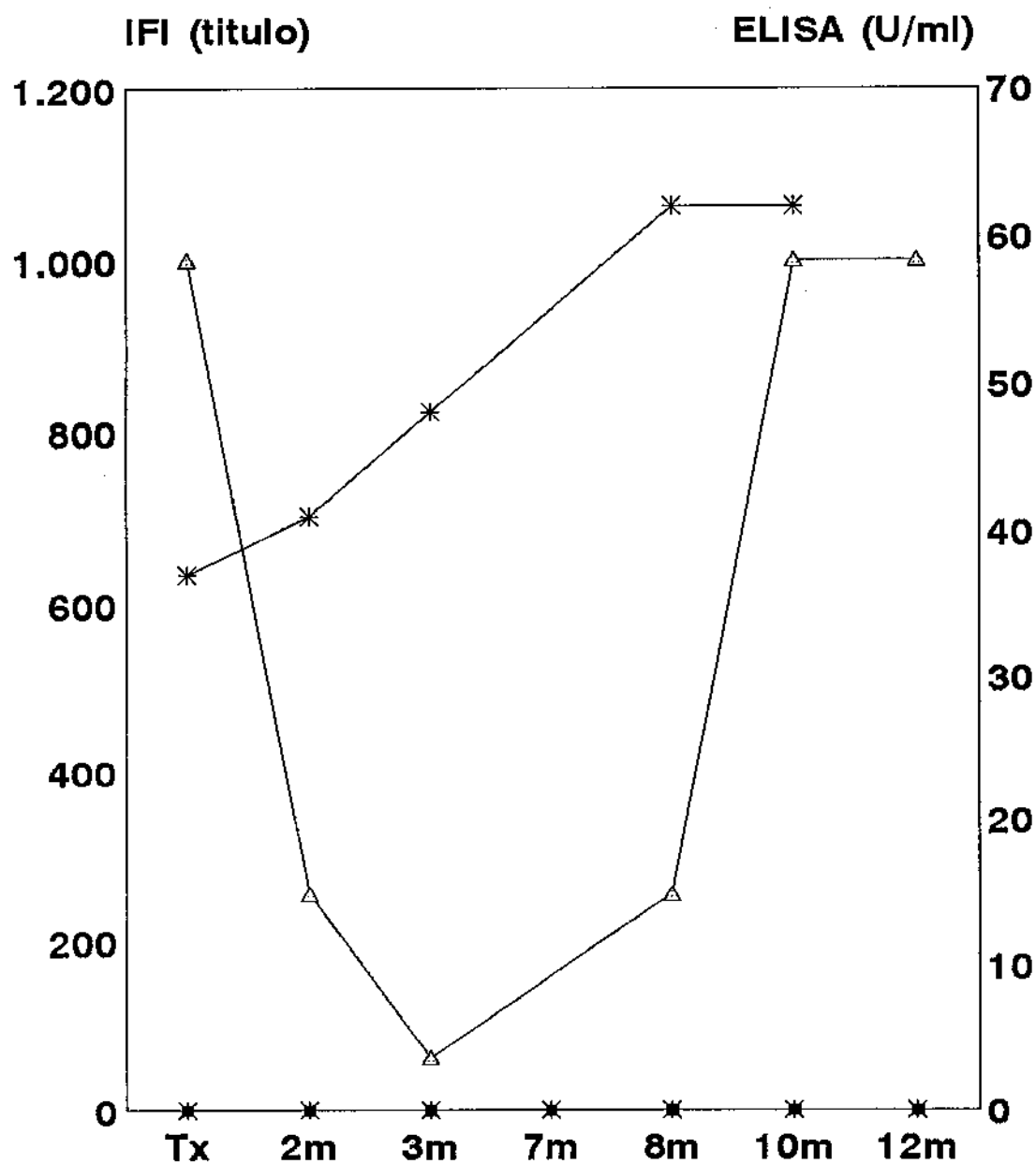
IFI-IgG	△	4	1	1	1	4
ELISA-IgG	*	130	300	1.000	800	1.000
IFI-IgM		-	+	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-
PCR		+	+	-	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 24 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 25



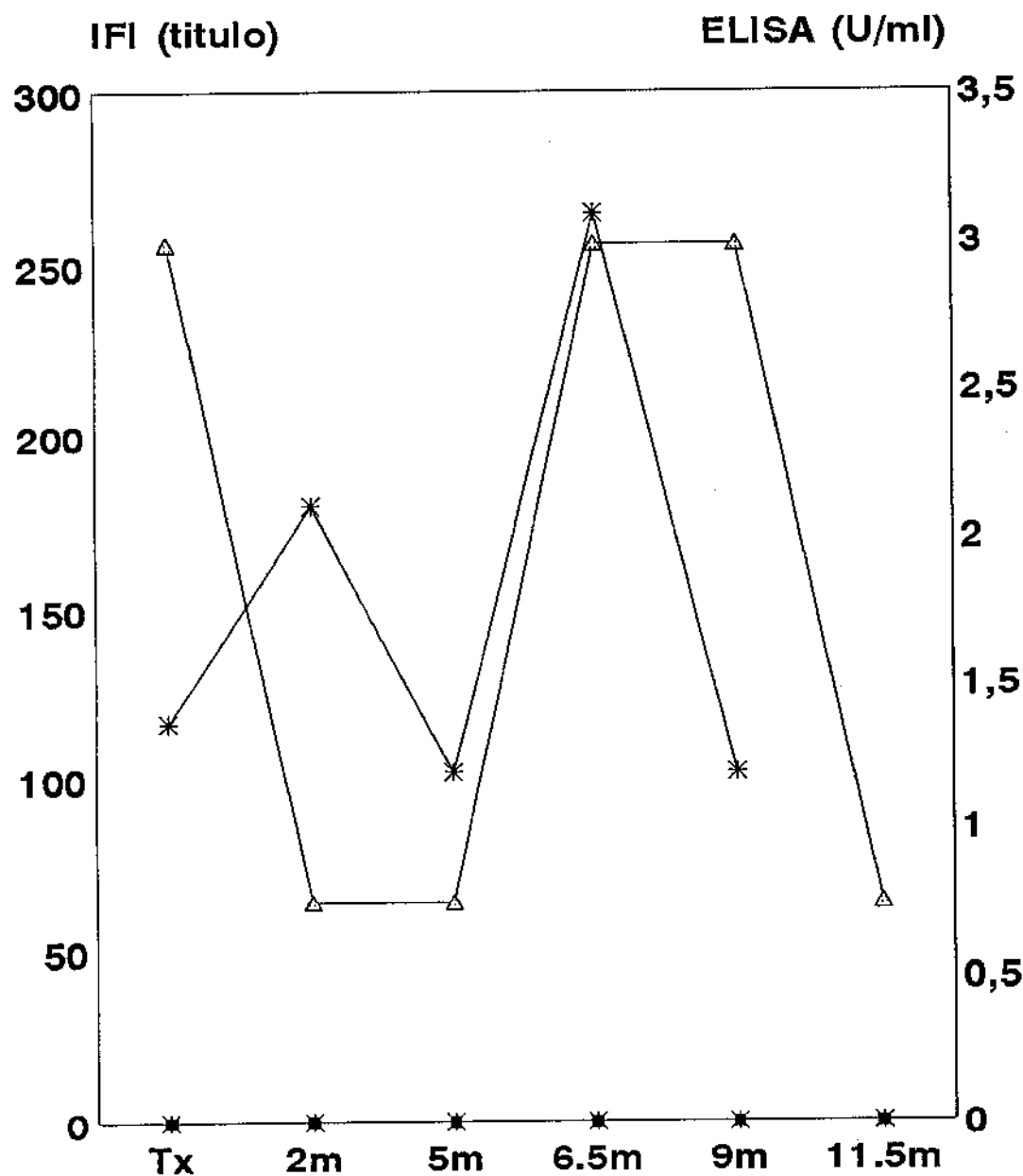
IFI-IgG	△	1.000	256	64		256	1.000	1.000
ELISA-IgG	*	37	41	48		62	62	
IFI-IgM		-	-	-		-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-		-	-	
PCR		-	-	+	-	-	-	

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 25 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 26



