

RENATA MARIA BORGES PERES

**DETECÇÃO E MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA PELO
CITOMEGALOVÍRUS HUMANO (HCMV) PELAS TÉCNICAS DE
ANTIGENEMIA, NESTED-PCR E REAL-TIME PCR EM PACIENTES
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOÉTICAS**

CAMPINAS

Unicamp

2009

RENATA MARIA BORGES PERES

**DETECÇÃO E MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA PELO
CITOMEGALOVÍRUS HUMANO (HCMV) PELAS TÉCNICAS DE
ANTIGENEMIA, NESTED-PCR E REAL-TIME PCR EM PACIENTES
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOÉTICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médica da Universidade Estadual
de Campinas, para a Obtenção do título de Mestre em
Clínica Médica, Área de Concentração Ciências Básicas.

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

CAMPINAS

Unicamp

2009

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P415d Peres, Renata Maria Borges
Detecção e monitorização da infecção ativa pelo citomegalovírus humano (HCMV) pelas técnicas de antigenemia, Nested-PCR e Real – time PCR em pacientes submetidos a transplante alogênico de células tronco hematopoéticas / Renata Maria Borges Peres. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

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

1. Citomegalovírus humano. 2. Transplante de células-tronco hematopoéticas. 3. Reação em cadeia de polimerase. I. Costa, Sandra Cecília Botelho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : “Detection and monitoring of active human cytomegalovirus infection (HCMV) by antigenemia, Nested-PCR and Real-time PCR assays in allogenic hematopoietic stem cell transplantation patients”

Keywords: • Human cytomegalovirus
• Hematopoietic stem cell transplantation
• Polymerase chain reaction

Titulação: Mestre em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa
Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos
Profa. Dra. Gláucia Elisabete Barbosa Marcon

Data da defesa: 21-08-2009

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Renata Maria Borges Peres

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sandra Cecilia Botelho Costa

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Sandra Cecilia Botelho Costa

Sandra Costa

2. Prof^a. Dr^a. Gláucia Elisabete Barbosa Marcon

Gláucia

3. Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos

marcel

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21/08/2009

Aos meus pais Fernando e Lúcia pela dedicação ao longo de toda minha vida e pelo imenso amor, respeito e exemplo que sempre me deram. Sempre levarei comigo o que aprendi com vocês: “A medida do homem é a medida do seu coração”...

Aos meus avós Waldir (in memoriam) e Olézia, Valdenil e Daura pelo amor incondicional que sempre me deram. Vocês são maravilhosos!

As minhas irmãs Mariana e Rafaela por tudo o que aprendemos juntas... Às vezes aprendi, às vezes ensinei, mas no final todas nós ganhamos. Vocês são presentes que Deus pôs em minha vida. Sei que nunca estarei sozinha!

Ao meu namorado Gilberto por ser um exemplo de persistência e por ser um grande companheiro. Obrigada por existir e por ocupar este lugar tão importante em minha vida. Com você aprendi que “a felicidade não se resume na ausência de problemas, mas sim na sua capacidade de lidar com eles”...

Ao meu sobrinho João Pedro por ter tornado minha vida muito mais especial. Você é um anjinho que Deus enviou para nós!

Obrigada por serem tão presente em minha vida. Amo muito todos vocês!

Em especial a Prof^a. Dr^a. Sandra Cecília Botelho Costa pela oportunidade, confiança, ensinamentos, atenção, amizade e dedicação ao longo deste período.

Ao Dr. Cármino Antonio de Souza, Dr. Afonso Celso Vigorito e Dr. Francisco José Penteado Aranha pelo respeito profissional e confiança neste trabalho.

A equipe de enfermagem do ambulatório de TMO (Márcia, Fernanda e Larissa) pelo companheirismo, amizade, e apoio durante todo este tempo.

A equipe de enfermagem da enfermaria de TMO pelas coletas realizadas.

Aos pacientes incluídos neste trabalho, não só pela participação no mesmo, mas sim pelo exemplo de vida e superação.

A Paula Durante Andrade pelo convívio, respeito, amizade e por poder contar com você sempre, até mesmo durante suas férias. Obrigada pela ajuda com projeto, formulários, artigos, tese e etc.

A Sandra Helena Alves Bonon por se fazer sempre presente. Obrigada por ser tão prestativa, amiga e por dividir comigo um pouco de sua experiência profissional e pessoal.

A Cláudia Raquel Cantarelli Costa, por se tornar muito mais que amiga, um exemplo de profissional, competência, e de ser humano. Sua sabedoria, humildade, discrição e alegria contagiavam todos que estão a sua volta. Obrigada por tudo o que você fez por mim.

A Angélica Martins Batista e Emanuel Borges Vitor Anjos pela amizade desde o começo do curso. No início troca de experiências, aulas, relatórios, congressos, até chegar a tão esperada qualificação e defesa de tese. E enfrentamos juntos, todas essas fases.

Agradeço a vocês por permitirem que aquela convivência inicial se tornasse essa grande amizade.

A Cristiane de Oliveira pela dedicação ao trabalho e pela amizade que sempre tivemos, tanto em momentos alegres, quanto em momentos difíceis. Muito obrigada pelo incentivo de sempre.

A Tycha Bianca Sabaini Pavan pela amizade, confiança, pelos “quebra-galhos”, conversas e gargalhadas.

A Camila de Aguiar pelo convívio, respeito e amizade.

A Débora de Campos Dieamant pelas trocas de experiências ao longo deste período.

Aos amigos de laboratório Suzana, Inah, Ketty, Michelli e Fernanda pela convivência e ajuda ao longo da realização deste trabalho.

Ao Roberto Zulli pela ajuda com as análises dos resultados e pela compreensão dos curtos prazos.

Agradeço a todos vocês por tudo o que fizeram por mim e para a concretização deste trabalho!

Considerações sobre o tempo...

*Cinco segundos caminhando na praia é pouco.
Cinco segundos caminhando sobre brasas é muito.
Cinco minutos para quem precisa dormir é pouco.
Cinco minutos para quem precisa acordar é muito.*

*Um fim de semana de sol é pouco.
Um fim de semana de chuva é muito.*

*Um mês de férias é pouco.
Um mês sem descanso é muito.
Uma vida para quem doa é muito,
Mas uma vida para quem espera é tudo.*

*Tempo é vida!
Doe órgãos, doe vida!*

(Ministério da Saúde)

O citomegalovírus humano (HCMV) é um vírus cosmopolita pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae*. É amplamente disseminado na população, com soroprevalência entre 40 e 100%. Sua transmissão se dá através do contato direto com secreções contendo o vírus como: sêmen, secreção cervical, urina, saliva, leite materno, hemoderivados e também através de transplante de órgãos e tecidos. Durante a infecção primária o HCMV apresenta intensa replicação e em seguida estabelece um estágio de latência no hospedeiro. Periódicas reativações ocorrem em situações de estresse, imunossupressão, doenças auto-imunes e uso de quimioterápicos. O impacto desta infecção em receptores de Transplante de Células Tronco Hematopoéticas (TCTH) é grande podendo causar pneumonia intersticial, doença no trato gastrointestinal, hepatite, mielossupressão, retinite, nefrite, encefalite, atraso da pega medular, doença do enxerto contra hospedeiro, infecções por outros organismos oportunistas, aceleração da perda do enxerto e óbito. Por este motivo, é de suma importância o uso de técnicas laboratoriais, suficientemente sensíveis e específicas, capazes de fazer o diagnóstico precoce da infecção ativa pelo HCMV e estudos mais aprofundados sobre a real relação e correlação clínica que estas técnicas apresentam a fim de prevenir o aparecimento da doença pelo HCMV e demais complicações associadas ao HCMV. Neste estudo foram monitorizados semanalmente, 30 pacientes submetidos a TCTH do tipo alogênico desde o dia do transplante até o dia 150 pós-transplante pelas técnicas de antigenemia, Nested-PCR e Real-time PCR. O tratamento precoce com medicamento antiviral foi iniciado a partir dos seguintes resultados: ≥ 1 célula pp65 positiva/ 3×10^5 leucócitos e/ou 2 ou mais Nested-PCR positivas consecutivas. O cut-off da Real-time PCR para a infecção ativa pelo HCMV foi

padronizado neste estudo, sendo de 418,39 cópias virais/ 10^4 leucócitos periféricos. Vinte e sete pacientes (90%) apresentaram infecção ativa pelo HCMV, com maior incidência durante o segundo mês pós-TCTH. Destes 27 pacientes, 21 (77,78%) foram submetidos ao tratamento precoce com Ganciclovir, 18 (66,67%) apresentaram infecções oportunistas, 11 (40,74%) tiveram DECH aguda, 9 pacientes (33,33%) tiveram infecção ativa recorrente pelo HCMV, 5 (18,52%) tiveram rejeição crônica do enxerto, 2 (7,4%) desenvolveram doença pelo HCMV e 11 (40,47%) evoluíram a óbito, sendo 1 (3,7%) por doença por HCMV associado a DECH aguda e infecção bacteriana. O teste mais precoce para o diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV foi a Nested-PCR com mediana de 33 dias pós-TCTH, seguido pela Real-time PCR e antigenemia, ambas com mediana de 40 dias pós-TCTH. A Real-time PCR foi o teste mais sensível (S=92,3%) e que apresentou melhor valor preditivo negativo (VPN=85,71%) para o diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV. Já a antigenemia foi o teste mais específico (E=77,77%) e que apresentou melhor valor preditivo positivo (VPP=84,61%) para este diagnóstico. Os testes utilizados no estudo foram eficazes no monitoramento da infecção ativa pelo HCMV, pois somente 2 (7,4%) dos 27 pacientes que apresentaram infecção ativa pelo HCMV desenvolveram doença por HCMV.

Human cytomegalovirus (HCMV) is a member of the *Herpesviridae* family and *Betaherpesvirinae* subfamily. HCMV is distributed worldwide, with prevalence of HCMV-positive antibodies of 40% to 100%. Transmission occurs during close personal contact with secretions of infected persons such as: semen, cervical secretions, urine, saliva, breast milk, blood products and transplanted organs and hematopoietic stem cell. During primary infection occurs intense replication followed by latent infection in host. Periodic reactivations occur in stress situations, immunosuppression, autoimmune diseases and use of chemotherapy. The impact of HCMV infection on recipients HSCT is large and can cause pneumonitis, gastrointestinal diseases, hepatitis, marrowsuppression, retinitis, nephritis, encephalitis, delay of bone marrow engraftment, severe acute graft-versus host disease (GVHD), opportunistic infections, chronic rejection and death. For this reason it is extremely important the use of sensitive and specific methods for early diagnostic of active HCMV infection and deeper studies about the real clinical relation and correlation these techniques show in order to prevent the disease through HCMV and further complications connected to HCMV. In this study 30 patients recipients of allogenic HSCT were monitored at weekly intervals from D+0 to D+150 post-transplant by antigenemia, Nested-PCR and Real-time PCR. Antiviral preemptive therapy was initiated upon a result ≥ 1 positive *pp65* cell/ 3×10^5 of PML and/or two or more consecutive positive Nested-PCR. The optimal cut-off value by Real-time PCR for active HCMV infection was 418,39 copies/ 10^4 of PBL. Twenty seven (90%) patients had active HCMV infection, with the highest incidence occurring during the second month after HSCT. Twenty one (77,78%) of the 27 patients who had active HCMV infection received preemptive antiviral therapy with

Ganciclovir, 18 (66,67%) had opportunist infection, 11 (40,74%) had acute graft-versus host disease (GVHD), 9 (33,33%) had recurrence of HCMV infection, 5 (18,51%) had chronic rejection, 2 (7,4%) developed HCMV disease and 11 (40,47%) died, one (3,7%) by HCMV disease associated with GVHD and bacterial infection. The most precocious test for diagnostic of active HCMV was Nested-PCR after a median of 33 days after HSCT followed by Real-time PCR and antigenemia, both with a median of 40 days after HSCT. Real-time PCR was the most sensitive (Sensitive=92,3%) and with the best predictive negative value (PNV=85,71%) for diagnostic of active HCMV infection. Antigenemia was the most specific (Specific=77,77%) and with the best predictive positive value (PPV=84,61%) for this diagnostic. The three assays utilized in this study were effective in active HCMV infection surveillance because only 2 (7,4%) of 27 patients that had active HCMV infection had HCMV disease.

μl	Microlitro
μM	MicroMol
A	Base Nitrogenada Adenina
AD 169	Linhagem de HCMV isolada em laboratório
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALT	Alanina aminotransferase
BMT	Bone Marrow Transplant
C	Base Nitrogenada Citosina
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
Ct	Threshold Cycle
D	Doador
dATP	Desoxirribonucleotídeo Adenina Trifosfato
dCTP	Desoxirribonucleotídeo Citosina Trifosfato
DECH	Doença de Enxerto Contra Hospedeiro
dGTP	Desoxirribonucleotídeo Guanina Trifosfato
DGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DHPG	Dihidroxipropoximetil guanina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dTTP	Desoxirribonucleotídeo Timidina Trifosfato
E	Período de expressão gênica precoce
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA	Teste sorológico imunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
G	Base Nitrogenada Guanina
g/cm³	Gramas por centímetro cúbico
GCV	Ganciclovir
GVHD	Graft-Versus-Host Disease
HAART	Highly Active AntiRetroviral Treatment
HCMV	Citomegalovírus Humano
HHV 3	Herpes Humano tipo 3 ou Herpes Zoster
HHV 5	Herpes Humano tipo 5
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HSCT	Hematopoietic Stem Cell Transplant
i.v.	Intravenoso
IE	Período de expressão gênica imediatamente precoce
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IR_L/IR_S	Seqüências invertidas repetidas do genoma do HCMV
Kg	Kilograma
Kpb	Kilopares de base
L	Período de expressão gênica tardia
mg	Miligramas
mL	Mililitros

mM	Milimolar
mm³	Milímetro cúbico
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pb	Pares de base
PBL	Peripheral Blood Leukocytes
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pdf	Probability Density Function
pH	Potencial Hidrogênico
PML	Polymorphonuclear Leukocytes
PNV	Negative Predictive Value
pp65	Fosfoproteína 65
PPV	Positive Predictive Value
R	Receptor
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA_m	Ácido Ribonucléico mensageiro
ROC	Receiver operating characteristic
RT-PCR	Transcrição Reversa Acoplada a PCR
SNC	Sistema Nervoso Central
SOT	Solid Organ Transplan
SRE	Sistema Retículo Endotelial
T	Base Nitrogenada Timidina
TCTH	Transplante de Células Tronco Hematopoéticas

$\mathbf{TR_L/TR_S}$	Seqüências de terminações repetidas do genoma do HCMV
$\mathbf{U_L}$	Seqüência única longa do genoma do HCMV
$\mathbf{U_S}$	Seqüência única curta do genoma do HCMV

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1. Características do grupo estudado	94
Tabela 2. Ocorrência de infecção ativa pelo HCMV <i>vs.</i> Complicações associadas ao TCTH...	101
Tabela 3. Comparação entre Antigenemia, Nested-PCR e Real-time PCR	102
Tabela 4. Tabela de contingência utilizando a antigenemia <i>pp65</i> como padrão de referência ..	103
Tabela 5. Tempo de diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV pela Antigenemia, Nested-PCR e Real-time PCR	103

Figura 1. Primeiras ilustrações das células “olhos de coruja” semelhantes a protozoários, observadas em rins de um natimorto com sífilis congênita.....	49
Figura 2. Estrutura morfológica do citomegalovírus humano.....	50
Figura 3. Mecanismo de infecção do HCMV nas células do hospedeiro.....	52
Figura 4. Inclusão intranuclear citomegálica em tecido pulmonar.....	56
Figura 5. Retinite por HCMV.....	62
Figura 6. Estado sorológico Doador e Receptor associado ao risco de desenvolvimento da doença por HCMV	65
Figura 7. Aparência típica do citomegalovírus humano pela microscopia eletrônica.....	67
Figura 8. Aparência histológica post mortem de pneumonia intersticial causada pelo HCMV em um receptor de células tronco hematopoéticas	68
Figura 9. Efeito citopático local típico do HCMV visto em cultura de fibroblasto humano de pulmão de um embrião	69
Figura 10. Cultura com isolamento rápido, fixado e corado 16 horas após inoculação, mostrando proteínas virais no núcleo de fibroblastos humanos infectados.....	70
Figura 11. Detecção do antígeno <i>pp65</i> do HCMV em sangue periférico de um paciente submetido a transplante de células tronco hematopoéticas	71
Figura 12. Análise direta do fragmento amplificado (159 pb), após eletroforese em gel de agarose.....	73
Figura 13. Curva de amplificação do DNA do HCMV pela Real-time PCR (TaqMan).....	74

Quadro 1. Posologia do ganciclovir – Dose padrão para o tratamento de doença por HCMV	80
Quadro 2. Posologia do ganciclovir – Dose padrão para o tratamento de infecção ativa pelo HCMV	80
Quadro 3. Posologia do foscarnet – Dose padrão para o tratamento de doença por HCMV	81
Quadro 4. Posologia do valganciclovir – Dose padrão para o tratamento de doença por HCMV	82
Quadro 5. Posologia do valganciclovir – Dose padrão para prevenção da doença por HCMV em transplante de órgãos	82
Quadro 6. Posologia do cidofovir – Dose padrão para o tratamento do HCMV	83

Gráfico 1. Curva ROC para valores ≥ 1 célula <i>pp65</i> positiva/200000 leucócitos para estabelecer o melhor valor de cut-off para a Real-time PCR	100
Gráfico 2. Gráfico de densidade de probabilidade da infecção ativa pelo HCMV durante os primeiros 150 dias pós-TCTH	101

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xv</i>
ABSTRACT	<i>xvii</i>
INTRODUÇÃO GERAL	41
1. Citomegalovírus Humano.....	43
2. Histórico do Citomegalovírus Humano.....	45
3. Estrutura Viral do Citomegalovírus Humano.....	49
4. Ciclo de Crescimento e Expressão Gênica do Citomegalovírus Humano.....	51
5. Epidemiologia da Infecção Ativa pelo Citomegalovírus Humano.....	54
6. Patogenia e Patologia do Citomegalovírus Humano	55
7. Manifestações Clínicas Associadas ao Citomegalovírus Humano.....	58
7.1 Síndrome da Mononucleose Infecciosa.....	58
7.2 Pneumonia Intersticial	59
7.3 Infecção no Trato Gastrointestinal	59
7.4 Hepatite.....	60
7.5 Infecção no Sistema Nervoso Central (SNC).....	61
7.6 Retinite	61
8. Manifestações Clínicas em Pacientes Submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoéticas	62
9. Diagnóstico do Citomegalovírus Humano	65
9.1 Detecção Viral	66
9.1.1 Microscopia Eletrônica.....	66

9.1.2 Exames Histopatológicos e Citotológicos	67
9.1.3 Isolamento Viral por Cultura Clássica.....	68
9.1.4 Técnica de “Shell vial” ou Cultura com Isolamento Rápido.....	69
9.1.5 Detecção do Antígeno <i>pp65</i> do HCMV em Sangue Periférico (Antigenemia).....	70
9.1.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	71
9.1.7 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real-time PCR)	73
9.1.8 Transcrição Reversa Acoplada a PCR (RT-PCR)	75
9.2 Detecção da Resposta Imunológica.....	75
9.2.1 Métodos Sorológicos	75
10. Prevenção da Infecção Ativa e Doença pelo Citomegalovírus Humano.....	76
10.1 Vacina contra o Citomegalovírus Humano	77
11. Estratégias de Tratamento	77
11.1 Profilaxia Universal.....	77
11.2 Terapia Precoce (Preemptive therapy)	78
12. Medicamentos Utilizados no Tratamento Antiviral	79
12.1 Ganciclovir	79
12.2 Foscarnet.....	80
12.3 Valganciclovir	81
12.4 Cidofovir.....	82
OBJETIVOS	85
CAPÍTULO I	89
CONCLUSÕES GERAIS	119

REFERÊNCIAS	123
ANEXOS	139

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

1. CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

O citomegalovírus humano (HCMV) é um vírus cosmopolita pertencente à família *Herpesviridae* e subfamília *Betaherpesvirinae* (1,2,3). É considerado o maior membro da família e possui ultra-estrutura semelhante à de outros herpesvírus, comprovada por microscopia eletrônica, sendo, por este motivo, também conhecido como Herpes Vírus Humano tipo 5 (HHV 5) (4,5,6). Essa classificação também é baseada nas propriedades biológicas de especificidade do hospedeiro, ciclo de replicação e efeitos citopáticos em geral (7). Os citomegalovírus têm sido isolados de muitos vertebrados diferentes, entre eles, camundongos, porquinhos-da-índia, macacos e o homem (8,9).

