

MARIA TERESA FIORAVANTI

**DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR
CITOMEGALOVÍRUS EM TRANSPLANTADOS RENAIIS
POR MEIO DA “NESTED”- PCR E ANTIGENEMIA**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Biomédica Maria Teresa Fioravanti.

Campinas, 20 de julho de 2001.

Sandra Cecília Botelho Costa
Profª. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa
- Orientadora -

CAMPINAS – 2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

MARIA TERESA FIORAVANTI

**DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR
CITOMEGALOVÍRUS EM TRANSPLANTADOS RENAIIS
POR MEIO DA “NESTED”- PCR E ANTIGENEMIA**

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.*

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

CAMPINAS, 2001

iii

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNIDADE	CB 2
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	F511d
V	
TOMBO	48172
PROC.	6-837/02
C	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00166070-3

IB ID 235863

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

F511d Fioravanti, Maria Teresa

Diagnóstico e monitorização da infecção por citomegalovírus em transplantados renais por meio da "nested" - PCR e antigenemia / Maria Teresa Fioravanti. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Sandra Cecília Botelho Costa

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Vírus. 2. Rins transplante. 3. Reação em cadeia de polimerase.
I. Sandra Cecília Botelho Costa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Membros:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Sandra Cecilia Botelho Costa

Prof. Dr. Gentil Alves Filho

G. A. Filho

Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca

Benedito Antonio Lopes da Fonseca

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/07/01

“ A independência mental, a curiosidade intelectual, a insistência no trabalho, são qualidades indispensáveis ao cultivador da investigação.”

(Ramon y Cajal)

A DEUS, tudo...

Aos meus pais de coração, Hermes e Lourdes,
que me apoiaram em todas as minhas conquistas.

Ao Fábio, todo meu amor, pelo incentivo em
todas as etapas deste trabalho,

Aos meus irmãos, No, Jú, Bia, Gi, Agui e Lúcia.
Aos meus amigos, sobrinhos, tios, primos...

Profª Drª Sandra Cecília Botelho Costa,
pela oportunidade, por orientar na
realização deste trabalho, pela
confiança e compreensão, meu
sincero agradecimento.

AGRADECIMENTOS

A todos os Pacientes transplantados renais que participaram deste trabalho.

À Dra Raquel, Dra Kelcia, Dr Gentil e aos residentes pela paciência, apoio e compreensão.

Ao Dr Claudio, Dra Luciana e funcionários do laboratório de Patologia Clínica.

À amiga Maria Helena (Male), pela disponibilidade. À Juliana, que está iniciando seu caminho na pesquisa, desejo que continue e tenha êxito em todos os seus passos.

Ao meu primo e amigo, Fiori por me apoiar em todas as etapas deste trabalho e amigos de viagem à Campinas prof. Ado, Pio, Simone e Sandra.

À amiga Helena por me ouvir e apoiar.

À Paula, Sandra Bonon e Dulcinéia (Dú), pelos primeiros passos, paciência e amizade.

Às amigas, Lúcia Helena , Rosana, Gláucia, Andréa, Silvia e Silmara, pelo incentivo. Aos amigos Angélica, Fabiano, Guaraci, Erivan, Ciça, ...

Ao pessoal do "APA ", Betinha, Paulo e Carlos, por encaminhar os pacientes, meus sinceros agradecimentos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, secretários Wanderley e Eduardo e funcionários do Departamento de Clínica Médica.

As estatísticas Cleide e Andréia e pessoal do Áudio Visual da FCM pela colaboração.

SUMÁRIO

Resumo.....	27
1. INTRODUÇÃO.....	31
1.1. Histórico.....	31
1.2. Características biológicas do citomegalovírus humano.....	33
1.3. Patogênese.....	36
1.4. Epidemiologia e transmissão.....	38
1.5. Manifestações clínicas.....	40
1.6. Citomegalovírus em transplantados renais.....	43
1.7. Diagnóstico da infecção por citomegalovírus.....	45
1.7.1. Citológicos e histopatológicos.....	46
1.7.2. Isolamento do vírus.....	47
1.7.3. Sorológicos.....	48
1.7.4. Detecção de antígenos virais.....	50
1.7.5. Detecção de ácidos nucleicos.....	51
1.8. Tratamento e prevenção da infecção por citomegalovírus humano	54
2. OBJETIVOS.....	59
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	63
3.1. Casuística.....	63
3.2. Protocolo de imunossupressão dos receptores de transplante renal.....	64
3.3. Métodos.....	65
3.3.1 Antigenemia.....	65

3.3.2. “Nested”-PCR.....	68
3.3.3. Critérios para detecção de infecção ativa.....	75
3.3.4. Critérios para caracterização de provável doença.....	76
3.3.5. Metodologia estatística.....	77
4. RESULTADOS.....	81
4.1. Características dos doadores.....	81
4.2. Características dos receptores que foram incluídos no estudo.....	82
4.3. Pré-transplante.....	83
4.4. Pós-transplante.....	84
4.4.1. Infecção ativa por citomegalovírus humano	85
4.4.2. Provável doença por citomegalovírus humano	94
4.4.3. Evolução clínica de uma paciente com provável doença por citomegalovírus humano.....	98
4.5. Episódios de rejeição aguda	99
5. DISCUSSÃO.....	103
6. CONCLUSÕES.....	119
7. SUMMARY.....	123
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
9. APÊNDICE.....	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores “primers” para a 1ª PCR.....	71
Tabela 2: Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores “primers” para a “Nested”-PCR.....	72
Tabela 3: Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores “primers” para a 1ª PCR da β -globina.....	73
Tabela 4: Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores “primers” para a “Nested”-PCR da β -globina.....	74
Tabela 5: Características dos doadores estudados.....	82
Tabela 6: Características dos receptores estudados.....	83
Tabela 7: Resultados de sorologia, “Nested”-PCR e Antigenemia no período pré-transplante para doadores e receptores.....	84
Tabela 8: Porcentagem de infecção ativa por HCMV detectada nos receptores.....	86
Tabela 9: Resultados de “Nested”-PCR e Antigenemia indicativos de infecção ativa.....	87
Tabela 10: Comparação entre infecção ativa por HCMV e os resultados obtidos pela técnica de “Nested”-PCR.....	90
Tabela 11: Comparação entre infecção ativa por HCMV e os resultados obtidos pela técnica de Antigenemia.....	92

Tabela 12: Cronologia do diagnóstico da provável doença por HCMV, em dias após o transplante, e manifestações clínico-laboratoriais apresentadas pelos receptores de transplante renal.....	95
Tabela 13: Comparação entre provável doença por HCMV e os resultados obtidos pela técnica de "Nested"-PCR.....	96
Tabela 14: Comparação entre provável doença por HCMV e os resultados obtidos pela técnica de Antigenemia.....	96
Tabela 15: Comparação entre a infecção ativa por HCMV e os episódios de rejeição aguda.....	100

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição por número de receptores com infecção ativa e 1º resultado positivo para as técnicas de “Nested”-PCR e Antigenemia.....	89
Gráfico 2: Representação gráfica comparativa por sorogrupo entre infecção ativa e provável doença.....	97
Gráfico 3: Representação gráfica comparativa entre as técnicas para infecção ativa e provável doença.....	98
Gráfico 4: Representação gráfica comparativa entre os períodos de detecção do HCMV pelas técnicas de Antigenemia e “Nested”-PCR e o início dos sintomas para a Paciente nº. 4.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Citomegalovírus humano – Herpesvírus 5.....	34
Figura 2: Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em minigel de agarose 2%.....	91
Figura 3: Reação de imunoperoxidase (Antigenemia).....	93

LISTA DE ABREVIações

HCMV	Citomegalovírus humano
PCR	Reação em cadeia da polimerase
“Nested”-PCR	Dupla reação em cadeia da polimerase
AD169	Linhagem de HCMV isolada em laboratório
HHV-5	Herpesvírus humano tipo 5
DNA	Ácido desoxirribonucléico
pH	Potencial hidrogeniônico
Fc	Porção da molécula da imunoglobulina
IRA	Insuficiência Renal Aguda
IRC	Insuficiência Renal Crônica
HLA	Antígenos leucocitários humanos
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
ELISA	Teste sorológico imunoenzimático
IFI	Imunofluorescência indireta
RIA	Radioimunensaio – método sorológico
pp65	Proteína matricial de peso molecular de 65 Kd
CYA	Ciclosporina
AZA	Azatioprina
MMF	Micofenolato mofetil
FK506	Tracolimus
OKT3	Anticorpo antilinfócito T

EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Micromol
ml	Mililitros
μl	Microlitros
dl	Decilitros
nm	Nanômetros
fg	Ficogramas
Kb	Quilobases
kg	Quilograma
g	Grama
ng	Nanograma
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Rpm	Rotações por minuto
Pb	Pares de bases
TKM1/TKM2	Tampões de lise celular
PBS	Tampão fosfato salino

RESUMO

RESUMO

A infecção ativa por citomegalovírus humano (HCMV) aumenta a morbidade e mortalidade de pacientes imunocomprometidos. Em transplantados renais, sabe-se que 70% a 90% dos receptores apresentam infecção ativa por HCMV, em períodos que variam de 1 a 4 meses pós-transplante e isso tem uma influência negativa na sobrevida do enxerto.

A natureza variável da doença por HCMV, neste grupo de pacientes, faz com que seja essencial o diagnóstico precoce desta infecção, para não confundir suas manifestações com outros eventos do período pós-transplante. Em particular, os quadros de disfunção renal devido à infecção ativa por HCMV, que se confundem com rejeição, podem ser erroneamente tratados, resultando em imunossupressão adicional, colocando em risco a vida do paciente.

O objetivo principal do presente trabalho foi estudar, prospectivamente, um grupo de transplantados renais em relação à infecção ativa pelo HCMV, comparando as técnicas "Nested"-PCR e Antigenemia para monitorização da infecção ativa e verificar a soroprevalência da infecção por HCMV no grupo analisado.

Foram monitorados, prospectivamente, 48 transplantados renais em seguimento no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP), no período de junho de 1999 a novembro de 2000. O material para análise foi obtido no pré-transplante e por um período de quatro meses, após o transplante.

Na população estudada, observou-se uma soroprevalência de 89% o que confirma a alta prevalência da infecção por HCMV em nosso meio.

Como resultados globais observou-se que a infecção ativa (replicação viral) por HCMV ocorreu em 34 (71%) dos pacientes estudados. Em 18 transplantados, só a “Nested”-PCR foi capaz de identificar infecção ativa. Quatorze pacientes que não apresentaram evidências de infecção ativa por nenhum dos testes, não tiveram problemas clínicos.

Durante a monitorização 15 pacientes (31%) apresentaram manifestações clínicas sugestivas de serem secundárias à replicação viral (provável doença por HCMV). Entre os pacientes sintomáticos, somente 4 apresentaram infecção primária. A técnica da “Nested”-PCR foi positiva em 100% dos casos sintomáticos e a da Antigenemia foi positiva em 87% desses.

Entre os pacientes com episódios de rejeição aguda 85% apresentaram infecção ativa e em 54% ocorreram manifestações clínicas.

Concluimos que as técnicas da “Nested”-PCR e da Antigenemia são sensíveis, rápidas e precoces no diagnóstico da infecção ativa por HCMV e portanto adequadas para a monitorização da infecção e provável doença por HCMV em pacientes transplantados renais.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

O primeiro relato da existência do Citomegalovírus humano (HCMV) ocorreu em 1904, quando Ribbert, a partir dos rins retirados de uma criança natimorta com sífilis congênita, observou a presença de células contendo inclusões intranucleares. Posteriormente, foi descrito por Tyzzer (1906) o mesmo tipo de inclusões celulares em biópsias de lesões cutâneas causadas por varicela. Nesse período, ocorreram divergências quanto à origem destas formações celulares incomuns (MURRAY, 1997).

Smith & Weidman (1914) também observaram inclusões celulares semelhantes e as classificaram como sendo causadas por protozoário; porém, Goodpasture e Talbot (1921) questionaram este conceito quando descreveram a presença de células citomegálicas em glândulas submaxilares de crianças com infecções diversas, sugerindo que estas células, apesar da similaridade com protozoários, seriam de origem epitelial. Lipschutz suspeitou que a citomegalia seria de etiologia viral, dada a semelhança das alterações histológicas com outras viroses, sendo o responsável pela designação do termo DIC - Doença de Inclusão Citomegálica. (ALFORD & BRITT, 1990).

A primeira evidência experimental para dar suporte à etiologia viral da DIC ocorreu quando Cole e Kutner, em 1926, demonstraram a presença do vírus em células de glândulas submaxilares de cobaias jovens, que adquiriram a infecção após terem recebido uma inoculação de glândulas salivares. Eles sugeriram que o agente infeccioso pertencia

ao grupo dos vírus filtráveis, já que o material do inóculo havia sido filtrado, e eram espécie-específico (PLACHTER, SINGZER, JAHN, 1996).

Em 1954, Smith conseguiu isolar o vírus a partir de culturas de tecidos, usando a infecção de glândula salivar de camundongo como modelo experimental. Em 1956/57, o isolamento do citomegalovírus humano ocorreu quase que simultaneamente por três pesquisadores: Smith em St. Louis, Rowe em Bethesda e Weller em Boston, que utilizaram técnicas de cultura celular em amostras de urina e tecido de crianças com provável infecção causada pelo vírus (COSTA, 1999).

O nome definitivo citomegalovírus foi proposto em substituição aos termos doença de inclusão citomegálica e vírus de glândulas salivares. Weller listou 3 critérios para identificação do citomegalovírus: (a) tendência em causar infecção em glândula salivar; (b) crescimento lento, somente em linhagens celulares derivadas de seus hospedeiros naturais e (c) formação de inclusões citoplasmáticas, além das inclusões nucleares (Weller, 1970).

A partir destes estudos, uma linhagem do HCMV, (cepa AD169), foi adaptada ao laboratório por Tamashiro (1982), que realizou sua replicação em culturas de fibroblastos humanos e caracterizou a infecção pela presença de lesões focais constituídas por células gigantes, contendo inclusões intranucleares idênticas àquelas observadas nos materiais procedentes de pacientes (ALFORD & BRITT, 1990).

O citomegalovírus humano HCMV foi originalmente classificado como herpesvírus, baseando-se em critérios morfológicos e bioquímicos. Em 1973, o Grupo de Estudos dos Herpesvírus do Comitê Internacional para a Nomenclatura dos Vírus decidiu não utilizar o termo citomegalovírus e recomendou que fosse dado um número arábico a todos os

herpesvírus: o HCMV ficou classificado como Herpesvírus humano 5 (HHV 5). Em 1979, o mesmo Comitê reabilitou o nome citomegalovírus. A família *Herpesviridae* foi dividida em três subfamílias: vírus herpes simples (*Alphaherpesvirinae*), citomegalovírus (*Bethaherpesvirinae*) e o grupo dos vírus linfoproliferativos (*Gammaherpesvirinae*) (HO, 1991; BROWN & ABERNATHY, 1998).

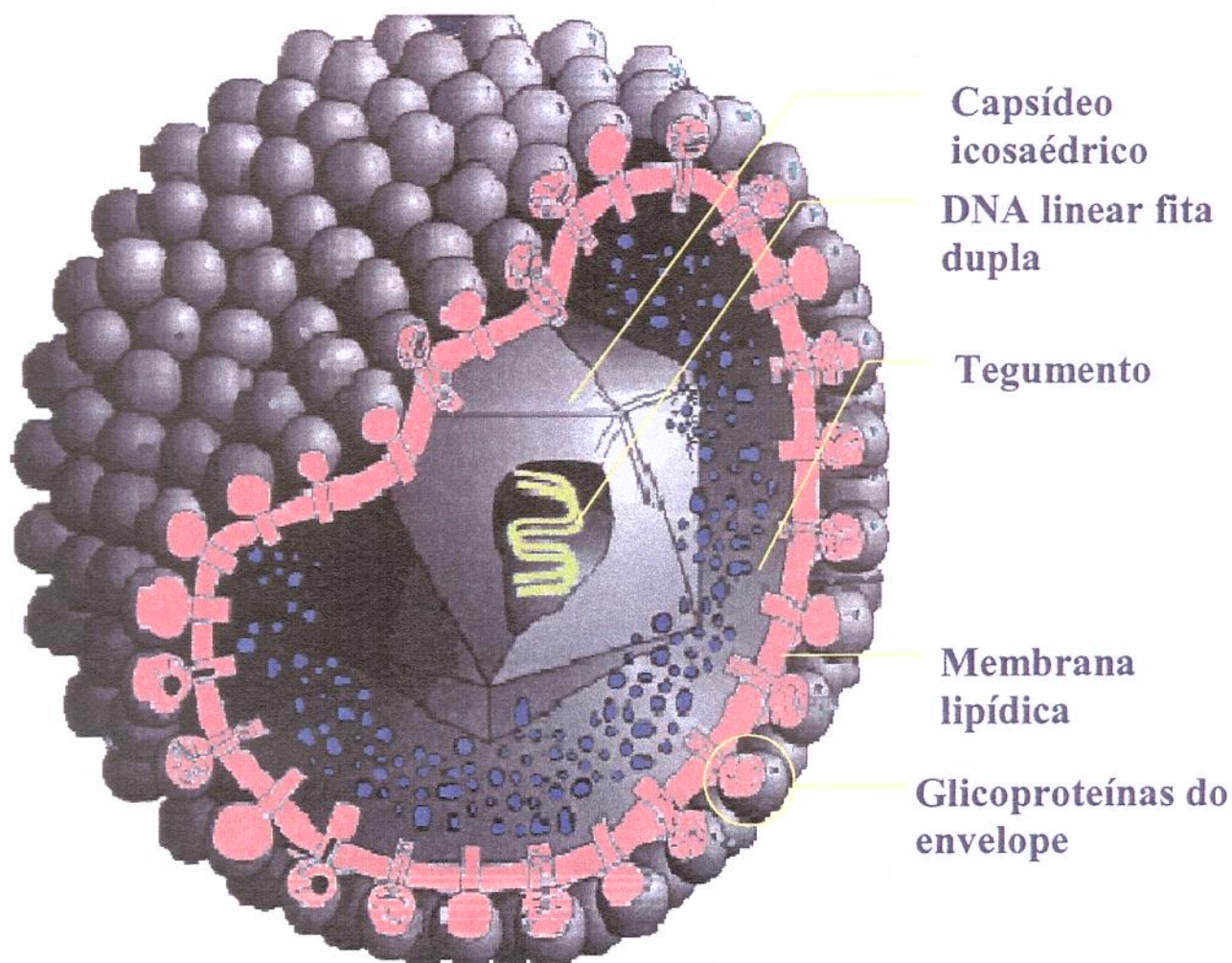
Com a descoberta do citomegalovírus, muitos estudos foram iniciados para que se atingisse um maior conhecimento da sua biologia molecular, resposta imune, etc.. e centenas de trabalhos estão sendo feitos visando um melhor controle clínico dessa virose nos grupos de risco.

1.2. Características biológicas do citomegalovírus humano

A classificação do HCMV é baseada nas propriedades biológicas de: especificidade do hospedeiro, efeitos citopáticos e ciclo de replicação lento. em cultura celular e no hospedeiro.

O virion completo mede entre 180 e 250nm de diâmetro; possui um envelope glicolipídico que envolve toda estrutura viral, um capsídeo icosaédrico de 110nm, com 162 capsômeros que envolvem o núcleo composto por DNA de dupla hélice com 240 Kb (STINSK, 1990). A formação do envelope glicolipídico, composto de porções das membranas nuclear ou citoplasmática, ocorre quando a partícula viral atravessa do núcleo para o citoplasma ou deste para o exterior da célula infectada. No processo de formação do envelope, ocorre a projeção de glicoproteínas virais que constituirão sítios antigênicos

para anticorpos neutralizantes e serão responsáveis pelo estímulo da imunidade humoral e celular do hospedeiro (HO, 1991) (Figura 1).