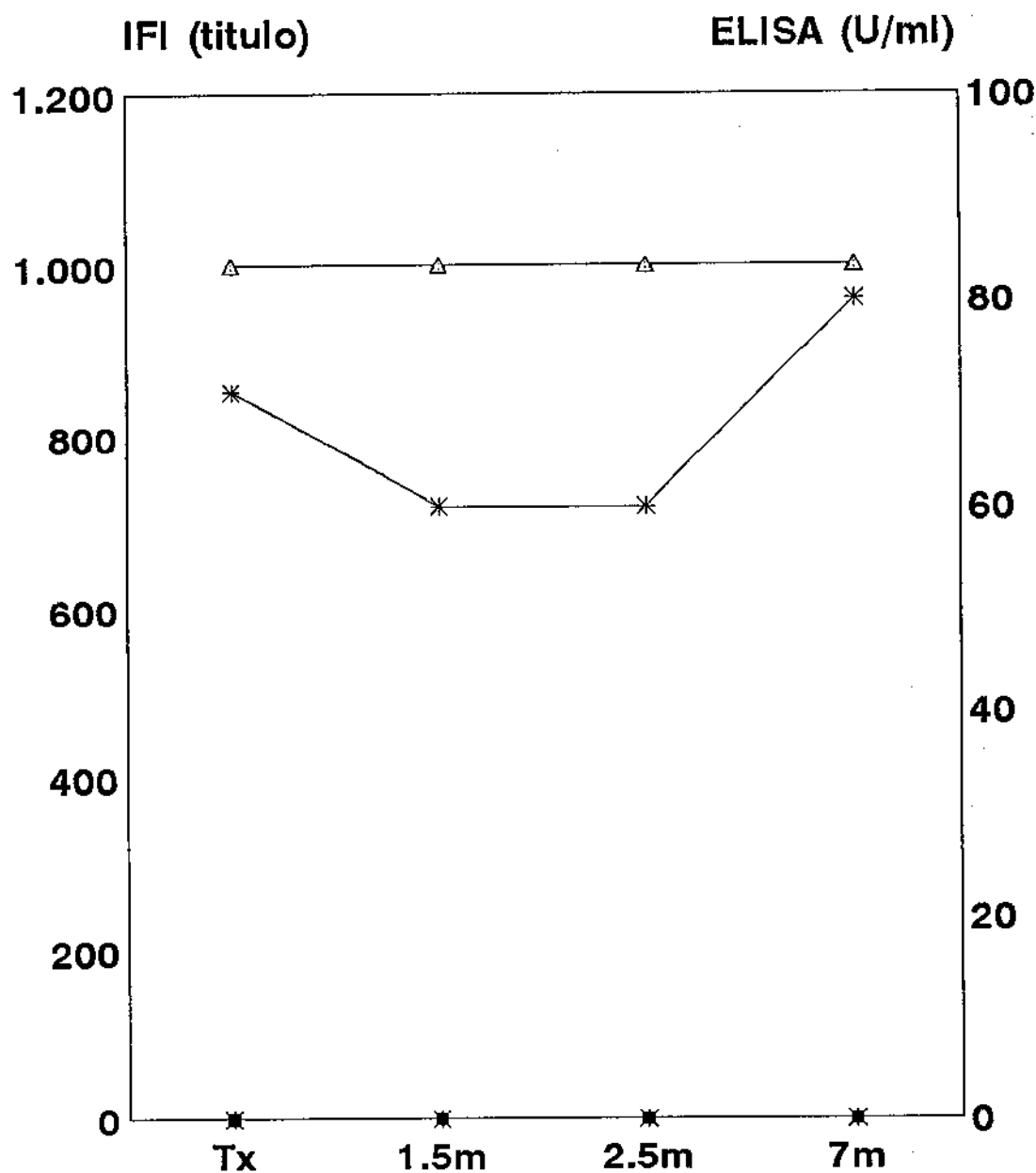
IFI-IgG	△	256	64	64	256	256	64
ELISA-IgG	*	-	-	-	-	-	-
IFI-IgM		-	-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-	-
PCR		-	-	-	-	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 26 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 27



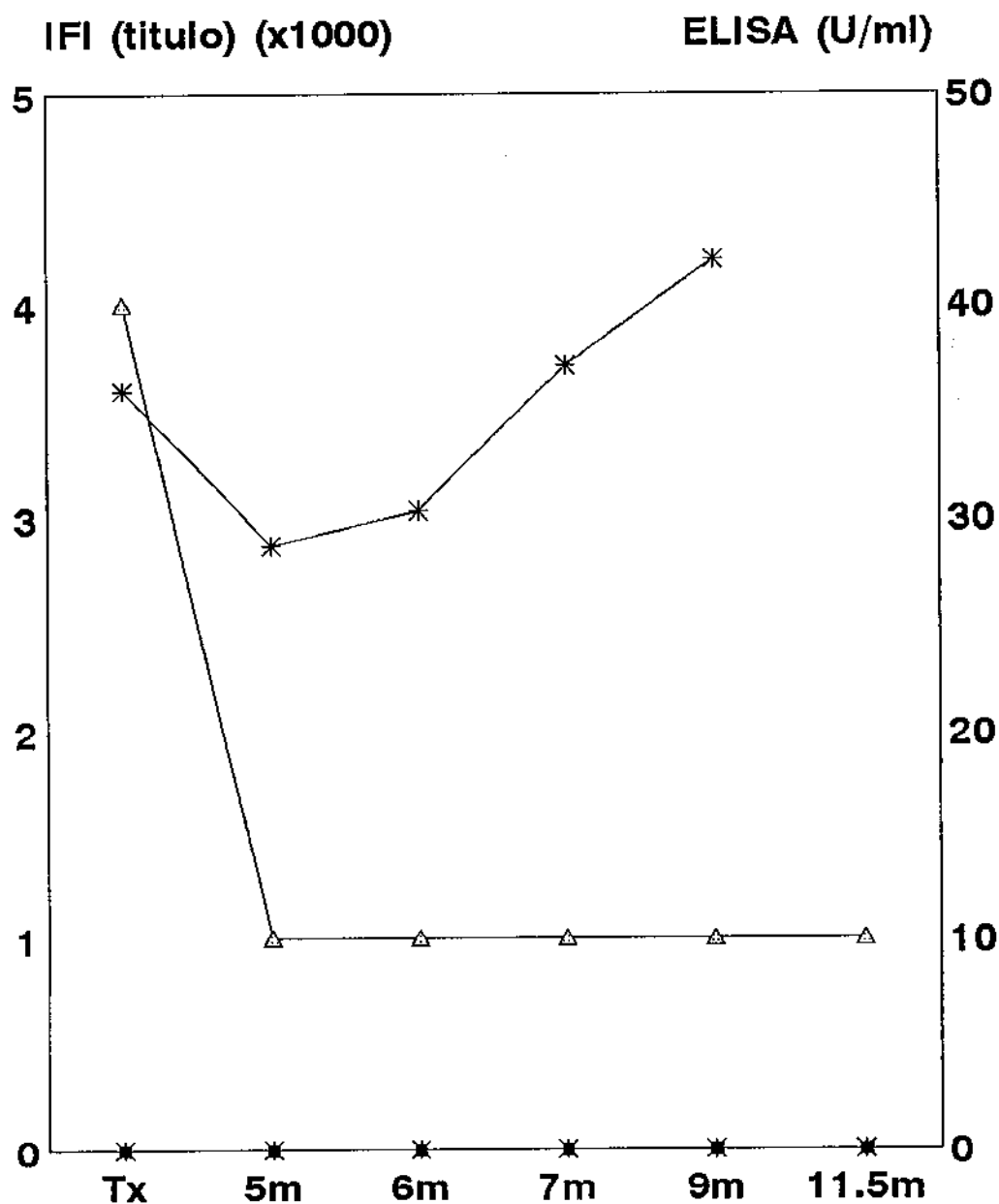
IFI-IgG $\triangle$	1.000	1.000	1.000	1.000
ELISA-IgG *	71	60	60	80
IFI-IgM	-	-	+	+
ELISA-IgM	-	-	-	-
PCR	-	-	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 27 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 29