O HCMV possui como características morfológicas a presença de envelope, capsídeo e DNA linear com dupla-fita com 230 kilobases (3), o qual pode expressar mais de 70 genes, que produzem proteínas e enzimas que causam a destruição das células infectadas durante a infecção (4). O HCMV causa inclusões nucleares e edema nas células do hospedeiro, produzindo um aspecto conhecido como “olhos de coruja” (10). Está amplamente disseminado na população, tendo sua soroprevalência geral entre 40 e 100%. Populações mais pobres apresentam maior número de indivíduos HCMV soropositivos (3).

O HCMV é um vírus extremamente lábil a 37°C, é inativado a 56°C durante 30 minutos, pH baixo (<5), exposição ao éter 20% por 2 horas, luz ultravioleta por 5 minutos e ciclos de congelamento e descongelamento. É mais estável na urina a 4°C (6).

O HCMV é um vírus comum que pode causar infecções primárias e secundárias, tendo como único reservatório natural o organismo humano (3). A transmissão viral se dá pelo contato direto com secreções contendo o vírus como: sêmen, secreção cervical, urina, saliva, leite materno (1,5), hemoderivados ou por transplantes de órgãos e tecidos (11).

A infecção primária pelo HCMV ocorre geralmente na infância e como todos os herpesvírus, o HCMV possui a capacidade de latência e de reativação (1,2,12,13).

Durante a infecção primária o HCMV apresenta intensa replicação (11) e em seguida estabelece um estágio de latência em diversos grupos de células que asseguram a proteção do genoma viral no organismo do hospedeiro. As células mononucleares, linfócitos T, tecido endotelial vascular e glândulas são os prováveis sítios de latência (10,14). Periódicas reativações ocorrem em situações de estresse, imunossupressão, doenças auto-imunes e uso de quimioterápicos (12).

Em indivíduos imunocompetentes, geralmente, a infecção pelo HCMV passa despercebida ou tem uma leve manifestação de doença semelhante à síndrome da mononucleose infecciosa, caracterizada por quadro febril prolongado, astenia, sudorese e hepatoesplenomegalia, mal-estar, disfunções hepáticas e linfocitose atípica (6, 2,13, 15, 16).

Contudo, em pacientes imunossuprimidos, o HCMV é associado a uma significativa morbidade e mortalidade (1,2,17,18,19). Durante a fase virêmica, o HCMV pode acometer os pulmões, causando pneumonia intersticial, o fígado, causando hepatite e o trato gastrointestinal, com manifestações de dor abdominal e diarreia (10).

Constituem grupos de risco para a infecção ativa pelo HCMV: recém-nascidos com infecção congênita, portadores de HIV, transplantados de órgãos sólidos e de células tronco hematopoéticas (TCTH).

Em transplantes de órgãos e tecidos o maior determinante para a transmissão e desenvolvimento da infecção pelo HCMV é o estado sorológico do receptor e do doador. No TCTH outros fatores são levados em consideração como idade, presença de doença de enxerto contra hospedeiro, dose total de irradiação corpórea e regime de condicionamento (10). Em pacientes submetidos a TCTH os maiores danos estão associados a pneumonia intersticial, tendo como características febre, tosse não produtiva, dispnéia, hipoxia e diarreia. Em pacientes portadores do HIV pode causar cegueira, pneumonia, encefalites, mielites e morte. O vírus pode ser isolado em mais de 90% dos pacientes transplantados e profundamente imunossuprimidos (1).

Por este motivo o diagnóstico precoce da infecção ativa pelo HCMV é de suma importância para guiar estratégias preventivas (preemptive therapy) com uso de medicamentos antivirais, evitar o aparecimento da doença por HCMV e diminuir o seu impacto nos pacientes imunossuprimidos (6,20).

2. HISTÓRIO DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

O Citomegalovírus Humano (HCMV) foi descrito primeiramente no final do século XIX por Ribbert, que observou a presença de grandes inclusões intranucleares em formato de “olhos de coruja” em tecido renal de um natimorto com sífilis. Sua observação não foi registrada até que 23 anos mais tarde, quando as primeiras ilustrações dessas células semelhantes a protozoários, observadas nos rins, pulmões e fígado de outro natimorto com sífilis congênita, fossem publicadas (21) (Figura 1).

Em 1910, um grupo de pesquisadores chegou à conclusão de que estas inclusões celulares eram resultado de uma infecção causada por protozoário e propuseram o nome de *Entamoeba mortinatalium* para este suposto agente (22).

Em 1921, Goodpasture e Talbot descreveram a presença de células citomegálicas em glândulas submaxilares de crianças com infecções diversas, e sugeriram que estas células poderiam ser de origem epitelial, e não causadas por protozoários. Além disso, foram os primeiros a sugerir que as alterações celulares observadas eram similares às lesões da pele causadas pelo vírus Varicella zoster (VZV), portanto, que a citomegalia poderia ser provocada pelo efeito indireto de um agente similar. Eles também observaram que as inclusões nucleares estavam algumas vezes associadas à inclusões no citoplasma (23).

Ainda em 1921, Tyzzer observou em biópsia de lesão de pele inclusões pequenas, similares àsquelas encontradas anteriormente (9), e Lipschutz, neste mesmo ano, também descreveu inclusões similares que foram associadas com lesões em humanos e coelhos infectados com herpes simples. Ele afirmou que as estruturas constituíam uma reação específica da célula contra algum tipo de vírus, sendo o primeiro a reconhecer esta similaridade e postulou uma etiologia viral para a “Doença de Inclusão Citomegálica” (24).

A primeira evidência experimental para dar suporte à etiologia da “Doença de Inclusão Citomegálica” 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. Estes pesquisadores sugeriram que o agente infeccioso pertencia ao grupo dos vírus filtráveis, já que o material do inóculo havia sido filtrado e era espécie-específico (25).

Farber e Wolbach, em 1932, em estudo retrospectivo, revisaram 183 autópsias de crianças, sendo que 22 (12%) apresentaram inclusões nas glândulas submaxilares, 2

crianças mais velhas com inclusões na parótida e glândula submandibular e 2 outras com inclusões no pulmão, fígado, rins e pâncreas. Em 13 de 22 casos, sintomas de pneumonia foram observados. Os dois casos com inclusões viscerais apresentaram sintomas de doença hemorrágica e eritroblastose, respectivamente (26).

Smith e Vellios, em 1950, analisaram 89 casos de “Doença de Inclusão Citomegálica” e constataram que a maioria dos casos de infecção generalizada ocorreu durante os primeiros 2 anos de idade. Eles concluíram que a infecção poderia ocorrer no útero ou no período neonatal (27).

Fetterman, em 1952, diagnosticou “Doença de Inclusão Citomegálica” por exame citológico de urina e Minder (1953), utilizando a microscopia eletrônica, identificou a partícula viral (20,28). Margaret Smith conseguiu, em 1954, isolar o vírus em cultura de tecido, usando a infecção de glândula salivar de cobaia como modelo (29).

Em 1956, através das técnicas de cultura celular, o HCMV foi independentemente isolado por três laboratórios distintos, em amostras de urina e tecido de crianças com manifestações clínicas de provável infecção pelo vírus (11,27,30). Smith conseguiu isolar o vírus das glândulas salivares de 2 crianças (uma morreu de infecção citomegálica generalizada). No mesmo ano, Rowe e colaboradores isolaram três linhagens de HCMV de tecido adenoidal de crianças submetidas à adenoidectomia e a partir destes estudos, conseguiram adaptar uma linhagem de HCMV em laboratório (AD 169), replicando em culturas de fibroblastos humanos. Weller e colaboradores reconheceram o vírus em amostras de urina e pulmão de crianças com “Doença de Inclusão Citomegálica” generalizada. Em cada laboratório foi detectado um efeito citopático idêntico (9).

A partir de 1960, com a evolução nos processos cirúrgicos para transplantes, a infecção pelo HCMV começa a ser reconhecida como uma patologia de importância

clínica, e passa a ser considerado o principal agente patogênico em hospedeiros imunossuprimidos. Na década seguinte, foram organizados grupos de estudo para avaliar o impacto da infecção nos pacientes imunossuprimidos e propor medidas para manter a infecção sob controle (31). A partir desta fase, o HCMV foi, pela primeira vez, reconhecido como principal patógeno em hospedeiros imunossuprimidos (6,32). Nesta mesma época, a denominação de citomegalovírus foi proposta por Weller, substituindo as denominações de “vírus das glândulas salivares” ou “vírus da Doença de Inclusão Citomegálica”, entre outras, anteriormente utilizadas (33).

Em 1970 Weller propôs o nome definitivo “Citomegalovírus” e listou três critérios para a identificação do citomegalovírus: tendência em causar infecção em glândula salivar, crescimento lento (somente em linhagens celulares derivadas de seus hospedeiros naturais) e formação de inclusões citoplasmáticas, além das inclusões nucleares (9).

Em 1973, o grupo de Estudos dos Herpesvírus do Comitê Internacional para a Nomenclatura dos Vírus recomendou que fosse dado um número arábico a todos os herpesvírus, e 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: *Alphaherpesvirinae* (Herpes simplex tipo 1 e 2, Herpes zoster (HHV 3)), *Bethaherpesvirinae* (Citomegalovírus, Herpesvírus humano 6 e 7) e *Gammaherpesvirinae* (Epstein Barr e Herpesvírus Humano 8) (5,34).

Foi iniciada, em 1980, a utilização de medidas para o controle do vírus com agentes antivirais e intervenções imunológicas, e atualmente, os avanços para a compreensão dessa virose estão relacionados aos aspectos moleculares da infecção e controle clínico, principalmente nos grupos de risco (6,31).

Em 1982, uma linhagem do Citomegalovírus humano (HCMV - cepa AD169), foi adaptada em laboratório por Tamashiro *et al.*, que realizaram sua replicação em culturas de fibroblastos humanos e caracterizaram a infecção pela presença de lesões focais constituídas por células gigantes, contendo inclusões intranucleares idênticas àquelas observadas nos materiais precedentes de pacientes (9).

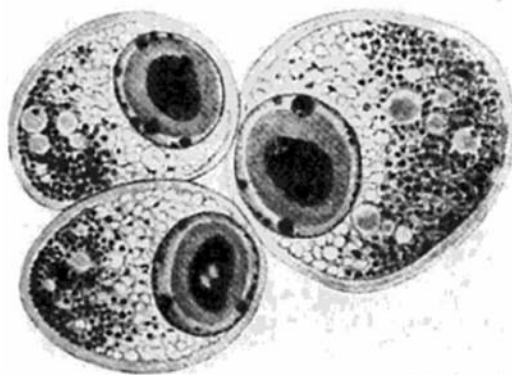
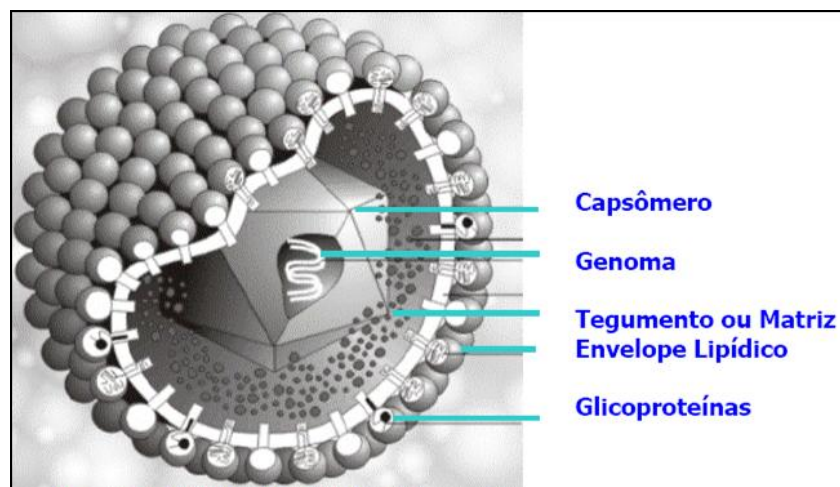


Figura 1. Primeiras ilustrações das células “olhos de coruja” semelhantes a protozoários, observadas em rins de um natimorto com sífilis congênita (35).

3. ESTRUTURA VIRAL DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

O vírion completo do HCMV é composto por um envelope glicolipídico que contém glicoproteínas virais em sua superfície, com diâmetro final de 200nm, um capsídeo icosaédrico de 110 nm de diâmetro composto por 162 capsômeros, no interior do qual se encontra o núcleo de 64 nm de diâmetro contendo o material genético (DNA). O capsídeo é rodeado por um material amórfico e assimétrico designado tegumento ou matriz (8,36,37) (Figura 2).

O genoma do HCMV é constituído por cadeia dupla de DNA linear e seu tamanho é de aproximadamente 230 Kilobases (229.354 pares de bases – GeneBank NC001347) ou massa molecular relativa de $150\text{-}155 \times 10^6$ e uma densidade de $1.716\text{-}1.717 \text{ g/cm}^3$ correspondente a 58% de guanosina e citosina. Este grande genoma codifica mais de 200 proteínas e é composto de duas regiões únicas definidas como longa (U_L) e curta (U_S), flanqueadas por seqüências repetidas invertidas localizadas internamente (IR_L e IR_S) e nas extremidades (TR_L e TR_S) (7,38,39,40).



Copyright 1994 – 97 Marko Reschke

Figura 2. Estrutura morfológica do citomegalovírus humano.

4. CICLO DE CRESCIMENTO E EXPRESSÃO GÊNICA DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

Os mecanismos moleculares que determinam a permissividade das células para a replicação do HCMV ainda não são claros, mas sabe-se que o vírus pode penetrar em uma variedade de células humanas sem que ocorra a replicação. Durante a infecção natural, a replicação viral pode ocorrer em células epiteliais, endoteliais, musculares, mesenquimais, hepatócitos, granulócitos e macrófagos (25,41).

A replicação do HCMV em cultura celular e após infectar o hospedeiro é lenta, e o período de possível doença pelo vírus é prolongado, podendo permanecer em estado latente. Para iniciar a infecção, é necessário que o vírus seja adsorvido aos receptores de superfície celular, resultado de uma cascata de interações entre proteínas virais e celulares, seguido da fusão do envelope viral com a lamela externa da membrana citoplasmática. Após fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática, o capsídeo (com algumas proteínas associadas ao tegumento) é transportado para o poro nuclear onde o DNA viral é lançado no núcleo. O DNA forma um círculo e é transcrito pelo maquinário de transcrição celular. Outras proteínas do tegumento permanecem no citoplasma ou são transportadas independentemente ao núcleo. O RNAm viral é transportado para a célula hospedeira com o capsídeo e é traduzido no citoplasma. Pelo menos uma das proteínas codificadas pelo RNAm viral está associada com a cadeia retículo endoplasmático – Complexo gongiense (42) (Figura 3) . Esse processo é rápido e eficiente tanto nos tipos celulares permissivos quanto nos não-permissivos. (43,44).

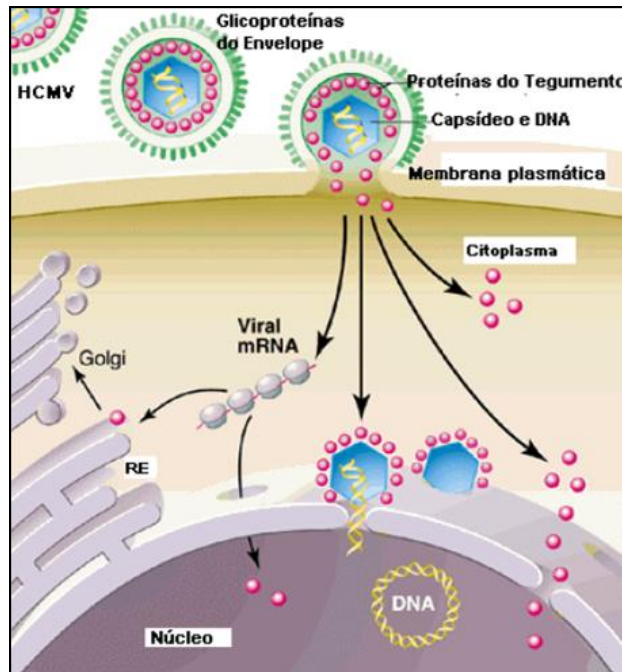


Figura 3. Mecanismo de infecção do HCMV nas células do hospedeiro (45).

A replicação do DNA viral começa entre 14 e 24 horas após a infecção (46). Durante a infecção ativa, o genoma do HCMV é expresso em períodos coordenados e é regulado por uma cascata de eventos transcricionais que levam à síntese de três categorias de proteínas virais denominadas: “immediate-early” (IE ou α), “early” (E ou β), e “late” (L ou γ) (8,47,48,49,50):

- ✓ α (IE) (0 a 2 horas pós-infecção) – os RNAm são transportados para o citoplasma e são traduzidos; ocorre a produção de certas proteínas regulatórias que são transportadas para o núcleo e que permitem ao vírus ter controle da síntese macromolecular da célula hospedeira. Os genes transcritos nessa fase podem ter influência na expressão de outros genes virais, seus próprios genes e, possivelmente, genes celulares;

- ✓ β (E) (2 a 24 horas pós-infecção) – inicia-se após o período IE e é caracterizada pela replicação do DNA viral, produção de proteínas nas células infectadas e produção da progênie;
- ✓ γ (L) (24 horas pós-infecção) – fase em que componentes estruturais ou de maturação dos vírus produzidos e o vírus infectante são eliminados da célula.

As proteínas IE têm um impacto profundo sobre a fisiologia da célula hospedeira, pois regulam a expressão de um grande número de genes desta célula. A expressão dos genes E depende da presença de proteínas IE funcionais e não é afetada por inibidores da replicação do DNA viral, a maioria delas codifica proteínas não estruturais, inclusive fatores de replicação do DNA viral, enzimas de reparo e proteínas envolvidas na evasão imune. As proteínas L são a última classe de produtos gênicos expressos durante a replicação do HCMV e elas têm, principalmente, papel estrutural e contribuem para a adsorção e morfogênese do vírion (44).

Em um paciente imunocompetente, a infecção é controlada por células T citotóxicas específicas para HCMV, e procede, geralmente, de forma assintomática. O período de incubação é de quatro a doze semanas, quando o antígeno pode ser demonstrado. Nesse período, há o aparecimento de IgG-HCMV ou, mais tarde, aumento de cerca de 4 vezes no nível de IgG-HCMV. No entanto, em pacientes imunossuprimidos que não receberam tratamento adequado há o risco de aparecimento da doença provocada pelo HCMV (51).

5. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO ATIVA PELO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

Após infecção primária, o HCMV permanece em latência, mas em situações de estresse ou imunossupressão pode tornar-se ativo. Essas reativações temporárias podem ser assintomáticas, causando pequeno dano ao hospedeiro, mas favorecendo a sua transmissão a novos hospedeiros (22). A transmissão pode ser horizontal ou vertical (52). Além disso, ela pode ser resultante de três padrões epidemiológicos: infecção primária em indivíduos previamente soronegativos; secundária por reativação da infecção latente e ainda secundária por reinfeção por outras linhagens do vírus (20).

Estudos soroepidemiológicos demonstram que a infecção pelo HCMV ocorre em praticamente todas as regiões do mundo (53), desde sociedades globalizadas até mesmo em sociedades isoladas (54,55). De modo geral, as taxas de soroprevalência variam de 40% a 60% nos países do hemisfério norte, enquanto na África e América Latina observam-se taxas de soroprevalência que variam entre 80% a 100%. Por outro lado, existem evidências de que a soroprevalência de anticorpos anti-HCMV não depende tanto da área geográfica, mas sim do nível socioeconômico das comunidades estudadas, já que amplas diferenças são observadas dentro de uma mesma área quando comunidades de características socioeconômicas diferentes são estudadas (56).

Hunter *et al.* no Alabama, Estados Unidos, demonstraram em uma mesma área geográfica que, enquanto 60% das gestantes de nível médio ou alto tinham anticorpos anti-HCMV, as gestantes provenientes de comunidades de baixo nível socioeconômico a prevalência era de 85% (57). Resultados semelhantes foram observados em São Paulo, com

taxas de soroprevalência variando de 65% a 85%, dependendo do nível socioeconômico das populações estudadas (56).

Essa variação, de acordo com as áreas, pode ser explicada pelo fato de a transmissão viral depender, em grande parte, da higiene, moradia e hábitos da população, já que o HCMV é encontrado em praticamente todos os líquidos corporais. Além disso, pelo fato da mulher estar cada vez mais trabalhando fora de casa, um número maior de crianças passou a habitar, por mais tempo, creches e escolas, facilitando a transmissão. Quando um indivíduo introduz o vírus em casa, aproximadamente 50% dos moradores apresentarão soroconversão num prazo de seis meses em média (58,59).

Na puberdade, entre 40% e 80% das crianças apresentam sorologia positiva para o HCMV, havendo um aumento para 70-90% nos adultos. A liberação de HCMV através das secreções do cérvix uterino é comum na gravidez, variando de 1-2% no primeiro trimestre, de 5-10% no segundo e no 10-15% no terceiro (60).