Copyright 1994 – 97 Marko Reschke (www.biografix.de/hcmv/html/metaframe/htm)

Figura 1– Estrutura do HCMV / Herpesvírus 5

O genoma do HCMV é extremamente grande, com comprimento estimado de 65-68nm; pode ser dividido em dois segmentos, denominados componente longo (L) e curto (S), com possibilidade de sofrerem inversão durante a replicação. Os segmentos estão delimitados por seqüências repetitivas terminais (TR). A junção entre os componentes L e S é composta de seqüências repetitivas internas (IR) e são designadas IR-L e IR-S, quando ligadas aos componentes L e S respectivamente. A seqüência entre as regiões repetidas são únicas (U) e referidas como U-L e U-S. O HCMV tem maior complexidade genômica que outros herpesvírus, devido à ocorrência de várias aquisições e duplicações gênicas. Apesar da complexidade do genoma, os β -herpesvírus mostram dependência pelas células hospedeiras (STINSK,1990).

O HCMV é bastante termolábil, sendo que sua vida média a 37°C é de apenas 45 minutos. Pode ser destruído rapidamente pelo calor, baixo pH, éter e ciclos de congelamento e descongelamento. A infectividade do HCMV 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 dimetil sulfóxido (DMSO), podem ser estocadas, por tempo indefinido, em nitrogênio líquido à -190°C. (BROWN & ABERNATHY, 1998; COSTA, 1999).

Para iniciar a infecção da célula é necessário que o vírus seja adsorvido aos receptores de superfície celular e haja fusão do envelope viral com a lamela externa da membrana citoplasmática. A partir daí, o capsídeo é transportado para os poros nucleares e o DNA é liberado no núcleo celular, onde ocorrem a transcrição e replicação do DNA viral e produção de novos capsídeos (SILVA, 2000).

A replicação viral apresenta padrão similar ao dos demais herpesvírus, com duração média de 18 a 24 horas ocorrendo em três fases (THE *et al.*, 1992).

A primeira fase (imediate) tem início com a entrada do vírus na célula hospedeira e incorporação do material genético, com duração de 3 a 4 horas; neste período, um pequeno número de genes é transcrito, ocorrendo a codificação de proteínas. As proteínas sintetizadas nesta fase têm papel fundamental na regulação da expressão do gene; são denominadas de antígenos imediatamente precoces (IEA) e estimulam a produção de outras proteínas conhecidas por antígenos precoces (EA).

A segunda fase (inicial) leva de 4 a 12 horas e é caracterizada pela ocorrência da síntese da DNA polimerase, entre outras proteínas.

A terceira fase (tardia) é caracterizada pela formação de proteínas estruturais, ligação das proteínas virais e liberação de novos vírus, com duração de 6 a 14 horas. A replicação do HCMV ocorre em um número restrito de células, entre as quais os fibroblastos humanos, que representam a linhagem celular à que o HCMV melhor se adapta e, por isso, é a mais utilizada em cultivos laboratoriais.

Estudos *in vivo* com células de pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos mostram que os leucócitos polimorfonucleares são as células sanguíneas mais freqüentemente infectadas pelo HCMV e representam importante sítio de replicação (DANKNER *et al.*, 1990).

Além de infectar o homem, os citomegalovírus são encontrados no mundo animal em camundongos, cobaias e macacos, mas estas cepas são espécie-específicas, de forma que as cepas de animais não infectam o homem.

1.3. Patogênese

Os mecanismos moleculares que determinam a permissividade das células para a replicação do HCMV não são bem entendidos, mas sabe-se que o vírus pode penetrar em uma variedade de células sem que ocorra a replicação. Conclui-se que fatores celulares determinam as conseqüências da infecção viral pelo HCMV, após a entrada deste na célula hospedeira (STINSK, 1990; PLACHTER *et al.*, 1996).

Um dos mecanismos pelo qual o HCMV evade das defesas do hospedeiro é a indução de receptores F_c e a ligação à β -2 microglobulina por parte de células infectadas, para a proteção contra a resposta imune humoral (MERIGAN & RESTA, 1990).

O HCMV compartilha com outros herpesvírus, a capacidade de: permanecer em estado latente no hospedeiro, disseminar-se célula a célula em presença de anticorpos circulantes, reativar-se em condições de imunossupressão e induzir imunossupressão transitória ao receptor (DRAGO *et al.*, 2000)

O termo latência é usado para designar o fato de que uma vez infectado com estes vírus, o indivíduo está infectado por toda a vida, mesmo sem evidência de replicação viral ativa; o vírus latente pode ser reativado geralmente em situações de grave imunossupressão. A estabilidade da latência e os fatores que irão reativar os vírus são diferentes para cada vírus, embora todos sejam reativados por drogas imunossupressoras, entretanto, estudos em humanos e murinos apontam para o provável sítio de latência, subpopulações de linfócitos, onde ocorreria a expressão de um número mínimo de genes. (BRUGEMMAN, 1993). A associação celular significa que o vírus é transmitido entre

indivíduos e dissemina-se célula a célula; a imunidade celular é essencial para a defesa do hospedeiro contra estes vírus.

1.4. Epidemiologia e transmissão

A infecção pelo HCMV é comum na maioria da população, infectando 0,5 a 1,0% de todos os recém-nascidos e mais ou menos 50% da população adulta em países desenvolvidos. Por meio de estudos soropidemiológicos, demonstrou-se que a infecção ocorre praticamente em todas as regiões do mundo e a prevalência de anticorpos aumenta com a idade, atingindo níveis máximos após 25 anos; existe uma relação bastante nítida entre a prevalência de anticorpos numa determinada população adulta e seu nível sócioeconômico (MUSTAFA, 1994; BROWN & ABERNATHY, 1998).

A análise de estudos correlacionando idade e prevalência da infecção sugere 2 períodos de aumento da infecção: o primeiro é o período perinatal, e o segundo ocorre durante os anos da maturidade sexual (HO *et al.*, 1990).

O índice endêmico da infecção mostra uma clara variação em diferentes regiões geográficas. Enquanto, por exemplo, o índice de infecção endêmica na América do Norte e na Europa está entre 50% (40-80%) em média, no Japão e alguns países da América do Sul ou África estão próximos de 100% (HO, 1991). No Brasil, há altas taxas de soroprevalência atingindo mais de 90% em populações adultas (SUASSUNA, LEITE,

VILELA, 1995; CAMARGO *et al.*, 1996; COSTA *et al.*, 1999; AQUINO & FIGUEIREDO, 2001).

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

Existem três padrões epidemiológicos da infecção por HCMV: infecção primária em indivíduos previamente soronegativos; secundária por reativação da infecção latente e ainda secundária, por reinfecção por outras linhagens do vírus (HIBBERD & SNYDMAN, 1995; MAYA & AZULAY, 2000).

O HCMV pode ser transmitido por :

- via transfusional (sangue ou seus derivados): a grande maioria de casos de transmissão pós-transfusionais, cerca de 90%, são assintomáticos. O risco aumenta com o número de unidades transfundidas (BOWDEN, 1991).
- via materno-fetal: a transmissão pode ocorrer por (a) transmissão transplacentária: geralmente ocorre em mulheres que adquirem a primoinfecção durante a gestação. A manifestação clínica acontece em 8-10% das crianças; (b) transmissão pelo canal de parto: ocorre em gestantes previamente soropositivas para o HCMV, devido à presença de partículas virais no cérvix uterino. Os bebês raramente apresentam manifestações clínicas; (c) transmissão pós-parto, cerca de 27% das mulheres

soropositivas para o HCMV excretam o vírus no leite materno, porém nem todos os recém-nascidos apresentam manifestações clínicas (MAYA & AZULAY, 2000).

- via contato sexual: tanto o cérvix uterino de mulheres previamente soropositivas como o sêmen humano são importantes reservatórios de HCMV. Ocorre maior prevalência de HCMV em mulheres com vários parceiros sexuais e em mulheres que iniciaram precocemente atividade sexual. Há evidências epidemiológicas e biológicas de que o HCMV também pode ser transmitido por relação homossexual, já que cepas idênticas de HCMV foram encontradas em parceiros sexuais (BRUGEMMAN, 1993).
- via órgão transplantado: a transmissão por transplante de órgãos geralmente está associada à presença de infecção latente nos órgãos transplantados (COSTA *et al.*, 1994). O HCMV é o agente infeccioso mais freqüente em transplantados de órgãos, afetando pelo menos 2/3 desses indivíduos (RUBIN, 1993).

Crianças infectadas com o HCMV conservam o vírus no trato respiratório e trato urinário por longos períodos; o mecanismo exato da transmissão do vírus entre crianças não é conhecido, mas parece ser necessário contato íntimo para a contaminação ocorrer.

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 e trato respiratório (COSTA, 1999).

1.5. Manifestações clínicas

Na grande maioria dos casos, a infecção pelo HCMV é subclínica. No adulto imunocompetente, quando sintomática, a infecção assume quadro clínico semelhante à “Síndrome da Mononucleose”, caracterizada pelo aparecimento de febre, anorexia, mialgias e artralgias. (SCHULMAN *et al.*, 1991; CAPULONG, MENDOZA, CHAVEZ, 1998).

No entanto, em pacientes imunossuprimidos, o HCMV pode provocar doença grave e os grupos de maior risco são: crianças com infecção congênita, receptores de transplantes de órgãos, pacientes com câncer submetidos à quimioterapia e os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (COSTA, 1999; MAYA & AZULAY, 2000).

Um dos fatores que mais têm contribuído para o aumento da ocorrência de infecção pelo HCMV é o emprego cada vez mais comum de drogas imunossupressoras. O HCMV causa aumento da morbidade, assim como da mortalidade, uma vez que esta infecção predispõe à infecção por outros patógenos oportunistas, da mesma forma que aumenta o risco de rejeição do órgão transplantado. Ocorrida a infecção, o vírus pode permanecer latente em equilíbrio com o organismo infectado ou reativar a atividade viral, quando ocorrer diminuição da imunidade do hospedeiro, caracterizando o HCMV como agente oportunista (HO *et al.*, 1990; MYERS & AMSTERDAM, 1997).

Manifestações clínicas mais freqüentes causadas pelo HCMV:

Febre: é a manifestação clínica mais freqüente, podendo ocorrer em 100% dos casos, em 30% dos casos, pode ser a única manifestação observada ($> 38^{\circ}\text{C}$); geralmente a duração é em torno de uma semana, podendo estender-se por até quatro semanas. Pode estar associada à cefaléia, fadiga, anorexia e mal-estar; De maneira geral, febre entre o primeiro e o quarto mês, pós-transplante renal sem foco infeccioso evidente, em pacientes soronegativo para HCMV, antes do transplante, é um evento altamente suspeito de infecção primária pelo HCMV e esta hipótese deve sempre ser considerada (LJUNGMAN & PLOTKIN, 1995).

Pneumonite: sintomatologia respiratória e achados radiológicos com infiltrado interstício-alveolar difuso bilateral, junto com o HCMV detectado em lavado brônquio-alveolar ou biópsia de pulmão. Na presença de sintomas respiratórios, a evolução para insuficiência respiratória aguda é freqüente; o HCMV pode estar associado a outro patógeno oportunista, por exemplo *P. carinii*.

Doença gastrointestinal: sintomatologias compatíveis com colite, gastrite ou esofagite associadas à histologia ou imuno-histoquímica positivas para HCMV de biópsias de lesões ulceradas macroscópicas do trato gastrointestinal.

Hepatite: o vírus deverá ser demonstrado em biópsias hepáticas, em combinação com aumento de duas vezes o valor normal das enzimas hepáticas, como Alanina-amino-transferase (ALT), e achados histopatológicos característicos.

Leucopenia: leucócitos abaixo de 4.000/mm³ ou trombocitopenia inferior a 100.000/mm³, excluídas outras causas hematológicas.

Manifestações mais raras: doenças neurológicas com sintomatologia compatível com quadro de encefalite, mielite ou doença difusa no sistema nervoso central, juntamente com a detecção do HCMV em líquido cefalorraquidiano, por cultura ou detecção do antígeno.

Manifestações tardias: corioretinite com lesões oftálmicas típicas com ou sem provas virológicas. O acometimento ocular, quando ocorre, é evidenciado por um infiltrado perivascular de caráter granuloso, com vários graus de exudatos e hemorragia retiniana, que pode progredir, acometendo a mácula (LJUNGMAN & PLOTKIN, 1995; HIBBERD & SNYDMAN, 1995).

1.6. Citomegalovírus em transplantados renais

Com o domínio de técnicas cirúrgicas adequadas, infecções e episódios de rejeição constituem os principais problemas enfrentados após a realização de transplante renal. Em relação às infecções há maior incidência de infecções virais, sejam elas na forma de doença aguda ou reativação de infecção latente (HO, 1991).

A infecção por HCMV pode levar à morbidade e mortalidade em pacientes transplantados. O risco da infecção pode estar relacionado com o estado sorológico do doador e do receptor antes do transplante (JONG *et al.*, 1998). Aproximadamente 80 a

100% dos transplantados foram infectados no passado e possuem anticorpos anti-HCMV da classe IgG.

A doença causada por HCMV pode ser resultante de 3 padrões epidemiológicos: infecção primária ou infecção secundária por reativação ou reinfeção. A infecção primária, geralmente mais grave, ocorre quando um indivíduo soronegativo para o HCMV se infecta com o vírus latente, presente em células de um doador soropositivo. Em transplantes renais, a fonte de infecção em 80-90% 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 HCMV (RUBIN, 1990).

A reativação da infecção ocorre quando o receptor de transplante, previamente infectado pelo HCMV (soropositivo antes do transplante), sofre reativação do vírus latente, após o transplante. A reinfeção é a forma na qual o receptor soropositivo recebe um enxerto de um doador também soropositivo, cuja cepa viral é reativada.(DRAGO *et al.*, 2000).

A incidência de doença sintomática é diferente para as três formas de infecção. Infecções primárias são freqüentemente sintomáticas(cerca de 40-60% dos casos); nas reativações, menos de 20% dos casos tornam-se sintomáticos e, na reinfeção, 40% dos pacientes apresentam manifestações clínicas (HIBBERD & SNYDMAN, 1995; COSTA, 1999).

Estudos soroepidemiológicos em sorogrupos (D+/R+), doador e receptor soropositivos, tem sugerido que a co-infecção com herpesvírus humano tipo 6 (HHV 6), representa um fator de risco adicional para o desenvolvimento da doença por HCMV, na ausência de outros fatores de risco (JONG *et al.*, 1998).

Muitas evidências sugerem que o HCMV é um fator de risco para a rejeição aguda, que por sua vez correlaciona-se com a menor sobrevida do enxerto renal a longo prazo, especialmente nos pacientes que fazem uso de imunossupressão com globulinas anti-linfócitos T (OKT3) (POUTEIL-NOBLE *et al.*, 1993; NAIMARK & COLE, 1994; PORTELA *et al.*, 1995; LOWANCE, *et al.*, 1999).

As citocinas produzidas em resposta à infecção viral favorecem a expressão dos antígenos maiores de histocompatibilidade de classe I e II, nas células infectadas, e conseqüente aumento da resposta citotóxica de linfócitos (SCHROEDER *et al.*, 1999; PELLEGRIN *et al.*, 2000).

O HCMV pode causar uma disfunção reversível do enxerto caracterizada pela elevação dos níveis séricos de creatinina, que geralmente regredem após o controle do processo infeccioso (SANTOS, QUADROS, FILHO, 2000).

A onipresença deste vírus, sua tendência a ser reativado quando as defesas do hospedeiro estão comprometidas e sua capacidade para se disseminar a vários órgãos são características que podem ajudar a explicar sua ocorrência freqüente na população transplantada (COSTA *et al.*, 1999).

1.7. Diagnóstico da infecção por citomegalovírus

A infecção pelo HCMV é extremamente difícil de ser diagnosticada pelo exame clínico e depende, em última análise, de confirmação laboratorial, que demonstre o vírus, seus componentes ou a presença de anticorpos específicos. O objetivo dos testes

diagnósticos é diferenciar a infecção por HCMV de outras infecções oportunistas ou rejeição, monitorar o uso de drogas antivirais e fornecer uma ferramenta para o estudo da interação entre o vírus e o sistema imune. O diagnóstico precoce da infecção ativa por HCMV é importante uma vez que estudos recentes mostram que o tratamento precoce de uma infecção ativa assintomática reduz efetivamente quadros de morbidade e mortalidade causados pelo HCMV em transplantados renais (GOODRICH *et al.*, 1991; JONG *et al.*, 1998)

Há alguns requisitos para se considerar uma boa técnica na monitorização do HCMV (BOECKH & BOIVIN, 1998). As características mais importantes são:

- Alta sensibilidade que permita a detecção precoce em indivíduos com alto risco para doença;
- Potencial para quantificar os resultados: aumentando o valor preditivo positivo do teste e medindo a carga viral durante o tratamento antiviral;
- Rapidez para permitir o início e o tratamento precoce;
- Alto grau de reprodutibilidade.

O primeiro método diagnóstico utilizado para identificação do citomegalovírus foi a citologia exfoliativa que evidenciava a presença de células grandes contendo inclusões intranucleares, identificadas como citomegálicas; posteriormente surgiram outros métodos mais sensíveis e específicos para identificação da infecção causada pelo HCMV. Estes métodos foram agrupados em categorias: citológicos e histopatológicos, isolamento do vírus, sorológicos, detecção de antígenos virais e detecção de ácidos nucleicos (CHOU, 1990).

1.7.1. Citológicos e histopatológicos

Citológicos

Os métodos citológicos para identificação do HCMV podem ser realizados em lavados, secreções e aspirados de tecidos (DREW, 1988; MAYA & AZULAY, 2000). Foi o primeiro método utilizado para se detectar a infecção pelo HCMV em pacientes vivos, por meio da pesquisa de células esfoliadas no material examinado. Em geral, é um método com baixas sensibilidade e especificidade (SUASSUNA & MACHADO, 1992).

Histopatológicos

O diagnóstico da presença do HCMV em cortes de tecidos é feito por meio da visualização das células com inclusões virais. O achado de células com inclusões típicas permite, muitas vezes, atribuir ao HCMV a disfunção ou lesão do órgão estudado. Apesar deste método ser considerado de baixa sensibilidade ele evidencia a doença tecidual invasiva (SUASSUNA & MACHADO, 1992; MAYA & AZULAY, 2000).

1.7.2. Isolamento do vírus

Cultura clássica

O HCMV não infecta nenhum animal de laboratório; todas as amostras para isolamento e identificação do vírus devem ser inoculadas em culturas celulares. O HCMV pode ser isolado de materiais biológicos variados como fluidos orgânicos (urina, sangue,

lavado de orofaringe, saliva, lágrimas, leite, sêmen, fezes e secreção cervico vaginal) e tecidos obtidos de biópsias ou necrópsias (MEYERS, LJUNGMAN, FISHER, 1990; HO, 1991). O diagnóstico clássico utilizado para demonstrar infecção ativa por HCMV é a inoculação do material suspeito em cultura de fibroblastos humanos, única linhagem celular que permite sua replicação *in vitro*. Porém, além da complexidade envolvida com os métodos de cultura celular, o efeito citopático é observado após muitos ciclos de replicação (28 dias para produzir efeito) e, dependendo da concentração de vírus na amostra, a replicação é mais lenta (CHOU, 1990; HO, 1991).

Cultura com isolamento rápido

Vários procedimentos têm sido usados para diminuir o tempo necessário para detecção do vírus em cultura de tecido. Após a inoculação da amostra na cultura de tecido, técnicas de imunofluorescência direta e/ou indireta podem ser usadas para detectar o antígeno viral em células infectadas da cultura.

A centrifugação da amostra em baixa velocidade, antes da sua inoculação ao meio de cultura, facilita a adsorção viral às células da cultura.

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 lamínula é retirada da placa, fixada e incubada com os anticorpos monoclonais antiproteína nuclear precoce e o sistema é revelado pelas técnicas de imunofluorescência.

É mais sensível e rápido que o método da cultura de células convencional (LEE & HALSWORTH, 1990).

1.7.3. Sorológicos

As duas principais razões para o uso clínico dos testes sorológicos para o HCMV são a determinação da susceptibilidade à infecção primária (mais frequentemente sintomática) e a avaliação do sangue e do órgão do doador quanto à prévia exposição ao HCMV (potencial de transmissão do HCMV latente) (CHOU, 1990).

Vários métodos são utilizados para a detecção de anticorpos contra o HCMV. Os métodos clássicos não discriminam anticorpos IgM e IgG e dentre estes há a neutralização viral e a fixação de complemento. Os métodos sorológicos modernos detectam anticorpos da classe IgM e IgG contra o HCMV por técnicas sorológicas variadas.