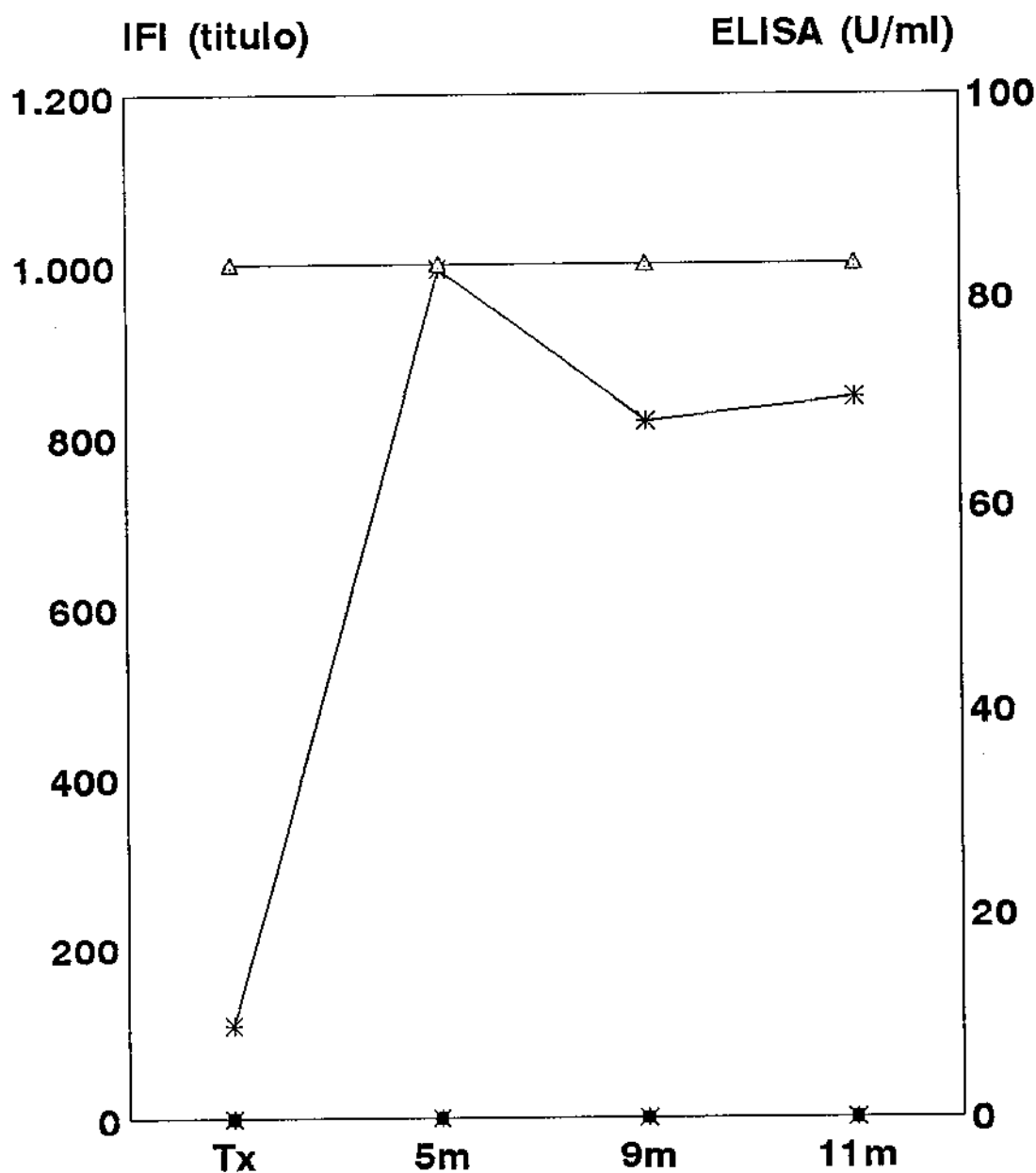
IFI-IgG	△	4	1	1	1	1	1
ELISA-IgG	*	35,94	28,74	30,33	37,11	42,07	
IFI-IgM		-	-	-	+	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-	
PCR		+	-	-	-	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 28 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 30



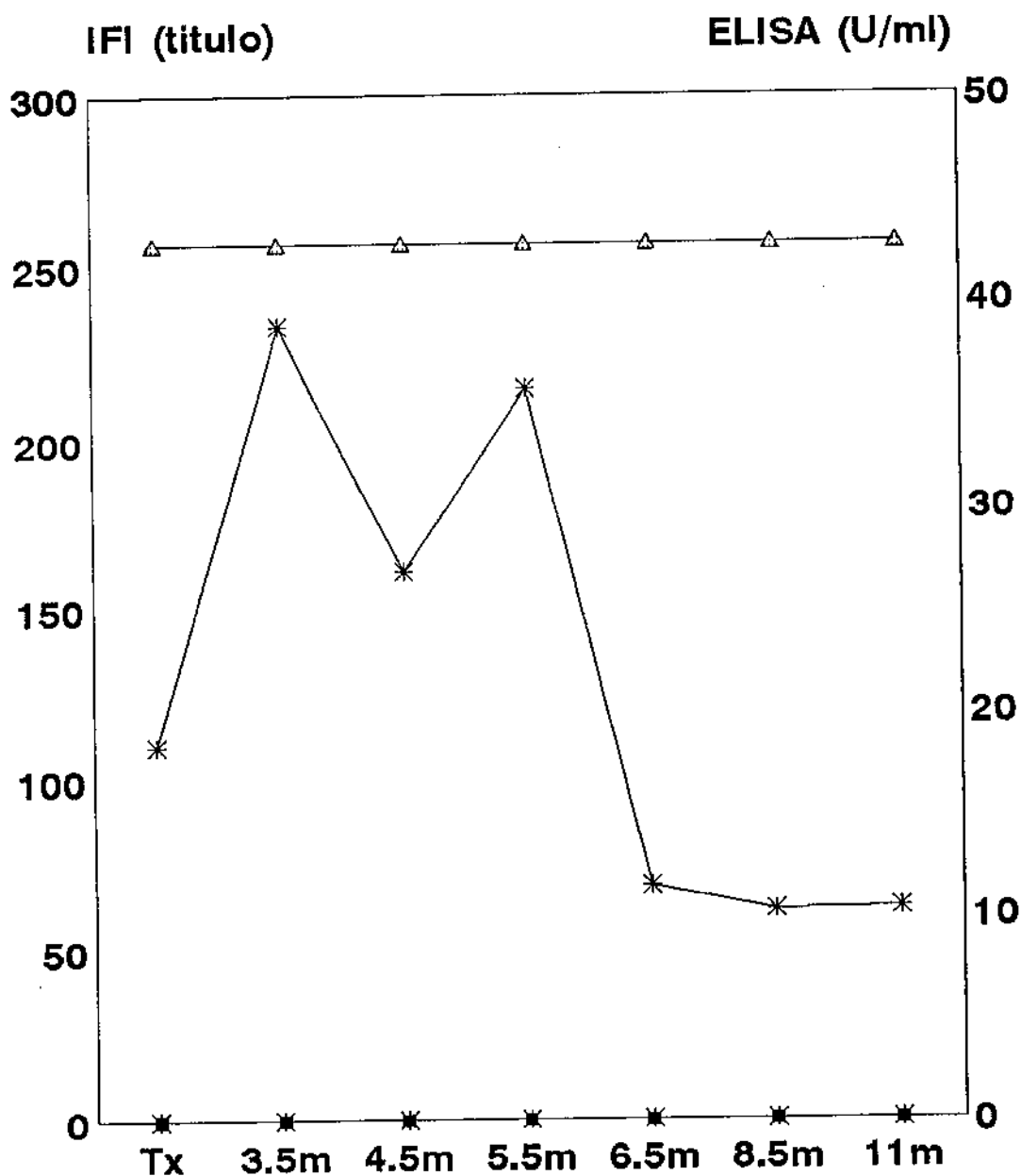
IFI-IgG $\triangle$	1.000	1.000	1.000	1.000
ELISA-IgG $*$	9,02	82,84	68,1	70,32
IFI-IgM	-	+	+	+
ELISA-IgM	-	+	+	+
PCR	-	-	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 29 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 31