A infecção primária pelo HCMV pode ocorrer no período pré-natal, perinatal, ou pós-natal, tanto por vias naturais como através de transfusões de sangue ou transplantes de órgãos e tecidos (61).

6. PATOGENIA E PATOLOGIA DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

A lesão característica da doença por HCMV é a inclusão intracelular e citoplasmática. A inclusão nuclear aparece de cor vermelho-púrpura (acidófila na coloração por hematoxilina-eosina) cercada por um halo claro. A inclusão citoplasmática é mais granulosa, sendo basófila (61) (Figura 4). Nas proximidades das células infectadas,

observam-se reações inflamatórias (geralmente linfomonocitária) e necrose, com ou sem calcificação (61).

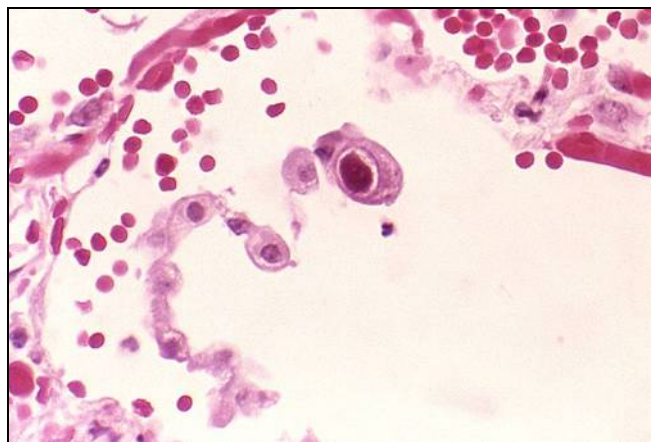


Figura 4. Inclusão intranuclear citomegálica em tecido pulmonar (62).

As células com inclusão citomegálica estão, em geral, amplamente disseminadas por vários órgãos, tais como: glândulas salivares, rins, fígado, pulmões, sistema nervoso central, pâncreas, tireóide, supra-renais, aparelho digestório, baço, timo, gânglios linfáticos, hipófise, testículos, ovários, coração, músculos, medula óssea, pele e vasos sanguíneos (63).

Nos rins são encontradas células de inclusão nos túbulos contornados, sendo mais raro o comprometimento glomerular. Observa-se o quadro de nefrite intersticial, sendo a reação inflamatória do tipo linfoplasmocitário, com distribuição focal ou difusa (63).

Nos pulmões são encontradas células citomegálicas no interior dos alvéolos e brônquios, com presença de reação inflamatória intersticial (pneumonia intersticial) (64,65).

No fígado, observa-se nítida hepatomegalia com quadro de hepatite, necrose e focos hemorrágicos, podendo ocorrer fibrose do tipo porta. As células de inclusão são encontradas no epitélio dos canais biliares, com menos frequência no epitélio capilar e raramente no parênquima (63).

No sistema nervoso central podem ser observadas hemorragias subaracnóides e intracerebrais, leptomeningite crônica, infiltração linfomonocitária, lesões degenerativas dos neurônios, necrose, calcificação e dilatação dos ventrículos e no sistema digestório encontram-se ulcerações, hemorragias e reações inflamatórias (44).

No feto, a infecção ocorre por via placentária, causando hiperplasia do sistema retículo endotelial (SRE), com consequente hepatoesplenomegalia e disseminação para o sistema nervoso central e supra-renais. No cérebro da criança, o HCMV produz intensa inflamação (encefalite), com necrose de células nervosas e posterior calcificação (61).

A localização do vírus parece guardar estreita relação com a porta de entrada. Assim, na infecção placentária, o HCMV localiza-se principalmente no fígado, baço, sistema nervoso central, rins e supra-renais, enquanto, na infecção adquirida, há localização preferencial nos pulmões (pneumonia intersticial) e gânglios linfáticos (61).

Acredita-se que o peso das crianças com doença por HCMV seja baixo devido à ação inibitória do HCMV sobre o crescimento normal das células, com redução substancial do seu número em vários órgãos e tecidos. O HCMV, no sangue periférico, localiza-se no interior de células leucocitárias, onde permanece viável até 48 horas (61).

Estudos experimentais em animais de laboratório demonstraram que a imunossupressão, antes da inoculação do HCMV, impede a reação inflamatória que localiza e limita a extensão da lesão e, assim, resulta em uma infecção rapidamente fatal (61).

7. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS AO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

7.1 Síndrome da Mononucleose Infecciosa

A infecção primária pelo HCMV pode ocasionar a síndrome da mononucleose infecciosa, caracterizada por mal-estar, dor de cabeça, febre, dor de garganta (mais comum na mononucleose causada por EBV), linfonodomegalia no pescoço ou generalizado, hepatite leve e transitória. Estima-se que 79% das mononucleoses infecciosas são causadas pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e os outros 21% são causadas pela infecção primária pelo HCMV. A transmissão se dá através da saliva, contato sexual, gotículas respiratórias e transfusão de sangue e acomete mais frequentemente adolescentes e adultos jovens, podendo acometer também idosos e crianças pré-adolescentes (66).

O quadro hematológico da síndrome da mononucleose infecciosa é uma relativa linfocitose, superior a 50% dos leucócitos do sangue periférico. Destes, 10% ou mais são compostos por linfócitos atípicos (66).

A síndrome da mononucleose infecciosa causada pelo HCMV ocorre sem uma fonte clara de transmissão, mas sabe-se que pode se dar através do beijo, transmissão direta ou indireta. Uma forma importante de transmissão direta é o contato sexual (66). A forma mais fácil de transmissão tanto do HCMV quanto do EBV é por transfusão de sangue. O HCMV também pode ser transmitido por transfusão de leucócitos (67). Quanto maior o número de unidades de sangue transfundido a um paciente, maior será o risco de transmissão, e quando uma grande quantidade de sangue é transfundida, o HCMV pode ser considerado uma causa de febre pós-transfusão. Este risco de transmissão é reduzido com a presença de

anticorpos anti-HCMV, depleção de leucócitos e com o descarte da doação de sangue de doadores soropositivos (34).

7.2 Pneumonia Intersticial

A pneumonia intersticial é a complicação mais grave da doença por HCMV em pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH), apresentando alta taxa de mortalidade (66).

A pneumonia intersticial é definida pelos seguintes critérios: evidência de dano alveolar extenso, revelado por infiltrados multilobulares, alterações na fisiologia pulmonar, além de sintomas clínicos de pneumonia, tais como tosse, dispnéia e febre (10).

Em 2002, Ljungman *et al.* definiram que o diagnóstico da pneumonia causada pelo HCMV é caracterizado pela presença de sinais e/ou sintomas de doença pulmonar combinado com a detecção do HCMV em lavado brônquio-alveolar ou biópsia de pulmão. A detecção deve ser realizada por cultura celular, testes histopatológicos, análise imunohistoquímica ou hibridização *in situ* (68).

7.3 Infecção no Trato Gastrointestinal

A infecção no trato gastrointestinal pelo HCMV era frequentemente diagnosticada em pacientes HIV – positivos antes da era HAART (Highly Active AntiRetroviral Treatment). O HCMV pode causar úlceras esofágicas e o diagnóstico é feito pela detecção de inclusões intranucleares nos tecidos de biópsias das úlceras, ou por cultura (66).

O HCMV pode também causar colite, e os pacientes acometidos apresentam diarreia, perda de peso, anorexia e febre. A colonoscopia revela hemorragias difusas na submucosa e ulcerações difusas na mucosa intersticial. Biópsias positivas evidenciam

corpos de inclusão típicos, geralmente na mucosa epitelial (66) ou nas criptas da mucosa (66). A biópsia pode revelar vasculite com infiltrado neutrofílico, células endoteliais infectadas por HCMV e inflamações não específicas (30).

Outras partes do sistema digestório podem ser infectadas pelo HCMV. Pacientes com AIDS podem apresentar pancreatite aguda por HCMV (69). Colecistite tem sido associada com a presença do HCMV no ducto biliar, vesícula biliar, e vias biliares (66).

Para se caracterizar a doença gastrointestinal por HCMV deve haver a associação clínica de sintomas gastrointestinais (colite, gastrite ou esofagite) e histologia ou imunohistoquímica positiva para HCMV de biópsias de lesões macroscópicas do trato gastrointestinal (68).

7.4 Hepatite

A hepatite por HCMV é geralmente associada à síndrome da mononucleose infecciosa, sendo comumente leve e raramente sintomática em indivíduos imunocompetentes (66).

Na biópsia do fígado, o achado característico da doença por HCMV são as inclusões intranucleares. Elas podem ser encontradas nos hepatócitos e nas células de Kupffer, mas são mais comuns nas células do epitélio biliar. Em pacientes imunossuprimidos, no entanto, as inclusões são mais frequentes nos hepatócitos e a doença é mais agressiva (70).

Para se diagnosticar a hepatite por HCMV o vírus deve ser demonstrado em tecidos de biópsias hepáticas (por cultura, imunohistoquímica, hibridização “*in situ*” ou PCR) em combinação com: aumento de pelo menos duas vezes o valor máximo normal de ALT (alanina aminotransferase) e achados histopatológicos consistentes com hepatite ou colangite (68).

7.5 Infecção no Sistema Nervoso Central (SNC)

Embora não se considere que o HCMV tenha tropismo pelo SNC, o HCMV pode, ocasionalmente, causar infecção no SNC. Esta infecção pode acarretar encefalite, mielite, poliradiculite e neuropatias multifocais. Mudanças de personalidade, dificuldade de concentração e sonolência são sintomas frequentes dessa infecção (66).

O diagnóstico da doença neurológica causada pelo HCMV associa sintomas como encefalite, mielite transversal ou outros sinais de doença difusa do SNC com a detecção do HCMV em líquido cerebrospinal por cultura ou PCR, em tecido de biópsia cerebral, exames imunohistoquímicos ou por hibridização “*in situ*” (68).

7.6 Retinite

A retinite por HCMV é a principal infecção oftalmológica relacionada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) em estágio avançado, quando a contagem de CD4 é menor que 50 células/mm³ (71,72).

Antes do aparecimento da AIDS, a retinite por HCMV em adultos era observada quase que exclusivamente em pacientes imunossuprimidos iatrogenicamente, incluindo pacientes transplantados, submetidos à quimioterapia e terapia imunossupressora para doenças auto-imunes (73,74,75). Na literatura médica, há relatos de poucos casos de pacientes com retinite por HCMV sem infecção pelo HIV (76,77,78).

O curso clínico da retinite é bastante variável, com quadros graves de diminuição da acuidade visual, alteração do campo visual, evoluindo com deslocamento de retina e acometimento de áreas nobres como a mácula e o nervo óptico, até as formas oligossintomáticas com comprometimento de áreas periféricas da retina. Muitos pacientes evoluem para amaurose (72).

O diagnóstico da doença ocular por HCMV pode ser confirmado com o aparecimento de lesões oftalmológicas típicas, com ou sem provas virológicas, diagnosticadas pelo exame de fundo de olho, realizado pelo oftalmologista, com presença de retinite necrotizante com infiltrado branco algodinoso, áreas de hemorragia, irite e vitrite (68).



A

B

C

Figura 5. Retinite por HCMV. (A) Doença no estágio inicial com comprometimento da veia; (B) Dano retinal extensivo e hemorragia retinal; (C) Retinite por HCMV com papilite (66).

8. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS

A infecção ativa pelo HCMV causa significativa morbidade e mortalidade em pacientes submetidos a TCTH ocorrendo entre 50 e 90% dos pacientes transplantados do tipo alogênico. A alta incidência desta infecção ocorre durante os três primeiros meses pós-

transplante devido à profunda imunossupressão em que estes pacientes se encontram neste período (79,80,81).

O impacto desta infecção em receptores de TCTH varia desde soroconversão assintomática até pneumonia intersticial, doença no trato gastrointestinal, hepatite, mielossupressão, retinite, nefrite, manifestação no SNC e alterações hematológicas (leucopenia e trombocitopenia) (10,82,83). A infecção pelo HCMV pode estar associada a manifestações mais graves como pancitopenia e hipoplasia da medula óssea, atraso da pega medular, aparecimento da DECH (doença de enxerto contra hospedeiro) infecções oportunistas, aceleração da perda do enxerto e óbito (84).

A pneumonia causada pelo HCMV é a complicação mais comum no pós-transplante de células tronco hematopoéticas, com taxa de mortalidade entre 60 e 80% sem o uso do ganciclovir e 50% com tratamento antiviral (85). Esta pneumonia geralmente mostra um padrão intersticial ao invés de doença alveolar, mas nódulos podem ser diagnosticados em exame de raio-X, ocorrendo, na maioria das vezes, durante os primeiros 120 dias pós-transplante (56).

A pneumonia pelo HCMV geralmente ocorre em um período curto, duração próxima a 2 semanas, apresentando complicações respiratórias. É caracterizada por hipoxia e progressão para insuficiência respiratória, e parece derivar da combinação dos efeitos citopáticos da replicação viral e do mecanismo imunopatológico do hospedeiro. Febre, tosse não-produtiva, e dispnéia que progride para hipoxia, precisando de ventilação mecânica, são comuns nos casos mais graves. Uma parte da gravidade da pneumonia pelo HCMV esta associada à presença de DECH localizada no pulmão, sendo responsável por 82% das pneumonias em associação com o HCMV (66).

A DECH é uma manifestação clínica que ocorre somente em pacientes submetidos a TCTH do tipo alogênico e resulta do ataque imunológico por parte das células imunocompetentes do doador contra os tecidos do receptor. A DECH aguda ocorre nos cem primeiros dias pós-TCTH e acomete entre 9% e 50% dos pacientes. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento de DECH aguda está a infecção ativa pelo HCMV.

Os principais órgãos atingidos pela DECH são: pele, fígado e trato gastrointestinal (10). Na maioria dos pacientes, a primeira manifestação clínica é o *rash* maculopapular, ocorrendo próximo da “pega” do enxerto comprometendo áreas de implantação como cabelo, orelha, ombros, palmas das mãos e sola dos pés (86). O fígado é o segundo órgão mais envolvido e se manifesta com alterações nos testes de função hepática (10). O comprometimento do trato gastrointestinal é geralmente grave e caracterizado por presença de diarreia e cólicas abdominais. A doença do trato gastrointestinal superior é caracterizada por anorexia, dispepsia, náuseas e vômitos (87).

O risco de desenvolvimento da infecção ativa e da doença por HCMV em pacientes submetidos a TCTH varia de acordo com alguns fatores:

- ✓ Sorologia pré-transplante do doador (D) e receptor (R) em relação ao HCMV. Assim, há quatro combinações possíveis, sendo: D+/R-; D+/R+; D-/R+; D-/R- (10) (Figura 6);
- ✓ Os pacientes com menor risco de desenvolvimento da doença por HCMV estão incluídos na combinação D-/R-. Nestes pacientes, o maior fator de risco de infecção pelo HCMV é o uso de produtos sanguíneos de doadores soropositivos (88);

- ✓ Carga viral: a carga viral presente no material transplantado é diretamente proporcional ao risco do aparecimento da doença (19).

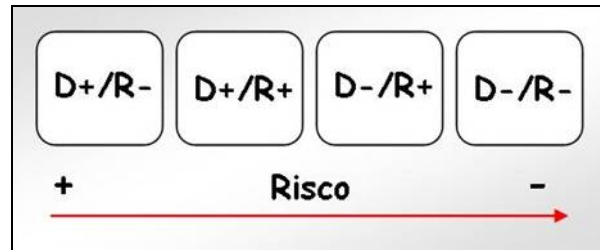


Figura 6. Estado sorológico prévio ao transplante do Doador (D) e Receptor (R):
associação ao risco de desenvolvimento da doença por HCMV (10).

No transplante autólogo a mortalidade é, na maioria das vezes, associada à recidiva da doença e no transplante alogênico, a mortalidade é associada principalmente a complicações decorrentes da imunossupressão usada no tratamento DECH. Sendo assim, devido a esta imunossupressão intensa, os pacientes transplantados alogênicos estão mais predispostos a graves complicações infecciosas (89).

9. DIAGNÓSTICO DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

Existem duas estratégias de diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV: detecção viral ou demonstração de uma resposta imunológica específica.

9.1 Detecção Viral

9.1.1 Microscopia Eletrônica

Dentre as vantagens deste método estão a rapidez de liberação de resultados positivos (entre 15 e 30 minutos) e a possibilidade de examinar materiais eventualmente contaminados por fungos ou bactérias, que não são apropriados para isolamento viral (22). Esta técnica é utilizada em amostras de urina de recém-nascidos com infecção congênita ou perinatal que contem títulos elevados (10^3 - 10^6 TCID₅₀/mL) de HCMV. Usando a microscopia eletrônica, é possível demonstrar esta virúria (90).

Diversos autores relataram que a detecção da infecção ativa pelo HCMV por microscopia eletrônica em recém-nascidos infectados ocorre em aproximadamente 80% dos casos. Resultados falso-negativos são claramente atribuídos às amostras de urina que apresentem baixos títulos de HCMV ($<10^3$ TCID₅₀/mL). Já a especificidade desta técnica foi relatada em 100%, devido ao fato de que raramente qualquer outro herpesvírus humano seja encontrado em títulos elevados na urina dos recém-nascidos (90).

A microscopia eletrônica não pode ser usada em pacientes imunossuprimidos por diversas razões. Primeiramente, os títulos de HCMV encontrados em amostras clínicas de adultos geralmente são mais baixos do que em recém-nascidos. Em segundo lugar, a técnica de microscopia eletrônica não distingue os vários tipos de herpesvírus que frequentemente infectam pacientes imunossuprimidos. Sendo assim, esta não é considerada uma boa técnica para guiar a terapia antiviral específica para estes pacientes (90).

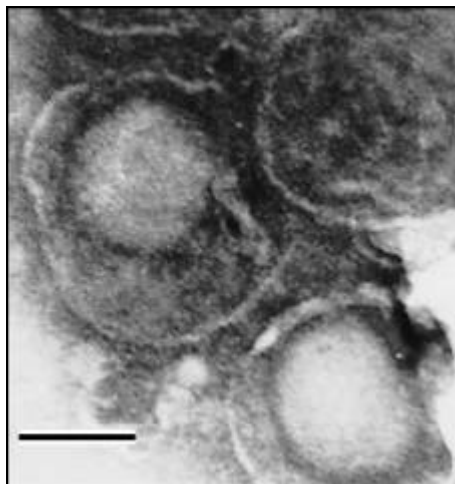


Figura 7. Aparência típica do citomegalovírus humano pela microscopia eletrônica (60).

9.1.2 Exames Histopatológicos e Citológicos

O HCMV pode ser diagnosticado em preparações histológicas pela presença de inclusões intranucleares conhecidas como “olhos de coruja” (Figura 8) podendo ser coradas com hematoxilina-eosina, Papanicolau, ou Giemsa. Estas inclusões podem ser encontradas em fragmentos de tecidos dos túbulos renais, ductos biliares, parênquima pulmonar e hepático, intestino, glândula salivar, com menor frequência no tecido de cerebral, em sedimento urinário, lavado gástrico, broncoalveolar e outros materiais (22).

Histologicamente, a detecção dos corpos de inclusão na amostra de tecido pode ser um método altamente específico para determinar o envolvimento do HCMV no órgão. Apesar desta alta especificidade, este método apresenta baixa sensibilidade, podendo acarretar em resultados falso-negativos (91).

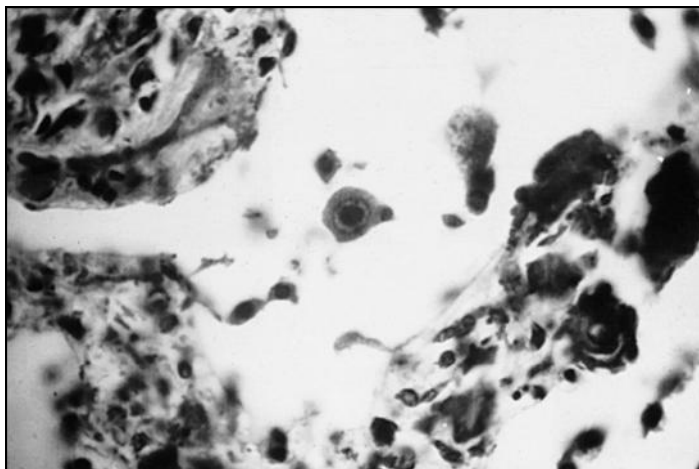


Figura 8. Aparência histológica *post mortem* de pneumonia intersticial causada pelo HCMV em um receptor de células tronco hematopoéticas (22).

9.1.3 Isolamento Viral por Cultura Clássica

O isolamento viral em cultura de fibroblastos humanos ainda é considerado, por alguns autores, o diagnóstico específico mais apropriado para demonstrar a infecção ativa pelo HCMV. Os agentes citopatogênicos revelam-se, na cultura de tecidos, pelo aparecimento de grandes inclusões nucleares eosinófilas, cercada por nítido halo claro, ocorrendo grande aumento das células infectadas (Figura 9).