Imunofluorescência indireta (IFI)

Dependendo do tipo de preparação do antígeno de HCMV, esta técnica permite a detecção de anticorpos dirigidos contra antígenos imediatamente precoce, precoce e tardio. A especificidade da IFI para IgG pode ser comprometida por receptores Fc no citoplasma de células infectadas que podem levar a resultados falso-positivos. Para eliminar este inconveniente, a imunofluorescência pode ser realizada com anticomplemento. Nessa situação, o complemento é incubado com o soro do paciente e apenas as imunoglobulinas que se ligarem especificamente ao seu antígeno, são capazes de ativar o complemento. O uso de anti-soro específico para diferentes classes de imunoglobulinas também permite a detecção de IgM e IgA.

Imunoensaios de ligação (Radioimunoensaio RIA / Imunoensaio Enzimático ELISA)

Estas técnicas permitem detectar diferentes classes de imunoglobulinas e utilizam os mesmos princípios analíticos, porém, os RIA utilizam substâncias radioativas e o ELISA utiliza uma enzima como substância reveladora.

Entre os imunoensaios mais recentes podem ser destacados: o imunoensaio com partículas de látex, o imunoensaio fluorescente em fase sólida e o imunoensaio com antígeno imobilizado em membrana.

Teste de avidéz de anticorpos

Devido às dificuldades de distinção entre infecção primária e secundária pelo HCMV, quando o *status* sorológico pré-transplante não é conhecido, o teste de avidéz de anticorpos anti-HCMV IgG tem sido utilizado para tentar solucionar esta questão. A avidéz dos anticorpos aumenta progressivamente com o tempo, após a exposição ao imunógeno, assim se a avidéz de anticorpos é baixa, isto confirma a infecção primária (LUTZ, WARD, GRAY, 1995).

1.7.4. Detecção de antígenos virais

A detecção do antígeno de HCMV em leucócitos do sangue periférico (Antigenemia) foi desenvolvida por van der Bij *et al.* em 1988, e tem sido demonstrada como sendo uma técnica rápida (4-5h), direta e sensível na detecção quantitativa do HCMV (THE *et al.*, 1990).

A Antigenemia é baseada na detecção imunocitoquímica direta de proteínas da matriz viral (pp65) em leucócitos do sangue periférico, usando uma mistura de anticorpos monoclonais (C10 e C11), diretamente contra essas proteínas; estes anticorpos possuem especificidade pelo antígeno pp65 codificado pelo HCMV, não detecta reação cruzada com células infectadas por outros vírus pertencentes ao herpesvírus e não reagem com outras células (BOECKH & BOIVIN, 1998).

O antígeno pp65 é a proteína viral dominante que se pode detectar nos leucócitos de sangue periférico durante as infecções ativas. O número de leucócitos positivos para pp65 pode variar de 1 a 100×10^5 leucócitos em infecções sintomáticas (van der BIJ *et al.* em 1988).

O teste da Antigenemia é um método sensível para a estimativa da carga viral sistêmica do HCMV e pode ser detectado de vários dias a uma semana antes do aparecimento dos sintomas. (THE *et al.*, 1990; TANABE *et al.*, 1997; SCHROEDER *et al.*, 1999; GOOSSENS *et al.*, 2000).

A vantagem da Antigenemia é que pode ser facilmente quantificada, revelando uma estimativa da carga viral que é útil na diferenciação de doença por HCMV de outras complicações; na avaliação da eficácia da terapia antiviral e, possivelmente, na detecção precoce da resistência à droga. Com relação ao valor da Antigenemia, existem relatos na literatura de que quando 2 a 5 células apresentam-se coradas por 50.000 polimorfonucleares (PMN) analisados, há um risco de 10% de desenvolver doença por HCMV e, se houver mais de 50 células por 50.000 PMN, o risco é superior a 70% (THE *et al.*, 1992). A desvantagem é que a amostra deve ser processada em curto espaço de tempo, sendo recomendável até 8 horas após a coleta. Em pacientes com grave

neutropenia, o exame não pode ser realizado em razão da baixa contagem de granulócitos (BOECKH *et al.*, 1992; BOECKH & BOIVIN, 1998).

1.7.5. Detecção de ácidos nucléicos

O desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante, com a conseqüente clonagem e caracterização do HCMV, tornou possível a detecção do vírus em amostras biológicas por meio de hibridização com sondas específicas para o HCMV. Estes métodos apresentam vantagens significativas sobre as técnicas clássicas e representam um grande avanço na metodologia diagnóstica do HCMV. No entanto, existem alguns inconvenientes referentes à complexidade da realização destes métodos e à utilização de isótopos radioativos. Ainda que o método seja sensível, estima-se ser necessária a presença de 30.000 a 40.000 partículas virais na amostra para a detecção ser realizada (CHOU & MERIGAN, 1983).

Com o início da amplificação gênica pela reação em cadeia catalisada pela polimerase (PCR) permitiu-se a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA, a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas (SAIKI, 1995; 1988).

Basicamente, esse procedimento permite a amplificação de um fragmento específico de DNA “primer”, escolhido pelo pesquisador. A orientação dos “primers” faz com que a síntese do DNA ocorra na região interna entre eles. Desse modo, 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. (COSTA & COSTA, 1992).

A PCR é um método rápido (4 a 6 horas), específico e extremamente sensível; os principais problemas deste método são os resultados falso-positivos resultantes da contaminação do teste e os resultados falso-negativos que podem ser causados pela variabilidade genética das cepas do HCMV ou pela presença de reagentes inibidores da PCR na amostra (THE *et al.*, 1992).

A partir dos trabalhos pioneiros de DEMMLER e SHIBATA utilizando a amplificação de DNA, por meio da reação em cadeia da polimerase a detecção do HCMV foi levada a efeito em amostras contendo pequeno número de cópias do vírus (DEMMLER *et al.*, 1988; SHIBATA *et al.*, 1988).

Ainda que o HCMV seja um vírus associado à célula, a PCR pode ser aplicada ao plasma ou soro (ASPIN *et al.*, 1994; NOLTE *et al.*, 1995; BOECKH *et al.*, 1997). Sugere-se que o DNA viral encontrado no plasma pode ser derivado da lise de células infectadas com o HCMV como os polimorfonucleares (PMN) e as células endoteliais (BOECKH *et al.*, 1997; GERNA *et al.*, 1994).

Diversos métodos de PCR são utilizados atualmente: PCR simples, "Nested" PCR (dupla PCR), RT-PCR (PCR após transcrição reversa); a técnica de PCR pode ser qualitativa ou quantitativa, entretanto sua padronização não está bem estabelecida; diferentes laboratórios amplificam diferentes regiões do genoma utilizando diferentes pares de "primers" (GERNA *et al.*, 1996).

A detecção de DNA viral do HCMV por PCR realizada em transplantados renais (van DORP, *et al.*, 1992) e de medula óssea (CASSOL *et al.*, 1989; EINSELE *et al.*, 1991) provou ser um indicador precoce da infecção por HCMV e tem sido considerada mais sensível que a cultura de células. Foi aplicada em cortes histológicos para detecção do

DNA do HCMV em biópsias retiradas de pacientes com doença por HCMV e provou ser mais sensível do que a técnica da hibridização *in situ* (EINSELE *et al.*, 1991).

Na tentativa de se aumentar a sensibilidade e especificidade da PCR simples e de se obter resultados mais rápidos, tem sido utilizada a “Nested”-PCR (dupla PCR). Nesta técnica ocorre a amplificação de uma sequência alvo em duas etapas: na primeira amplificação utiliza-se um par de “primers” específicos para um fragmento alvo desejado; a partir do produto da primeira amplificação, um novo par de “primers” é utilizado para uma região interna ao fragmento anterior (PORTER-JORDAN *et al.*, 1990; FOX *et al.*, 1995; SEGOND *et al.*, 1996; SUMIMOTO *et al.*, 1998; ABECASSIS *et al.*, 1997). Com o PCR simples é possível identificar 100fg de DNA do HCMV, com a PCR dupla pode-se detectar de 5 a 10fg de DNA (BRITTING *et al.*, 1991).

1.8. Tratamento e prevenção da infecção por citomegalovírus humano

Devido à alta frequência de infecção ativa por HCMV em receptores de transplante renal, cresce o interesse pela profilaxia da infecção pelo HCMV. Quando o ganciclovir tornou-se disponível, foi possível a profilaxia para vários tipos de transplante (FREISE *et al.*, 1991; GOODRICH *et al.*, 1993; MERIGAN *et al.*, 1992).

A administração de ganciclovir, que é um análogo da guanina, tem potente atividade contra o HCMV, inibindo competitivamente a DNA polimerase viral ao se incorporar ao DNA do vírus, ocorrendo o término da duplicação do DNA e, com isso, o da replicação viral (CRUMPACKER, 1996). A partir do mecanismo de ação do ganciclovir, observa-se que ele pode inibir apenas a replicação do vírus; os vírus latentes que não

sintetizam nenhum DNA durante o tratamento não são eliminados. Consequentemente, os vírus não podem ser removidos do organismo e recorrências e reativações são possíveis, mesmo após um tratamento com sucesso (SMITH *et al.*, 1997).

Na prevenção da infecção ativa por HCMV e, por consequência da doença associada, o ganciclovir tem se mostrado eficiente (SCHIMIDT *et al.*, 1991). Com a detecção precoce da infecção, a terapia com ganciclovir reduz significativamente o desenvolvimento da doença (GERNA *et al.*, 1991; WINSTON *et al.*, 1993; FLECHNER, *et al.*, 1998). Há duas alternativas para se evitar a ocorrência da doença em um grupo de pacientes sob risco da doença por HCMV. A primeira é a de administrar ganciclovir em todos os pacientes soropositivos; esta estratégia expõe um número substancial de pacientes a uma droga que é potencialmente tóxica. Outra possibilidade é a utilização de métodos de detecção de HCMV mais rápidos e sensíveis com o objetivo de iniciar precocemente a terapêutica específica e monitorar essa terapia, evitando custos e toxicidade desnecessários (GOODRICH, *et al.*, 1991; SCHIMIDT *et al.*, 1991, WINSTON *et al.*, 1993).

O ganciclovir pode causar granulocitopenia, trombocitopenia, azoospermia e elevação da creatinina sérica; ale da nefrotoxicidade (CRUMPACKER, 1996). Estes efeitos são reversíveis com a interrupção da droga. O ganciclovir pode também ser utilizado em pacientes de alto risco (doador positivo e receptor soronegativo) para infecção ativa e doença por HCMV e naqueles pacientes que fazem uso de anticorpos antilinfocíticos. Quanto à proteção imunológica com o uso de vacinas, estudos vêm sendo desenvolvidos, porém existem muitas dificuldades devido à grande variabilidade genética deste vírus. Imunoglobulina hiperimune associada ao ganciclovir pode ser usada em

pacientes de alto risco, diminuindo a gravidade da doença e das infecções oportunistas (FLECHNER, *et al.*, 1998)

Em virtude do exposto e à importância da infecção pelo HCMV em transplantados renais no Brasil, esse trabalho foi realizado.

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

- Estudar, prospectivamente, receptores de transplante renal em seguimento na disciplina de Nefrologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas FCM/Unicamp, em relação à infecção pelo HCMV, comparando as técnicas de "Nested"-PCR e Antigenemia para monitorização da infecção ativa por HCMV.
- Estabelecer a soroprevalência da infecção por HCMV nos receptores e respectivos doadores, antes do transplante renal.
- Estabelecer a prevalência e a cronologia da infecção ativa e provável doença por HCMV nos receptores de transplante renal estudados, utilizando a "Nested"-PCR e a Antigenemia.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. - CASUÍSTICA

Foram estudados, prospectivamente, durante 4 meses após o transplante, 48 pacientes submetidos à transplante renal na Disciplina de Nefrologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas FCM/UNICAMP no período de junho/1999 a novembro/2000.

Utilizamos os seguintes critérios para inclusão dos pacientes no estudo:

-Todos os pacientes que seriam submetidos à transplante renal com doador vivo ou cadáver, independente do sexo e idade.

-Sobrevida do paciente e do rim transplantado e acompanhamento de pelo menos 1 mês após o transplante;

-Manutenção da imunossupressão.

-Disponibilidade de amostras seriadas (pré e pós-transplante) adequadas de sangue para a realização dos testes laboratoriais.

Durante o período de estudo, o protocolo de seguimento para a realização das coletas foi o seguinte: no dia do transplante, foram colhidas amostras de soro e sangue

total do receptor e, quando possível, do doador. e coleta de sangue, semanais, durante o primeiro mês pós-transplante e a cada 15 dias, até o quarto mês pós-transplante. As amostras eram coletadas durante os períodos de internação ou nos retornos dos pacientes ao Ambulatório da Disciplina de Nefrologia (FCM/UNICAMP) e, em seguida, enviadas ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia.

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, a família concordou com a colheita do material necessário ao estudo. Termo de consentimento apêndice 1.

3.2. – Protocolo de imunossupressão dos receptores de transplante renal.

O esquema de imunossupressão padronizado para transplantados renais na Disciplina de Nefrologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, seguiu os seguintes parâmetros:

Doador vivo com HLA tipo I (idêntico) e HLA tipo II (haploidêntico)

- * Metilprednisolona , Ciclosporina (CYA), Azatioprina (AZA) ou Micofenolato Mofetil (MMF) nos casos de mielo ou hepatotoxicidade pela Azatioprina e Prednisona (PRED).

A compatibilidade HLA foi determinada no laboratório de histocompatibilidade.

Doador cadáver

* Ciclosporina (CYA), Azatioprina (AZA), Prednisona (PRED) e Tracolimus (FK 506)

Os episódios de rejeição aguda foram tratados com ‘pulsoterapia’ utilizando metilprednisolona. Episódios do tipo cortico-resistentes foram tratados com OKT3 (anticorpo antilinfócito T). Na presença de rejeição córtico-resistente substituiu-se AZA por MMF e CYA por FK 506.

3.3. - MÉTODOS

Neste estudo foram realizados dois métodos para a detecção de infecção ativa por HCMV.

1. Antigenemia para detecção de antígenos do HCMV no sangue periférico;
2. Reação em cadeia da polimerase tipo “Nested”-PCR para detecção de DNA viral no sangue periférico.

3.3.1. - ANTIGENEMIA

O teste de Antigenemia seguiu o método descrito por van der BIJ *et al.*, (1988), com algumas modificações.

A técnica de Antigenemia foi sempre realizada em quatro etapas básicas: (a) isolamento de leucócitos do sangue; (b) fixação dos leucócitos em lâminas microscópicas; (c) identificação de proteínas com o uso de anticorpos monoclonais e peroxidase e (d) avaliação microscópica e contagem semiquantitativa.

(a) Extração de leucócitos (polimorfonucleares) do sangue

Após a recepção do sangue em tubo com EDTA, este material foi transferido para um tubo de plástico de 15ml (Tipo Falcon) e a ele adicionaram-se 2ml da solução de Dextran (5%) diluído em PBS, pH 7.4 (sangue/dextran na proporção 4:1). O tubo foi homogeneizado por inversão e colocado em estante inclinada para tubos em ângulo de 45° por 30 minutos, em estufa à 37°C.

Em seguida, o sobrenadante foi transferido com pipeta Pasteur para outro tubo de 15ml e centrifugado 10 minutos a 1200 rpm; o sobrenadante foi desprezado e o sedimento agitado no vórtex vigorosamente.

Para remover as células vermelhas persistentes, o sedimento foi suspenso com 10ml da solução de Cloreto de Amônio (pH 7.4), homogeneizado e mantido em temperatura de 4°C por 10 minutos; em seguida, foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi lavado por 2 a 3 vezes com PBS e centrifugado 10 minutos a 1200 rpm. O sedimento celular foi suspenso em 200 a 1000µl de PBS, dependendo da quantidade de sedimento.

(b) Preparação das lâminas

Para cada amostra preparou-se uma suspensão com 2×10^5 células/ml. A seguir foram colocados 100µl da suspensão por “cup” da citocentrífuga (Marca Revan / Modelo

Citociclo) e realizou-se a centrifugação por 5 minutos a 970 rpm. As lâminas foram feitas em duplicata. Após a centrifugação, as lâminas eram secas, fixadas com Paraformaldeído por 10 minutos, lavadas 3 a 4 vezes com PBS e soro fetal bovino e permeabilizadas com Nonidet P-40 por 5 minutos; após nova lavagem, as lâminas foram novamente secas, embrulhadas em papel manteiga e papel alumínio e estocadas à temperatura de -20°C até o momento da revelação.

O sedimentode leucócitos remanescente foi utilizado para a reação de “Nested”-PCR.

(c) Coloração das lâminas

As lâminas foram secas por 10 minutos à temperatura ambiente e a área da reação foi delimitada com esmalte. Em seguida, as lâminas foram úmidas com PBS, escorridas e nelas aplicados 35µl de anticorpo monoclonal (anti-pp65) diluído 1:10 em PBS por área de reação. O anticorpo monoclonal utilizado foi o CLONAB HCMV do laboratório BIOTEST AG (Dreieck - W. Germany), contendo uma combinação de anticorpos monoclonais C-10 e C-11 que reconhecem o antígeno pp65.

As lâminas foram, então, incubadas por 45 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente (a área de reação na lâmina a partir desse ponto não pode secar). A seguir foram lavadas 3 vezes, 5 minutos cada, com PBS.

Foram aplicados 35µl do conjugado (anti-anticorpo secundário ligado a peroxidase) diluído a 1:40 em PBS na área da reação, (conjugado utilizado laboratório BIOTEST AG). A seguir, as lâminas foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, em câmara úmida e lavadas por 3 vezes com PBS, 5 minutos cada lavagem.

As lâminas foram cobertas com solução de AEC (3-amino-9-etil-carbazol – marca Sigma), e deixadas no escuro por 8 minutos, à temperatura ambiente. A solução de AEC deve ser recém-preparada (20mg de AEC dissolvida em 5ml de dimetilformamida - Sigma e 100 ml de tampão acetato de sódio 0,1M / pH 4.9), filtrada se necessário, adicionada de 50 µl de H₂O₂ -30% e mantida no escuro até o uso.

A seguir, foram lavadas por 10 minutos com tampão acetato de sódio 0,1M / pH 4,9, e novamente lavadas 3 vezes com água destilada, por 1, 2 e 5 minutos. As lâminas foram em seguida coradas com hematoxilina de Mayer, (marca MERCK), na diluição 1:10, por 20 a 30 segundos; utilizou-se água destilada para eliminar todo o corante em excesso e as lâminas foram secadas ao redor dos “spots”. Por fim, elas foram montadas com glicerina tamponada.

(d) Leitura das lâminas

Era realizada imediatamente após a preparação ou no dia seguinte. Foi utilizado um microscópio ótico (marca Nikon). Foram utilizadas, quando possível, lâminas positivas para o controle da reação. e foram observadas:

- Células positivas: Núcleo marrom, coloração total ou perinuclear em polimorfonuclear e ocasionalmente em monócitos.
- Células negativas: núcleo azul.

3.3.2. - “Nested”-PCR

Lise de leucócitos

Os leucócitos foram lisados por meio de lavagens com solução TKM1 (Tris-HCl 10mM / pH = 7,6; KCL 10mM; MgCl₂ 10mM e EDTA 20mM), sendo centrifugados durante 10 min a 2500 rpm, duas vezes consecutivas; foram adicionadas 3 gotas de Triton X – 100 (Nuclear) na primeira lavagem. A segunda lavagem não continha nenhum destes dois últimos reagentes especificados; o sobrenadante foi descartado e ao precipitado acrescentou-se solução TKM2 (0,8 ml da solução contendo Tris-HCl 10mM / pH 7,6; KCl 10mM; NaCl 0,4M; MgCl₂ 10mM; EDTA 2mM; 0,025ml de duodecil sulfato de sódio (SDS 20%). Em seguida a solução foi incubada durante 40 min à temperatura de 56°C e a ela adicionado 0,3ml de NaCl 5M. Após esta etapa, o precipitado foi novamente descartado e o sobrenadante transferido para um tubo estéril.