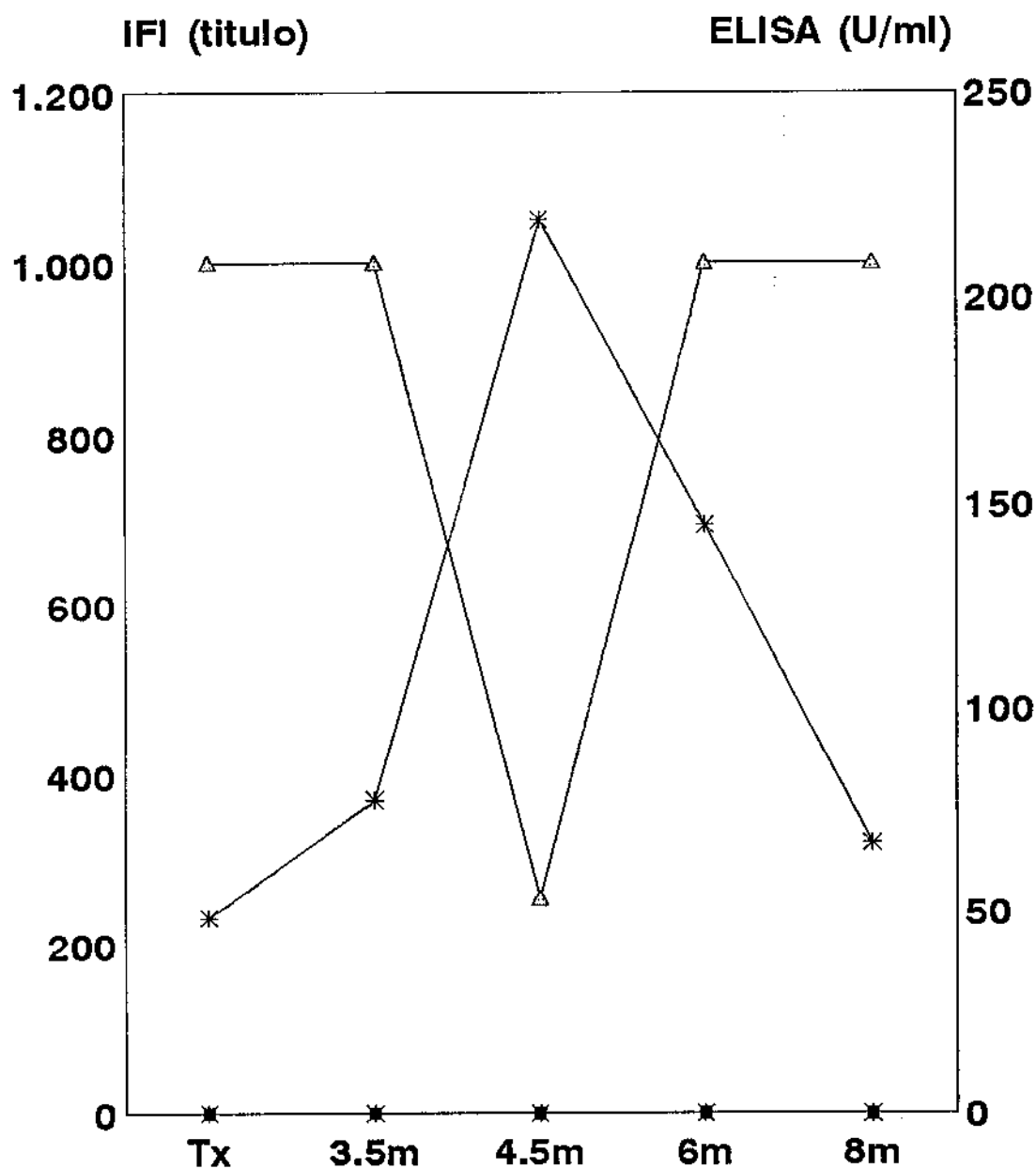
IFI-IgG	△	256	256	256	256	256	256
ELISA-IgG	*	18,27	38,77	26,77	35,81	11,45	10,23
IFI-IgM		-	-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	+	+	-	-	-
PCR		-	+	-	+	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 30 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente32



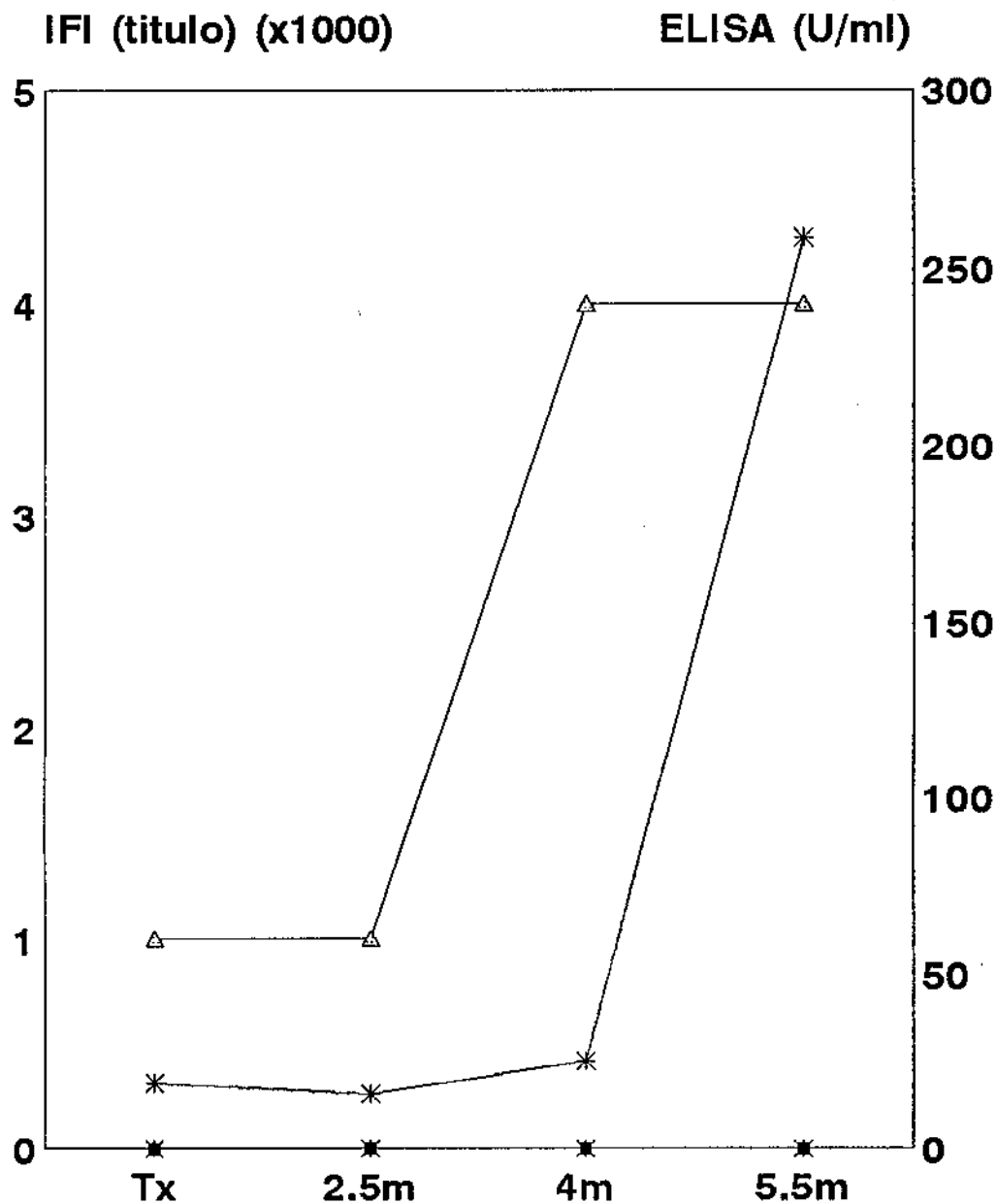
IFI-IgG $\triangle$	1.000	1.000	256	1.000	1.000
ELISA-IgG *	48,38	77,25	219	145	66,75
IFI-IgM	-	-	-	-	-
ELISA-IgM	-	-	-	-	-
PCR	-	-	-	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 31 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente35



IFI-IgG $\triangle$	1	1	4	4
ELISA-IgG *	18,85	15,78	25,3	258,55
IFI-IgM	-	-	-	+
ELISA-IgM	-	-	+	+
PCR	+	-	-	-