Os materiais que se inoculam nas culturas de tecidos são, preferencialmente, esfregaços de mucosa cervical, mucosa oral, saliva, sêmen, urina, biópsia de fígado ou da parótida, escarro, sangue, líquido, suco gástrico, ou qualquer outro material suspeito (61).

Este método ainda é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da doença por HCMV, embora não seja tão viável devido à necessidade de até quatro semanas para o aparecimento do efeito citopático, sendo este o principal obstáculo para o uso rotineiro desta técnica (51).

Esta técnica é muito utilizada para se fazer a diferenciação entre infecção congênita ou perinatal, através do isolamento viral de biópsia ou fluido corporal, principalmente urina. Se este isolamento somente puder ser feito em quatro a oito semanas após o nascimento tem-se uma infecção perinatal. Caso o isolamento for feito antes, diagnostica-se uma infecção congênita (92).

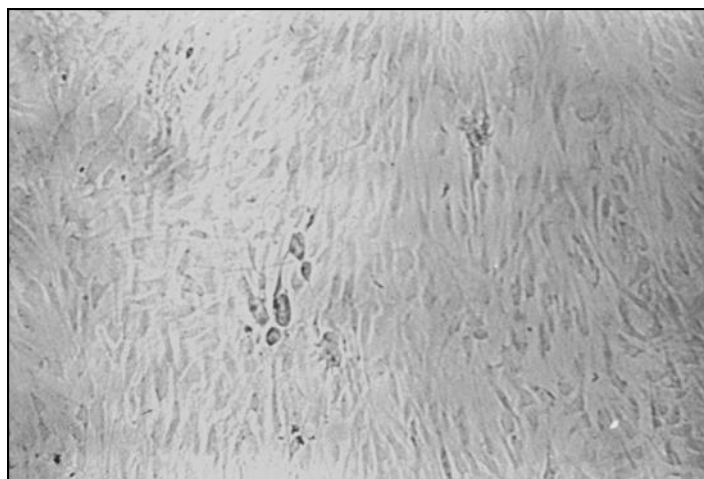


Figura 9. Efeito citopático local típico do HCMV visto em cultura de fibroblasto humano de pulmão de um embrião (22).

9.1.4 Técnica de “Shell vial” ou Cultura com Isolamento Rápido

A técnica de “shell vial” é basicamente o isolamento viral clássico com algumas modificações, representando, assim, uma alternativa mais rápida de diagnóstico. Neste caso, em vez de se esperar até quatro semanas pelo aparecimento do efeito citopático, adiciona-se uma mistura de anticorpos monoclonais contra diferentes antígenos do HCMV com posterior centrifugação para facilitar o processo de penetração do vírus nos fibroblastos, sendo a revelação feita em 24, 48 e 72 horas por imunofluorescência indireta - IFI. Sua sensibilidade é semelhante ao isolamento clássico (51) (Figura 10).

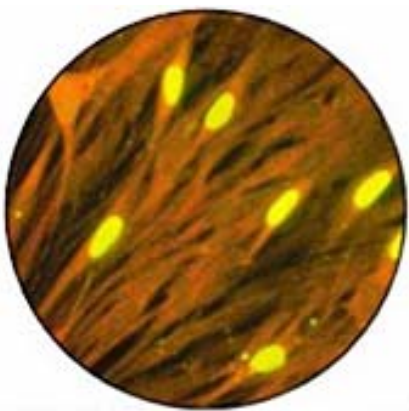


Figura 10. Cultura com isolamento rápido, fixado e corado 16 horas após inoculação, mostrando proteínas virais no núcleo de fibroblastos humanos infectados (93).

9.1.5 Detecção do Antígeno pp65 do HCMV em Sangue Periférico (Antigenemia)

O método da antigenemia tem sido considerado um grande avanço no diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV em transplantes de órgãos e tecidos. A presença de antígenos virais em leucócitos do sangue periférico proporciona um marcador precoce de infecção ativa pelo HCMV (94).

A antigenemia é baseada na detecção, a partir de anticorpos monoclonais, do antígeno viral *pp65*, uma proteína estrutural expressa nos leucócitos do sangue durante a fase precoce do ciclo de replicação do HCMV. O antígeno viral *pp65* é um marcador indireto de infecção ativa pelo vírus, onde altos níveis de antígenos são frequentemente encontrados em pacientes com doença por HCMV e baixos níveis correlacionam-se com infecções assintomáticas (44).

Esta técnica tem sido considerada a mais adequada para diagnosticar a infecção ativa pelo HCMV, guiar o início da terapia precoce e monitorizar a eficácia do tratamento

com ganciclovir em pacientes imunossuprimidos (95). Ela apresenta boa sensibilidade para estimar a carga viral sistêmica e diagnostica células antígeno-positivas precocemente, (96) indicando uma pré-disposição em desenvolver a doença por HCMV (18,97).

Entretanto, este método apresenta algumas desvantagens como a necessidade de processamento imediato das amostras, sendo recomendável até 8 horas após a coleta para não haver a diminuição da sensibilidade, além de poder apresentar resultados falso-negativos em pacientes com grave neutropenia devido à imunossupressão (18,97).

Muitos estudos têm indicado a antigenemia como padrão ouro guiar o tratamento precoce da infecção ativa pelo HCMV (98,99).



Figura 11. Detecção do antígeno *pp65* do HCMV em sangue periférico de um paciente submetido a transplante de células tronco hematopoéticas (93).

9.1.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica da PCR baseia-se no processo de replicação do DNA. Durante a PCR são usadas temperaturas elevadas de forma a separar as moléculas de DNA em duas cadeias

simples, permitindo então a ligação de oligonucleótidos iniciadores (primers). Para amplificar uma determinada região são necessários dois iniciadores complementares das sequências que flanqueiam o fragmento do DNA a amplificar, nos seus terminais 3', de modo a permitir a atuação da DNA polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA a amplificar (100). Após o término da PCR, o produto da reação pode ser analisado por eletroforese em gel (Figura 12).

A PCR vem substituindo gradativamente o isolamento viral clássico por apresentarem sensibilidade e especificidade semelhantes, além das vantagens como rapidez de execução, aproximadamente 6 horas, e possibilidade de congelamento e armazenamento das amostras (101).

Maior sensibilidade e especificidade foram alcançadas pela técnica de “Nested PCR”, utilizada por Porter-Jordan *et al.* (102) e, Brytting *et al.* (103). Esta variação da PCR é uma técnica que amplifica uma sequência alvo em dois passos: na primeira amplificação, utiliza-se um par de iniciadores específicos para um fragmento alvo desejado; a partir do produto desta 1ª reação, um novo par de iniciadores é utilizado para uma região interna ao fragmento anterior, por isso o aumento da sensibilidade e especificidade da reação (104).

A Reação em Cadeia da Polimerase pode ser utilizada de forma qualitativa (diagnóstico por PCR simples), quantitativa pela Real-time PCR (quantificação da carga viral), e pela Transcrição Reversa Acoplada a PCR (RT-PCR) no diagnóstico da replicação viral.

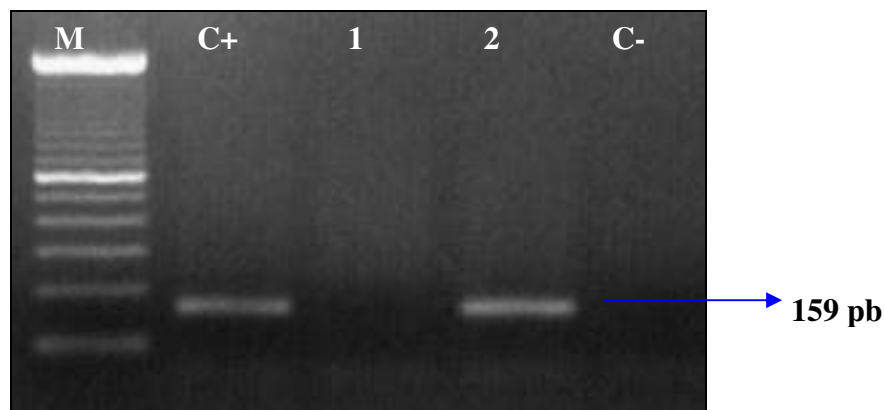


Figura 12. Análise direta do fragmento amplificado (159 pb), após eletroforese em gel de agarose (M: marcador de peso molecular; C+: controle positivo; 1: amostra HCMV-negativa; 2: amostra HCMV-positiva, C-: controle negativo)

9.1.7 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (*Real-time PCR*)

A Real-time PCR representa um grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, particularmente por facilitar significativamente as tarefas de quantificação da expressão gênica e carga de DNA (patógeno específico) em um determinado tecido ou amostra biológica. O método utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação, apresentando alta sensibilidade e especificidade, estas estando diretamente relacionadas à escolha dos “primers” e sondas (se for o caso), e a precisão é determinada pela C_t (threshold cycle), que é calculada durante a fase exponencial da reação (105).

O sistema TaqMan utiliza sondas marcadas com corantes fluorescentes e específicas para o segmento gênico cuja expressão se deseja estudar, e apresentam uma substância (fluoróforo na posição 5' da sonda) que é capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor, em comprimento de onda diferente do original (100).

Outra forma de realização da Real-time PCR utiliza um corante, o Sybr Green, em substituição à sonda Taqman. O princípio do método está baseado na detecção de fluorescência no tubo de reação à medida que DNA dupla fita é gerado, em virtude da concentração do corante Sybr Green entre as cadeias de DNA geradas (100).

Ambos os sistemas de emissão de luz (sonda TaqMan e Sybr Green) podem ser utilizados para detecção e quantificação pela Real-time PCR. O sistema TaqMan aumenta a especificidade da reação, mas apresenta um maior custo pela utilização de um oligonucleotídeo modificado além dos primers habituais para PCR. Já o Sybr Green é agente inespecífico e revela qualquer dupla fita gerada na reação de amplificação (100).

A Real-time PCR é utilizada para a detecção e monitorização da carga viral, sendo utilizada principalmente em pacientes imunossuprimidos, por auxiliar na predição do risco do paciente desenvolver doença por HCMV.

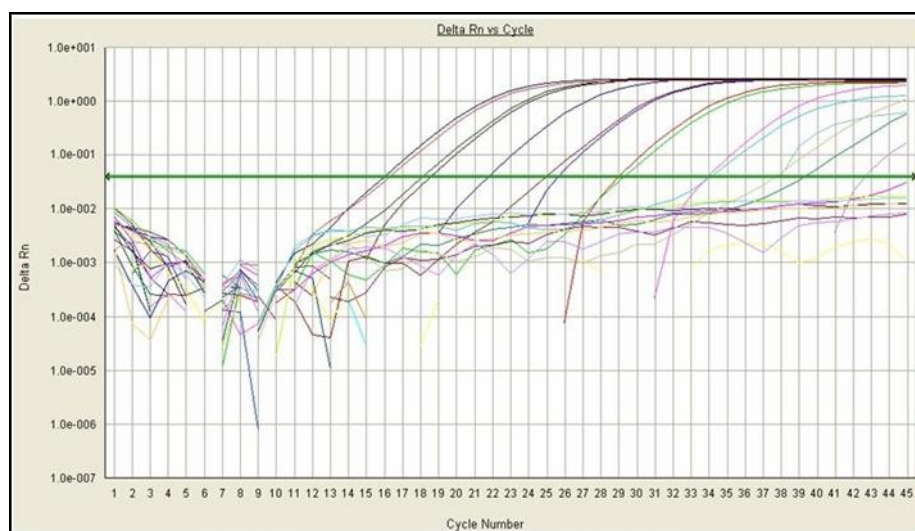


Figura 13. Curva de amplificação do DNA do HCMV pela Real-time PCR (TaqMan)

9.1.8 Transcrição Reversa Acoplada a PCR (RT-PCR)

A transcrição reversa acoplada a PCR é baseada em uma reação de transcriptase reversa, seguida de uma PCR. A partir do RNA, a enzima transcriptase reversa sintetiza uma fita de DNA complementar (cDNA) e, a partir daí, a PCR é executada com o cDNA. Esta metodologia permite identificar genes transcritos pelo vírus por ocasião de sua replicação nas células do hospedeiro, permitindo assim a identificação da infecção ativa (106). Estudos indicam esta técnica como sendo muito específica e clinicamente mais útil que outras técnicas utilizadas como, isolamento de vírus e técnicas de DNA e PCR (106).

9.2 Detecção da Resposta Imunológica

9.2.1 Métodos Sorológicos

As detecções de IgM e IgG por métodos sorológicos (imunofluorescência indireta, ELISA, radioimunoensaio) são rotineiramente solicitadas, porém têm papel limitado nos pacientes imunossuprimidos, não permitindo afastar ou confirmar esta infecção na ausência da detecção viral (61).

Entre os pacientes imunossuprimidos, ao contrário do que ocorre com os indivíduos imunocompetentes, a presença de IgM não significa obrigatoriamente infecção primária, já que é relativamente frequente observar pacientes previamente soropositivos apresentarem elevações séricas da IgM específica se ocorrer reativação ou reinfecção pelo HCMV durante a terapia imunossupressora. Por outro lado, pacientes imunossuprimidos podem apresentar infecção grave e, dependendo do grau de imunossupressão, podem ser encontrados resultados falso-negativos (61).

Conhecer o estado sorológico em relação ao HCMV de um indivíduo imunossuprimido é um fator importante, já que a soropositividade reflete uma infecção

anterior e, portanto, todos os indivíduos soropositivos abrigam o HCMV de forma latente, podendo se reativar a qualquer momento. No TCTH é necessária a realização da sorologia pré-transplante para o HCMV, tanto do receptor quanto do doador, para se escolher, quando possível, a melhor combinação entre eles, sendo preferencialmente, doadores HCMV-negativos com receptores soronegativos. A relação entre a sorologia do doador e do receptor pode reduzir significativamente a incidência de doença por HCMV nesses pacientes (107).

10. PREVENÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA E DOENÇA PELO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

A prevenção da infecção ativa pelo HCMV nos grupos de risco está diretamente associada às rotas de transmissão do mesmo. Em receptores de transplante o risco de uma infecção primária pode ser reduzido com a combinação de doadores e receptores soronegativos, embora esta estratégia seja restrita devido à escassez de doação de órgãos (108). A profilaxia com drogas antivirais e terapia precoce também são úteis em pacientes transplantados. A transmissão do HCMV por transfusão de sangue para indivíduos imunossuprimidos, gestantes e recém-nascidos prematuros pode ser evitada usando sangue e hemoderivados HCMV-negativos, filtrados, ou com depleção de leucócito (109). A administração de uma vacina contra HCMV seria uma outra maneira de proteger os pacientes considerados de risco (56).

10.1 Vacina contra o Citomegalovírus Humano

Até o momento, não há vacinas aprovadas para prevenir as infecções causadas pelo HCMV e, segundo anúncio da Novartis de 29 de dezembro de 2008, os ensaios clínicos de fase II para este agente foram iniciados em 2009 (110).

11. ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO

Medicamentos antivirais são utilizados na profilaxia e tratamento da infecção ativa e doença por HCMV em pacientes imunossuprimidos. Em indivíduos imunocompetentes a infecção normalmente é solucionada sem intervenção medicamentosa. Duas diferentes estratégias terapêuticas podem ser empregadas para combater a infecção ativa pelo HCMV: profilaxia universal ou terapia precoce (preemptive therapy) (44).

11.1 Profilaxia Universal

A profilaxia universal refere-se à estratégia que administra drogas antivirais a todos os pacientes, independentemente dos resultados dos testes de investigação de viremia (excluindo somente os doadores soronegativos com receptores negativos para o HCMV) (93).

A profilaxia com uso de ganciclovir pós-TCTH do tipo alogênico em receptores soropositivos foi significativamente eficaz em dois estudos realizados por Goodrich *et al.* (111) e Broeck e Bowden (112), mas falhou em um terceiro, de responsabilidade de Winston *et al.* (113), onde a redução da mortalidade não foi atingida provavelmente porque a neutropenia induzida pelo ganciclovir acarretou infecções bacterianas e fúngicas fatais.

Em conclusão, a profilaxia antiviral pode ser útil em alguns casos, mas é uma estratégia onde pacientes são expostos à toxicidade da droga (mielossupressão e toxicidade renal), possível resistência antiviral e risco de infecções tardias pelo HCMV (114).

11.2 Terapia Precoce (Preemptive therapy)

O tratamento precoce foi descrito primeiramente no início da década de 1990 (115) como meio de reduzir o aparecimento da doença por HCMV. O tratamento antiviral é iniciado quando o HCMV é detectado no sangue, qualquer outro líquido corporal e lavado broncoalveolar em pacientes assintomáticos ou oligossintomáticos usando métodos sensíveis, como a PCR e a antigenemia (93).

Geralmente o uso precoce do ganciclovir exige que os pacientes sejam monitorizados pelo menos uma vez por semana durante o período de risco máximo (até o 100º dia pós-TCTH). Monitorização mais longa é recomendada a pacientes com DECH, pacientes submetidos a transplantes não relacionados e pacientes que tiveram reativação prévia pelo HCMV.

Dentre as vantagens da monitorização da infecção ativa pelo HCMV e consequente tratamento precoce está a redução do número de pacientes expostos à toxicidade dos medicamentos antivirais e diminuição do risco de resistência à droga antivirais, melhorando, assim, a relação custo-benefício (116).

12. MEDICAMENTOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO ANTIVIRAL

12.1 Ganciclovir

O ganciclovir é um nucleosídeo sintético análogo da 2'-desoxiguanina, que inibe a replicação dos herpes vírus, tanto *in vitro* como *in vivo*. Seu nome químico é 9-[2-hidroxi-1-(hidroximetil)-etoximetil] guanina, embora seja mais comumente conhecido como dihidroxipropoximetil guanina (DHPG) (117).

Nas células infectadas pelo HCMV, o ganciclovir é inicialmente fosforilado a ganciclovir monofosfato pela quinase protéica viral UL97. Depois de ocorrer a fosforilação, diversas quinases celulares produzem o ganciclovir trifosfato, o qual é lentamente metabolizado no interior da célula. A atividade virustática do ganciclovir é devido à inibição da síntese do DNA viral por dois mecanismos: (a) inibição competitiva da incorporação da desoxiguanosina trifosfato (DGTP) ao DNA pela DNA polimerase e (b) a incorporação do trifosfato de ganciclovir ao DNA viral causa um subsequente término ou alongamento muito limitado do DNA viral (117).

O principal efeito adverso do ganciclovir é a neutropenia, que ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes em tratamento. Outros efeitos associados à droga são mielossupressão e plaquetopenia (61,94).

A resistência do HCMV ao ganciclovir é rara (aproximadamente 1%), mas deve ser considerada em pacientes com resposta clínica repetidamente pobre ou com excreção viral persistente durante o tratamento. O principal mecanismo de resistência ao ganciclovir é a diminuição da capacidade de formar moléculas ativas de trifosfato. Resistência viral tem sido descrita devido à mutação no gene UL97 do HCMV que controla a fosforilação do ganciclovir e mutações na polimerase do DNA viral (117).

Quadro 1. Posologia do ganciclovir – Dose padrão para o tratamento de doença por HCMV

Dose padrão para tratamento de doença por HCMV
<i>Terapia de indução:</i> 5 mg/kg administrada por infusão intravenosa a cada 12 horas por 21 dias.
<i>Tratamento de manutenção:</i> 5 mg/kg administrada por infusão intravenosa 3 vezes/semana até 12 doses.

Quadro 2. Posologia do ganciclovir – Dose padrão para o tratamento de infecção ativa pelo HCMV

Dose padrão para tratamento de infecção ativa pelo HCMV
<i>Tratamento de indução:</i> 5 mg/kg administrada por infusão intravenosa a cada 12 horas por 7 dias.
<i>Tratamento de manutenção:</i> 5 mg/kg administrada por infusão intravenosa 3 vezes/semana até 12 doses.

12.2 Foscarnet

O foscarnet (ácido fosfonofórmico), análogo do pirofosfato, é um agente antiviral de amplo espectro que inibe todas as viroses humanas conhecidas do grupo do herpes, incluindo o HCMV e alguns retrovírus, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) em concentrações que não afetam o crescimento celular normal (116).

A ação antiviral do foscarnet ocorre por inibição direta específica da DNA polimerase viral e transcriptase reversa em concentrações que não afetam a DNA polimerase celular. Linhagens de HCMV resistentes ao ganciclovir podem ser sensíveis ao foscarnet (116).

Sua toxicidade é principalmente renal, levando ao aumento dos níveis de creatinina sérica de duas a três vezes em 20% a 30% dos pacientes submetidos ao tratamento viral

com esta droga. Outros efeitos colaterais observados com menor frequência são hipofosfatemia, convulsões e úlceras penianas ou vulvares (94).