Extração de DNA

Ao sobrenadante foi adicionado 4,0ml de etanol absoluto gelado(EtOH), ocorrendo a precipitação do DNA. O precipitado foi lavado em 1,0ml de álcool 70% gelado e a seguir foi centrifugado; após descartado o sobrenadante, o DNA precipitado foi seco à temperatura ambiente e solubilizado em água destilada, deionizada e estéril (dH₂O); por fim, foi mantido durante 8 horas em banho-maria a 37°C.

Amplificação gênica do HCMV pela PCR

Para cada reação de amplificação, utilizou-se um volume total de 20µl de reação foram adicionados água, 50mM de cloreto de potássio, 10mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2,5mM

de cloreto de magnésio, 0,1 μ M de cada “primer” externo MIE4 e MIE5 (DEMMLER *et al.*, 1988), (flanqueiam uma região conservada nas diversas cepas do vírus, sendo específicos para o HCMV) (Tabela 1), 200mM de cada desoxirribunucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,5 μ l (0,1 a 1 μ g) do DNA a ser analisado (obtidos de amostras de sangue periférico, nas quais foram feitas a extração pelo método já descrito); e 0,5 unidade de Taq DNA polimerase.

Foram completados 30 ciclos de amplificação para cada amostra, sendo realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler”- Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn, EUA).

Cada ciclo era constituído de 3 etapas: a) separação das hélices de DNA (desnaturação) por aquecimento a 94° C durante 1 minuto; b) ligação complementar entre os “primers” (anelamento) e o DNA à temperatura de 55° C por 1 minuto e c) síntese do DNA pela Taq polimerase (extensão) à temperatura de 72° C por 1 minuto. Antes do primeiro ciclo, as amostras foram aquecidas inicialmente a 94° C por 5 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que pudesse interferir na reação enzimática. No último ciclo, o período de extensão (72° C) foi de 7 minutos.

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos dos iniciadores “primers” para a 1ª PCR.

“primers”	Sequência	Sentido
MIE 4	CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C localização no genoma: 731-755	“sense”
MIE 5	CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTG G localização no genoma: 1165-1150	“antisense”

Obs: O primeiro par de “primers” (MIE4/MIE5) amplifica um fragmento de 435pb; MIE - “Major immediate early antigen of CMV strain Towne” (DEMMLER *et al.*, 1988).

Reamplificação do HCMV por “Nested”-PCR

Utilizando-se do mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação de PCR foi reamplificada com um par de “primers” internos IE1 e IE2 (SHIBATA *et al.*, 1988) (tabela 2). As condições da “Nested”-PCR foram as mesmas utilizadas para fazer a primeira PCR.

Tabela 2. Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores “primers” para a “Nested” PCR.

“primers”	Seqüência	Sentido
IE 1	CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC localização no genoma: 926-945	“sense”
IE 2	CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC localização no genoma: 1087-1067	“antisense”

Obs: O segundo par de “primers” (IE1/IE2) amplifica um fragmento de 159pb; IE – “Immediate early” (SHIBATA *et al.*, 1988).

Detecção do HCMV

Após as 2 reações de amplificação e reamplificação, 7µl do produto da “Nested” acrescidos de 2,0µl do corante azul de bromofenol foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio para visualização do fragmento sob luz ultravioleta, e fotografado em sistema Polaroyd. Em amostras positivas para o HCMV foi observado um fragmento de DNA de 159 pb ao passo que nas amostras negativas não houve amplificação de nenhum fragmento.

Em todos os experimentos realizados, utilizou-se como controle positivo da reação uma alíquota do extrato viral da cepa AD-169 do HCMV; como controle negativo, uma amostra certamente negativa para o vírus e, como branco de reação, a água.

Amplificação gênica da β -globina humana pela PCR

A β -globina humana foi aplicada em todas as amostras a serem testadas, sendo utilizada como controle para se confirmar a presença de DNA. Para a amplificação gênica da β -globina seguimos a metodologia descrita por SAIKI *et al.*, (1985). Para a primeira reação e para a “Nested”-PCR da β -globina humana foram empregadas as mesmas condições aplicadas para a detecção do HCMV; porém os “primers”, que flanqueiam uma região constante do gene da β -globina, foram P3 e P5 (externos) na primeira reação e 109 e 110 (internos) (Tabela 3 e 4). para a “Nested”-PCR.

Tabela 3: Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores “primers” para a 1ª PCR da β -globina.

“primers”	Seqüência 5'-3'	Sentido
P3	AGACAGAGAAGACTCTTG	“sense”
P5	TCATTGCTCTGTTTCCCATTC	“antisense”

“Homo sapiens genomic beta globin region (HBBC) on cromossome 11” NG. 000007/13907843.

Reamplificação da β - globina humana por “Nested”-PCR

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

Tabela 4: Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores “primers” para o “Nested”-PCR da β -globina.

“primers”	Seqüência 5'-3'	Sentido
110	CGTCCTATTGGTCTATTTT	“sense”
109	CCCTTCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT	“antisense”

“Homo sapiens genomic beta globin region (HBBC) on cromossome 11” NG. 000007/13907843.

Detecção da β -globina humana

As condições de detecção também foram as mesmas descritas para o HCMV. Em todas as amostras foi observado um fragmento de 257pb correspondente ao gene da β -globina. O fragmento obtido indicou que o DNA era de boa qualidade e que não houve inibição da reação, condição indispensável para um diagnóstico seguro.

Para se evitar a contaminação das amostras alguns cuidados foram tomados: a manipulação das amostras ocorreu em salas diferentes (sala pré-PCR e sala pós-PCR), sendo que todos os reagentes e materiais pré-PCR e pós-PCR também foram preparados e utilizados em ambientes diferentes. Antes da abertura dos tubos de microcentrífuga foi efetuada rápida centrifugação para concentrar o seu conteúdo na região inferior e evitar sua dispersão por aerosol. Todo material plástico (ponteiras com filtro e ependorffs) utilizado era novo e trocas constantes de luvas foram feitas durante todo o procedimento.

O aumento da especificidade e sensibilidade foram alcançados pela PCR dupla (“Nested-PCR”), em que o produto da primeira PCR, amplificado com um par de “primers”, foi submetido a nova reação de amplificação, utilizando-se um par de “primers” internos ao primeiro, sendo o produto então detectado por eletroforese em gel de agarose (BRYTTING *et al.*, 1991; SUMIMOTO *et al.*, 1998).

Utilizamos alguns critérios para determinar a presença de infecção ativa e provável doença nos receptores estudados.

3.3.3. - Critérios para detecção de infecção ativa

Os critérios para a detecção de infecção ativa e provável doença pelo HCMV seguiram aqueles reconhecidos pela maioria dos trabalhos da literatura nessa área (THE *et al.*, 1992; HIBBERD *et al.*, 1992; GERDES *et al.*, 1993; KUHN *et al.*, 1994; LJUNGMAN & PLOTKIN, 1995).

A presença de um dos itens abaixo foi considerada como indicativo de infecção ativa por HCMV:

- “Nested”-PCR – Duas ou mais reações positivas consecutivas para HCMV.
- Antigenemia – Cinco ou mais células antígeno-positivas encontradas nas lâminas dos pacientes estudados.

3.3.4. - Critérios para caracterização de provável doença

Para caracterização de provável doença por HCMV, além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas anteriormente, fazia-se necessária a presença de duas ou mais manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo HCMV:

- Febre maior ou igual a 38°C, no mínimo por três dias;
- Pneumonite com sintomatologia respiratória e achados radiológicos, associados à detecção de HCMV em lavado brônquio-alveolar ou biópsia de pulmão;
- Doença gastrointestinal com sintomatologias compatíveis com colite, gastrite ou esofagite, associada à histologia ou imuno-histoquímica positiva para HCMV em biópsias de lesões macroscópicas do trato gastrointestinal;
- Hepatite ou Colangite: o vírus deverá ser demonstrado em biópsias hepáticas, em combinação com aumento de duas vezes o valor normal de alanina-aminotransferase (ALT) e achados histopatológicos consistentes com hepatite ou colangite;
- Doenças neurológicas: sintomatologia compatível com quadro de encefalite, mielite ou doença difusa no Sistema Nervoso Central, juntamente à detecção do DNA do HCMV ou do antígeno;
- Leucopenia: leucócitos abaixo de 3000/mm³, ou trombocitopenia inferior a 100.000/mm³, afastadas outras causas hematológicas;
- Disfunção renal com aumento de creatinina sérica em 1 mg/dl;
- Dores mioarticulares.

3.3.5. – Metodologia estatística

Foi realizada análise descritiva por meio de tabelas de frequência e medidas de posição e dispersão. Medidas de Acurácia:

- Sensibilidade é definida como a proporção dos indivíduos com a doença que tem um teste positivo para a mesma, ou a capacidade do método de identificar corretamente os indivíduos que têm a doença.

- Especificidade do método é a proporção dos indivíduos sem a doença que tem um teste negativo. Assim, é a capacidade do teste diagnóstico de identificar corretamente a ausência de doença.

- Acurácia é a proporção de todos os resultados corretos dos testes, tanto positivos quanto os negativos. Ou seja, é a fração dos casos em que o teste concorda com o padrão.

- Valor preditivo positivo e negativo resultados positivos com doença e resultados negativos sem doença, respectivamente (FILHO & MARCOPITO, 1984).

RESULTADOS

4 - RESULTADOS

Antes do transplante foram coletadas amostras de 61 receptores, porém só 48 receptores preencheram os critérios de inclusão descritos acima. Entre os receptores não incluídos no estudo ocorreram: 5 óbitos (que receberam de 3 doadores vivos e 1 doador cadáver), 2 casos de rejeição aguda (1 doador vivo e 1 cadáver) e em 6 casos (4 doadores vivos e 2 cadáveres) as coletas foram muito irregulares.

4.1. Características dos doadores

Foram avaliados 33 doadores (referentes apenas aos receptores incluídos no estudo), sendo que 24 (73%) eram homens e 9 (27%) eram mulheres. No total de doadores, 18 eram doadores cadáveres e 15 eram doadores vivos relacionados, quanto à compatibilidade HLA: 5 eram HLA tipo I – idêntico e 10 HLA tipo II – haploidêntico (a compatibilidade HLA foi avaliada no laboratório de histocompatibilidade) . A idade média dos doadores foi de 36,1 anos (variação de 23 a 52 anos).

A tabela 5 mostra as características dos doadores renais estudados (apêndice 2- características individuais dos doadores).

Tabela 5: Características dos doadores estudados.

Número de Doadores	33
Idade (anos)	36,1 (23-52)
Sexo (M/F)	24/9
vivo / cadáver	15/18

4.2. Características dos receptores que foram incluídos no estudo

No total de 48 receptores; 28 (58%) eram do sexo masculino e 20 (42 %) do sexo feminino. A idade média foi de 38,7 anos (variação de 22 a 60 anos).

Quanto ao tipo de transplante 15 (31%) receptores receberam rim de doador vivo relacionado e 33 (69%) receptores receberam de doador cadáver. Todos os pacientes estavam em tratamento dialítico antes do transplante por 6 a 90 meses.

As causas de insuficiência renal crônica (IRC) foram em sua maioria de origem indeterminada, observada em 27 (56%) receptores, em 21 (44%) receptores ocorreu devido à: 11 casos de glomerulonefrite crônica, 3 de pielonefrite crônica, 2 de hipertensão arterial sistêmica, 2 de rins policísticos, 2 de Síndrome de Alport e 1 caso de glomerulonefrite membranosa

A tabela 6 mostra os dados clínicos dos transplantados renais estudados (apêndice 3 - características dos receptores).

Tabela 6: Características dos receptores estudados.

Total de receptores	48
Idade (anos)	38,7 (22-60)
Sexo (M / F)	28 / 20
Doença de base	
- Indeterminada	27 / 48
- Outras	21 / 48
- Glomerulonefrite crônica	11
- Pielonefrite Crônica	3
- Síndrome de Alport	2
- Hipertensão Arterial Sistêmica	2
- Rins Policísticos	2
- Glomerulonefrite membranosa	1

4.3 - Pré-transplante

No período pré-transplante realizou-se a Sorologia (IgG e IgM anti-HCMV por ELISA), a “Nested”-PCR e a Antigenemia para 26 doadores, excluindo-se 7 doadores cadáveres dos quais não foi possível obter amostras pré-transplante e 48 receptores.

Quanto aos resultados obtidos no período pré-transplante observamos:

Sorologia, 23 (88%) doadores eram soropositivos (IgG+) e 3 (11%), soronegativos (IgG-). Todos os doadores estudados apresentaram IgM negativo. Entre os receptores estudados, 43 (90%) eram soropositivos (IgG+) para HCMV e 5 (10%) receptores eram soronegativos (IgG-). Apenas 1 receptor apresentou IgM+ no pré-transplante os demais eram soronegativos.

“Nested”-PCR foi negativa em 32 doadores e 46 receptores; positiva em 1 doador (cadáver) e 2 receptores.

Antigenemia em todos os doadores e receptores estudados apresentou resultado negativo no pré-transplante.

A Tabela 7 ilustra os resultados das análises laboratoriais realizadas no período pré-transplante.

Tabela 7: Resultados de Sorologia, “Nested”-PCR e Antigenemia no período pré-transplante para doadores e receptores. ^a

	Sorologia		“Nested”- PCR		Antigenemia	
	IgG+	IgG-	+	-	+	-
Doador	23(88%)	3 (11%)	1 (4%)	25(96%)	0	26 (100%)
Receptor	43(90%)	5 (10%)	2 (4%)	46(96%)	0	48 (100%)

(a) Em 7 doadores cadáveres não foi possível realizar nenhuma das técnicas de diagnóstico.

4.4- Pós-transplante

4.4.1 – Infecção ativa por citomegalovírus humano

De acordo com os critérios para constatação de infecção ativa (já mencionados em métodos), ela foi identificada em 34/48 (71%) dos pacientes monitorados, sendo que 5/34 (15%) foram infecções primárias e 29/34 (85%) foram infecções secundárias (reinfecções ou reativações). Em 14 pacientes não foi diagnosticado infecção ativa por nenhum dos métodos utilizados e todos se mostraram assintomáticos, durante todo o seguimento.

Entre os 34 receptores com infecção ativa, 5 (15%) receptores soronegativos para o HCMV receberam órgãos de doadores soropositivos, 21 (72%) receptores soropositivos receberam órgãos de doadores soropositivos e 8 (27%) receptores soropositivos receberam órgãos de doadores com *status* sorológico não determinado.

A Tabela 8 mostra a porcentagem de receptores com infecção ativa, classificando-os pela natureza da infecção (primária ou secundária) e respectivos sorogrupos obtidos no período pré-transplante.

Tabela 8: Porcentagem de infecção ativa por HCMV detectada nos receptores.

Taxa global de infecção ativa	71% (34/48)
Infecção Primária	15% (5/34)
Doador + / Receptor -	100% (5/5)
Infecção Secundária	85% (29/34)
Doador + / Receptor +	72% (21/29)
Doador ? / Receptor +	27% (8/29)

(?) *status* sorológico indeterminado

Entre os receptores estudados 34/48 (71%) apresentaram infecção ativa com 2 ou mais reações de “Nested”-PCR positiva. A Antigenemia foi positiva em 16/48 (33%) receptores. Assim, em 18 pacientes só a Nested”-PCR foi capaz de identificar infecção ativa por HCMV.

A tabela 9 representa todos os receptores que apresentaram infecção ativa, de acordo com os critérios estabelecidos, os resultados positivos dos métodos utilizados no período pré-transplante e pós-transplante durante o período de monitorização.

Tabela 9: Resultados de PCR e AGM indicativos de infecção ativa pelo HCMV nos transplantados renais estudados.

Paciente	Sorologia Pré-Tx D/R	PCR Pré-Tx	AGM Pré-Tx	Tempo em dias Pós-Transplante	
				PCR (+)	AGM (nº. Cels +)
1	+/+	-	-	99, 113	-
2	+/+	-	-	12, 19, 26, 33, 38, 52, 59, 80	52 (15)
3	+/+	+	-	45, 59, 74, 87	45 (61)
4*	+/-	-	-	42, 52, 58, 63, 70	42 (5), 58 (117)
6	+/+	-	-	19, 24, 40, 45	45 (6)
7	+/+	-	-	10, 19, 24, 38	-
9	+/+	-	-	20, 28, 34	28 (14), 34 (5)
10	+/+	-	-	18, 25, 30, 46, 53	-
11	+/+	-	-	9, 18, 23, 30, 46	-
12	+/+	+	-	5, 13	-
13	NR/+	-	-	27, 48, 60	-
15*	+/-	-	-	39, 52, 73, 88	73 (25)
16	+/+	-	-	5, 12, 46	-
17*	+/-	-	-	5, 12, 19, 26, 45	12 (5)
18*	+/-	-	-	15, 22, 36, 43, 50	15 (10), 22 (128)
20*	+/-	-	-	29, 38, 43, 58	-
22	+/+	-	-	27, 33, 42, 48, 55	42 (150), 48 (35)

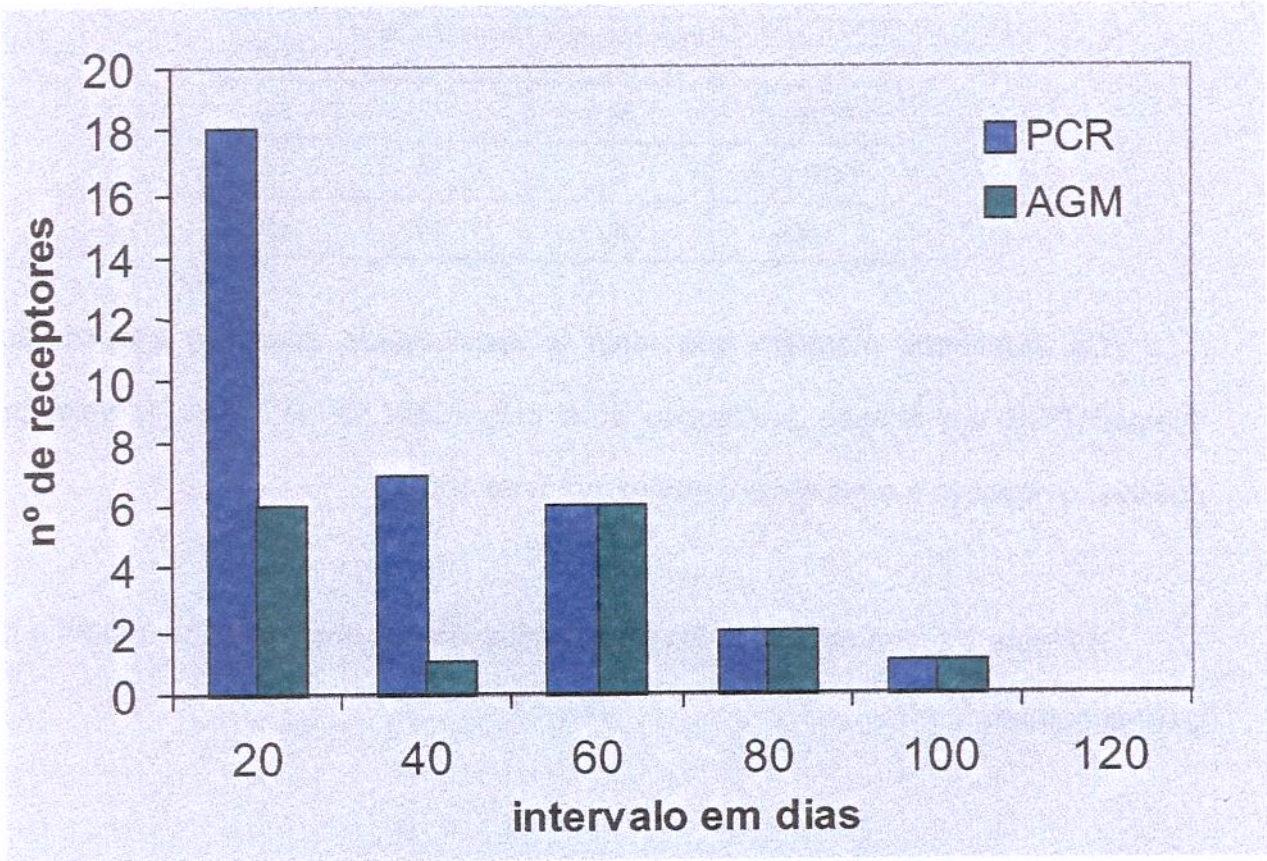
Continuação da tabela 9

24	+/+	-	-	68, 80, 87, 94	68 (10), 80 (5)
26	+/+	-	-	2, 29	-
29	NR/+	-	-	77, 93	-
30	NR/+	-	-	51, 77, 93, 114	-
32	NR/+	-	-	41, 48	-
33	NR/+	-	-	34, 42, 49, 65	-
34	+/+	-	-	48, 56, 62, 77, 84, 98, 104	84 (22), 98 (6)
37	NR/+	-	-	4, 17, 26	17 (11)
38	NR/+	-	-	12, 21, 27, 33	-
40	+/+	-	-	7, 12, 19, 26	7 (10); 12 (50), 19 (14)
41	+/+	-	-	12, 19, 26	19 (5)
42	+/+	-	-	8, 13, 20, 27	8 (5), 13 (8), 20 (4)
43	+/+	-	-	39, 46, 53	-
44	+/+	-	-	18, 25, 38, 52, 59, 66, 73, 80	59 (15), 66 (12), 73 (3)
45	NR/+	-	-	15, 22, 28	-
47	+/+	-	-	27, 41	-
48	+/+	-	-	55, 62	-

(-)Resultados negativos; (+)Resultados positivos; (NR)Não realizada a reação; (*)Pacientes com risco de desenvolverem infecção primária.