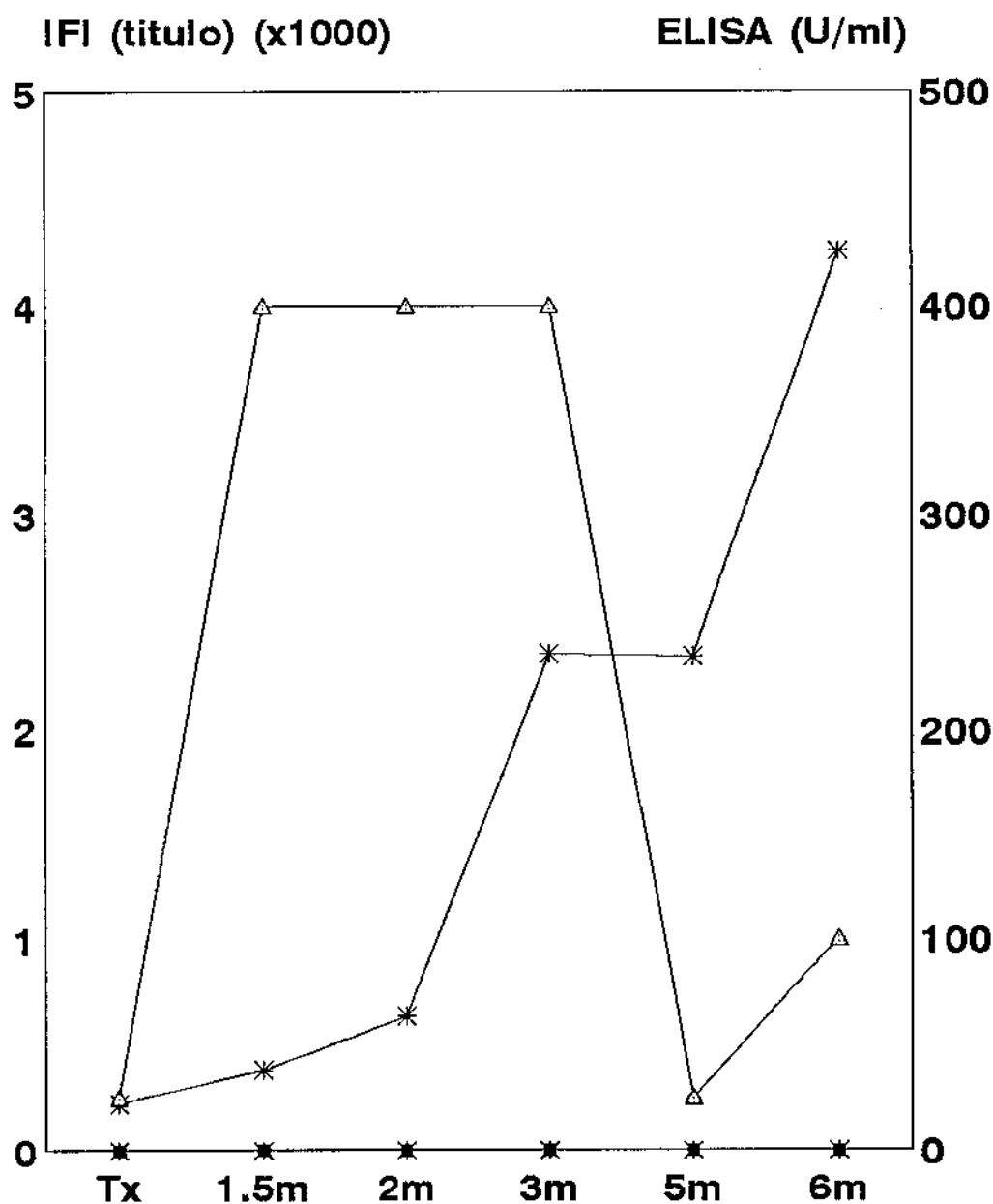
Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 32 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos

anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente37



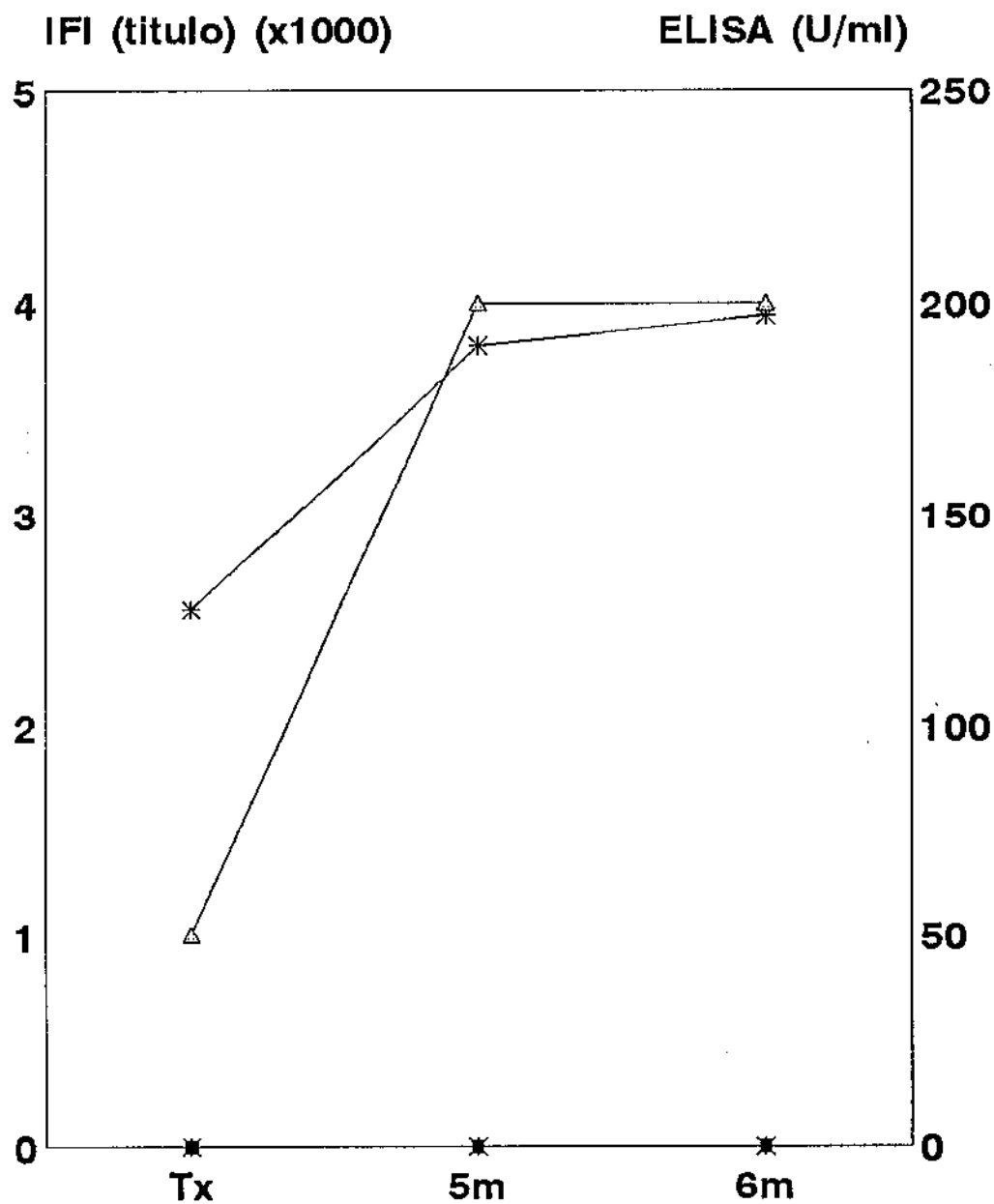
IFI-IgG	△	0,256	4	4	4	0,256	1
ELISA-IgG	*	22,5	38,5	63,52	234,6	233,5	425,33
IFI-IgM		+	-	-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-	-	-
PCR		-	-	-	-	-	-

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 33 - Resultados do PCR e da pesquisa de antígenos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente38



IFI-IgG	△	1	4	4
ELISA-IgG	*	127	190	197
IFI-IgM		-	-	+
ELISA-IgM		-	-	-
PCR		-	-	-

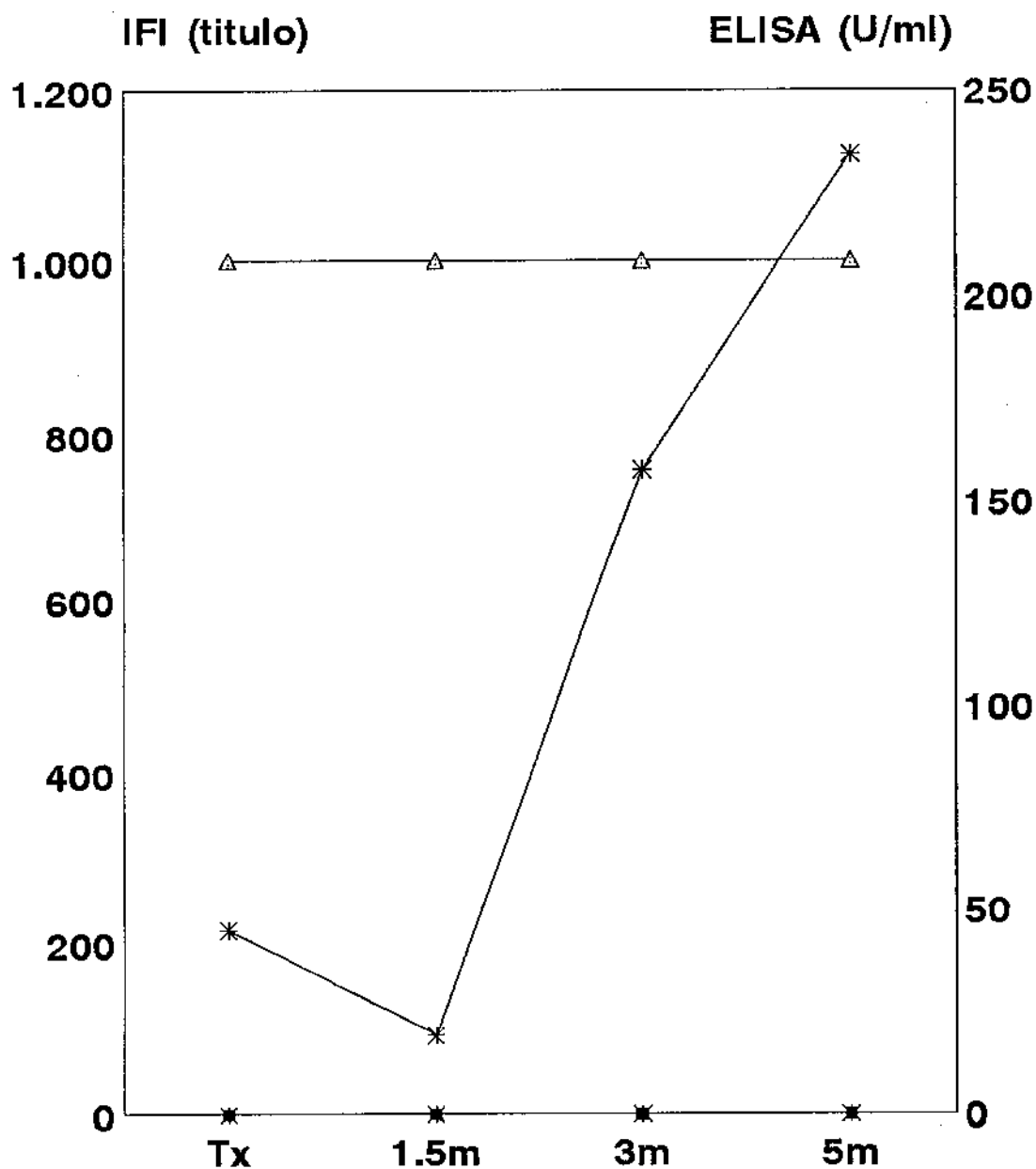
Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 34 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos

anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente39



IFI-IgG	1.000	1.000	1.000	1.000
ELISA-IgG	44,95	19,18	158,15	234
IFI-IgM	-	-	-	-
ELISA-IgM	-	-	-	-
PCR	+	-	+	+

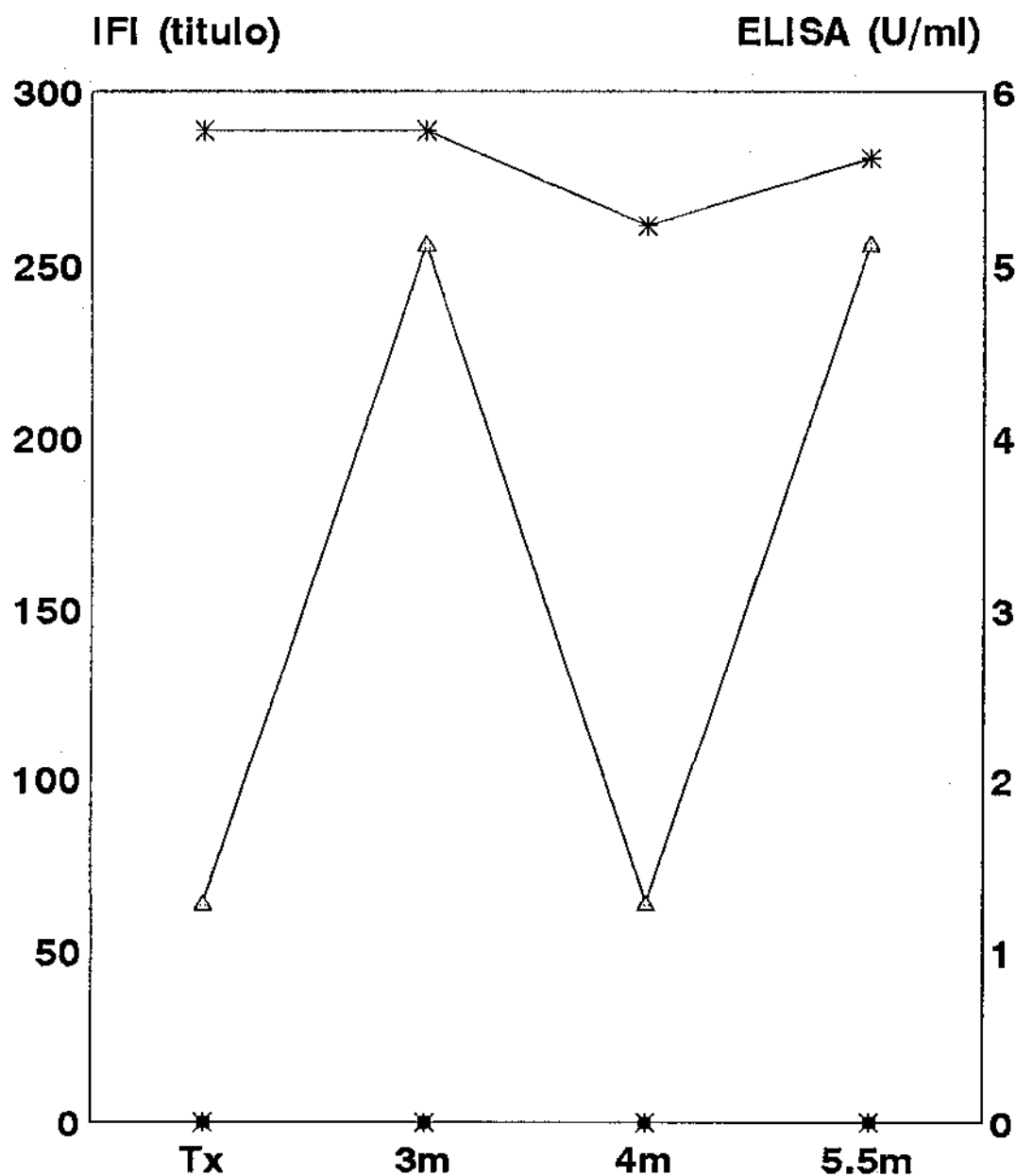
Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 35 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos

anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 41



IFI-IgG	△	64	256	64	256
ELISA-IgG	*	5,77	5,77	5,22	5,61
IFI-IgM		-	-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-	-
PCR		-	-	-	-

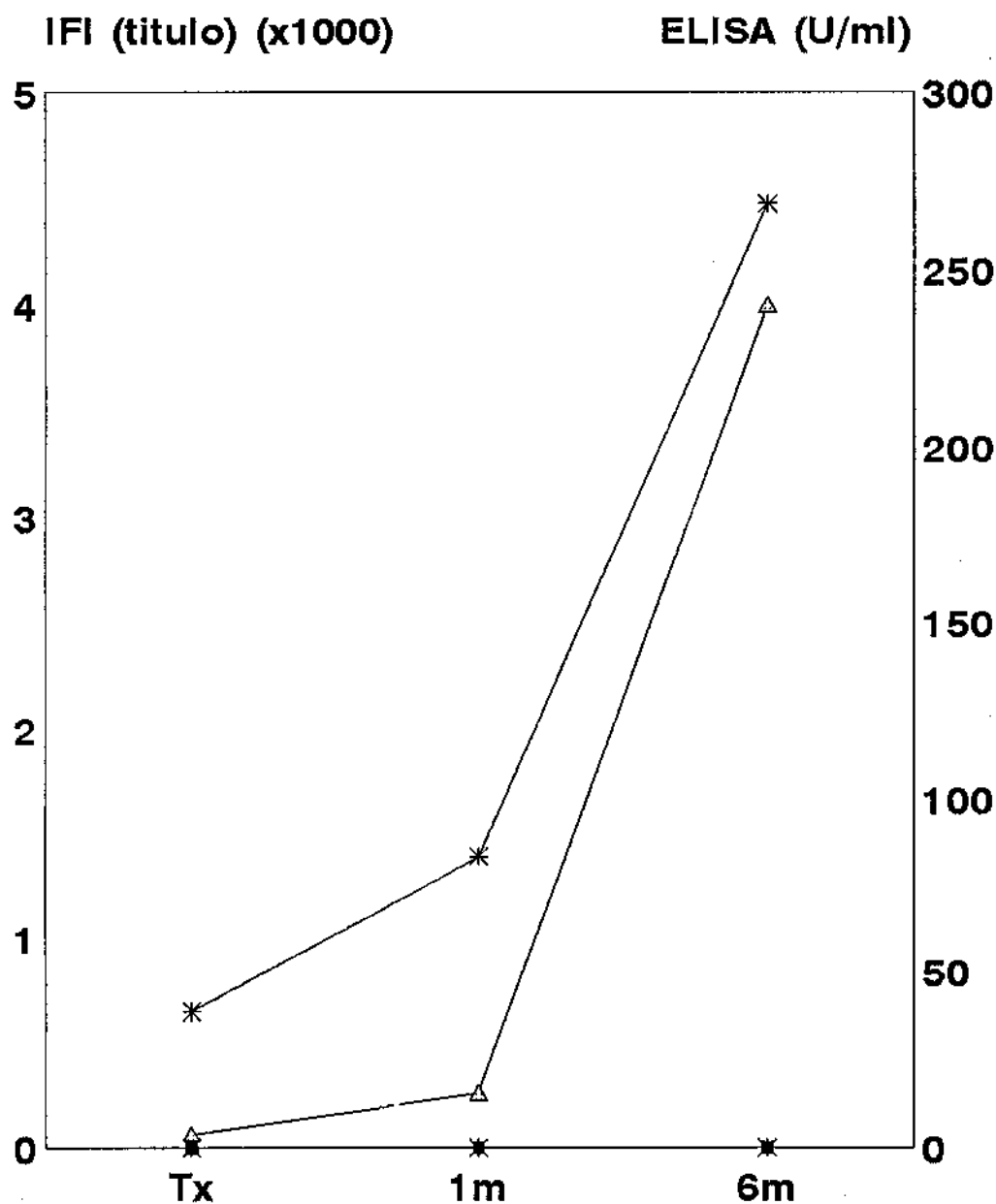
Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 36 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos

anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente42



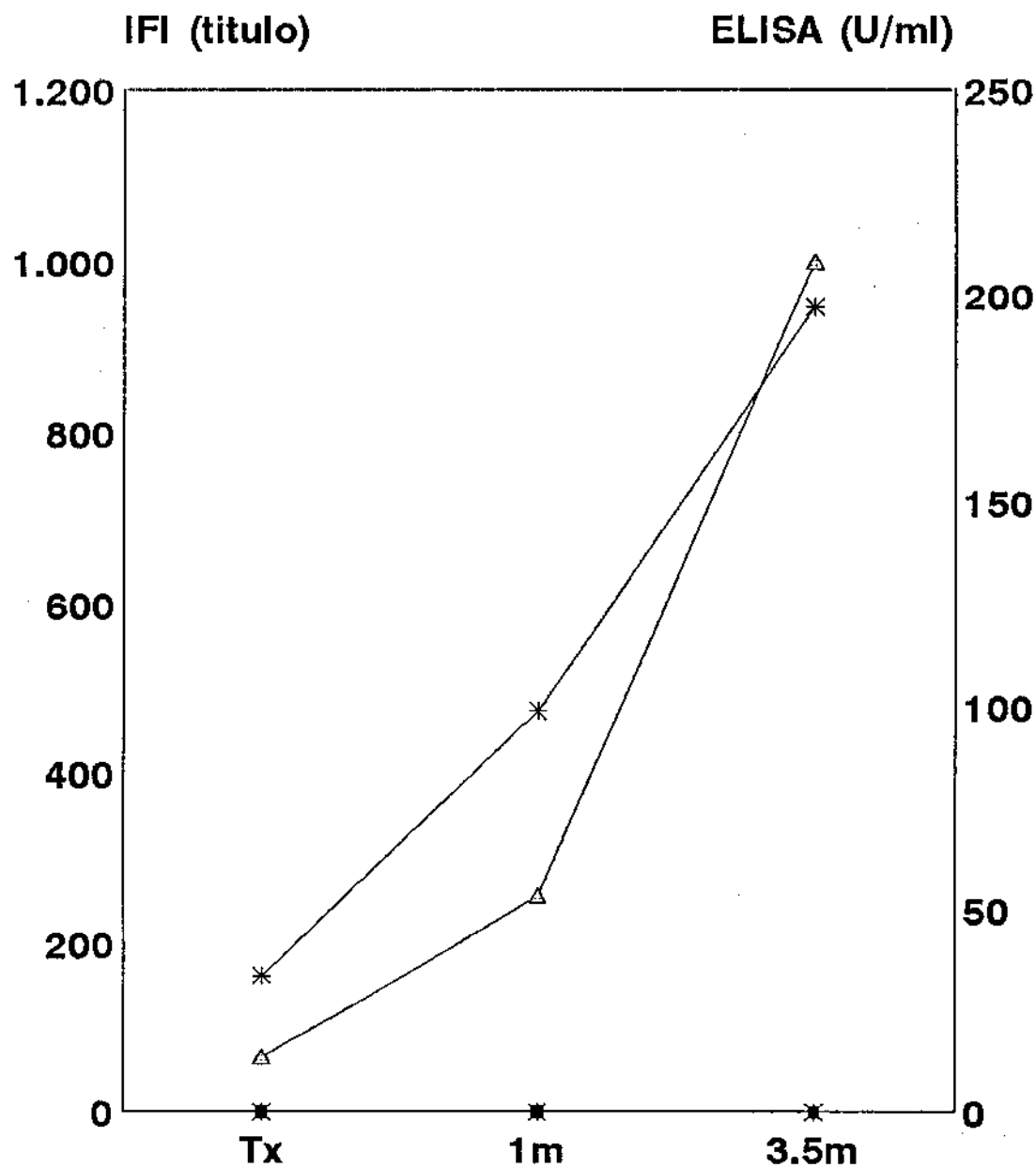
IFI-IgG	△	0,064	0,256	4
ELISA-IgG	*	38,4	83,55	268,65
IFI-IgM		-	-	-
ELISA-IgM		-	-	-
PCR		+	+	+

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses apos o transplante

Gráfico 37 - Resultados de PCR e da pesquisa de anticorpos específicos anti-CMV, detectados por IFI e ELISA, em transplantados renais

Paciente 43



IFI-IgG $\triangle$	64	256	1.000
ELISA-IgG $*$	33,9	98,78	197,17
IFI-IgM	-	-	-
ELISA-IgM	-	-	-
PCR	-	-	+

Tx - amostra imediatamente anterior ao transplante

m - meses após o transplante

Devemos ressaltar que as interpretações dos gráficos de nº 13 e de nº 22 apresentam peculiaridades especiais em relação ao aumento dos títulos de IgG pela reação de imunofluorescência indireta. Isso se deve ao fato de que títulos (recíproca das diluições) para IFI somente foram obtidos usando-se diluições de 1/16, 1/256, 1/1000 e 1/4000, enquanto os valores de ELISA variaram quantitativamente em relação à presença de anticorpos específicos contra o CMV (IgG) de maneira contínua. As tendências das curvas de IFI e ELISA em relação a anticorpos da classe IgG contra o CMV, permitem concluir que teriam interpretação semelhante, isto é, de aumentos significativos dos valores de IgG (4x), demonstrando infecção ativa pelo CMV nesses momentos. No entanto, isto não é a conclusão baseada nos valores numéricos obtidos somente pela análise dos títulos. As amostras de nº 13 e de nº 23 (correspondente ao gráfico 22), provavelmente apresentariam anticorpos detectáveis à diluição de 1/1024 (já que na diluição 1/1000 o resultado era positivo). Entretanto, o resultado foi negativo na diluição seguinte (1/4000).

Devemos dizer também que não foram considerados significativos para a interpretação de infecção ativa pelo CMV, gráficos com valores de títulos flutuantes.

ANEXO II

Resumo da evolução clínica dos transplantados renais

nº 1- Sem nenhum quadro clínico sugestivo de CMV

2 anos após transplante: nenhum episódio de RCA e creatinina 0,8 mg/dl.

nº 2- 2 episódios de RCA. 2 anos após TX, com quadro de rejeição crônica - creatinina 2,6 mg/dl.

nº 3- Infecções urinárias de repetição (por pseudomonas e enterococos). Refluxo com dilatação enxerto. Nenhum episódio de RCA - creatinina 1,0 mg/dl.

nº 4- Necrose cortical aguda no rim transplantado. Foi retirado 14 dias após o transplante. 6 meses após a perda do enxerto renal, criança foi a óbito por sangramento SNC secundário à hipertensão arterial sistêmica.

nº 5- Nefrotoxicidade pela ciclosporina na 1ª. semana após TX. 1 episódio de pielonefrite grave por *E. coli*. Após 1 ano e 7 meses do TX nenhum episódio de RCA - creatinina 1,3 mg/dl.

nº 6- Entre o 5º e 6º mês após TX, mialgias, febre e tosse. 10º mês após TX - Internado - Febre há 7 dias (até 40°C), tosse com escarro hemoptoico e mialgias. RX torax: opacidade homogênea no lobo inferior E (segmento posterior). Nenhum episódio de RCA - creatinina 1,0 mg/dl.

nº 7- 1 episódio de RCA (7º PO). 20 dias após TX, pneumonia HTE. 6 meses após TX - pneumonia base D. Problema: proteinúria após transplante a partir do 7º mês. creatinina 1,7 mg/dl.

nº 8- 1 episódio ITU 1 mês e 1/2 após TX. Nenhum episódio de RCA. creatinina 0,8 mg/dl.

nº 9- 1 episódio de RCA + NTA 5º PO. A partir de 2 meses e 1/2 após TX vem apresentando proteinúria por Esclerose Focal - creatinina 1,0 mg/dl.