Quadro 3. Posologia do foscarnet – Dose padrão para o tratamento de doença por HCMV

Dose padrão para tratamento de doença por HCMV
<i>Terapia de indução:</i> 60 mg/kg na forma de infusão intermitente a cada 8 horas por 2-3 semanas dependendo da resposta clínica.
<i>Terapia de manutenção:</i> dose varia de 90 a 120 mg/kg administrada por infusão diária pelo tempo que se considerar apropriado.

12.3 Valganciclovir

O valganciclovir é um L-valil éster (pró-droga) do ganciclovir, que após sua administração oral, é rapidamente convertido para ganciclovir pelas esterases intestinal e hepática e a partir daí age interrompendo a reprodução do HCMV. O ganciclovir é um análogo sintético da 2'- desoxiguanosina, a qual inibe a replicação dos vírus do herpes, *in vitro* e *in vivo* (119).

A biodisponibilidade absoluta de ganciclovir a partir do valganciclovir é de aproximadamente 60%. Por ser uma pró-droga do ganciclovir, espera-se que os efeitos colaterais sabidamente associados ao uso de ganciclovir podem ocorrer com valganciclovir (119).

Estudos clínicos de valganciclovir foram realizados em pacientes com AIDS e retinite por HCMV. O valganciclovir apresentou eficácia comparável ao ganciclovir intravenoso para tratamento da retinite por HCMV (119).

Quadro 4. Posologia do valganciclovir – Dose padrão para o tratamento de doença por HCMV

Dose padrão para tratamento de doença por HCMV
<i>Terapia de indução:</i> 900 mg (dois comprimidos de 450 mg) duas vezes ao dia durante 21 dias.
<i>Tratamento de manutenção:</i> 900 mg (dois comprimidos de 450 mg) uma vez ao dia.

Quadro 5. Posologia do valganciclovir – Dose padrão para prevenção da doença por HCMV em transplante de órgãos

Dose padrão para prevenção da doença por HCMV em transplante de órgãos
A dose recomendada é de 900 mg (dois comprimidos de 450 mg) uma vez ao dia. O tratamento deve ser iniciado até o 10º dia após o transplante e mantido até o 100º dia pós-transplante.

12.4 Cidofovir

O cidofovir é um nucleosídeo análogo da citosina e seu nome químico é (S)-1[3-hidroxido-2(phosphorylmethoxy)propyl] cytosine. O cidofovir só deve ser usado quando outros agentes terapêuticos são considerados inadequados (66).

Cidofovir tem sido associado com toxicidade renal moderada, similar ao descrito para foscarnet em análise retrospectiva de experiências clínicas realizadas em centros da Europa (120).

Quadro 6. Posologia do cidofovir – Dose padrão para o tratamento do HCMV

Dose padrão para tratamento do HCMV
<i>Tratamento de indução:</i> 5 mg/kg (em perfusão intravenosa a débito constante), administrada uma vez por semana, durante duas semanas consecutivas.
<i>Tratamento de manutenção:</i> 5 mg/kg (em perfusão intravenosa a débito constante), administrada de duas em duas semanas. Inicia-se duas semanas após completar o tratamento de indução.

Objetivos

OBJETIVOS

Considerando-se a significativa morbi-mortalidade associada ao Citomegalovírus Humano em pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) e a necessidade do uso de técnicas laboratoriais sensíveis e específicas capazes de diagnosticar precocemente e monitorizar a infecção ativa pelo HCMV nesses pacientes, este trabalho teve como objetivos:

- ✓ Monitorizar, prospectivamente, pacientes submetidos a TCTH, em relação à infecção ativa e doença causadas pelo HCMV utilizando as técnicas de antigenemia, Nested-PCR e Real-time PCR;
- ✓ Padronizar o “cut-off” da Real-time PCR para o diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV;
- ✓ Determinar os atributos das técnicas laboratoriais utilizadas a saber: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e precocidade no diagnóstico de cada técnica.

Capítulo I

CAPÍTULO I

(Artigo Submetido – BMC Infectious Disease)

Surveillance of active Human Cytomegalovirus infection in Hematopoietic Stem Cell Transplantation: search for the optimal cut-off value by Real-time PCR

Renata MB Peres¹, Cláudia RC Costa¹, Paula D Andrade¹, Sandra HA Bonon¹, Dulcinéia M Albuquerque¹, Cristiane de Oliveira¹, Afonso C Vigorito², Francisco JP Aranha², Cármino A de Souza², Sandra CB Costa^{* 1}

¹Department of Clinical Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas – UNICAMP, P.O.Box 6111, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

²Bone Marrow Transplant Unit, Hemocenter, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, P.O.Box 6111, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Email: Renata MB Peres – re_peres@yahoo.com.br; Cláudia RC Costa - claurcc@hotmail.com; Paula D Andrade - paula@fcm.unicamp.br; Sandra HA Bonon - sbonon@unicamp.br; Dulcinéia M Albuquerque – dulmal@unicamp.br ; Cristiane de Oliveira- tytyane@hotmail.com; Afonso C Vigorito - afonso@obelix.unicamp.br ; Francisco JP Aranha – aranha@unicamp.br ; Cármino A de Souza – carmino@pq.cnpq.br ; Sandra CB Costa^{*} - costa@fcm.unicamp.br

^{*}Corresponding author

Abstract

Background: Human cytomegalovirus (HCMV) infection still causes significant morbidity and mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). For this reason it is extremely important the use of sensitive and specific methods for early diagnostic of active HCMV infection and deeper studies about the real clinical relation and correlation these techniques show in order to prevent the disease through HCMV and further complications connected to HCMV.

Methods: After allogeneic HSTC, thirty patients were monitored weekly for active HCMV infection by *pp65* antigenemia, Nested-PCR and Real-time PCR assays during the first 150 days after HSCT.

Results: Using ROC curves, the optimal cut-off value by Real-time PCR was 418.39 copies/ 10^4 of PBL, with sensitivity of 71.4 % and specificity of 89.7 %. Twenty seven (90%) of the 30 analyzed patients had active HCMV infection and 2 (6.66%) developed HCMV disease. Eleven (40.74%) of these 27 patients who had active HCMV infection had occurrence of acute GVHD, 18 (66.66%) had opportunist infection, 5 (18.5%) had chronic rejection and 11 (40.7%) died, one by HCMV disease associated with GVHD and bacterial infection.

Conclusions: Our results suggest that antigenemia, Nested-PCR and Real-time PCR can be used as markers for assessing the monitoring and the introduction of preemptive therapy. The Nested-PCR detected active HCMV infection earlier than antigenemia and Real-time PCR. The optimal cut-off value by Real-time PCR for therapeutic intervention needs to be clearly defined to determine the maximal specificity for HCMV disease.

Background

Human cytomegalovirus (HCMV) infection still causes significant morbidity and mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) [1] and occurs in 50–90% of allogeneic transplant recipients [2].

Prophylaxis with ganciclovir (GCV) during the first 100 days after transplantation results in an effective prevention of HCMV disease in high risk patients, but is also associated with significant myelotoxicity, increased incidence of invasive fungal infection, and late HCMV disease due to delayed HCMV-specific T-cell response recovery [3,4,5]. In recent years, the strategy of dealing with HCMV disease has moved from universal prophylaxis to preemptive antiviral therapy, that has been shown to reduce the risk of HCMV disease [6]. Preemptive therapy reduces overall exposure of these patients to GCV by avoiding unnecessary treatment and by initiating therapy before significant morbidity and mortality, secondary to HCMV occurrence [7].

Thus, it is important early diagnosis guided by appropriate laboratory assays for the control of this infection. The *pp65* antigenemia has been used as a guide for preemptive therapy in patients at risk of developing HCMV disease and to monitor the antiviral response [8,9], while PCR is used to monitor the infection.

The aim of this study was the diagnosis and monitoring of active HCMV infection in allogeneic HSCT patients by three different assays: antigenemia, Nested-PCR and Real-time PCR in peripheral blood, and to define the HCMV DNA levels of virus replication that warrant intervention with antiviral agents to accurately prevent HCMV disease.

Methods

Patients

Between August 2006 and September 2008, 38 consecutive allogenic HSCT with HLA identical sibling donors were carried out. Eight out of 38 patients were excluded because they survived less than 30 days after transplantation. Therefore, 30 patients were considered valuable for this study (Table 1). These patients were monitored prospectively for active HCMV infection using antigenemia, Nested-PCR and Real-time PCR. A total of 557 peripheral blood samples were collected and tested for active HCMV infection by three techniques at weekly intervals from D+0 to D+150 post-transplant. The protocol was designed in accordance with the requirements for research involving human subjects in Brazil, and was approved by the Institutional Ethics Committee.

Table 1. Characteristics of the group studied

Characteristic	
<i>Age – median in years (range)</i>	40.5 (16-56)
<i>Sex – male/female</i>	17/13
<i>Underlying disease – n (%)</i>	
Malignant disease	
Acute lymphocytic leukemia (ALL)	4 (13.33%)
Acute myelogenous leukemia (AML)	10 (33.3%)
Chronic lymphocytic leukemia (CLL)	1 (3.33%)
Chronic myelogenous leukemia (CML)	4 (13.33%)
Non-Hodgkin's lymphoma (NHD)	2 (6.67%)
Hodgkin's disease (HD)	3 (10%)
Multiple myeloma (MM)	1 (3.33%)
Myelofibrosis	2 (6.67%)
Non-malignant disease	

Severe aplastic anaemia (SAA)	3 (10%)
<i>Acute GVHD – (n%)</i>	11 (36.67%)
<i>Pretransplant CMV sorostatus – (n%)</i>	
D+/R+	30 (100%)
<i>Conditioning regimen – (n%)</i>	
Myeloablative transplant	
BU + FLU	7 (23.33%)
BU + Cy	6 (20%)
BU+ Cy + VP-16	3 (10%)
Cy + VP-16 + TBI	2 (6.67%)
Cy + TBI	1 (3.33%)
Non-myeloablative transplant	
FLU + TBI	9 (30%)
FLU + TBI + ARA-C	1 (3.33%)
<i>GVHD prophylaxis – (n%)</i>	
CsP	2 (6.67%)
CsP + MMF	7 (23.33%)
CsP + MTX	20 (66.66%)
CsP + MTX + Mitoxantrone + Cy	1 (3.33%)
<i>Stem cell source</i>	
Bone marrow	15 (50%)
Peripheral blood	15 (50%)
<i>Deaths</i>	13 (43.33%)

GVHD (Graft-versus-host disease); BU (Bussulfan) ; FLU (Fludarabine); Cy (Cyclophosphamide); VP-16 (Etoposide); TBI (Total body irradiation); ARA-C (Cytarabine); CsP (Cyclosporine); MMF (Mycophenolate mofetil); MTX (Methotrexate).

Definitions

Active HCMV infection, HCMV recurrence and HCMV disease were defined according to published recommendations [10]. Active HCMV infection is defined as the isolation of the HCMV virus or detection of viral proteins or nucleic acid in any body fluid or tissue

specimen. In this study we considered one or more positive cells by antigenemia assay and/or two or more consecutive positive Nested-PCR and/or load HCMV ≥ 418.39 copies/ 10^4 peripheral blood leukocytes (PBL) by Real-time PCR. HCMV recurrence is defined as the new detection of HCMV infection in a patient who has had previously documented infection and who has not had virus detected for an interval of at least 4 weeks during active surveillance. HCMV disease was defined when HCMV was demonstrated in biopsy specimens by immunohistochemical analysis and this was accompanied by clinical signs and symptoms [10]. Probable HCMV disease was defined when clinical signs and symptoms are present, but without accomplishment of biopsy.

Preemptive therapy was used to prevent the HCMV disease. Active HCMV infection was treated with GCV (5 mg/Kg twice day, i.v) for 7 days, followed by a maintenance dose of 5 mg/Kg/day, i.v., three times a week for 4 weeks and HCMV disease was treated with GCV (5 mg/Kg twice day, i.v) for 21 days, followed by a maintenance dose of 5 mg/Kg/day, i.v., three times a week for 4 weeks.

HCMV pp65 antigenemia assay

Antigenemia is based on immunocytochemical detection of the early structural, lower matrix protein (*pp65*) in polymorphonuclear leukocytes (PML), as described by Van der Bij *et al.* [11], with some modifications, as described in Bonon *et al.* [12]. Blood samples were collected in EDTA-containing tubes and transferred to the laboratory within 6h. Leukocytes were isolated by dextran sedimentation method, followed by erythrocyte lysis. The cell pellet was suspended in phosphate-buffered saline (PBS), and the polymorphonuclear leukocytes (PML) were then centrifuged to prepare cytopsin slides (3×10^5 of PML per slide). The slides were air-dried and fixed with formaldehyde, then immunostained with

monoclonal antibodies (Iq Products, Netherlands), and reacted with peroxidase-labeled anti-mouse conjugate (HRP, Biotest, Dreieich, Germany). The test was carried out in duplicate. Results were expressed as number of positive cells per slide.

Nucleic acid extraction by manual phenol-chloroform method

HCMV DNA was extracted from peripheral blood collected in EDTA-containing tubes. The erythrocyte were lysed followed by lysis of leukocytes. The sample was transferred to a tube containing 400 µl of extraction buffer (Tris-HCl [10 mM, pH 7.6], KCl [10mM], MgCl₂ [10mM], NaCl [0,4 M], EDTA [2 mM]) and 25 µl of sodium dodecyl sulfate [10%], and incubated at 55°C for 30 minutes. The supernatant was then purified by phenol-chloroform isoamyl alcohol (24:1) followed by purification with chloroform isoamyl alcohol (24:1). DNA was precipitated with ethanol, resuspended in 25µl of distilled water and stored at -20°C until use.

Nested-PCR

HCMV DNA in blood specimens was detected by Nested-PCR using primers, as described by Demmler *et al.* [13] and Shibata *et al.* [14]. HCMV DNA was extracted from peripheral blood by a manual phenol-chloroform method. The primers were selected from the MIE region of HCMV-AD169. The size of the PCR amplification products was 159 base pairs. The same protocol was used to amplify the human β-globin gene sequence to guarantee the quality of the extracted DNA.

Real-time PCR

The sequences of the PCR primers and probe were selected from the US17 region of HCMV AD169. The forward and reverse primers were 5' GAAGGTGCAGGTGCCCTG 3' and 5' GTGTCGACGAACGACGTACG 3', respectively. The Taq Man probe selected between both primers was fluorescence labeled with 6-carboxyfluorescein at the 5' end as the reporter dye and 6-carboxytetramethylrhodamine at the 3' end as the quencher (5' FAM ACGGTGCTGTAGACCCGCATACAAA TAMRA3'). A search of databases indicated that neither the primers nor the probes shared significant homology with any known nucleotide sequence. The reference standard curve for calibration of HCMV copy numbers was constructed inserting the US17 amplicon, respectively, into a plasmid *PROMEGA P GEM – T Easy Vector System I* (promega), using a cloning strategy and propagated in competent *Escherichia coli* cells. For this construct, plasmid DNA was purified in columns with SV Wizard Purification System (*Promega*) and DNA concentration was determined by measuring OD260 using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer and the corresponding copy number was then calculated. The construct was serially diluted in water within a range of 10^2 to 10^7 copies / μ l. The Real-time PCR was performed with a 12 μ l mixture containing: 3mM MgCl₂; 10 μ M dATP, dCTP, dGTP , dTTP; 5 U/ μ l of Platinum Taq (Invitogen), 60ng DNA templates, 150nM of the forward and reverse primers (HCMVUS17F-HCMVUS17R for HCMV detection) and 2 μ M of the specific Taq Man probe (PE Applied Biosystems). The PCR was performed in 96-well microliter plates under the follow conditions: 1 cycle at 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes and 45 cycles at 95°C 15 seconds and 60°C for 1 minute. The β -actin gene amplification was performed under the same PCR conditions described above for the reaction control using 2 μ M β -actin

Probe (FAM™ Probe), 3uM β-actin Forward Primer, and 3uM β-actin Reverse Primer (TaqMan® β-actin Detection Reagents).

Statistical analysis

Receiver operating characteristic (ROC) plot analysis was performed to determine a threshold value of the HCMV DNA load in peripheral blood leukocytes (PBL) for initiating treatment. Using 1 *pp65* antigen positive cell/3x10⁵ of PML as the reference standard, the sensitivities and specificities were calculated to determine optimal cut-off value for HCMV DNA copies. ROC curves of sensitivity versus (1-specificity) were plotted for each cut-off value of HCMV DNA copies. Probability density function (pdf) was used to describe the probability of active HCMV infections occurrence during the period of monitoring. A contingency table was used to calculate the sensitivity, specificity and positive (PPV) and negative predictive values (NPV) of the Nested-PCR and Real-time PCR using *pp65* antigenemia ≥ 1 *pp65* antigen positive cell as the reference standard. The Fisher's exact test was used to calculate the probability of association between active HCMV infection and HCMV disease, acute GVHD, opportunist infection, graft rejection and death.

Results

ROC curve analysis

Using ROC curves, optimal cut-off points for viral load performed by Real-time PCR in peripheral blood leukocytes (PBL) were calculated for one specific antigenemia value: ≥ 1 positive cell/3x10⁵ of PML. The optimal cut-off value for Real-time PCR in peripheral blood leukocytes was 418.39 copies/10⁴ of PBL, with a sensitivity of 71.4% and specificity of 89.7 % (Figure 1).

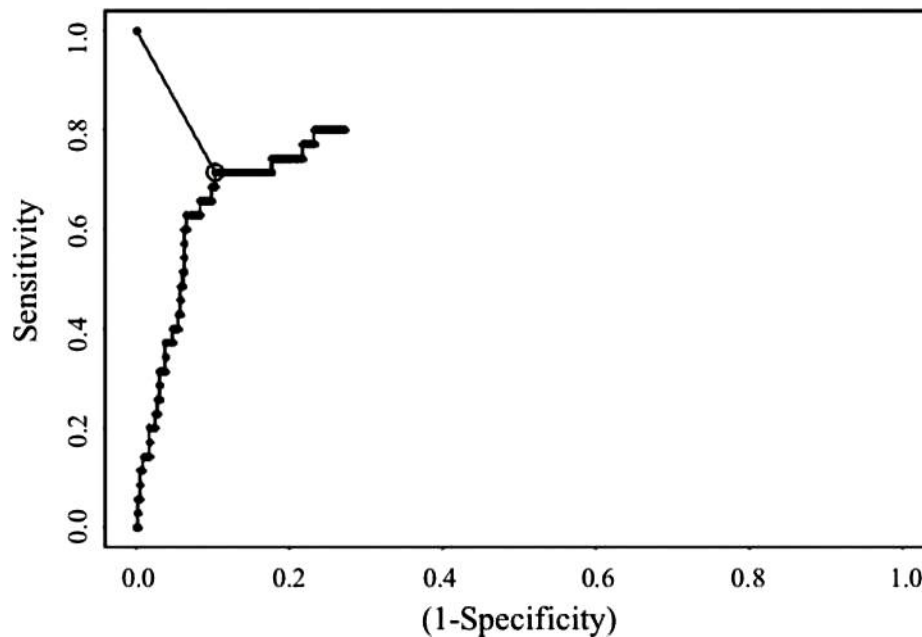


Figure 1. ROC curve analysis for antigenemia value of ≥ 1 pp65-positive cells/200000 leukocytes from PBMC for establishing the optimal level cut-off for Real-time PCR

Active HCMV infection

The highest incidence of active HCMV infections occurred during the second month (31 – 60 days) post transplant with a percentage of active HCMV infection of 76.67% and maximum value of probability density of 0.010 at day 44.38 after HSCT (Figure 2). Twenty seven (90%) of the 30 analyzed patients had active HCMV infection, 9 (30%) had recurrence of HCMV infection, 2 developed probable HCMV disease (6.67%) and 2 (6.67%) developed HCMV disease. Twenty seven (90%) of the 30 analyzed patients had active HCMV infection, detected by antigenemia and/or Nested-PCR and/or Real-time PCR. Twenty one (77.78%) of the 27 patients who had active HCMV infection received preemptive antiviral therapy, 11 (40.74%) had occurrence of acute graft-versus host disease

(GVHD), 18 (66.67%) had opportunist infection, 5 (18.51%) had chronic rejection and 11 (40.74%) died (Table 2).