Gráfico 1 mostra o número de receptores com infecção ativa e os resultados do primeiro dia positivo pós-transplante para cada teste utilizado nesse estudo, com intervalo em dias (apêndice 4. resultados individuais dos 34 receptores com infecção ativa).

Gráfico 1: Distribuição por número de receptores e 1º resultado positivo para as técnicas de “Nested”-PCR e Antigenemia .



Pela análise do gráfico 1 podemos observar que os receptores com infecção ativa apresentaram, em sua maioria, resultados positivos para as técnicas de “Nested”-PCR e Antigenemia durante os dois primeiros meses pós-transplante.

As Tabelas 10 e 11 mostram os resultados comparativos entre a presença de infecção ativa por HCMV nos receptores estudados e os métodos diagnósticos utilizados.

Tabela 10: Comparação entre infecção ativa e os resultados da técnica de “Nested”-PCR.

	Infecção ativa (+)	Infecção ativa (-)	Total
PCR (+)	34	0	34
PCR (-)	0	14	14
Total	34	14	48

Os resultados mostram que tanto a sensibilidade quanto a especificidade da “Nested”-PCR em relação à infecção ativa por HCMV foi de 100%. O valor preditivo positivo, o negativo e a acurácia também foram de 100%.

A Figura 2 ilustra os resultados da amplificação dos fragmentos do HCMV e da β -globina humana.

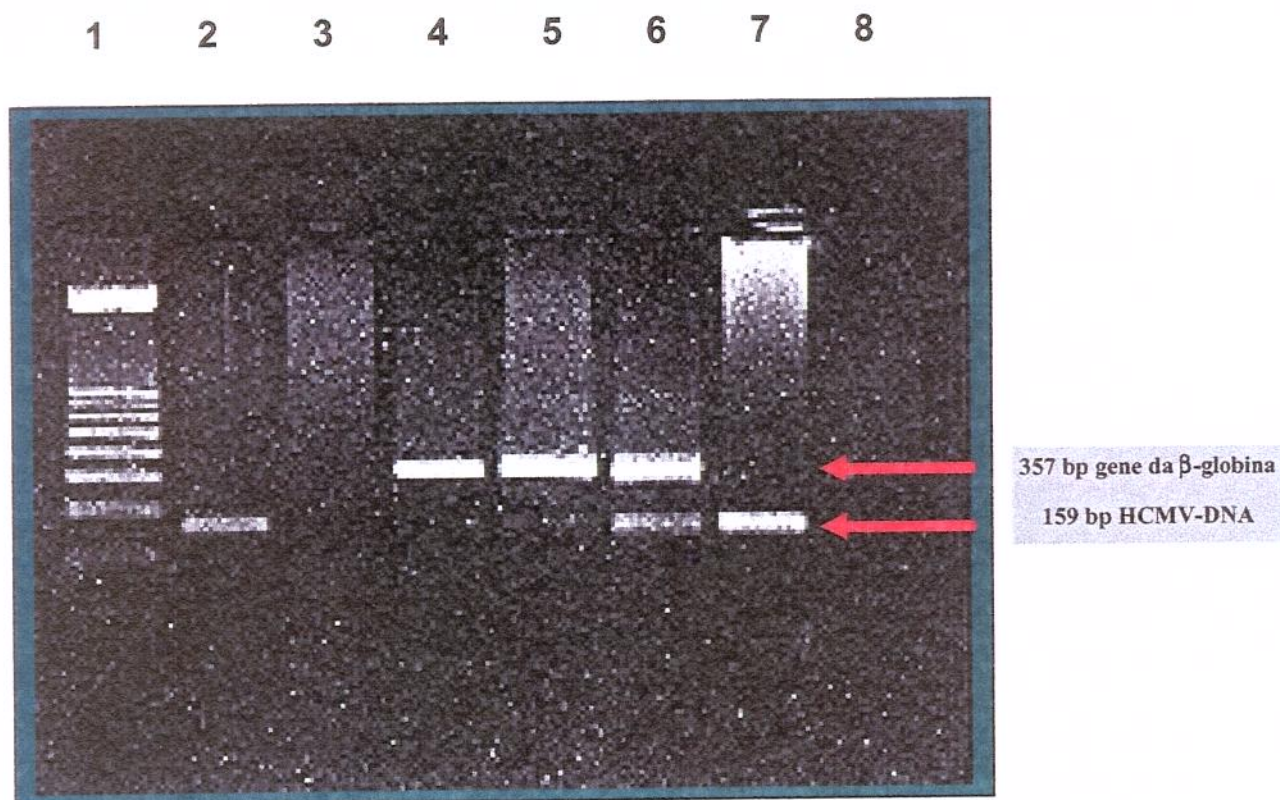


Figura 2 - Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em minigel de agarose 2%. Linha 1, Marcador de peso molecular (Ladder de 100pb); linha 2, controle positivo (cepa AD169) do HCMV; linha 3, controle negativo; linhas 4 e 5, amostras de DNA de sangue positivas para o gene da β -globina; linha 06, amostra de DNA de sangue positiva para o gene da β -globina e para o HCMV; linha 07, controle positivo (cepa AD169) do HCMV.

Tabela 11: Comparação entre infecção ativa e os resultados da Antigenemia.

	Infecção ativa (+)	Infecção ativa (-)	Total
AGM (+)	16	0	16
AGM (-)	18	14	32
Total	34	14	48

Os resultados mostram que a sensibilidade da AGM em relação à infecção ativa foi de 47% e a especificidade, 100%. Os valores preditivos positivo e negativo da Antigenemia para a infecção ativa foram, respectivamente, 100% e 44%. A concordância (acurácia) entre a Antigenemia e a infecção ativa foi de 62%.

A Figura 3 ilustra células antígeno-positivas e negativas para a reação da Antigenemia do HCMV.



Figura 3 - Reação de Imunoperoxidase (Antigenemia). Células antígeno-positivas **pp65**, identificadas pela coloração castanho-avermelhada nuclear ou perinuclear em leucócitos polimorfonucleares; células negativas – núcleo azul. Os leucócitos foram preparados em lâminas microscópicas, fixados com Paraformaldeído/NP40 e submetidos à coloração com imunoperoxidase com o uso de anticorpos monoclonais C10/C11.

4.4.2 – Provável doença por citomegalovírus humano

Entre os 48 receptores estudados, foram observadas manifestações clínicas sugestivas de serem secundárias à replicação viral (provável doença por HCMV) em 15 (31%) pacientes; o início dos sintomas ocorreu a partir do primeiro mês após o transplante. Em 33 (69%) pacientes não foram observadas manifestações clínicas relacionadas ao HCMV.

Dos 15 pacientes sintomáticos, 4 (27%) pertenciam ao sorogrupo D+/R- e desenvolveram infecção primária. Em 11 (73%) pacientes observou-se infecção secundária (reinfecção ou reativação viral).

Entre os pacientes sintomáticos a “Nested”-PCR foi positiva nos 15 (100%) pacientes e a Antigenemia em 13 (87%). Pela análise do início dos sintomas e as evidências laboratoriais de infecção ativa, observou-se que a “Nested”-PCR positiva precedeu 20 dias (em média) os sintomas clínicos em 14 pacientes; em 1 paciente a positividade da PCR ocorreu depois dos sintomas; a Antigenemia positiva precedeu 13 dias (em média) os sintomas em 9 pacientes, porém em 4 pacientes a positividade da Antigenemia ocorreu depois dos sintomas.

A Tabela 12 destaca os sintomas apresentados pelos 15 pacientes com provável doença pelo HCMV, o início do quadro clínico e o primeiro dia de positividade de cada técnica empregada no seguimento dos transplantados renais em relação à infecção pelo HCMV.

Tabela 12: Cronologia do diagnóstico da provável doença por HCMV, em dias após o transplante, e manifestações clínico-laboratoriais apresentadas pelos receptores de transplante renal.

Paciente	Sinais, Sintomas e Alterações laboratoriais	Tempo pós-transplante (dias)		
		Início do quadro clínico	PCR +	AGM +
2	Leucopenia, Trombocitopenia	38	12	52
4*	Febre, Mialgia, Alteração de enzimas hepáticas, Leucopenia	49	42	42
6	Febre, Trombocitopenia	47	19	45
15*	Febre, Mialgia	86	39	73
17*	Mialgia, Trombocitopenia	25	5	12
18*	Febre, Alteração de enzimas hepáticas, Leucopenia	36	15	15
22	Febre, Leucopenia, Trombocitopenia	18	27	42
34	Leucopenia	49	48	84
37	Alteração de enzimas hepáticas, alteração da função renal	25	4	17
38	Febre, Leucopenia	42	12	-
40	Trombocitopenia, Alteração de enzimas hepáticas	15	7	7
41	Pancitopenia	26	12	19
42	Febre prolongada, Alteração de enzimas hepáticas	47	8	8
43	Febre, Leucopenia	43	39	-
44	Alteração da função renal, Trombocitopenia	38	18	59

(*) Infecções primárias.

As Tabelas 13 e 14 mostram os resultados comparativos entre a ocorrência de provável doença por HCMV nos receptores estudados e os métodos diagnósticos utilizados.

Tabela 13: Comparação entre provável doença por HCMV e os resultados da técnica de “Nested”-PCR.

	Provável doença (+)	Provável doença (-)	Total
PCR (+)	15	19	34
PCR (-)	0	14	14
Total	15	33	48

Os resultados mostram que a sensibilidade da “Nested”-PCR em relação à provável doença por HCMV foi de 100% e a especificidade, 42%.

Os valores preditivos positivo e negativo da “Nested”-PCR para a provável doença por HCMV foram, respectivamente, 44% e 100%. A concordância (acurácia) entre a “Nested”-PCR e a provável doença foi de 60%.

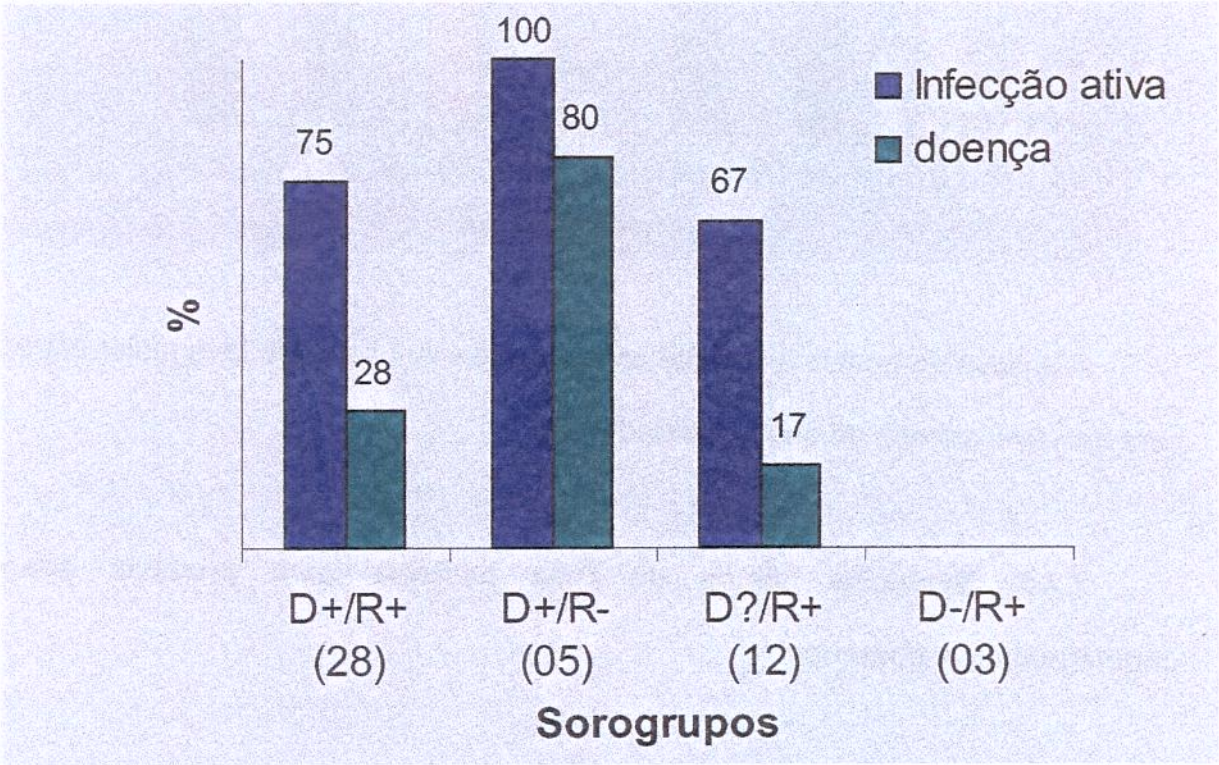
Tabela 14: Comparação entre provável doença e os resultados da Antigenemia.

	Provável doença (+)	Provável doença (-)	Total
AGM (+)	13	3	16
AGM (-)	2	30	32
Total	15	33	48

Os resultados mostram que a sensibilidade da Antigenemia em relação à provável doença foi de 87% e a especificidade, 91%.

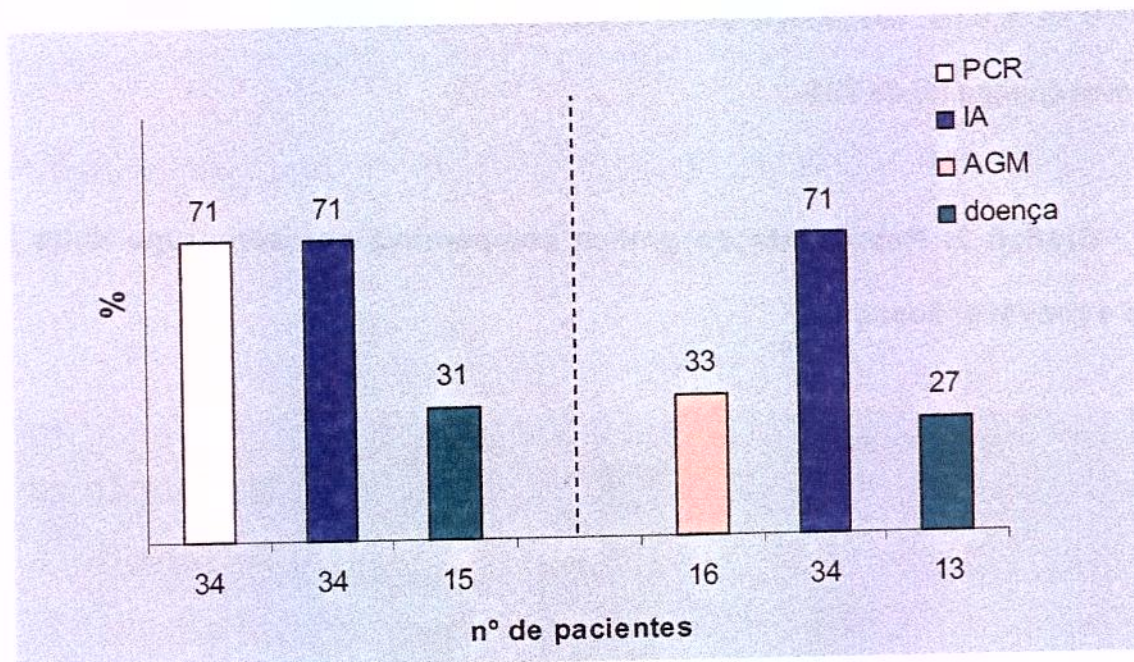
Os valores preditivos positivo e negativo da Antigenemia para a provável doença foram 81% e 93%, respectivamente. A concordância (acurácia) entre a Antigenemia e a provável doença foi de 99%.

Gráfico 2: Representação gráfica comparativa por sorogrupo entre infecção ativa e provável doença.



A análise do gráfico 2 permite observar a importância de se determinar o perfil sorológico do doador e receptor no pré-transplante . O sorogrupo D+/R- apresentou infecção ativa em 100% dos casos e provável doença em 80% dos casos.

Gráfico 3: Representação gráfica comparativa entre as técnicas para infecção ativa e provável doença.



A análise do gráfico 3 permite concluir que a Antigenemia teve maior especificidade para provável doença do que a “Nested”-PCR.

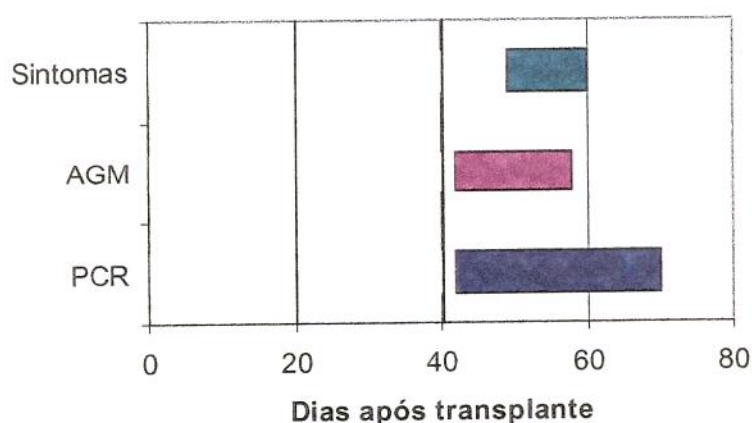
4.4.3. Evolução clínica de uma paciente com provável doença por citomegalovírus humano

Paciente (nº. 4) do sexo feminino, 32 anos, doador vivo relacionado (irmão gemelar), HLA II. Imunossupressão por Ciclosporina, Azatioprina e Prednisona. Recebeu profilaxia com Ganciclovir durante 14 dias, pois a paciente era soronegativa para HCMV enquanto seu doador era soropositivo (D+/R-). No 42º dia pós-transplante, tanto a PCR quanto a

Antigenemia foram positivas. A PCR permaneceu positiva até o 105º dia e a Antigenemia até o 58º dia. No 49º dia, a paciente apresentou febre, mialgias, náuseas, mal-estar, leucopenia e alterações das enzimas hepáticas. Foi iniciada nova terapia com Ganciclovir por 21 dias. Durante a monitorização, a paciente não apresentou nenhum episódio de rejeição.

O Gráfico 4 ilustra o período de monitorização da Paciente nº. 4 em relação à provável doença por HCMV.

Gráfico 4: Representação gráfica comparativa entre os períodos de detecção do HCMV pelas técnicas de Antigenemia e PCR e o início dos sintomas para a Paciente nº. 4.



4.5. Episódios de rejeição aguda

Ocorreram ao longo do estudo 16 episódios de rejeição em 13 pacientes. Destes casos, apenas 1 foi tratado com OKT3 (paciente nº. 18) e os demais com 'pulso' de metilprednisolona.

A Tabela 15 apresenta uma comparação entre a presença de infecção ativa por HCMV nos pacientes estudados e a ocorrência de episódios de rejeição

Tabela 15: Comparação entre a infecção ativa e os episódios de rejeição.