- nº 10- No 2º mês e 10 dias pós TX, creatinina aumentou, sem evidências de RCA. Apresentou 2 episódios de RCA: o primeiro, 6 meses após o TX e o segundo 1 ano e 1 mês após TX. creatinina 1,51 mg/dl.
- nº 11- 2 episódios de RCA, o primeiro 1 mês após TX, e o segundo 5 meses e 8 dias após TX. Após biópsia renal (5º mês após o TX) choque séptico com coagulação intra-vascular disseminada. 2 hemoculturas positivas para *E. coli*. Óbito - creatinina 6,48 mg/dl.
- nº 12- RCA no 6º PO - 7º mês após o TX - Internado: Febre e disúria com queda do estado geral, sem confirmação de ITU. 1 ano e 5 meses após TX - RCA , nefrotoxicidade crônica pela ciclosporina e rejeição crônica. Após biópsia renal, houve diminuição do volume urinário: Ultrassom abdominal mostrou hidronefrose moderada no rim transplantado. Feito nefrostomia com retirada de coágulo obstrutivo. 4 meses após nefrostomia, ITU por *Klebsiella* - creatinina 5,89 mg/dl.
- nº 13- RCA 7º PO. No 11º PO suspenso ciclosporina pelo resultado biópsia renal: compatível com Síndrome hemolítico urêmica. 1 mês após transplante, internado: - FEBRE A ESCLARECER com leucopenia, (3000) tosse sem expectoração e esplenomegalia . RX torax - normal. Urocultura - neg., liquor - neg., 2 hemoculturas - neg.; sorologias para: mono, lues, toxo, cisticercose negativas. A partir do 6º mês após TX passou a apresentar hematúria e proteinúria com creatinina 1,32 mg/dl. Biópsia renal - Gn tipo membrano proliferativa (diagnóstico anatômico), Gn membranoproliferativa tipo III, Glomerulopatia do transplante. creatinina no final do seguimento 1,5 mg/dl.
- nº 14- 13º PO - Poliadenomegalia axilar. Sorologias negativas. Biópsia ganglionar - hiperplasia linfóide difusa. Nenhum episódio de RCA. creatinina 1,21 mg/dl.
- nº 15- 7º PO RCA com NTA associada, sem intercorrências importantes. creatinina - 1,0 mg/dl.
- nº 16- RCA no 4º PO e 14º PO. 10º mês pós Tx - febre com mialgias. No seguimento, 1 ano após Tx, proteinúria - 21 gr/ 24 hs. Biópsia renal: compatível com esclerose focal

recorrente ou "de novo", compatível com rejeição crônica e / ou nefrotoxicidade à ciclosporina. creatinina - 2,15 mg/dl.

nº 17- No 5º mês após Tx: aumento dos níveis de creatinina e aumento do volume do enxerto, sem confirmação de RCA - "Pulsado", sem resultado. Biópsia - rejeição crônica. creatinina 2,2 mg/dl.

nº 18-RCA no 7º PO. Após isso, sem intercorrências. creatinina 0,9 mg/dl.

nº 19- RCA no 8º PO - 1 mês e 1/2 pós Tx - novo episódio de RCA. Usado OKT3. A partir do 5º mês após Tx: edema, aumento dos níveis de creatinina e proteinúria. Biópsia: RCA, GNMP recidivante, GN do transplante. creatinina 2,54 mg/dl.

nº 20- Sem intercorrências até 1 ano e 5 meses após Tx.

nº 21- 1 episódio de RCA no 17º PO. Apresentou ITU de repetição até 4º mês após Tx. creatinina 1,2 mg/dl.

nº 23- 2 meses e 1/2 pós Tx - Diabetes secundário ao uso corticosteróide. 3 meses após Tx - Internado: icterícia e prurido. Exames: BT - 4,3, TGO - 270 (até 22), BD - 3,9, TGP - 139 (até 22), leucócitos - 4.000, BI - 0,4. Marcadores para hepatite A, B e C negativos. creatinina 1,4 mg/dl.

nº 24- 3º PO e 17º PO - RCA. 1 mês após Tx - Internada: dispnéia, cefaléia, febre e obstrução nasal. Rx seios da face - sinusopatia frontal e Rx tórax com borramento discreto cúpula diafragmática D, que 4 dias após, evoluiu para infiltrado intersticial bilateral com derrame pleural à D. PO₂ - 60. Biópsia renal dessa ocasião RCA - iniciou OKT3 (por 10 dias). No 2º e 3º meses após TX - novos episódios de RCA. No seguimento, apresentando rejeição crônica. creatinina 2,5 mg/dl.

nº 25- Nenhum episódio de RCA. Sem intercorrências clínicas. creatinina 1,4 mg/dl.

nº 26- Nenhum episódio de RCA. Sem intercorrências clínicas até 1 ano e 3 meses após Tx, quando apresentou ITU por *E. coli*. creatinina 1,6 mg/dl.

- nº 27- Nenhum episódio de RCA. 3 meses após Tx, proteinúria 24 hs - 7,5 gr. Biópsia renal - esclerose focal. 1 ano e 5 meses após Tx. creatinina 2,54 mg/dl.
- nº 29- RCA no 10º PO. Leucopenia mantida apesar da diminuição da dose de azathioprina. creatinina 1,2 mg/dl.
- nº 30- No 5º PO - RCA. No 11º mês após Tx - febre, secreção nasal. creatinina 1,2 mg/dl.
- nº 31- Nenhum episódio RCA. 1 mês e 1/2 após TX - febre, tosse e coriza. Rx tórax - normal 2 meses após Tx e 4 meses e 1/2 após TX, ITU por *enterobacter*. Restante do seguimento, sem problemas. creatinina 0,74 mg/dl.
- nº 32- 1 mês após TX - RCA. 2º mês após TX - Nefrotoxicidade à ciclosporina (biópsia). 1 ano após Tx, creatinina 5,95 mg/dl (hemodiálise).
- nº 35- Sem episódios de RCA. 5º mês pós Tx - sangramento digestivo alto. 5º mês e 1/2 pós Tx - febre e mialgias por 1 semana. Seguindo sem problemas. creatinina 1,2 mg/dl.
- nº 37- RCA no 4º dia PO, e no 6º e 7º mês após Tx. 1 mês após Tx - febre alta e dor torácica com infiltrado pulmonar à E. Biópsia 1 ano após Tx: esclerose focal em cronificação. clearance 12,4 ml/min/1,73 m² - proteinúria 20,1 gr/24hs. Fazendo hemodiálise. creatinina 11 mg/dl.
- nº 38- 7 mês após Tx - Biópsia - RCA + NTA em regeneração + arteriolosclerose hialina (secundária à HAS e/ou nefrotoxicidade pela ciclosporina). creatinina 2,2 mg/dl.
- nº 39- 7º PO - RCA 1 mês e 1/2 após Tx, fraqueza geral, mialgias e febre. Biópsia 4 meses após Tx - esclerose focal. creatinina 1,2 mg/dl.
- nº 41- Sem episódios de RCA. Sem intercorrências clínicas. 8 meses após Tx. clearance 73 ml/min/1,73 m². creatinina 1,2 mg/dl.
- nº 42- 17º PO e 22º PO - RCA. 2 "pulsos" com corticosteróide a seguir, usado OKT3 (10 dias). Creatinina não diminuiu (8,2 mg/dl). Necessitou diálise peritoneal (perdeu enxerto). 1 mês após Tx - evoluindo com pico febril, sem foco.

nº 43- Sem episódios de RCA. Sem intercorrências clínicas. creatinina 1,0 mg/dl.

TX - transplante

PO - pós-operatório

RCA - rejeição celular aguda

SNC - sistema nervoso central

RX - radiografia

HTE - hemitorax esquerdo

ITU - infecção do trato urinário

NTA - necrose tubular aguda

GN - glomerulonefrite

GNMP - glomerulonefrite membrano-proliferativa

PO₂ - pressão parcial de oxigênio - (mm/Hg). Gasometria arterial

HAS - hipertensão arterial sistêmica

OKT₃ - anticorpo antilinfocitário