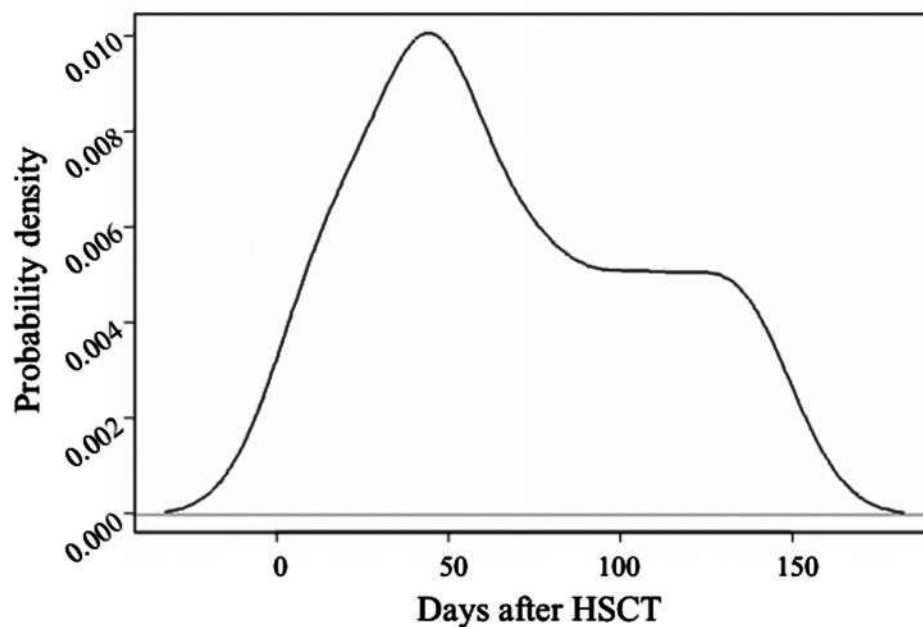


Figure 2. Probability density of active HCMV infection during the first 150 days after HSCT

Table 2. Occurrence of active HCMV infection *versus* complications associated with HSCT

Active HCMV Infection					
	Positive	Negative	Median (days)	Range	<i>p</i> [*]
Recurrence of Active HCMV Infection	9/27	0/3	114	46 – 152	NS
HCMV Disease	2/27	0/3	86.5	80 – 93	NS
Acute GVHD	11/27	0/3	77	26 – 96	NS
Opportunist Infection	18/27	3/3	20	3 – 348	NS
Graft Rejection	5/27	0/0	166	51 – 199	NS
Death	11/27	2/3	203	33 – 534	NS

HCMV, human cytomegalovirus; GVHD, graft-versus host disease; NS, not significant; ^{*}Fisher's exact test.

Comparisons of the pp65 antigenemia assay, Nested-PCR and Real-time PCR

A total of 557 weekly samples were obtained from 30 patients and analyzed by antigenemia, Nested-PCR and Real-time PCR assays. A total of 35 samples obtained from 13 patients were positive by antigenemia assay, 154 samples from 21 patients were positive by Nested-PCR and 78 samples from 23 patients were positive by Real-time (Table 3). Ten patients were positive by three assays (antigenemia, Nested-PCR and Real-time PCR), 2 patients were positive by antigenemia and Real-time PCR, 1 patient was positive by antigenemia and Nested-PCR, 7 patients were positive by Nested-PCR and Real-time PCR, 4 patients were positive by Real-time PCR only and 3 patients were positive by Nested-PCR only. The sensitivity and specificity of the antigenemia were 52.38% and 77.77%, and the positive predictive value (PPV) and the negative predictive value (NPV) were 84.61% and 41.17%. The Nested-PCR showed a sensitivity of 84.61%, specificity of 41.18%, PPV of 52.38% and NPV of 77.78% and the Real-time PCR presented the sensitivity of 92.3%, specificity of 35.3%, PPV of 52.17% and NPV of 85.71% (Table 4).

Table 3. Comparison between Antigenemia, Nested-PCR and Real-time results

	Antigenemia*		Total
	Positive	Negative	
Nested-PCR			
Positive	11	10	21
Negative	2	7	9
Total	13	17	
Real-time			
Positive	12	11	23
Negative	1	6	7
Total	13	17	

*Antigenemia was the reference standard.

Table 4. Results of contingency table analysis using *pp65* antigenemia was the reference standard

	Antigenemia	Nested-PCR	Real-time PCR
Sensitivity	52.38%	84.61%	92.3%
Specificity	77.77%	41.18%	35.3%
PPV	84.61%	52.38%	52.17%
NPV	41.17%	77.78%	85.71%
Reference Standard	Nested-PCR	Antigenemia	Antigenemia

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Time to detection of *pp65* antigenemia, Nested-PCR and Real-time PCR in transplanted patients

Thirteen (43.33%) of the 30 patients monitored developed positive *pp65* antigenemia after a median of 40 days (range 29–152 days), 21 (70%) developed a consecutive positive Nested-PCR after a median of 33 days (range 0–126 days), while 23 (76.66%) developed positive Real-time PCR after a median of 40 days (range 0 - 119 days) from HSCT (Table 5).

Table 5. Time to until detection of active HCMV infection by antigenemia, Nested-PCR and Real-time PCR

	N° Patients	Median (days after TCTH)	Range
Patients with active HCMV infection	27 (90%)	33	0 - 119
Positive antigenemia (%)	13 (43.33%)	40	29 - 152
Positive Nested-PCR (%)	21 (70%)	33	0 - 126
Positive Real-time PCR (%)	23 (76.66%)	40	0 - 119

HCMV, human cytomegalovirus.

Incidence of HCMV disease and probable HCMV disease

Two of the 30 patients developed HCMV disease after a median of 86.5 days (range 80-93 days) from HSCT and both had gastrointestinal disease with demonstration of HCMV infection in gastrointestinal tract biopsy specimens. Two patients had probable HCMV disease after a median of 70.5 days (range 30-111 days) from HSCT, 1 had gastrointestinal infection and other had interstitial pneumonia, both without accomplishment of biopsy. The patient who had interstitial pneumonia died of this cause at 33 days after HSCT.

Causes of death

Thirteen (43.33%) of the 30 patients monitored died after a median of 203 days (33 - 534 days) from HSCT: five due to disease progression (two acute lymphocytic leukemia, one acute myelogenous leukemia, one Hodgkin's disease and one myelofibrosis), one by HCMV disease associated with GVHD and bacterial infection, one by probable HCMV disease, two by *Fusarium*, one by *Acinetobacter baumannii*, one by pericarditis, one by fungal sinusitis and one by fungal infection.

Discussion

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is an important therapeutic tool for malignant and non-malignant disorders and HCMV reactivation is common in this population of patients due to the immunocompromised state of patients [15].

The impact of HCMV infection on this patients extends beyond direct clinical manifestations (e.g. pneumonitis, gastrointestinal diseases, hepatitis, marrow suppression) and includes indirect effects such as increased incidence of other opportunistic infections and decreased patient survival [16,17]. Other HCMV-associated problems in this patient

population include severe acute graft-versus host disease (GVHD) and even death from myelosuppression [18]. In addition to direct disease, many groups over the past three decades have implicated HCMV in the acceleration of long-term disease processes such as increased graft loss due to acute and chronic rejection in HSCT patients [18].

Prophylactic treatment with GCV has been used to decrease the incidence of HCMV disease, however, GCV may also lead to unnecessary drug toxicity and the development of resistant strains [19]. Preemptive antiviral therapy is more appropriate for preventing HCMV disease. It consists of the administration of antiviral agents after transplantation to individuals with microbiological markers that predict HCMV disease [9,20].

Despite major advances in treatment and prevention, HCMV infections remain an important cause of morbidity and mortality in HSCT recipients [21]. The highest incidence of HCMV infections occurs during the first 3 post-transplant months [22], secondary to the greatest degree of immunosuppression [23,24,25]. In our study, the highest incidence of active HCMV infections occurred during the second month (31 – 60 days) post-transplant with a percentage of active HCMV infection of 76.67% and maximum value of probability density of 0.010 in the 44.38 days after HSCT, corroborating data in the literature.

Different techniques, with different sensitivities, can be utilized to diagnose HCMV infection. However, HCMV DNA can be detected in a substantial number of patients not at risk of HCMV disease, so that it's necessary to define an optimal cut-off value to distinguish between the latent and active forms of the infection [26]. Preemptive therapy strategies require monitoring by highly predictive tests for HCMV disease and the most often assays are the *pp65* antigenemia and HCMV DNA assays [21,22]. Many studies have shown that the amount of HCMV DNA in blood is significantly associated with disease development [27,28,29].

We used 3 different detection assays for monitoring active HCMV infection in HSTC recipients: antigenemia, Nested-PCR and Real-time PCR.

pp65 Antigenemia is the reference standard test for the early diagnosis of HCMV infection and is widely used for guiding HCMV therapy [3]. Preemptive antiviral therapy, based on *pp65* antigenemia, is associated with a reduction in the incidence of HCMV disease in allogeneic HSCT recipients [30] and the number of HCMV positive cells in the peripheral blood reflects the viral load and high numbers of *pp65* positive cells correlate with HCMV disease [31,32]. However, the antigenemia assay has some disadvantages: low sensitivity for detecting early active HCMV infection or disease that may occur before engraftment, due to the lack of leukocytes during the period of aplasia, low positive predictive value for the occurrence of HCMV gastroenteritis [9,33,34], requirement for processing of the blood samples within a few hours, lengthy method and inability to be automated. Furthermore, Germa *et al.* [35,36] demonstrated poor correlation by antigenemia with virus replication in SOT recipients with primary HCMV infections. A similar phenomenon was observed in HSCT recipients, in whom the myeloablation caused by total body irradiation simulated the occurrence of a primary HCMV infection with increasing antigenemia and decreasing or stable DNAemia levels during ganciclovir therapy [37].

A significant number of positive *pp65* cells must be defined to initiate the antiviral treatment in transplant recipients. In our BMT (Bone Marrow Transplant) Unit, preemptive therapy is initiated upon a result ≥ 1 positive *pp65* cell/ 3×10^5 of PML and/or two or more consecutive positive Nested-PCR with an incidence of HCMV disease of 6%.

The Nested-PCR is a qualitative PCR and, for this reason, may not discriminate latent HCMV infection from replicating HCMV infection. Other studies [38,39,40,41] have shown that the sensitivity of this assay was 100%, but that the specificity for HCMV

disease was less than 50%. We found a sensitivity of 84.61% and specificity of 41.18%, using the antigenemia as the reference standard.

Real-time PCR, a quantitative PCR assay, has been recently evaluated for diagnosing and monitoring active HCMV infection after allogenic HSCT. However, evaluation of the exact role of the previously reported Real-time PCR assays in guiding preemptive HCMV therapy in allogenic HSCT recipients remains difficult, due to differences in the origin of samples (whole blood, plasma, serum, peripheral blood mononuclear cells, peripheral blood leukocytes) [21] and the different protocols used in each study. Moreover, this assay is too sensitive and may detect HCMV DNA load in asymptomatic patients, who never develop HCMV disease, as such establishment of a cut-off value of HCMV DNA level is necessary to initiate the antiviral therapy to prevent disease. We used a protocol, standardized in house, and established a cut-off value of 418.39 copies/ 10^4 of PBL for antigenemia value ≥ 1 positive *pp65* of PML.

In our study, 30 patients who received HSCT were included. The incidence of active HCMV infection was high (27 of 30 patients, 90%), after a median of 33 days (range 0–119 days) after HSCT. The Nested-PCR detected active HCMV infection earlier (median 33 days) than antigenemia (median 40 days) and Real-time PCR (median 40 days). The recurrence was observed in 9 patients (30%) and only 2 patients had HCMV disease, both in the gastrointestinal tract at 86.5 days (80 – 93 days) after HSCT. The late onset of HCMV disease is in accordance with published reports [42,43]. Ruel *et al.* [42] noted a low level of HCMV disease in HSCT and in 88% of analyzed patients with HCMV disease, disease onset was observed at 100 days post transplant. Einsele *et al.* [43] confirmed that later disease onset was seen in the era of PCR monitoring and preemptive treatment.

Viral load kinetics has been reported to be predictive for the development of HCMV disease with the initial viral load and the initial rate of increase in viral load being independent risk factors [27].

Two patients had HCMV gastrointestinal disease in our study. The first patient had a peak viral load by Real-time PCR at D+37 (766.48 copies), and initiated preemptive therapy in D+49. At D+80 HCMV disease was diagnosed by biopsy. Results before this date were negative in three assays because this patient was in treatment with GCV until D+79. At D+84 Real-time PCR detected 770.43 copies and in D+91 antigenemia detected 3 positive *pp65* cells starting preemptive therapy again. At D+140 Real-time PCR detected 73084.04 and by antigenemia 1 positive *pp65* cell was diagnosed. At D+149 657.02 copies and 80 positive *pp65* cells were diagnosed.

The other patient who had HCMV disease presented a peak viral load by Real-time PCR at D+20 (2845.65 copies) and at D+27 (8487.29 copies) was initiated preemptive antiviral therapy. At D+49 2009.50 copies was detected by Real-time PCR and at D+56 1 positive *pp65* cell was diagnosed. At D+93 HCMV disease was diagnosed by biopsy together with acute GVHD, being detected by Nested-PCR, only. Real-time PCR obtained positive results at D+132 (1499.03 copies), D+139 (28721.38 copies), D+146 (35406.32 copies), D+153 (10391.48 copies).

In the presence of organ involvement, the virus and its components can be detected in tissue biopsies and fluids, such as bronchoalveolar lavage, aqueous humour and cerebrospinal fluid, and less frequently in peripheral blood [44]. Moreover, despite the high sensitivity for the detection of viral reactivation before the onset of HCMV pneumonitis, HCMV antigenemia does not necessarily precede the onset of other HCMV diseases, [34] as seen in our patients with gastrointestinal HCMV disease.

Emery *et al.* showed that both the initial viral loads and the change in viral loads were independent risk factors for the development of HCMV disease not only in allogeneic HSCT patients but also in kidney and liver transplant recipients [27] and Ljungman *et al.* concluded that viral load kinetics after initiation of antiviral therapy is predictive of the risk of developing HCMV disease. Patients who responded slower had a higher risk [45].

Only one (3.33%) of 30 patients, monitored in this study died by HCMV disease, in agreement with the low rates of HCMV-related mortality cited in published reports [46,47]. This patient died at D+252 after HSCT by HCMV disease associated with GVHD and bacterial infection. During this period, the surveillance was no longer being carried out because the period considered for our study was between D+0 and D+150 after HSCT. Antigenemia assay was performed as clinical routine and the values found were: D+182 (+695 cells), D+189 (+1127 cells), D+196 (+22 cells), D+203 (+50 cells), D+217 (+20 cells), D+226 (+10 cells), D+233 (+250 cells) and D+238 (+700 cells).

The optimal cut-off value by Real-time PCR for therapeutic intervention needs to be clearly defined to determine the maximal specificity for HCMV disease, and to define its value for prognosis and use in therapeutic clinical trials. We propose a HCMV DNA load of 418.39 copies/ 10^4 PBL as a threshold level to start an antiviral therapy in HSCT patients. Graffari *et al.* previously defined a positive cut-off value of higher than 1000 copies/ 2×10^5 of PBL in HSCT recipients [48]. It is difficult to compare data from different centers because Real-time PCR methods are not well standardized and use different target sequences, primer sets, and extraction and detection methods, which result in different analytical performances [49].

Conclusion

The low incidence of HCMV disease in HSCT recipients in our study attests to the efficacy of HCMV surveillance, based on the *pp65* antigenemia assay and Nested-PCR (assay used in clinical routine), and the cut-off value by Real-time PCR proposed for us presented good clinical correlation with HCMV disease. For this reason we think Real-time PCR can be used complementarily to antigenemia screening to monitor preemptive therapy for present high sensitivity, besides be an alternative for HCMV diagnoses in cases of samples collected before engraftment due to the lack of leukocytes during the period of aplasia, in neutropenic patients and in occurrence of HCMV gastrointestinal disease.

List of Abbreviations

HCMV: human cytomegalovirus,

HSCT: hematopoietic stem cell transplantation,

ROC: receiver operating characteristic,

PBL: peripheral blood leukocytes,

GVHD: graft-versus host disease,

GCV: ganciclovir,

PCR: polymerase chain reaction,

HLA: human leukocyte antigen,

PML: polymorphonuclear leukocytes,

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid,

PBS: phosphate-buffered saline,

pdf: probability density function,

PPV: positive predictive value,

NPV: negative predictive value,

SOT: solid organ transplant,

BMT: bone marrow transplant,

Competing interest

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

All the authors contributed substantially to the study. RMBP and CRCC designed the study, contributed to data analysis, carried out the immunoassays and wrote the manuscript. PDA and SHAL contributed to data analysis and drafted the manuscript. DMA and CO carried out the immunoassays. ACV, FJPA and CAS coordinated and participated in the study. SCBC contributed to design of the study, conducted and coordinated the laboratory studies and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Roberto Zulli for statistical analysis and Nicola Amanda Conran Zorzetto for revising the English.

References

1. Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, Bowden RA, Huang ML, Myerson D, Stevens-Ayers T, Flowers ME, Cunningham T, Corey L: **Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity.** *Blood* 2003, **101**:407-414.

2. Laso JF: **Diagnostico Diferencial en Medicina Interna**. 2 ed. Barcelona: *Elsevier Espanã*. 2005. 497p.
3. Boeckh M, Gooley T A, Meyerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA: **Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study**. *Blood* 1996, **88**:4063-4071.
4. Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, Keller C, Schoch G, Meyers JD: **Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant**. *Ann Intern Med* 1993, **118**:173-178.
5. Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR: **Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis**. *Blood* 1994, **83**:1971-1979.
6. Kusne S, Grossi P, Irish W, St George K, Rinaldo C, Rakela J, Fung J: **Cytomegalovirus pp65 antigenemia monitoring as a guide for preemptive therapy: A cost effective strategy for prevention of cytomegalovirus disease in adult liver transplant recipients**. *Transplantation* 1999, **68**:1125-1131.
7. Tong CY, Cuevas L, Williams H, Bakran A: **Use of laboratory assays to predict cytomegalovirus disease in renal transplant recipients**. *J Clin Microbiol* 1998, **36**:2681-2685. (Erratum in 1999; 37:881).
8. Patel R, Paya CV: **Infections in solid organ transplant recipients**. *Clin Microbiol Rev* 1997, **10** (1):86-124.
9. Boeckh M, Boivin G: **Quantification of Cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications**. *Clin Microbiol Rev* 1998, **11**:5333-5354.

10. Ljungman P, Griffiths P, Paya C: **Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients.** *Clin Infect Dis* 2002, **34**:1094-1097.
11. van der Bij W, Schirm J, Torensma R, van Son WJ, Tegzess AM, The TH: **Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood.** *J Clin Microbiol* 1988, **26(12)**:2531-2535.
12. Bonon SH, Menoni SM, Rossi CL, De Souza CA, Vigorito AC, Costa DB, Costa SC: **Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients.** *J Infect* 2005, **50**:130–137.
13. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA: **Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification.** *J Infect Dis* 1988, **158**:1177-1184.
14. Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM, Arnheim N: **Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus.** *J Infect Dis* 1988, **158**:1185-1192.
15. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M: **High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection.** *J Infect Dis* 2002, **185**:273-282.
16. Boeckh M, Nichols WG: **Immunosuppressive effects of betaherpesviruses.** *Herpes* 2003, **10**:12-16.
17. Gentile G, Capobianchi A, Ferraironi M, Greco E, Martino P: **Relationship of serum human herpesvirus 6 DNA with cytomegalovirus pp65 antigenemia in allogeneic bone marrow transplant recipients.** *Transplantation* 2004, **77**:1907-1908.

18. Streblow DN, Orloff SL, Nelson JA: **Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus.** *Curr Opin Immunol* 2007, **19**:577–582.
19. Limaye AP, Corey L, Koelle DM: **Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants.** *Lancet* 2000, **356**:645-649.
20. Singh N: **Cytomegalovirus infection of liver transplant recipients: Comparison of antigenemia and molecular biology assays.** *Liver Transpl* 2001, **7**(11):1004–1007.
21. Gentile G, Picardi A, Capobianchi A, Spagnoli A, Cudillo L, Dentamaro T, Tendas A, Cupelli L, Ciotti M, Volpi A, Amadori S, Martino P, de Fabritiis P: **A prospective study comparing quantitative Cytomegalovirus (CMV) polymerase chain reaction in plasma and pp65 antigenemia assay in monitoring patients after allogeneic stem cell transplantation.** *BMC Infect Dis* 2006, **6**:167.
22. Schroeder R, Michelon T, Fagundes I, Bortolotto A, Lammerhirt E, Oliveira J, Santos A, Bittar A, Keitel E, Garcia V, Neumann J, Saitovitch D: **Cytomegalovirus disease latent and active infection rates during the first trimester after kidney transplantation.** *Transplant Proc* 2004, **36**:896-898.
23. Opelz G, Döhler B, Ruhenstroth A: **Cytomegalovirus prophylaxis and graft outcome in solid organ transplantation: a collaborative transplant study report.** *Am J Transplant* 2004, **4**:928-936.
24. Borchers AT, Perez R, Kaysen G, Ansari AA, Gershwin ME: **Role of cytomegalovirus infection in allograft rejection: a review of possible mechanisms.** *Transplant Immunol* 1999, **7**:75-82.

25. Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, Sund S, Scott H, Degré M, Foss A, Leivestad T, Osnes K, Fauchald P, Rollag H: **The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients.** *Am J Transplant* 2002, **2**:850-856.
26. Grangeot-Keros L, Cointe D: **Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection.** *J Clin Virol* 2001, **21**:213–221.
27. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD: **Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation.** *Lancet* 2000, **355**:2032-2036.
28. Razonable RR, Brown RA, Wilson J, Groettum C, Kremers W, Espy M, Smith TF, Paya CV: **The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease.** *Transplantation* 2002, **73**:968-973.
29. Wolf DG, Spector SA: **Early diagnosis of human cytomegalovirus disease in transplant recipients by DNA amplification in plasma.** *Transplantation* 1993, **56**:330-334.
30. Boeckh M, Huang M, Ferrenberg J, Stevens-Ayers T, Stensland L, Nichols WG, Corey L: **Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:1142-1148.
31. Gerna G, Furione M, Baldanti F, Percivalle E, Comoli P, Locatelli F: **Quantitation of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients.** *Br J Haematol* 1995, **91**:674-683.
32. Boeckh M, Bowden RA, Goodrich JM, Pettinger M, Meyers JD: **Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes (PBL) after allogeneic marrow transplantation.** *Blood* 1992, **80**:1358-1364.

33. Jang EY, Park SY, Lee EJ, Song EH, Chong YP, Lee SO, Choi SH, Woo JH, Kim YS, Kim SH: **Diagnostic Performance of the Cytomegalovirus (CMV) Antigenemia Assay in Patients with CMV Gastrointestinal Disease.** *Clin Infect Dis* 2009, **48(12)**:e121-124.
34. Mori T, Okamoto S, Matsuoka S, Yajima T, Wakui M, Watanabe R, Ishida A, Iwao Y, Mukai M, Hibi T, Ikeda Y: **Risk-adapted pre-emptive therapy for cytomegalovirus disease in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation.** *Bone Marrow Transplant* 2000, **25**:765-769.
35. Gerna G, Percivalle E, Torsellini M, Revello MG: **Standardization of the human cytomegalovirus antigenemia assay by means of in vitro-generated pp65-positive peripheral blood polymorphonuclear leukocytes.** *J Clin Microbiol* 1998, **36**:3585–3589.
36. Gerna G, Zavattoni M, Baldanti F, Sarasini A, Chezzi L, Grossi P, Revello MG: **Human cytomegalovirus (HCMV) leukoDNAemia correlates more closely with clinical symptoms than antigenemia and viremia in heart and heart-lung transplant recipients with primary HCMV infection.** *Transplantation* 1998, **65**:1378–1385.
37. Gerna G, Lilleri D, Baldanti F, Torsellini M, Giorgiani G, Zecca M, De Stefano P, Middeldorp J, Locatelli F, Revello MG: **Human cytomegalovirus immediate-early mRNAemia versus pp65 antigenemia for guiding pre-emptive therapy in children and young adults undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective, randomized, open-label trial.** *Blood* 2003, **101**:5053–5060.
38. Patel R, Smith TF, Espy M, Portela D, Wiesner RH, Krom RA, Paya CV: **A prospective comparison of molecular diagnostic techniques for the early detection of cytomegalovirus in liver transplant recipients.** *J Infect Dis* 1995, **171**:1010–1014.

39. Patel R, Smith TF, Espy M, Wiesner RH, Krom RA, Portela D, Paya CV: **Detection of cytomegalovirus DNA in sera of liver transplant recipients.** *J Clin Microbiol* 1994, **32**:1431–1434.
40. Blank BS, Meenhorst PL, Mulder JW, Weverling GJ, Putter H, Pauw W, van Dijk WC, Smits P, Lie-A-Ling S, Reiss P, Lange JM: **Value of different assays for detection of human cytomegalovirus(HCMV) in predicting the development of HCMV disease in human immunodeficiency virus-infected patients.** *J Clin Microbiol* 2000, **38(2)**:563–569.
41. Preiser W, Bräuninger S, Schwerdtfeger R, Ayliffe U, Garson JA, Brink NS, Franck S, Doerr HW, Rabenau HF: **Evaluation of diagnostic methods for the detection of cytomegalovirus in recipients of allogeneic stem cell transplants.** *J Clin Virol* 2001, **20**:59–70.
42. Ruell J, Barnes C, Mutton K, Foulkes B, Chang J, Cavet J, Guiver M, Menasce L, Dougal M, Chopra R: **Active CMV disease does not always correlate with viral load detection.** *Bone Marrow Transplant* 2007, **40**:55-61.
43. Einsele H, Hebart H, Kauffmann-Schneider C, Sinzger C, Jahn G, Bader P, Klingebiel T, Dietz K, Löffler J, Bokemeyer C, Müller CA, Kanz L: **Risk factors for treatment failres in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection.** *Bone Marrow Transplant* 2000, **25**:757-763.
44. Baldanti F, Lilleri D, Gerna G: **Human cytomegalovirus load measurement and its applications for pre-emptive therapy in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation.** *Hematol Oncol* 2008, **26(3)**:123-130.
45. Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J, Avetisyan G, Sparrelid E, Aschan J, Barkholt L, Larsson K, Winiarski J, Yun Z, Ringdén O: **Risk factors for the development of**

cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006, **91(1)**:78-83.

46. Machado CM, Dulley FL, Boas LS, Castelli JB, Macedo MC, Silva RL, Pallota R, Saboya RS, Pannuti CS: **CMV pneumonia in allogenic BMT recipients undergoing early treatment or pre-emptive ganciclovir therapy.** *Bone Marrow Transplant* 2000, **26**: 413-417.

47. Martino R, Caballero MD, Canals C, San Miguel J, Sierra J, Rovira M, Solano C, Bargay J, Pérez-Simon J, León A, Sarrá J, Brunet S, de la Cámara R; alloPBSCT and Infectious/noninfectious Complications Subcommittees of the Grupo Español de Transplante Hematopoyético (GETH): **Reduced-intensity conditioning reduces the risk of severe infections after allogenic peripheral blood stem cell transplantation.** *Bone Marrow Transplant* 2001, **28**:341-347.

48. Ghaffari SH, Obeidi N, Dehghan M, Alimoghaddam K, Gharehbaghian A, Ghavamzadeh A: **Monitoring of Cytomegalovirus Reactivation in Bone Marrow Transplant Recipients by Real-time PCR.** *Pathol Oncol Res* 2008, **14(4)**:399-409.

49. Gimeno C, Solano C, Latorre JC, Hernández-Boluda JC, Clari MA, Remigia MJ, Furió S, Calabuig M, Tormo N, Navarro D: **Quantification of DNA in Plasma by an Automated Real-Time PCR Assay (Cytomegalovirus PCR Kit) for Surveillance of Active Cytomegalovirus Infection and Guidance of Preemptive Therapy for Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients.** *J Clin Microbiol* 2008, **46(10)**:3311-3318.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ O valor de cut-off da Real-time PCR, padronizado neste estudo em 418,39 cópias do DNA viral/ 10^4 leucócitos mostrou-se eficaz para a diferenciação entre infecção latente de infecção ativa pelo HCMV no grupo estudado;
- ✓ Observou-se uma alta taxa de infecção ativa pelo HCMV nos pacientes monitorizados, sendo a Nested-PCR o teste que diagnosticou mais precocemente a infecção ativa pelo HCMV;
- ✓ O período considerado crítico para infecção ativa pelo HCMV nos pacientes estudados foi o segundo mês pós-TCTH, com valor máximo de densidade de probabilidade no dia 44,38 pós-TCTH;
- ✓ A monitorização semanal e o tratamento precoce baseado nas técnicas realizadas foram eficazes na evolução dos pacientes, onde somente sete por cento dos pacientes que apresentaram infecção ativa pelo HCMV, desenvolveram doença por HCMV;
- ✓ Embora a monitorização semanal e o tratamento precoce tenham sido eficazes no diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV, a taxa de mortalidade pelo HCMV foi alta, onde, dos dois pacientes que desenvolveram doença por HCMV, um (50%) evoluiu a óbito por este motivo.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Szczepura A, Westmoreland D, Vinogradova Y, Fox J, Clark M. Evaluation of techniques in prediction and diagnosis of cytomegalovirus disease in immunocompromised patients. *Health Technol Assess*. 2006; 10: 1-176.
2. Kochs S, Solana R, Dela Rosa O, Pawelec G. Human cytomegalovirus infection and T cell immunosenescence: A mini review. *Mech Ageing Dev*. 2006; 1-6.
3. Mendelson E, Aboudy Y, Smetana Z, Tepperberg M, Grossman Z. Laboratory assessment and diagnosis of congenital viral infections: Rubella, cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), herpes simplex virus (HSV), parvovirus B19 and human immunodeficiency virus (HIV). *Reprod Toxicol*. 2006; 21: 350-82.
4. Miller CS, Avdiushko SA, Kryscio RJ, Danaher RJ, Jacob RJ. Effect of prophylactic valacyclovir on the presence of Human Herpesvirus DNA in saliva of healthy individuals after dental treatment. *J Clin Microbiol*. 2005; 5: 2173-80.
5. Brown HL, Abernathy MP. Cytomegalovirus Infection. *Semin Perinatol*. 1998; 22(4): 260-66.
6. Costa SCB. Infecção por Citomegalovírus (CMV): Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento. *Revista Brasileira de Clínica Terapêutica*. 1999; 25(1): 18-28.
7. Stinski MF. Cytomegalovirus and Its Replication. In: Fields BN, Knipe DM. *Virology*, 2 ed. New York: Raven Press Ltda; 1990. 1959-80.
8. Mustafa MM. Cytomegalovirus Infection and Disease in the Immunocompromised Host. *Pediatr Infect Dis J*. 1994; 13: 249-59.
9. Alford CA, Britt WJ. Cytomegalovirus. In: Fields BN, Knipe DM. *Virology*, 2ª ed., New York: Raven Press Ltda; 1990. 1981-2010.

10. Machado LN, Camandoni VO, Leal KPH, Moscatello ELM. Transplante de Medula Óssea: Abordagem Multidisciplinar. São Paulo: Lemar – Livraria e Editora Marina; 2009. 346p.
11. Hoppe L, Bressane R, Lago LS, Schiavo FL, MAarroni CA, Keiserman DR et al. Risk factors associated with cytomegalovirus-positive antigenemia in orthotopic liver transplant patients. *Transplant Proc.* 2004; 36: 961-3.
12. Gupta M, Diaz-Mitoma F, Feber J, Shaw L, Forget C, Filler G. Tissue HHV6 and HHV7 determination in pediatric solid organ recipients – a pilot study. *Pediatr Transplant.* 2003; 7: 458-63.
13. Hara S, Kimura H, Hoshino Y, Tanaka N, Nishikawa K, Ihira M, et al. Detection of herpesvirus DNA in serum of immunocompetent children. *Microbiol Immunol.* 2002; 46(3): 177-80.
14. Nichols WG, Boeckh M. Recent advances in the therapy and prevention of CMV infections. *J Clin Virol.* 2000; 16: 25-40.
15. Lautenschlager I, Lappalainen M, Linnavuori K, Suni J, Höckerstdt K. CMV infection is associated with concurrent HHV6 and HHV7 antigenemia in liver transplant patient. *J Clin Virol.* 2002; 57-61.
16. Krause PR, Straus SE. Herpesvirus Vaccines. *Infect Dis Clin North Am.* 1999; 13(1): 61-81.
17. Hernando S, Folgueira L, Lumbreras C, Juan San R, Maldonado S, Prieto C et al. Comparison of cytomegalovirus viral load measure by real-time PCR with pp65 antigenemia for the diagnosis of cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients. *Transplant Proc.* 2005; 37: 4094-6.

18. Lassener D, Geissler F, Bosse S, Hofmann J, Witzigmann H, Remke H et al. Diagnosis and monitoring of acute cytomegalovirus infection in peripheral blood of transplant recipients by nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Transpl Int.* 2000; 13: 366-71.
19. Ihira M, Yoshikawa T, Suzuki K, Ohashi M, Suga S, Asonuma K et al. Correlation between Human Herpesvirus 6 and 7 infections after living related liver transplantation. *Microbiol Immunol.* 2001; 45(3): 225-32.
20. Maya TC, Azulay DR. Infecção pelo Citomegalovírus. In: Lupi O, Silva AS, Pereira JrAC. *Herpes: Clínica, Diagnóstico e Tratamento.* 1 ed. Brasil: Medsi Editora Médica e Científica Ltda; 2000. 135-56.
21. Ribbert H. Veber protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Negeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zentralbl Allg Pathol.* 1904; 15: 945-8.
22. Griffiths PD. Cytomegalovirus. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD, Schoub BD. *Principles and Practices of Clinical Virology.* 5 ed. Londres: John Wiley & Sons Ltd; 2004. 79-114.
23. Goodpasture EW, Talbot FB. Concerning the nature of iprotozoan-like cells in certain lesions of infancy. *Am J Dis Child.* 1921; 21: 415-25.
24. Lipschutz B. Untersuchungen über die Aetiologie der Krankheiten d. herpes genitalis, etc. *Arch Dermatol Syphilol.* 1921; 136: 428-82.
25. Plachter B, Singzer C, Jahn G. Cell Types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus advances. *Virus Research.* 1996; 46: 195-261.
26. Farber R S, Wolbach SB. Intranuclear and cytoplasmic inclusions (iprotozoan-like bodies) in the salivary glands and other organs of infants. *Am J Pathol.* 1932; 8:123-35.

27. Smith MG, Vellios F. Inclusion disease or generalized salivary gland virus infection. Arch Pathol. 1950; 50:862-84.
28. Drew WL. Herpesviridae: Cytomegalovirus. In: Lennette EH, Halonen P, Murphy FA. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice. New York: Springer-Verlag; 1988. 247-60, v.2
29. Smith MG. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. Proc Soc Exp Biol Med. 1956; 92: 418-24.
30. Naraqi S. Cytomegaloviruses. In: Belshe RB. Textbook of Human Virology. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc; 1990. 889-922.
31. Rubin RH. Introduction to the Symposium. Rev Infect Dis. 1990; 12(Suppl.): 691-2.
32. Riley JR. History of the Cytomegalovirus. South Med J; 1997 Feb. Disponível em: <http://www.sma.org/smj/97feb4.htm>
33. Weller TH, Hanshaw JB, Scoth DE. Serological differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. Virology. 1960; 12: 30-2.
34. Ho M. Cytomegalovirus: Biology and infection. 2 ed. New York: Plenum Publishing Corporation; 1991. 1440p.
35. Reddehase MJ, Lemmermann N. Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology. Intl Specialized Book Service Inc; 2006. 610p
36. Costa SCB, Miranda SRP, Alves G, Rossi CL, Figueiredo LTM, Costa FF. Detection of Cytomegalovirus Infections by PCR in Renal Transplant Patients. Braz J Med Biol Res. 1999; 32: 953-9.
37. Zaia JA. Epidemiology and pathogenesis of cytomegalovirus disease. Semin Hematol. 1990; 27: 5-10.

38. Chee MA, Bankier AT, Beck S. An analysis of the protein coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol.* 1990; 154: 125-69.
39. Rüger R, Bornkamm GW, Fleckenstein B. Human Cytomegalovirus DNA Sequences with Homologies to the Cellular Genome. *J Gen Virol.* 1984; 65: 1351-64.
40. Spector DH, Klucher KM, Rabert DK, Wright DA. Human Cytomegalovirus Early Gene Expression. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990; 154:21-45.
41. Mocarski ESJr, Abenes GB, Manning WC, Sambucetti LC, Cherrington JM. Molecular Genetic Analysis of Cytomegalovirus Gene Regulation in Growth, Persistence and Latency. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990; 154: 47-73.
42. Bresnahan WA, Shenk T. A Subset of Viral Transcripts Packege Within Human Cytomegalovirus Particles. *Science.* 2000; 288: 2373-6.
43. Silva AG. Propriedades Gerais dos Herpesvírus. In: Lupi O, Silva AS, Pereira JrAC. *Herpes – Clínica, Diagnóstico e Tratamento.* Medsi Editora Médica e Científica Ltda; 2000. 135-156.
44. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The Human Cytomegalovirus. *Pharmacol Ther.* 2003; 98: 269-97.
45. Dieamant DC. Diagnóstico e Genotipagem de Citomegalovírus Humano (HCMV) em Receptores Pediátricos de Transplante de Rim ou Células Tronco Hematopoéticas [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.
46. Hertel L, Mocarski ES. Global analysis of host cell gene expression late during cytomegalovirus infection reveals extensive dysregulation of cell cycle gene expression and induction of Pseudomitosis independent of US28 function. *J Virol.* 2004; 78(21): 1988-2011.

47. Straus SE. Introduction to herpesviridae. In: Mandel GL, Douglas JrRG, Bennett, JE. Principles and Practice of Infectious Diseases, 3ed. New York: Churchill Livingstone; 1990. 1139-44.
48. Colimon R, Michelson S. Human Cytomegalovirus: pathology, diagnosis, and treatment. Adv Nephrol. 1990; 333-56.
49. Sweet C. The pathogenicity of cytomegalovirus. FEMS Microbiol Lett. 1999; 23: 457-82.
50. Rasmussen L. Immune Response to Human Cytomegalovirus Infectious. Top Microbiol Immunol. 1990; 154: 221-54.
51. Anaizy N, PhD. Citomegalovirus in solid organ transplantation. Disponível em: <http://www.thedrugmonitor.com/cmV-1.html>
52. Drago F, Aragone MG, Lugani C, Rebora A. Cytomegalovirus Infection in Normal and Immunocompromised Humans. Dermatology. 2000; 200:189-95.
53. Gold E, Nankervis GA. Cytomegalovirus. 3 ed. New York: Plenum Press; 1991. 169p.
54. Griffiths PD. Cytomegalovirus. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR. Principles and Practice of Clinical Virology. 4 ed. London: John Wiley and Sons; 2000. 79– 116.
55. Pass RF. Cytomegalovirus. In: Knipe D, Howley P. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001. 2675–705.
56. Pannuti CS. Citomegalia. In: Veronesi R. Tratado de Infectologia. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005. 314-21.
57. Hunter K, Stagno S, Capps E, Smith RJ. Prenatal screening of pregnant women for infections caused by cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, herpesvirus, rubella, and *Toxoplasma gondii*. Am J Obstet Gynecol. 1983; 145 (3):269-73.

58. Couto CFC, Rodrigues MV, Melo GEBA, Menezes GS, Leite JM. Citomegalovírus e Gestação: Um Antigo Problema sem Novas Soluções. *Femina* Jul. 2003. 6(31): 509-16.
59. Cannon MJ, Davis KF. Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC Public Health*. 2005; 5:70.
60. Dalen AB. Cytomegalovirus. In: Haaheim LR, Pattison JR, Whitley RJ. *A Practical Guide to Clinical Virology*. 2 ed. John Wiley & Sons, LTD. 2002;149-56.
61. Conceição OJG, Focaccia R, Veronesi R. Citomegalia. In: Veronesi R. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 8 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005. 206-10.
62. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cytomegalovirus_01.jpg
63. Phillips CA, Fanning WL, Gump DW. Cytomegalovirus in immunologically normal adults. *JAMA*. 1977; 238:2299–300.
64. Apperley JF, Goldman JM. Cytomegalovirus: biology, clinical features and methods for diagnosis. *Bone Marrow Transplant*. 1988; 3:253– 64.
65. Wreghitt TG, Hakim M, Gray JJ, Kucia S, Wallwork J, English TA. Cytomegalovirus infections in heart and heart and lung transplantation. *J Clin Pathol*. 1988; 41:660–7.
66. Crumpacker CS, Wadhwa S. Cytomegalovirus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Disease*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Inc; 2005. 1786-96.
67. Chou S, Kim DY, Norman DJ. Transmission of cytomegalovirus by pretransplant leucocytes transfusions in renal transplant candidates. *J Infect Dis*. 1987; 155: 565-7.
68. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*. 2002; 34:1094–7.

69. Teixidor HS, Honig CL, Norsoph E, Albert S, Mouradian JA, Whalen JP. Cytomegalovirus infection of the alimentary canal: Radiologic findings with pathologic correlation. *Radiology*. 1987;163(2):317-23.
70. Disponível em: <http://www.hepcentro.com.br>
71. Kempen JH, Jabs DA, Wilson LA, Dunn JP, West SK, Tonascia JA. Risk of vision loss in patients with cytomegalovirus retinitis and the acquired immune deficiency syndrome. *Arch Ophthalmol*. 2003; 121(4): 466-76.
72. Kempen JH, Jabs DA, Dunn JP, West SK, Tonascia JA. Retinal detachment risk in cytomegalovirus retinitis related to the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Ophthalmol*. 2003; 119(2): 33-40.
73. Tufail A, Holland GN. Cytomegalovirus retinitis: are intraocular devices the answer? *Br J Ophthalmol*. 1995; 79(12):1066-7.
74. Coskuncan JM, Jabs DA, Dunn JP, Haller JA, Green WR, Vogelsang GB et al. The eye in bone marrow transplantation.VI.Retinal complications. *Arch Ophthalmol*. 1994; 112(3): 372-9.
75. Maquire AM, Nichols CW, Crooks GW. Visual loss in cytomegalovirus retinitis caused by cystoid macular edema in patients without the acquired immune deficiency syndrome. *Ophthalmol*. 1996; 103:601-5.
76. Wagle AM, Biswas J, Gospal L, Madhaven JN. Clinical profile and immunological status of cytomegalovirus retinitis in organ transplant recipients. *Indian J Ophthalmol*. 2002; 50: 115-21.
77. Ciardella AP, Barile G, Langton CS. Cytomegalovirus retinitis and FK506. *Am J Ophthalmol*. 2003; 1(36): 386-9.