	Rejeição (+)	Rejeição (-)	Total
Infecção ativa (+)	11	23	34
Infecção ativa (-)	2	12	14
Total	13	35	48

Entre os pacientes com episódio de rejeição, 11 (84,6%) apresentaram infecção ativa por HCMV, sendo que destes, 7 (53,8%) tiveram manifestação clínica (provável doença) por HCMV.

A análise (Teste Exato de Fischer) entre Infecção ativa e rejeição aguda não mostrou diferenças estatisticamente significantes ($p=0,292$).

DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

A maioria da população humana é soropositiva para o citomegalovírus (HCMV), um membro da família β -herpesvírus. Normalmente, a infecção de indivíduos imunocompetentes não causa a doença. Entretanto, a infecção em indivíduos imunocomprometidos, como os pacientes com AIDS e os receptores de transplantes, pode levar ao aumento da morbidade e da mortalidade nesses grupos de risco (LJUNGMAN, 1996; PATEL & PAYA, 1997; BLOCK *et al.*, 2000). O HCMV é o agente infeccioso mais freqüente em transplantados de órgãos, afetando pelo menos 2/3 desses indivíduos (RUBIN, 1993).

Nos transplantados renais, a infecção por HCMV pode ocorrer sob a forma de infecção primária, em que o transplante de órgão de doador soropositivo para receptor soronegativo é a causa mais freqüente de infecção e geralmente evolui para doença, por reativação do vírus latente, em receptores soropositivos para o HCMV antes do transplante, o vírus latente pode ser reativado geralmente em situações de grave imunossupressão ou por reinfecção com uma nova linhagem viral presente no órgão transplantado (HIBBERD & SNYDMAN, 1995).

O HCMV tem sido reconhecido como significativo fator de risco para falência e morte do enxerto em vários estudos prospectivos já realizados. A observação da ocorrência de um episódio de rejeição aguda concomitante à infecção por HCMV tem permitido o estabelecimento de uma relação entre a infecção por HCMV e rejeição (POUTEIL-NOBLE *et al.*, 1993).

Ainda que a profilaxia antiviral tenha levado à redução da morbidade e da mortalidade da doença por HCMV nos últimos anos, a toxicidade associada com os atuais agentes antivirais disponíveis continua a ser um problema significativo; assim, os esforços têm sido direcionados ao desenvolvimento de métodos de detecção, altamente sensíveis e quantitativos, para identificar pacientes com risco para doença antes do início dos sintomas, com isso direcionando o tratamento antiviral apenas aos pacientes seguramente com risco para doença (BOECKH & BOIVIN, 1998).

Com o advento de drogas eficazes para o tratamento das infecções causadas pelo HCMV, o diagnóstico precoce da infecção com o objetivo de reduzir seu impacto clínico tornou-se imperativo. No presente trabalho comparam-se as técnicas de reação em cadeia da polimerase tipo “Nested”-PCR com a Antigenemia em granulócitos (PMN) do sangue periférico, com o objetivo de identificar infecção ativa por HCMV em receptores de transplante renal; a sorologia IgG e IgM anti-HCMV por ELISA foi utilizada para determinar o *status* sorológico pré-transplante dos receptores monitorados e de seus respectivos doadores.

A reação em cadeia da polimerase introduzida por SAIKI *et al.*, (1985; 1988), para amplificação seletiva de seqüências de ácido nucléico tem mostrado grande utilidade em um número cada vez maior de situações clínicas, incluindo o diagnóstico de doenças infecciosas variadas.

Os trabalhos pioneiros que utilizaram a PCR no diagnóstico da infecção pelo HCMV foram os de DEMMLER *et al.*, (1988) e SHIBATA *et al.*, (1988), ambos demonstraram que a PCR simples seguida de hibridização era mais sensível que a cultura viral clássica para o HCMV.

Em razão da alta sensibilidade da técnica de PCR, o HCMV é também detectado em um número substancial de pacientes com infecção assintomática que nunca progridem para doença (VLIEGER *et al.*, 1992; BOECKH *et al.*, 1997). Os cuidados tomados durante a técnica de PCR para se evitar a contaminação das amostras, revelam-se extremamente úteis para prevenir resultados falso positivos.

Em nosso meio, o primeiro estudo que utilizou PCR para identificar infecção ativa em transplantados renais foi o de COSTA *et al.*, (1999), que estudaram 37 pacientes, por meio da detecção de partículas virais na urina, utilizando a PCR simples, seguida por hibridização específica e comparando estes resultados com reações sorológicas (ELISA e IFI). Os resultados globais, agrupando sorologia e PCR, mostraram 32 (86,48%) pacientes com evidências de infecção ativa por HCMV; desses, 16 (43,2%) apresentaram manifestações clínicas compatíveis com provável doença por HCMV. Os dados deste trabalho indicaram que a infecção por HCMV é um problema relevante após o transplante renal em populações brasileiras.

Empregou-se a “Nested”-PCR, que é uma técnica de dupla PCR, desenvolvida para alcançar resultados mais rápidos quando comparada à PCR simples seguida de hibridação (PORTER-JORDAN *et al.*, 1990; XU *et al.*, 1993; BRAINARD, 1994; FOX *et al.*, 1995; EHRNST, 1996). Neste caso, a detecção do fragmento amplificado ocorreu por visualização direta; as vantagens deste procedimento são óbvias tanto do ponto de vista de rapidez e praticidade, quanto do ponto de vista econômico.

Como previamente reportado (FREYMUTH *et al.*, 1994; SEGOND *et al.*, 1996; SUMIMOTO *et al.*, 1998; AQUINO & FIGUEIREDO, 2001), a “Nested”-PCR utilizada para

detecção do HCMV em receptores de transplante renal é um procedimento confiável e sensível, podendo ser bastante útil na identificação da infecção ativa por HCMV.

Em associação à “Nested”-PCR, utilizou-se a técnica de Antigenemia, que foi inicialmente descrita por van den BIJ *et al.*, (1988) e tem representado um avanço para o diagnóstico de infecções e doença por HCMV em pacientes com transplantes de órgãos sólidos. O teste da Antigenemia é um método sensível para a estimativa da carga viral sistêmica do HCMV e pode ser detectado de vários dias a uma semana antes do aparecimento dos sintomas. (THE *et al.*, 1990; TANABE *et al.*, 1997; SCHROEDER *et al.*, 1999; GOOSSENS *et al.*, 2000).

O teste apresenta muitas vantagens do ponto de vista clínico pode ser facilmente quantificada, revelando uma estimativa da carga viral que é útil na diferenciação de doença por HCMV de outras complicações; na avaliação da eficácia da terapia antiviral e, possivelmente, na detecção precoce da resistência à droga e também possui vantagens em termos de práticas laboratoriais. É uma técnica rápida, permitindo a detecção viral após 4-5 h da amostragem de sangue, quando comparada à cultura convencional e ao “shell vial” (NIUBO *et al.*, 1996). Tomando-se a técnica de cultura como referência, a sensibilidade da AGM foi reportada na literatura, variando de 81 a 100% (THE *et al.*, 1992; LANDRY & FERGUSON, 1993; BAILEY *et al.*, 1995; ECKART *et al.*, 1997; BLOCK *et al.*, 2000).

Os dados da literatura mostram que a Antigenemia é tão sensível quanto a PCR (HEBART *et al.*, 1996) ou menos que a PCR (THE *et al.*, 1992; GERNA *et al.*, 1994), dependendo do método que se usar para cada técnica.

O uso da técnica de sorologia, no período pré-transplante, é justificado pela importância da determinação da susceptibilidade à infecção primária (mais freqüentemente sintomática) e do exame do sangue e do órgão do doador quanto à prévia exposição ao HCMV e ao potencial de transmissão acarretada por portadores do HCMV latente (CHOU, 1990). A presença pregressa de anticorpos confere certo grau de proteção contra subsequente doença por HCMV, mas não protege contra reativação endógena do vírus latente ou de reinfecção por cepa exógena.

Com relação à epidemiologia do HCMV, nos países em desenvolvimento há altas taxas de soroprevalência do vírus na população de adultos, devido aos diferentes mecanismos de transmissão envolvidos. Este fato exerce influência na morbimortalidade associada a infecções pelo HCMV após transplante de órgãos, uma vez que nos transplantes em adultos reduz-se, consideravelmente, o risco de infecção primária (BRUGEMMAN, 1993).

Os dados obtidos nesta casuística, no período pré-transplante, confirmam a alta prevalência da infecção pelo HCMV em nosso meio; na população estudada (48 receptores e 26 doadores), observou-se uma prevalência de 89%; taxa esta elevada e concordante com os dados obtidos em nosso meio por SUASSUNA *et al.*, (1995), COSTA *et al.*, (1999), CAMARGO *et al.*, (1996) e AQUINO & FIGUEIREDO (2001). Esses resultados são compatíveis com dados da literatura que apontam prevalência de infecção pelo HCMV entre 80 e 100% quando populações de reduzido nível sócio-econômico são analisadas.

A alta taxa de soropositividade neste estudo levou a que apenas 10% dos transplantados estivessem sob risco de desenvolver infecção primária. Nossos resultados

mostram que 5 pacientes (4, 15, 17,18,20), soronegativos em relação ao HCMV se encontravam sob risco de desenvolver, após o transplante, infecção primária pelo HCMV pois seus respectivos doadores eram soropositivos em relação ao HCMV.

Não utilizou-se a análise sorológica para o diagnóstico de infecção ativa por HCMV no período pós-transplante, pela limitação desse método em transplantados, devido à significativa imunossupressão a que estes pacientes são submetidos, o que pode interferir na produção de imunoglobulinas e resultar em dados incorretos (DRAGO, *et al.*, 2000).

Ainda em relação ao período pré-transplante observamos que apenas 2 receptores e 1 doador possuíam “Nested”-PCR positiva. Um dos receptores apresentou infecção ativa durante o acompanhamento e desenvolveu tardiamente provável doença por HCMV (paciente nº 12, descrito posteriormente), o outro recebeu profilaxia com OKT3 devido à retransplante associado à ganciclovir também apresentou infecção ativa, mas não desenvolveu provável doença. A Antigenemia foi negativa para todos os receptores e doadores estudados.

As taxas de infecção ativa pós-transplante pelo HCMV são geralmente elevadas, variando de 50% a 90%, o que se deve à imunossupressão que o paciente é submetido podendo levar à ativação do HCMV latente e ao papel ativo do enxerto como fonte de transmissão (HIBBERD & SNYDMAN, 1995; ECKART *et al.*, 1996).

Neste trabalho observa-se que a infecção ativa ocorreu em 34 (71%) dos 48 receptores estudados, pela “Nested”-PCR e detectou 16 (33%) receptores com infecção ativa pela Antigenemia. Em 18 receptores somente a “Nested”-PCR foi capaz de identificar infecção ativa pelo HCMV.

Em 14 pacientes não foi diagnosticado infecção ativa por nenhum dos métodos utilizados no estudo e todos se mostraram assintomáticos, durante todo o seguimento. Estes pacientes eram soropositivos para o HCMV no pré-transplante e portanto possuíam o HCMV latente.

A análise dos sorogrupos em relação à infecção ativa mostrou que todos os receptores soronegativos com doador soropositivo (D+/R-), apresentaram infecção ativa, o sorogupo D+/R+ apresentou 75% de infecção ativa e já no sorogrupos D-/R+ nenhum receptor desenvolveu infecção ativa, mostrando que de acordo com os dados da literatura a infecção por HCMV nos transplantados geralmente está relacionada à presença do vírus latente no órgão transplantado (COSTA *et al.*, 1994).

Em relação à infecção ativa por HCMV, os resultados de sensibilidade e de especificidade da “Nested”-PCR foram 100% e os da Antigenemia foram 47% e 100%, respectivamente. Segundo TANABE *et al.*, (1996) e THE *et al.*, (1992), a sensibilidade e a especificidade da PCR para a infecção ativa mostrou um valor de 94% e 91% e a da Antigenemia, 90% e 91%, respectivamente. Assim, com relação à PCR, os resultados foram similares aos encontrados na literatura; no entanto, o valor da sensibilidade da Antigenemia mostrou-se diferente. Por ser uma técnica mais sensível a “Nested”-PCR detectou infecção ativa em pacientes assintomáticos que não evoluíram para doença.

A maioria das infecções, tanto nos pacientes com infecção primária, quanto nos pacientes previamente soropositivos, ocorreu nos três primeiros meses pós-transplante. Estes achados confirmam as observações de outros pesquisadores (THE *et al.*, 1992; TANABE *et al.*, 1996; BOECK & BOIVIN, 1998), que dizem serem raras as infecções a partir do 4º mês pós-transplante.

ECKART *et al.*, (1996) em seus estudos sobre o diagnóstico de HCMV em transplantados renais, afirmam que o sorogrupo D+/R- é um fator preditivo para o desenvolvimento da infecção viral ativa. No presente trabalho, entre os sorogrupos estudados, todos os receptores soronegativos que receberam rim de doador soropositivo apresentaram infecção ativa por HCMV.

Estes receptores soronegativos apresentaram soroconversão com a presença de anticorpos da classe IgM e IgG positivos pela técnica de ELISA (resultados observados nos prontuários dos pacientes) em períodos posteriores à positividade dos métodos utilizados neste estudo.

Com relação à infecção sintomática (provável doença) por HCMV, observa-se uma taxa de 31% (15 receptores) que está de acordo com os vários investigadores que descreveram infecção sintomática em 20-60% dos casos (NEVINS & DUNN, 1992; HIBBERD *et al.*, 1992; PELLEGRIN *et al.*, 2000).

No Brasil, os trabalhos realizados com transplantados renais mostraram variação das incidências de infecção sintomática por HCMV. CAMARGO *et al.*, (1996) observaram uma incidência de 10%, utilizando para detecção do HCMV técnicas sorológicas comparadas com cultura em “shell vial”. AQUINO & FIGUEIREDO (2001), por meio da técnica de “Nested”-PCR relataram a presença de doença em 18,7% dos pacientes. COSTA *et al.*, (1999), como descrito anteriormente, compararam a PCR seguida de hibridização com técnicas sorológicas, detectando 43,24% de doença. A presença de diferenças significativas entre a porcentagem de provável doença por HCMV encontrados ocorreu devido às diferentes metodologias empregadas em cada trabalho.

Estratégias profiláticas para prevenção da doença por HCMV, em transplantados de órgãos sólidos, são particularmente apropriadas a receptores do sorogrupo D+/R-, já que além de apresentarem risco de infecção maior que 70%, neles a doença é com frequência mais grave que nos pacientes com infecção secundária (SHARMA, 1997; PATEL & PAYA, 1997; NICHOLS & BOECKH, 2000; SAGEDAL *et al.*, 2000). Estes resultados mostram que, entre os pacientes com infecção ativa, 80% (4/5) dos casos de infecção primária apresentaram provável doença por HCMV e apenas 37% (11/29) dos pacientes com infecção secundária tiveram manifestações clínicas.

No grupo de receptores monitorizados foi feita a profilaxia com ganciclovir por 14 dias em 2 pacientes (nº. 4 e 15) soronegativos com doador vivo relacionado soropositivo (D+/R-). Ambos apresentaram sintomas provavelmente associados ao vírus, caracterizando doença por HCMV.

Quando se comparam as técnicas utilizadas neste estudo com a provável doença por HCMV, observa-se que os valores de sensibilidade e especificidade foram 87% e 91%, para a Antigenemia e 100% e 42% para a “Nested”-PCR, respectivamente. Os valores preditivos positivo e negativo foram 81% e 93% para a Antigenemia e 44% e 100% para a “Nested”-PCR, respectivamente. Estes resultados mostraram-se bastante similares aos reportados na literatura (MEYER-KÖNIG *et al.*, 1995; NIUBO *et al.*, 1996; TANABE *et al.*, 1997; ECKART *et al.*, 1997).

ABECASSIS *et al.*, (1997) afirmaram que a PCR qualitativa apresenta um baixo valor preditivo positivo para o desenvolvimento de doença por HCMV. De fato, em nosso estudo observou-se que para a PCR, o valor preditivo positivo para provável doença por HCMV foi menor quando comparado ao da Antigenemia.

Poucos são os estudos que comparam os resultados quantitativos da Antigenemia entre diferentes laboratórios. Uma vez que cada laboratório utiliza uma metodologia diferente, torna-se cada vez mais necessário uma padronização destas medidas. Existem algumas etapas dos procedimentos técnicos da Antigenemia que poderiam interferir significativamente, na diminuição do número de células positivas, ou seja, na sensibilidade do teste, como a perda de leucócitos (35 a 65%) durante os procedimentos de centrifugação ou em outra etapa da técnica (THE *et al.*, 1995).

Quanto aos anticorpos monoclonais utilizados, eles devem ser específicos contra a proteína pp65; recomenda-se usar diferentes anticorpos monoclonais contra diferentes epítopos para se obter uma melhor sensibilidade do método. GERNA, *et al.*, (1992) demonstraram um número maior de células positivas usando os anticorpos 2AC/1C3 ao invés dos anticorpos C10/C11. Também a técnica de coloração por imunofluorescência poderia apresentar melhores resultados que a imunoperoxidase usada em nosso trabalho.

Quanto ao número de células positivas para considerar a Antigenemia positiva ainda é controverso na literatura e existem informações conflitantes a este respeito. Com técnica rigorosa, a presença de apenas uma célula corada não deve ser desconsiderada e daí a necessidade da realização seqüencial deste exame (GERNA *et al.*, 1998; WOO *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2000).

O valor preditivo positivo (81%) da Antigenemia para provável doença mostrou que um número significativo de pacientes com Antigenemia positiva evoluiu para infecção sintomática. Portanto a especificidade da Antigenemia em relação à provável doença é maior quando comparada à "Nested"-PCR.

RUBIN & COLVIN (1981) afirmaram que o período entre a 4ª e a 12ª semanas após o transplante renal é crítico para a infecção sintomática por HCMV. Nos estudos de AQUINO & FIGUEIREDO (2001), 66,6% dos pacientes sintomáticos iniciaram o quadro clínico entre a 2ª e 5ª semanas após o transplante e os 33% restantes, entre a 14ª e 15ª. Esta casuística mostrou que 5 pacientes manifestaram os sintomas 2 a 3 semanas após o transplante e 60% tiveram sintomas entre a 5ª e 7ª semanas.

Fez-se exceção ao tempo de aparecimento da provável doença por HCMV para a paciente de nº12 que apresentou infecção sintomática, porém as manifestações clínicas desta paciente ocorreram apenas após o 13º mês do transplante. portanto não foi incluída entre os pacientes com provável doença. Esta paciente apresentou infecção ativa com “Nested”-PCR positiva desde o pré-transplante até 2 coletas pós-transplante. Em seguida, a “Nested”-PCR tornou-se negativa para voltar a positivar no 48º dia pós-transplante. Após isso, até o final do tempo de monitorização (4 meses), a “Nested”-PCR manteve-se negativa, voltando a positivar-se apenas no 13º mês pós-transplante; neste período a Antigenemia também foi positiva. Por ter apresentado manifestações clínicas compatíveis com HCMV, esta paciente foi tratada com ganciclovir, obtendo regressão dos sintomas.

A manifestação clínica mais freqüentemente detectada entre os pacientes com evidência de infecção sintomática foi síndrome febril (53%). A leucopenia também foi comumente encontrada nos nossos pacientes (47%). HOKEBERG *et al.*, (1995) detectaram artralgia e trombocitopenia em 66% e 7% dos pacientes com doença por HCMV, respectivamente, enquanto que em nosso estudo nenhum paciente apresentou artralgia e 40% deles tiveram trombocitopenia.

Nossos dados mostram que no grupo de receptores com provável doença por HCMV, as manifestações clínicas não foram tão graves; relatos da literatura indicam que nos transplantes de medula óssea ou de coração, as manifestações clínicas causadas pelo HCMV são extremamente mais graves.

O desenvolvimento de testes de diagnósticos rápidos e sensíveis é de grande interesse prático por fornecer uma detecção precoce da infecção ativa por HCMV. Alguns pesquisadores avaliaram a precocidade da PCR e da Antigenemia com relação aos sintomas clínicos e concluíram que estas técnicas precederam a manifestação clínica de vários dias a uma semana (SUMIMOTO *et al.*, 1998; PELLEGRIN *et al.*, 2000; GOOSSENS *et al.*, 2000).

Nossos resultados mostraram que a Antigenemia tornou-se positiva 13 dias (2-39) antes do início da doença em 69% dos casos. Em 4 pacientes a Antigenemia tornou-se positiva após o início do quadro clínico. A “Nested”-PCR precedeu os sintomas em 93% dos pacientes, com uma média de 20 dias (1-47).

Na maioria dos casos sintomáticos, a “Nested”-PCR tornou-se positiva alguns dias antes da Antigenemia. A análise conjunta dos dois testes utilizados neste trabalho revelou uma precocidade de ambos os testes em relação às manifestações clínicas de provável doença por HCMV.

Evidências sugerem que o HCMV é um fator de risco para a rejeição aguda que, por sua vez, correlaciona-se com a menor sobrevida do enxerto renal a longo prazo (NAIMARK & COLE, 1994; COSTA *et al.*, 1999; SCHROEDER *et al.*, 1999; PELLEGRIN *et al.*, 2000).

Em nossa casuística, dos 13 pacientes que tiveram episódios de rejeição, 11 (85%) apresentaram evidências laboratoriais de infecção ativa pelo HCMV. Foram observadas manifestações clínicas em 7 (54%) pacientes com episódios de rejeição, ocorrendo perda do enxerto em 2 casos. Em 2 pacientes que apresentaram episódios de rejeição não foram observadas evidências de infecção ativa por nenhum dos testes.

O desenvolvimento de técnicas que possibilitam o diagnóstico rápido da infecção por HCMV como a “Nested”-PCR e a Antigenemia, utilizados neste trabalho, propiciam a implementação precoce de medidas terapêuticas como o uso de drogas antivirais, por exemplo. Nossos resultados, de acordo com outros trabalhos desenvolvidos em nosso meio, sugerem que a infecção por HCMV é um problema relevante após transplante renal, no Brasil.

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.

CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

#Observou-se uma soroprevalência de 89% na população estudada (receptores e doadores).Os dados obtidos confirmam a alta prevalência de infecção pelo HCMV em nosso meio.

Com o emprego da “Nested”-PCR foi possível identificar DNA viral do HCMV indicativo de infecção ativa em 71% dos pacientes transplantados renais, estudados prospectivamente.

Com a utilização da Antigenemia, empregada neste trabalho, foi possível detectar 47% de infecção ativa por HCMV.

A técnica de Antigenemia mostrou maior especificidade para provável doença quando comparada a “Nested”-PCR.

A análise conjunta dos dois testes utilizados neste trabalho revelou uma precocidade de 69% para a Antigenemia e de 93% para a “Nested”-PCR, em relação às manifestações clínicas de provável doença por HCMV.

SUMMARY

7. SUMMARY

Human Cytomegalovirus (HCMV) active infection remains a significant cause of morbidity and mortality of immunocompromised patients. In the case of renal transplant recipients, it is known that 70% to 90% of them have HCMV active infection, which has a negative influence on graft survival, and that the highest risk period is between one to four months posttransplant. Early diagnosis of HCMV infection/disease and a correct differentiation from other opportunistic infections that occur during the posttransplant period are essential, considering that confusion between renal dysfunction caused by HCMV active infection and allograft rejection may lead to additional immunosuppressive therapy and life-threatening consequences to the patient.

The present study was designed to follow prospectively 48 renal transplant recipients managed at the University Hospital of Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) and evaluate the usefulness of the HCMV "Nested" - PCR technique and pp65 Antigenemia assays in monitoring HCMV active infection. A further aim of the study was to establish the seroprevalence of HCMV infection in 28 donors and in the 48 recipients and verify the clinic impact caused by HCMV active infection and disease.

Among 76 evaluated people, 68 (89,5%) had anti-CMV IgG, indicating that they were infected with CMV before transplantation.

Considering the incidence of active HCMV infection, of 48 patients enrolled in the study, 34 (70,8%) experienced active HCMV infection and 18 of these 34 patients were only HCMV-PCR-positive.

During the follow-up period, a total of 15 (31,3%) patients developed clinical disease with evocative symptoms. Thirteen (81,3%) of 16 HCMV-antigenemia-positive patients had HCMV disease, and 15 (44,1%) of 34 HCMV-PCR-positive patients developed HCMV disease.

Our results indicated that PCR is more sensitive than Antigenemia; however, both are rapid and early assays for detection of cytomegalovirus infection.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABECASSIS, M. M.; KOFFRON, A J.; KAPLAN, B.; BUCKINGHAM, M.; MULDOON, J.P.; CRIBBINS, A J.; KAUFMAN, D.B.; FRYER, J.P.; STUART, J.; STUART, F.P. – The role of PCR in the diagnosis and management of CMV in solid organ recipients. **Transplantation**, **63(2)**: 275-279, 1997.
- ALFORD, C.A. & BRITT, W.J. - Cytomegalovirus In : FIELDS, B.N. & KNIPE, D.M. Virology. 2 ed. Nova Iorque. **Raven Press**, p.1981-2010, 1990.
- AQUINO, V.H. & FIGUEIREDO, L.T.M. – Cytomegalovirus Infection in Renal Transplant Recipients diagnosed by nested-PCR. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **34**: 93-101, 2001.
- ASPIN, M.M.; GALLEZ-HAWKINS, G.M.; GIUGNI, T.D.; TEGTMEIER, B.; LANG, D.J.; SCHMIDT, G.M.; FORMAN, S.J.; ZAIA, J.A. - Comparison of Plasma PCR and Bronchoalveolar lavage fluid culture for Detection of Cytomegalovirus Infection in Adult Bone Marrow Transplant Recipients. **Journal of Clinical Microbiology**, **32**: 2266-2269, 1994.

- BAILEY, T.C.; BULLER, R.S.; ETTINGER, N.A ; TRULOCK, E.P.; GAUDREALT-KEENER, M.; LANGROIS, T.M.; FORNOFF, J.E.; COOPER, J.D.; STORCH, G.A - Quantitative analysis of Cytomegalovirus viremia in Lung Transplant Recipients. **The Journal of Infectious Diseases**, **171**: 1006-1010, 1995.
- BLOCK, M. J.; LAUTENSCHLAGER, I.; CHRISTIAANS, M.H.L.; Van HOOFF, J.P.; GOOSSENS, V.J.; MIDDELDORP, J.M.; SILLEKENS, P.; HÖCKERSTEDT, K.; BRUGEMAN, C.A - Sensitive Detection of Cytomegalovirus Infection in Transplant Recipients Using Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. **Transplantation Proceedings**, **32**: 149 – 151, 2000.
- BOECKH, M. & BOIVIN, G. – Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications. **Clinical Microbiology Review**, **11(3)**: 533-554, 1998.
- BOECKH, M.; BOWDEN, R.A ; GOODRICH, J.M.; PETTINGER, M.; MEYERS, J.D. – Cytomegalovirus Antigen Detection in peripheral blood leukocytes after Allogeneic Marrow Transplantation. **Blood**, **80**: 1358-1364, 1992.
- BOECKH, M.; HAWKINS, G.; MYERSON, D.; ZAIA, J.; BOWDEN, R.A - Plasma PCR for Cytomegalovirus DNA after Allogeneic Marrow Transplantation: Comparison with PCR using peripheral blood leukocytes, pp65 Antigenemia and Viral Culture. **Transplantation**, **64**: 108-113, 1997.

- BOWDEN, R.A. – Cytomegalovirus Infections in Transplant patients: Methods of ety human prevention of Primary Cytomegalovirus. **Transplantation Proceedings**, **23**: 136-138,1991.
- BRAINARD, J.A. – Detection of Cytomegalovirus in Liver Transplant biopsies **Transplantation**, **57**: 1753-1757, 1994.
- BROWN, H.L. & ABERNATHY, M.P. – Cytomegalovirus Infection. Seminars in Perinatology, **22**(4): 260-266, 1998.
- BRUGEMMAN, C.A. – Cytomegalovirus and latency: an overview. Archiv B Cell Pathol, **64**: 325-333, 1993.
- BRYTTING, M.; SUNDQVIST, V.A ; STALHANDSKE, P.; LINDE, A ; WAHREN, B. – Cytomegalovirus DNA Detection of an Immediate early Protein Gene with Nested primer oligonucleotides. **The Journal of Virological Methods**, **32**: 127-138, 1991.
- CAMARGO, L.F.A ; GRANATO, C.F.H.; TOMYIAMA, H.T.; COBO, E.; AJZEN, H.; PESTANA, J.OM. – Infecção pelo Citomegalovirus em Pacientes submetidos a Transplante Renal: Estudo de 20 casos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, **18**(2): 130-136, 1996.

CAPULONG, M.G.T.; MENDOZA, M.; CHAVEZ, J. – Cytomegalovirus pneumonitis in Renal Transplant Patients. **Transplantation Proceedings**, **30**: 3151-3153, 1998.

CASSOL, S.A ; POON, M.; PAL, R.; NAYLOR, M.J.; CULVER-JAMES, J.; BOWEN, T.J.;
RUSSEL, J.A ; KRAWTZ, S.A ; PON, R.T.; HOAR, D.I. – Primer-Mediated Enzymatic
Amplification of Cytomegalovirus (CMV) DNA. **Journal of Clinical Investigation**, **83**:
1109-1115, 1989.

CHEN, Y.T.; MERCER G.; CHEIGY, O. – Cytomegalovirus Infection of Renal Allograft
Transplantation **Transplantation**, **53**: 99-102, 1992.

CHOU, S. – Differentiation of Cytomegalovirus strains by Restriction Analysis of DNA
Sequences Amplified from Clinical Specimens. **Journal of Infectious Diseases**, **162**:
738-742, 1990.

CHOU, S. & MERIGAN, T.C. – Rapid Detection and Quantitation of Human
Cytomegalovirus in Urine through DNA Hybridization. **The New England Journal of
Medicine**, **308**: 921-925, 1983.

COSTA, F.F. & COSTA. S.C.B.- Reação em cadeia da Polimerase (PCR), Princípios e
Aplicações Clínicas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, **32**: 142-146, 1992.

COSTA, S.C.B. – Infecção por Citomegalovírus (CMV): Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento. **Revista Brasileira de Clínica Terapêutica**, **25(1)**: 18-28, 1999.

COSTA, S.C.B.; MIRANDA, S.R.P.; ALVES, G.; ROSSI, C.L.; FIGUEIREDO, L.T.M.;
COSTA, F.F – Detection of Cytomegalovirus Infections by PCR in Renal Transplant Patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **32**: 953-959, 1999.

COSTA, S.C.B.; MIRANDA, S.R.P.; ALVES, G.; ROSSI, C.L.; FIGUEIREDO, L.T.M.;
COSTA, F.F – Donated organs as a source of Cytomegalovirus (CMV) in Renal Transplant Patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **27**: 2573-2578, 1994.

CRUMPACKER, C.S. – Ganciclovir. **The New England Journal of Medicine**, **335(10)**: 721-729, 1996.

DANKNER, W.N.; McCUTCHAN, J.A ; RICHMAN, D.D.; HIRATA, K.; SPECTOR, S.A -
Localization of Human Cytomegalovirus in peripheral blood leucocytes by in situ Hybridization. **The Journal of Infectious Diseases**, **161**: 31-36, 1990.

DEMMLER, G.J.; BUFFONE, G.J.; SHIMBOR, C.M.; MAY, R.A – Detection of Cytomegalovirus in urine from Newsborn by Using Polimerase chain reaction DNA Amplification. **The Journal of Infectious Disease**, **158**: 1177-1184, 1988.

DRAGO, F.; ARAGONE, M.G.; LUGANI, C.; REBORA, A. – Cytomegalovirus infection in normal and immunocompromised humans. **Dermatology**, **200**: 189-195, 2000.

DREW, W.L. – Herpesviridae: Cytomegalovirus. Laboratory Diagnosis Infectious Diseases (Principles and Practice), vol II, 247-260, 1988.

ECKART, P.; BROUARD, J.; LEGOFF, C.; FREYMUTH, F.; DUHAMEL, J.F.; RYCKELYNCK, J.P.; LIGNY, H. – Virological Diagnosis of Cytomegalovirus in Renal Transplantation: Comparison of three diagnostic methods: DNA in plasma by PCR, pp65 leucocytic Antigenemia, and viremia. **Transplantation Proceedings**, **28**: 2806-2807, 1996.

ECKART, P.; BROWARD, J.; VABRET, A.; FREYMUTH, F.; GUILLOT, M.; RYCKELYNCK, J.P.; LIGNY, B.H. – Detection of cytomegalovirus in renal transplantation Comparison of four diagnostic methods DNA in sera by Polimerase chain reaction (PCR), DNA in leukocytes by PCR, pp65 leukocytic Antigenemia and viremia **Transplantation Proceedings**, **29**: 2387-2389, 1997.

EHRNST, A. – The Clinical relevance of different laboratory test in CMV Diagnosis. **The Journal of Infectious Disease**, Suppl **100**: 64-71, 1996

EINSELE, H.; EHNINGER, G.; STEIDLE, M.; VALLBRACHT, A ; MÜLLER, M.; SCHIMDT, H.; SAAL, J.G.; WALLER, H.D.; MÜLLER, C.A. – Polimerase chain reaction to evaluate antiviral therapy for Cytomegalovirus disease. **Lancet**, **338(8776)**: 1170-1172, 1991.

FILHO, A.C.; MARCOPITO, L.F. – A interpretação dos testes diagnósticos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, **30**: 64-66, 1984.

FLECHNER, S.M.; AVERY, R.K.; FISHER, R.; MASTROIANI, B.; PAPAJOIC, D.; OMALLEY, K.J.; GOORMASTIC, M.; GOLDFARB, D.A. ; MODLIN, C.S.; NOVICK, A C. -Monitoring of CMV Infection after Renal Transplantation: Serology, Culture and Viral DNA Detection by Hybrid Capture. **Transplantation Proceedings**, **31**: 1255-1257, 1998.

FOX, J.D.; BRINK, N.S.; ZUCKERMAN, M.A.; NEILD, P.; GAZZARD, B.G.; TEDDER, R.S.; MILLER, R.F. – Detection of herpesvirus DNA by nested Polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid of Human Immunodeficiency virus- infected persons with neurologic disease A prospective evaluation. **The Journal of Infectious Diseases**, **172**: 1087-1090, 1995.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

FREISE, C.E.; PONS, V.; LAKE, J.; BURKE, E.; ASCHER, N.L.; ROBERTS, J.P. – Comparison of three regimens for Cytomegalovirus prophylaxis in 147 Liver Transplant recipients. **Transplantation Proceedings**, **23**: 1498-1500, 1991.

FREYMUTH, F. GEMMETAY, E. PETITJEAN, J. EUGENE, G. LIGNY, B.H. RYCKELINCK, J.P. LEGOFF, C. HAZERA, P.; BAZIN, C. – Comparison of nested PCR for Detection of DNA in plasma with pp65 leukocytic Antigenemia procedure for diagnosis of human Cytomegalovirus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, **32**: 1614-1618, 1994.

GERDES, J.C.; SPEES, E.K.; FITTING, K.; HIRACKI, J.; SHEEHAN, M.; DUDA, D.; JARVI, T.; ROEHL, C.; ROBERTSON, A.D. – Prospective study utilizing a Quantitative Polymerase chain reaction for Detection of Cytomegalovirus DNA in the blood of Renal Transplant patients. **Transplantation Proceedings**, **25**: 1411-1413, 1993.

GERNA, G.; FURIONE, M.; BALDANTI, F.; SARASINI, A. - Comparative Quantitation of Human Cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of Transplant and AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**, **32**: 2709-2717, 1994.

U N I V E R S I T A D E
B I B L I O T E C A C E N T R A L
S E C Ç Ã O C I R C U L A N T E

GERNA, G.; ZAVATTONI, M.; PERCIVALLE, E.; GROSSI, P.; TOSELLINI, M.; REVELLO, M.G. – Rising levels of Human Cytomegalovirus (HCMV) Antigenemia during initial antiviral treatment of solid-organ Transplant recipients with primary HCMV infection. **Journal of Clinical Microbiology**, 36: 1113-1116, 1998.

GERNA, G.; ZAVATTONI, M.; PERCIVALE, E.; ZELLA, D.; TORSSELLINI, M. & REVELLO, M.G. – Diagnosis of Human Cytomegalovirus infections in the Immuno Compromised host. **Clinical Diagnos Virology**, 5: 181-186, 1996.

GERNA, G.; ZIPETO, D.; PAREA, M.; REVELLO, M.G.; SILINI, E.; PERCIVALLE, E.; ZAVATTONI, M.; GROSSI, P.; MILANESI, G. – Monitoring of Human Cytomegalovirus infections and Ganciclovir treatment in Heart Transplant recipients by Determination of viremia, Antigenemia an DNAemia. **The Journal of Infectious Diseases**; 164: 488-498. 1991.

GOODRICH, J.M.; BOWDEN, R.A. ; FISHER, L.; KELLER C.; SCHOCH, G.; MEYERS, J.D. – Ganciclovir Prophylaxis to Prevent Cytomegalovirus disease after Allogeneic Marrow transplant. **Annals of Internal Medicine**, 118: 173-178, 1993.

GOODRICH, J.M.; MORI, M.; GLEAVES, C.A ; MOND, C.D.; GAYS, M.; EBELING, D.F.;
BUHLES, W.C.; DEARMOND, B. AND MEYERS, J.D. – Early treatment with
Ganciclovir to Prevent Cytomegalovirus disease after Allogeneic Bone Marrow
transplantation. Ganciclovir. **The New England Journal of Medicine**, **325**(23): 1601-
1607, 1991.

GOOSSENS, V.J.; BLOCK, M.J.; CHRISTIAANS, M.H.L.; SILLEKENS, P.; MIDDELDORP,
J.M.; BRUGGEMAN, C.A. – Early Detection of Cytomegalovirus in Renal Transplant
recipients: Comparison of PCR, NASBA, pp65 Antigenemia and Viral culture.
Transplantation Proceedings, **32**: 155-158, 2000.

HEBART, H.; MÜLLER, C.; LÖFFLER, J.; JAHN, G.; EINSELE, H. – Monitoring of CMV
Infection: a Comparison of PCR from whole blood, plasma-PCR, pp65-Antigenemia
and virus culture in Patients after Bone Marrow Transplantation. **Bone Marrow
Transplantation**, **17**: 861-868, 1996.

HIBBERD, P.L. & SNYDMAN, D.R. - Cytomegalovirus Infection in Organ Transplant
recipients. **Infectious Disease Clinics North America**, **9 (4)**: 863-877, 1995.

HIBBERD, P.L.; TOLKOFF-RUBIN, N.E.; COSIMI, A.B. – Syntomatic Cytomegalovirus
Disease in the Cytomegalovirus antibody seropositive Renal Transplant Recipient
treated with OKT3. **Transplantation**, **53**: 68-72, 1992

HO, M. - Cytomegalovirus: Biology and Infection. 2 ed., New York, Plenum Publishing Corporation. 1440, 1991.

HO, M.; MANDELL, G.L.; DOUGLAS JR, R.G.; BENNET, J.E. - Principles and Practice of Infectious Disease. 3 ed. New York Churchill Livingstone, 1159-1172, 1990.

HOCKEBERG, I.; ERIKSSON, B.M.; SWEYGBERG-WIRGART, B.; TUFVESSON, G. OLDING-STEINKVISTE, S.; GRILLNER, L. – Diagnostic markers and risk factors of Cytomegalovirus infection and disease in Renal Allograft recipients. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, **27**: 435-440, 1995.

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

KUHN, J.E.; WENDLAND, T.; SCHAFER, P.; MOHRING, K.; WIELAND, U.; ELGAS, M.; and EGGERS, H.J. – Monitoring of Renal Allograft recipients by Quantitation of Human Cytomegalovirus genomes in peripheral blood leukocytes. **The Journal of Medical Virology**, **44**: 398-400, 1994.

- LANDRY, M. & FERGUSON, D. – Comparison of Quantitative Cytomegalovirus Antigenemia Assay with Culture Methods and Correlation with Clinical Disease. **Journal of Clinical Microbiology**, **31**: 2851-2856, 1993.
- LEE, P.C.& HALSWORTH, P. – Rapid viral Diagnosis in perspective **British Medical Journal** **300**: 1413-1418, 1990.
- LJUNGMAN, P. – Cytomegalovirus Infections in Transplant Patients. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, Suppl **100**: 59-63, 1996.
- LJUNGMAN, P. & PLOTKIN, A. – Workshop on CMV Disease; Definitions, Clinical Severity Scores, and New Syndromes. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, Suppl **99**: 87-89, 1995.
- LOWANCE, D.; NEUMAYER, H.H.; LEGENDRE, C.M.; SQUIFFLET, J.P.; KOVARICK, J.; BRENNAN, P.J.; NORMAN, D.; MENDEZ, R.; KEATING, M.R.; COGGON, G.L.; CRISP, A.; LEE, I.C. – Valacyclovir for the prevention of Cytomegalovirus disease after Renal Transplantation. **The New England Journal of Medicine**, **340**: 1462-1470, 1999.

LUTZ, E.; WARD, K.N. & GRAY, J.J. – Maturation of antibody Avidity after primary Human Cytomegalovirus Infection is delayed in immunosuppressed solid organ Transplant Patients. **Transplantation**, **44**: 3170-322, 1995.

MAYA, T.C. & AZULAY, D.R. – Infecção pelo Citomegalovírus. In: LUPI, O; SILVA, A S.; PEREIRA JR, A C. – **Herpes – Clínica, Diagnóstico e Tratamento**, 1ª edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda. Cap. 8, p. 135-156, 2000.

MERIGAN, T.C.; RENLUND, D.G.; BRISTOW, M.R.; STARNES, V.O.; CONNELL, J.B.; RESTA, S.; DUNN, D.; GAMBERG, P.; RATKOVEC, R.M. – A Controlled trial of Ganciclovir to Prevent Cytomegalovirus disease after Heart Transplantation. Ganciclovir. **The New England Journal of Medicine**, **326**: 1182-1186, 1992.

MERIGAN, T.C. & RESTA, S. – Cytomegalovirus: Where have we been and where are we going?. **Rev. Infectious Disease**, **12**(suppl 7): S693-700, 1990.

MEYER-KÖNIG, V.; SERV A.; vonLAER, D.; NEUMANN, H.; HAEFELIN, D. and HUFEST, F.T. – Human Cytomegalovirus immediate early and late transcript in peripheral blood leukocytes Diagnostic value in Renal Transplant recipients **The Journal of Infectious Diseases**, **171**: 705-709, 1995.

- MEYERS, J.D.; LJUNGMAN, P.; FISHER, L.D. – Cytomegalovirus excretion as a Predictor of Cytomegalovirus Disease after Marrow Transplantation: Importance of Cytomegalovirus viremia. *The Journal of Infectious Diseases*, **162**: 373-380, 1990.
- MURRAY, B.M. – Manegement of Cytomegalovirus Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *Immunological Investigations*, **26**: 243-255, 1997.
- MUSTAFA, M.M. – Cytomegalovirus Infection and Disease in the Immunocompromised Host. *The Pediatric Infectious Diseases Journal*, **13**: 249-259, 1994.
- MYERS, J.B. & AMSTERDAM, D. The Laboratory Diagnosis of Cytomegalovirus Infections. *Immunological Investigations*, **26(3)**: 383-394, 1997.
- NAIMARK, D.M.J. & COLE, E. – Determinants of long-term Renal Allograft Survival. *Transplantation Review*, **8**: 93, 1994.
- NICHOLS, W.G. & BOECKH, M. – Cytomegalovirus *Journal of Clinical Virology*, **16**: 25-40, 2000.

- NIUBO, J.; PEREZ, J.L.; MARTINEZ-LACASA, J.T.; GARCIA, A ; ROCA, J.; FABREGAT, J.; GIL-VERNET, S.; MARTIN, R. – Association of Quantitative Cytomegalovirus Antigenemia whit Syntomatic Infection in Solid Organ Transplant Patients. **Diagnosis Microbiology Infectious Disease**, **24**: 19-24, 1996.
- NOLTE, F.S.; EMMENS,R.K.; THURMOND,C.; MITCHELL, P.S.; PASCUZZI, C.; DEVINE, S.M.; SARAL,R.; WINGARD, J.R. – Early Detection of Human Cytomegalovirus viremia in Bone Marrow Transplant Recipients by DNA Amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**: 1263-1266, 1995.
- PATEL, R. & PAYA, C.V. – Infections in Solid Organ Transplant recipients **Clinical Microbiology Review**, **10**: 86-124, 1997.
- PELLEGRIN, I.; GARRIGUE, I.; EKOUEVI, D.; COUZI, L.; MERVILLE, P.; MEREL, P.; CHENE, G.; SCHRIVE, M.H.; TRIMOULET,P.; LAFON, M.E.; FLEURY, H. – New Molecular Assays to predict occurrence of Cytomegalovirus Disease in Renal Transplant Recipients, **The Journal of Infectious Diseases**, **182**: 36-42, 2000.
- PLACHTER, B.; SINGZER, C.; JAHN, G. – Cell Types Involved in Replication and Distribution of Human Cytomegalovirus. **Advances in Virus Research**, **46**: 195-261, 1996.

PORTELA, D.; PATEL, R.; LARSON-KELLER, J.J.; ILSTRUP, D.M.; WIESNER, R.H.; STEERS, J.L.; KROM, R.A. PAYA, C.V. – OKT3 treatment for allograft rejection is a risk factor for cytomegalovirus disease in liver transplantation. **The Journal of Infectious Diseases**, **171**: 1014-1018, 1995.

PORTER-JORDAN, K.; ROSEMBERG, E.I.; KEISER, J.F.; GROSS, J.D.; ROSS, A.M.; NASSIM, S.; GARRET, C.T. – Nested Polimerase chain reation assay for the Detection of Cytomegalovirus overcomes false-positive caused by contamination with fragmented DNA. **The Journal of Medical Virology**, **30**: 85091, 1990.

POUTEIL-NOBLE, C. ; ECHOCHARD, R.; LANDRIVON, G.; DONIAMAGED, A; TARD, J.C.; BOSSHARD, S.; COLON, S.; BETUEL, H.; AYMARD, M. & TOURAINE, J.L. - Cytomegalovirus Infection in Etiological Factor for Rejection. **Transplantation**, **55(4)**: 851-857, 1993.

ROWLEY, A.H.; WOLINSC, S.M.; SAMBOL, S.P.; BARCKHOLT, A.E.S.; ANDERSON, J.P. – Rapid detection of cytomegalovirus DNA and RNA in blood of renal Transplant patients by in situ Amplification **Transplantation**, **51**: 1028-1033, 1991.

RUBIN, R.H. - Infections disease complications of Renal Transplantation. **Kidney International**, **44**: 221-236, 1993.

RUBIN, R.H. – Introduction to the Symposium. **Reviews of Infectious Disease**, 12(suppl) 691-692, 1990.

RUBIN, R.H. & COLVIN, R.B. – Effects of antithymocyte globulin on Cytomegalovirus Infection in Renal Transplant recipients **Transplantation**, 31: 143-145, 1981.

SAGEDAL S.; NORDAL, K.P.; HARTMANN, A.; DEGRE, M.; HOLTER, E.; FOSS, A.; LEIVESTAD, T.; FAUCHALD, P.; ROLLAG, H. – A Prospective study of the Natural Course of Cytomegalovirus Infection and Disease in Renal Allograft recipients. **Transplantation**, 70: 1166-1174, 2000.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. – Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-491, 1988.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. – Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, 230: 1350-1354, 1985.

SANTOS, R.L.S.; QUADROS, K.R.S.; FILHO, G.A. – Transplante Renal e Citomegalovirus. In JENNER, C – **Atualidades de Nefrologia** ed. Sarvier 6: 369-372, 2000.

SCHIMIDT, G.M.; HORACK, D.A ; NILAND, J.C.; DUNCAN, S.R.; FORMAN, J.F. & ZAIA, J.A – A randomized controlled trial of prophylatic ganciclovir for Cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplant. Ganciclovir. **The New England Journal of Medicine**, **324(15)**: 1005-1011, 1991.

SCHROEDER, R.; MESKO, J.; SANTOS, E.; KEITEL, E.; BITTAR, A ; GARCIA, V.; NEUMANN, J. – Cytomegalovirus Antigenemia and Renal Function Post-Kidney-Transplantation. **Transplantation Proceedings**, **31**: 3027-3028, 1999.

SCHULMAN, L.L.; REISON, D.S.; AUSTIN, J.H.M.; ROSE, E.A. – Cytomegalovirus pneumonitis after Cardiac Transplantation. *Archives Intern Med*, **151**: 1118-1124, 1991.

SEGOND, M.; MOURAD, G.; BOUMZEBRA, A.; MONTES, B.; LERAY, H. – Comparison of Viral Culture, pp-65 Antigenemia, and Polymerase chain reaction for the Detection of Cytomegalovirus in blood specimens from Renal Transplant recipients. **Transplantation Proceedings**, **28(5)**: 2810, 1996.

SHARMA, A.K.; TAYLOR, J.D.; TONG, W.; BROWN, M.W.; SELLS, R.A.; BAKRAN, A. – Utility of the pp65 Direct Antigenemia Test in the Diagnosis of Cytomegalovirus (CMV) in Renal Transplant Recipients. **Transplantation Proceedings**, **29**: 799, 1997.

- SHIBATA, D.; MARTIN, W.J.; APPLEMAN, M.D.; CAUSEY, D.M.; LEEDOM, J.M.; ARNHEIM, N. – Detection of Cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood of Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, **158**: 1185-1192, 1988.
- SILVA, A G. – Propriedades Gerais dos Herpesvírus. In: LUPI, A ; SILVA A S.; PEREIRA JR, A C. – **Herpes Clínica, Diagnóstico e Tratamento**, 1º edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda, cap. 1, p. 1-13, 2000.
- SMITH, I.L.; CHERRINGTON, J.M.; JILES, R.E.; FULLER, W.R.; FREEMAN, W.R.; SPECTOR, S.A – High-level resistance of Cytomegalovirus to Ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA Polymerase genes. **The Journal of Infectious Diseases**, **176**: 69-77, 1997.
- STINSK, M.F. – Cytomegalovirus and Its Replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. – **Virology**, 2 ed., New York, Raven Press Ltda, p. 1959-1980,1990.
- SUASSUNA, J.H.R.; LEITE, L.L.; VILELA, L.H. - Prevalence of cytomegalovirus infection in different patient groups of an urban university in Brazil **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **28**: 105-108, 1995.

SUASSUNA, J.H.R. & MACHADO, R.D. – Diagnósticos das Infecções por Citomegalovirus (CMV) em Pacientes com Deficiência Imunológica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, **38**: 33-47, 1992.

SUMIMOTO, R.; FUKUDA, Y.; NAKAYAMA, T.; HOSSHINO, S.; TAKAHASHI, M.; MARUBAYASHI, S.; ASAHARA, T. – Examination of a nested polymerase chain reaction assay using polymorphic neutrophils for cytomegalovirus infection after kidney transplantation. **Transplantation Proceedings**, **30**: 3146-3148, 1998.

TANABE, K.; TAKAHASHI, K.; KOIAMA, I.; SONDA, K.; FUCHNOUE, S.; KAWAY, T.; TOKUMOTO, T.; KOGA, S.; NAITO, T.; YAGISAWA, T.; TOMA, H.; OTA, K.; NAKAJIMA, H. – Early diagnosis of CMV Syndrome after kidney transplantation Comparisson between CMV Antigenemia and PCR assay. **Transplantation Proceedings**, **28**: 1508-1510, 1996.

TANABE, K.; TOKUMOTO, T.; ISHIKAWA, N.; KAYAMA, I.; TAKAHASH, K.; FUCHNOUE, S.; KAWAI, T.; KOGA, S.; YAGISAWA, T.; TOMA, H.; OTA, K.; NAKAYAMA, H. – Comparative study of Cytomegalovirus (CMV) Antigenemia assay , Polimerase chain reaction, Serology and Shell Vial assay in the early Diagnosis and Monitoring of CMV infection after Renal Transplantation. **Transplantation**, **64(12)**: 1725, 1997.

THE, T.H.; van der BIJ, W.; van der BERG, A P.; van der GESSEN, M.; WEITS, J.; SPRENGER, H.G.; van SON, W. – Cytomegalovirus Antigenemia. **Review Infectious Disease**, **12 (supll 7)**: 737-744, 1990.

THE, T.H.; van der PLOEG, M.; van der BERG, A P.; VLIEGER, A M.; van der Giessen, M.; van SON, W.J. – Direct Detection of Cytomegalovirus in peripheral blood leucocytes. A Review of Antigenemia assay and Polimerase chain reaction. **Transplantation**, **54**: 193-198,1992.

van der BIJ, W.; TORENSMA, R.; van SON, W.J.; SCHIRM, J.; TEGZESS, A M.; THE, T.H. – Rapid Immunodiagnosis of active Cytomegalovirus infection by Monoclonal Antibody staining of blood leucocytes. **The Journal of Medical Virology**, **25**: 179-188, 1988.

van DORP, W.T.; VLIEGER, A.; JIWA, N.M.; van ES, L.A.; van der PLOEG, M.; van SAASE, J.L.C.M. and van der WOUDE, F.J. – The Polimerase chain reaction , A sensitive and Rapid technique for Detecting Cytomegalovirus Infection after Renal Transplantation. **Transplantation**, **54**: 661-664, 1992.

VLIEGER, A M.; BOLAND, G.J.; JIWA, N.M.; WEGER, R.A ; WILLENZE, R.; de GAST, G.C.; FALKENBURG, J.H. – Cytomegalovirus Antigenemia Assay or PCR can be used to Monitor Ganciclovir Treatment in Bone Marrow Transplant Recipients. **Bone Marrow Transplantation**, **9**: 247 – 253, 1992.

XU, W.; SUNDQVIST, V.A.; BRYTTING, M. and LINDE, A. – Diagnosis of Cytomegalovirus Infections using Polymerase chain reaction, virus isolation and serology. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, **25**: 311-316, 1993.

WINSTON, D.J.; HO, W.G.; LIN, C.H.; BARTONI, K.; BUDINGER, M.D.; GALE, R.P.; CHAMPLIN, R.E. – Intravenous Immune Globulin for Prevention of Cytomegalovirus Infection and Interstitial Pneumonia after Bone Marrow Transplantation, **Annals International Medicine**, **106**: 12-18, 1993.

WOO YANG, C.; OK KIM, Y.; SOO KIM, Y.; YONG KIM, S.; SUNG MOON, I.; JONG, A.H.N.; BOK KOH, Y.; KEE BANG, B. – Clinical course of Cytomegalovirus (CMV) viremia with and without ganciclovir treatment in CMV-seropositive Kidney Transplant recipients. **American Journal Nephrology**, 1998.

APÊNDICE

9. APÊNDICE

Apêndice1. Consentimento pós-informação

Eu, _____,

R.G. _____, aceito colaborar com um estudo que será realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), para pesquisa do Citomegalovírus, por três diferentes métodos de diagnósticos. Para isso, sei que colherão 4 a 8mL do meu sangue, uma vez por semana no primeiro mês, e quinzenais nos cinco meses posteriores após a cirurgia, para a realização dos referidos exames. Estou ciente de que poderei desistir de participar deste estudo a qualquer hora, e que isto nada irá prejudicar meu tratamento, e a minha colaboração em muito auxiliará o tratamento de pacientes transplantados renais que vierem a ser também transplantados. Sei também que esses dados possuem caráter sigiloso, e que meu nome não sairá em nenhuma publicação.

Campinas, ____ de _____ de 199__.

Paciente : _____

Médico : _____

Apêndice 2. Características dos doadores, quanto ao parentesco (doadores vivos), sexo, idade, compatibilidade HLA e sorologia anti-HCMV IgM e IgG.

Número	Parentesco	Sexo	Idade (anos)	HLA	IgM/IgG
1	IRMÃ	F	34	II	-/+
2*	#	M	42	-	-/+
3	IRMÃO	M	36	II	-/+
4	IRMÃO	M	30	I	-/-
5*	#	F	37	-	-/+
6*	#	M	35	-	-/+
7*	#	M	29	-	-/+
8	PAI	M	52	II	-/+
9	#	M	30	-	?
10	IRMÃO	M	28	I	-/+
11	MÃE	F	44	II	-/+
12*	#	F	26	-	-/+
13	#	M	29	-	-/+
14	IRMÃO	M	27	I	-/-
15	IRMÃO	M	26	II	-/+
16*	#	F	32	-	-/+
17*	#	M	41	-	-/+

18	#	M	25		?
19	PAI	M	49	II	-/+
20	IRMÃ	F	33	II	-/+
21	PRIMO	M	38	II	-/+
22*	#	F	38	-	?
23	IRMÃO	M	35	II	-/+
24*	#	F	29	-	?
25	IRMÃO	M	40	I	-/+
26	IRMÃO	M	34	II	-/-
27*	#	M	23	-	?
28*	#	F	41	-	?
29*	#	M	43	-	-/+
30	IRMÃO	M	35	I	-/+
31*	#	M	48	-	-/+
32*	#	M	42	-	?
33*	#	M	25	-	-/+

– Doador cadáver; * - cadáveres que doaram os dois rins; M masculino/ F feminino, ? sorologia indeterminada.

Apêndice 3. Características gerais dos receptores, quanto ao dia em que foi realizado o transplante, sexo, idade, doença de base que levou a Insuficiência Renal Crônica e a sorologia anti-HCMV IgM e IgG.

RECEPTOR	Dia do transplante	SEXO	IDADE (anos)	DOENÇA DE BASE (IRC)	IgM/IgG
1. SVO	08/06/99	M	33	GNC	-/+
2. MLS	26/06/99	F	41	I	-/+
3. EBR	26/06/99	M	27	S.ALPORT	-/+
4. JMP	13/07/99	F	36	GNC	-/-
5. HAS	03/08/99	F	29	GNC	-/+
6. HAR	07/08/99	M	55	GNC	-/+
7. AMP	07/08/99	M	52	GNC	-/+
8. VE	11/08/99	M	37	I	-/+
9. FD	11/08/99	M	53	HAS	-/+
10. GRS	22/08/99	M	43	I	-/+
11. SPO	22/08/99	F	29	GNM	-/+
12. JFA	26/08/99	F	29	I	-/+
13. PDC	15/09/99	M	32	I	-/+
14. SFM	14/09/99	M	24	I	-/+
15. FMG	21/09/99	M	16	S. ALPORT	-/-
16. REL	25/09/99	M	22	I	-/+

17. FR	25/09/99	M	59	I	-/-
18. JAG	29/09/99	M	47	GNC	-/-
19. VBS	19/10/99	F	23	I	-/+
20. LLS	16/10/99	F	28	GNC	-/-
21. OS	04/11/99	M	51	I	-/+
22. AP	04/11/99	M	51	I	-/+
23. CDR	23/11/99	M	33	I	-/+
24. PLC	23/11/99	M	34	I	-/+
25. MNS	05/11/99	F	32	I	-/+
26. VLR	14/12/99	M	37	GNC	-/+
27. SAS	04/01/00	F	35	I	-/+
28. MLC	30/11/99	F	36	I	-/+
29. AA	12/01/00	M	46	I	-/+
30. MSO	12/01/00	F	42	RP	-/+
31. LLR	07/12/99	M	24	I	-/+
32. CDA	08/02/00	M	45	PNC	-/+

UNITA 2
 JARINCO AD310 JAR
 SECAL JACQUANT

33. IMM	08/02/00	F	39	HAS	-/+
34. AFSR	15/02/00	F	44	I	-/+
35. JGC	23/02/00	F	32	I	-/+
36. CLS	25/02/00	M	32	I	-/+
37. APL	25/02/00	M	54	GNC	+/+
38. MGO	16/03/00	F	43	I	-/+
39. JBG	16/03/00	M	38	I	-/+
40. VRS	30/03/00	M	40	I	-/+
41. MSS	30/03/00	F	60	I	-/+
42. MAS	29/03/00	F	28	I	-/+
43. ARV	07/04/00	M	42	I	-/+
44. TT	07/04/00	F	55	PNC	-/+
45. LACS	17/04/00	F	32	PNC	-/+
46. GA	17/04/00	M	29	RP	-/+
47. MRDS	28/04/00	F	36	GNC	-/+
48. AAB	28/04/00	M	39	GNC	-/+

IRC – Insuficiência renal crônica

PNC – Pielonefrite crônica

GNC – Glomerulonefrite crônica

I - indeterminada

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

RP – Rins policísticos

M masculino/ F feminino