78. Assi AC, Lightman S. Cytomegalovirus retinitis in patients with Goodpasture Syndrome. *Arch Ophthalmol*. 2002; 120: 510-2.
79. Laso JF. *Diagnostico Diferencial en Medicina Interna*. 2 ed. Barcelona: Elsevier Espanã. 2005. 497p.
80. Schroeder R, Michelon T, Fagundes I, Bortolotto A, Lammerhirt E, Oliveira J et al. Cytomegalovirus disease latent and active infection rates during the first trimester after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2004; 36:896-8.
81. Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, Sund S, Scott H, Degré M et al: The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant*. 2002; 2:850-6
82. Boeckh M, Nichols WG. Immunosuppressive effects of betaherpesviruses. *Herpes*. 2003; 10:12-6.
83. Gentile G, Capobianchi A, Ferraironi M, Greco E, Martino P. Relationship of serum human herpesvirus 6 DNA with cytomegalovirus pp65 antigenemia in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Transplantation*. 2004; 77:1907-8.
84. Streblow DN, Orloff SL, Nelson JA. Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19:577-82.
85. Gandhi MK, Wills MR, Sissons JG, Carmichael AJ. Human cytomegalovirus-specific immunity following haemopoietic stem cell transplantation. *Blood Rev*. 2003; 17: 259–64.
86. Couriel D, Caldara H, Champlin R, Komanduri K. Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Cancer*. 2004; 101:1936.
87. Schwartz JM, Wolford JL, Thornquist MD. Severe gastrointestinal bleeding after hematopoietic cell transplantation, 1987-1997: Incidence, causes, and outcome. *Am J Gastroenterol*. 2001; 96:385-93.

88. Maher K, Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4: 725–38.
89. Nucci M, Maiolino A. Infecções em transplante de medula óssea. In: Bone Marrow Conference, 2000, Ribeirão Preto/Brasil. *Annals of the Bone Marrow Conference*. Brasil: 2000. 33: 278-293.
90. Taylor GH. Cytomegalovirus. *Am Fam Physician*. 2003; 67(3):519-24.
91. Daiminger A, Bader U, Eggers M. Evaluation of two novel enzyme immunoassays using recombinant antigens to detect cytomegalovirus specific immunoglobulins M in sera from pregnant women. *J Clin Virol*. 1999; 13: 161-71.
92. Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1985; 21(2): 217-21.
93. Bonon SHA. Diagnóstico e Monitorização da Infecção Por Citomegalovírus em Transplantados Alogênicos de Células Progenitoras Hematopoéticas. [Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.
94. Pannutti CS. Citomegalia. In: Ferreira AW, Ávila SLM. *Diagnóstico Laboratorial das principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. 2 ed. Editora Guanabara Koogan; 2001. 68-73.
95. van den Berg AP, Klompmaker IJ, Haagsma EB, Scholten-Sampson A, Bijleveld CM, Schirm J et al. Antigenemia in the Diagnosis and Monitoring of Active Cytomegalovirus Infection after Liver Transplantation. *J Infect Dis*. 1991; 164: 265-70.
96. Gondo H, Minematsu T, Harada M, Akashi K, Hayashi S, Taniguchi S et al. Cytomegalovirus (CMV) antigenaemia for a rapid diagnosis and monitoring of CMV-associated disease after bone marrow transplantation. *Br J Haematol*. 1994; 86(1):130-7.

97. Machida U, Kami M, Fukui T, Kazuyama Y, Kinoshita M, Tanaka Y et al. Real-Time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. J Clin Microbiol. 2000; 38: 2536-42.
98. Patel R, Paya CV. Infections in solid organ transplant recipients. Clin Microbiol Rev. 1997; 10 (1):86-124.
99. Boeckh M, Boivin G. Quantification of Cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. Clin Microbiol Rev. 1998; 11:5333-4.
100. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/Publico/LaboratorioReferencia/ManualHematologia/pages/PCRQuantitativoemTempoRealReal-TimePCR.aspx>
101. Clementi M. Quantitative Molecular Analysis of Virus Expression and Replication. J Clin Microbiol. 2000; 38(6): 2030-6.
102. Porter-Jordan K, Rosemberg EI, Keiser JF, Gross JD, Ross AM, Nassim S et al. Nested Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Cytomegalovirus Overcomes False Positive Caused by Contamination with Fragmented DNA. Journal of Medical Virology. 1990; 30: 85-91.
103. Brytting M, Sundqvist VA, Stalhandske P, Linde A, Wahren B. Cytomegalovirus DNA Detection of an Immediate early Protein Gene with Nested Primer Oligonucleotides. Journal of Virological Methods. 1991; 32: 127-38.
104. Albuquerque DM de. Aspectos moleculares do citomegalovírus humano durante infecção ativa em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea. [Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.
105. Nitsche A, Steuer N, Schmidt CA, Landt O, Ellerbrok H, Pauli G et al. Detection of Human Cytomegalovirus DNA by Real-Time Quantitative PCR. Clin Microbiol. 2000; 38(7): 2734-7.

106. Pradeau K, Bordessoule D, Szelag J, Rolle F, Ferrat P, Meur Y et al. A Reverse transcription-Nested PCR Assay for HHV-6 mRNA Early Transcript Detection After Transplantation. *J Virol Methods*. 2006; 134: 41-7.
107. Pillay D, Ali AA, Lui SF, Kops E, Swamy P, Griffiths PD. The prognostic significance of positive CMV cultures during surveillance of renal transplant recipients. *Transplantation*. 1993; 56: 103-8.
108. Stratta RJ, Wood RP, Langnas AN, Duckworth RM, Shaefer MS, Marujo W et al. Donor selection for orthotopic liver transplantation: lack of an effect of gender or cytomegalovirus (CMV) status. *Transplant Proc*. 1990; 22:410-3.
109. Sayers MH, Anderson KC, Goodnough LT, Kurtz SR, Lane TA, Pisciotto P et al. Reducing the risk for transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *Ann Intern Med*. 1992; 116:55– 62.
110. Disponible en: <http://www.novartis.com/newsroom/media-releases/en/2008/1279693.shtml>
111. Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, Keller C, Schoch G, Meyers JD. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med*. 1993; 118:173–8.
112. Boeckh M, Bowden R. Cytomegalovirus infection in marrow transplantation. *Cancer Treat Res*. 1995; 76:97–136.
113. Winston DJ, Ho WG, Bartoni K, Du Mond C, Ebeling DF, Buhles WC et al. Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. Results of a placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Intern Med*. 1993; 118: 179–84.

114. Emery VC. Prophylaxis for CMV should not now replace preemptive therapy in solid organ transplantation. *Rev Med Virol.* 2001; 11:83–6.
115. Rubin RH. Preemptive therapy in immunocompromised hosts. *N Engl J Med.* 1991; 324:1057–9.
116. Einsele H, Ehninger G, Hebart H, Wittkowski KM, Schuler U, Jahn G et al. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood.* 1995;86: 2815–20.
117. Disponível em: http://www. Roche.com.br/NR/rdonlyres/A829520A-3806-48C3-8320-8844F219658B/520/Cymevene_IV.pdf
118. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/bula/2628/foscavir.htm>
119. Disponível em: <http://www. Roche.com.br/NR/rdonlyres/79DE178C-ED23-48FF-A37B-3447D901B116/922/Valcyte.pdf>
120. Disponível em <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Vistide/H-121-PI-pt.pdf>

Anexas

Características dos pacientes incluídos no estudo

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Doença de base	Tipo de enxerto	Tipo de regime de condicionamento	Regime de condicionamento	Profilaxia para DECH	Sorologia IgG HCMV pré-TCTH
1. GAOS	F	20	LMA	MO	Mieloablativo	BU+FLU	CSA+MTX	D+/R+
2. VAN	M	31	AAG	MO	Mieloablativo	BU+CY	CSA+MTX	D+/R+
3. AMP	F	53	LLA	MO	Mieloablativo	CY+VP-16+ICT	CSA+MTX	D+/R+
4. CAFC	F	34	LMC	CPP	Mieloablativo	BU+CY	MAS+MTX	D+/R+

5. SMACO	F	49	LLA	MO	Mieloablativo	BU+CY+VP-16	CSA+MTX	D+/R+
6. CDMJ	M	20	LMA	MO	Mieloablativo	BU+CY	CSA+MTX	D+/R+
7. AAF	M	36	LMC	MO	Mieloablativo	CY+VP-16+ICT	CSA	D+/R+
8. NRS	M	39	AAG	MO	Mieloablativo	BU+FLU	CSA+MTX	D+/R+
9. ASS	F	56	LMA	CPP	Não- mieloablativo	FLU+ICT	CSA+MMF	D+/R+
10. OTFN	M	56	MM	CPP	Não- mieloablativo	FLU+ICT	CSA+MTX	D+/R+
11. LPC	F	16	LLA	MO	Mieloablativo	BU+CY+VP-16	CSA+MTX	D+/R+

12. TRMZ	F	44	LMA	CPP	Não- mieloablativo	FLU+ICT+ARA- C	CSA+MTX+Mitoxantron+Cy	D+/R+
13. ACB	M	49	Mielofibrose	MO	Mieloablativo	BU+FLU	CSA+MTX	D+/R+
14. WC	M	37	LMA	CPP	Mieloablativo	BU+FLU	CSA+MTX	D+/R+
15. SAAC	F	40	LLA	CPP	Mieloablativo	BU+CY+VP-16	CSA+MTX	D+/R+
16. GGR	M	39	LH	MO	Não- mieloablativo	FLU+ICT	CSA+MMF	D+/R+
17. LP	M	25	AAG	MO	Mieloablativo	BU+CY	CSA+MTX	D+/R+
18. MCGM	M	54	LMA	MO	Mieloablativo	BU+FLU	CSA+MTX	D+/R+

19. GAOS	F	21	LMA	CPP	Mieloablativo	CY+ICT	CSA	D+/R+
20. TSV	M	47	LH	CPP	Não- mieloablativo	FLU+ICT	CSA+MTX	D+/R+
21. VCR	M	54	LMC	CPP	Mieloablativo	BU+CY	CSA+MTX	D+/R+
22. RVA	M	23	LNH	CPP	Não- mieloablativo	FLU+ICT	CSA+MTX	D+/R+
23. JAP	M	23	LMA	CPP	Mieloablativo	BU+FLU	CSA+MTX	D+/R+
24. NFS	F	54	LNH	MO	Não- mieloablativo	FLU+ICT	CSA+MMF	D+/R+
25. MMB	F	56	LNH	MO	Não- mieloablativo	FLU+ICT	CSA+MMF	D+/R+

26. SSML	F	41	LMA	MO	Mieloablativo	BU+FLU	CSA+MTX	D+/R+
27. APS	M	48	LLC	CPP	Não- mieloablativo	FLU+ICT	CSA+MMF	D+/R+
28. ACB	M	49	Mielofibrose	CPP	-	-	CSA+MMF	D+/R+
29. MCJ	F	51	LMA	CPP	Não- mieloablativo	FLU+ICT	CSA+MMF	D+/R+
30. FFMF	M	35	LMC	CPP	Mieloablativo	BU+CY	CSA+MTX	D+/R+

M: masculino; F: feminino; LMA: leucemia mielóide aguda; AAG: anemia aplástica grave; LLA: leucemia linfóide aguda; LMC: leucemia mielóide crônica; MM: mieloma múltiplo; LH: linfoma de Hodgkin; LNH: linfoma não-Hodgkin; LLC: leucemia linfóide crônica; MO: medula óssea; CPP: células progenitoras periféricas; DECH: doença do enxerto contra hospedeiro; BU: Bussulfano; FLU: Fludarabina; Cy: Ciclofosfamida; VP-16: Etoposide; ICT: irradiação de corpo total; ARA-C: Citarabina; CSA: Ciclosporina; MMF: Micofenolato mofetil; MTX: Metotrexato; TCTH: transplante de células tronco hematopoéticas; D: doador; R: receptor.

**Panorama Geral dos resultados obtidos para o HCMV durante a monitorização dos
pacientes submetidos a TCTH**

Paciente	Antigenemia	Nested-PCR	Real-time PCR
1. GAOS	-	54, 61 , 68, 75	14(+6112.73), 47(+2022.29), 61(+1322.53)
2. VAN	-	40, 47 , 63	47(+3.44)
3. AMP	-	-	-
4. CAFC	-	46, 53, 60, 67, 81, 102, 151	7(+26012.06), 14(+612.85), 27(+103.47), 40(+119.64), 144(30.88)
5. SMACO	-	0, 32, 39, 46, 53	0(+1104.97), 32(+3804.78), 39(+334.87), 46(+8221.95), 53(+8358.64)
6. CDMJ	-	14, 26, 33, 40	-
7. AAF	-	0, 7, 30 , 37, 42, 114, 121	14(+36.56), 30(+8.16) , 63(+359.51), 142(+193.57)
8. NRS	152(+3)	47, 54	-
9. ASS	30(+2) , 91(+3), 140(+1), 149(+80)	1, 9 , 23, 30, 37, 42 , 119, 126 , 133, 140 , 149	1(+414.61), 9(+136.32), 30(+167.54),

			37(+766.48), 42(+78.56), 84(+770.43), 126(+119.3), 140(+73084.04), 149(+657.02), 154(+464.94)
10. OTFN	106(+1), 111(+7), 132(+2)	27, 34, 41, 106, 111, 120, 125, 132, 146	106(+1567.37), 111(897.92), 120(+12427.76), 125(+288.04), 132(+5956.83), 139(+340.55)
11. LPC	35(+7), 42(+27)	35, 42, 49, 56, 75	35(+1159.66), 42(+7343.73), 49(+6280.84), 117(+418.05), 133(+317.27), 147(+822.96), 154(+197.55)
12. TRMZ	56(+70), 63(+1), 98(+1), 105(+3)	35, 44, 49, 56, 63, 70, 91, 98, 105	49(+2289.24), 56(+1176.3), 63(+3505.27), 70(+49.03), 91(+59.08), 105(+1011.1)
13. ACB	-	33, 42, 54, 61, 133, 140	14(+127.68), 19(+221.95), 42(+615.82), 49(1994.71), 54(+272.2), 70(+323.7), 82(+251.06), 96(+313.28), 103(+371.91), 145(+18.49)
14. WC	-	49, 54, 61, 68, 89	42(+45.22),

			49(+92.78), 54(+67.26), 61(+700.8), 68(+209.86), 84(+472.93), 96(+132.56), 140(+7.81)
15. SAAC	-	6, 11, 18 , 25, 32, 39	18(+23.25), 48(+555.28), 60(+208.08), 69(+130.87), 76(+163.38)
16. GGR	-	105 , 126, 135, 147	42(+301.87), 63(+300.38), 86(+22.56), 100(+966.12), 105(+4690.94), 112(+3093.34), 119(+753.94), 147(+115.47)
17. LP	-	26 , 98	5(+153.86), 12(+188.76), 26(+346.55), 68(+553.43)
18. MCGM	33(+18), 42(+5), 47(+10)	12, 26, 33, 42 , 54, 138	19(+297.81), 26(+833.05), 33(+1314.80), 42(+455.06), 47(+435.15), 61(306.85), 68(10.01)
19. GAOS	52(+3)	36, 43, 52, 66, 71 , 148	1(+205.56), 52(+22327.21), 66(+1212.96), 71(+90.94)

20. TSV	29(+1), 97(+5), 118(+20), 125(+6), 132(+3)	15, 20, 29, 41, 92, 106, 111, 118, 125, 132, 139, 146, 153	15(+18.56), 20(+168.18), 29(+59.04), 34(+498.46), 41(+171.02), 69(+112.97), 92(+872.3), 97(+8530.31), 106(+110136.6), 111(+15603.11), 118(+28602.44), 125(+6524.34), 132(+4154.48), 146(+18.05), 153(+3194.89)
21. VCR	-	-	5(+246.42)
22. RVA	-	-	0(+418.39), 14(+112.20), 21(+437.23), 35(+83.54)
23. JAP	47(+10)	47	0(+225.53), 5(+350.11), 54(+872.3), 70(+733.46), 98(+6963.17), 103(+125.45), 117(+5.91)
24. NFS	35(+2), 49(+12), 56(+503), 133(+1)	30, 35, 42, 49, 56, 65, 77, 84, 91, 98, 105, 114, 126, 133, 140	35(+1754.34), 56(+16495.24), 65(+4609.05), 72(+733.46), 84(+366.33), 91(+61.29), 105(+455.02), 114(+43.13), 119(+283.68), 126(+4919.62), 133(+5621.25), 140(+1710.5)

25. MMB	40(+5) , 145(+5)	33 , 40 , 49, 110, 131	26(+13.58), 33(+16495.24) , 40(+2047.31) , 138(256.10)
26. SSML	-	33 , 75	33(+27.91) , 40(+17454.58), 61(+14.38), 68(+5.38), 82(+186.14)
27. APS	37(+1) , 56(+1), 132(+5) , 146(+15)	13, 20 , 27 , 37 , 63, 86, 98, 105 , 118, 125 , 132 , 139	0(+753.94), 20(+2845.65) , 27(+8487.29) , 37(+33.3) , 49(2009.50), 105(+33.98) , 112(+53.68), 125(+251.33) , 132(+1499.03) , 139(+28721.38) , 146(+35406.32) , 153(+10391.48)
28. ACB	-	-	51(+58.86), 57(+10435.77)
29. MCJ	119(+8)	37 , 70, 91	37(+290.82) , 49(+67.84), 98(+31.95), 107(+322.91), 119(+9414.18) , 126(+2887.04)
30. FFMF	-	61	54(+92.00), 110(+11.38)

Antigenemia: Dia pós-TCTH (n° de células positivas); Nested-PCR: Dia pós-TCTH com amplificação do DNA viral; Real-time PCR: Dia pós-TCTH (n° de cópias de DNA viral amplificado); Datas destacadas em azul: concomitância de resultados positivos pela Nested-PCR e Real-time PCR; Datas destacadas em verde:

concomitância de resultados positivos pela antigenemia e Nested-PCR; Datas destacadas em roxo:
concomitância de resultados positivos antigenemia e Real-time PCR; Datas destacadas em vermelho:
concomitância de resultados positivos pela antigenemia, Nested-PCR e Real-time PCR.

Monitorização da infecção ativa pelo HCMV e complicações pós-TCTH

Paciente	Pega da Medula	Antigenemia	Nested-PCR	Real-time PCR	DECH	Doença por HCMV	Início TTO (GCV)	Outros	Óbito
1. GAOS	D+19	-	54, 61, 68, 75	14(+6112.73), 47(+2022.29), 61(+1322.53)	-	-	D+81	-	-
2. VAN	D+19	-	40, 47, 63	-	-	-	D+68	D+11: <i>Streptococcus oralis</i>	-
3. AMP	D+17	-	-	-	-	D+30: Provável doença: pneumonia por HCMV	D+21	Tomografia de tórax de alta resolução altamente sugestiva para pneumonite por HCMV	D+33 (Provável pneumonia por HCMV e insuficiência respiratória)
4. CAFC	D+16	-	46, 53, 60, 67	7(+26012.06), 14(+612.85)	D+144: Boca - crônico	-	-	D+7: <i>Staphylococcus epidermides</i> D+144: <i>Herpes</i>	-

								zoster	
5. SMACO	D+16	-	32, 39, 46, 53	0(+1104.97), 32(+3804.78), 46(+8221.95), 53(+8358.64)	-	-	D+54	D+3: <i>Staphylococcus epidermides</i> D+27: Aspergilose pulmonar D+54: úlceras genitais, púrpura palpável em MMII e candidíase oral e esofágica	D+113 (Progressão da doença - LLA)
6. CDMJ	-	-	26, 33, 40	-	-	-	-	D+30: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	D+44 (Pericardite)
7. AAF	D+21	-	0, 7, 30, 37, 42, 114, 121	-	-	-	D+37	TCTH alogênico prévio (recaída) D+84: IVAS D+105: Hipogamaglobulinemia	-
8. NRS	D+17	152(+3)	47, 54	-	D+96: Pele e cavidade oral – agudo grau III	D+111: Provável doença por HCMV: TGI	D+60	D-2: <i>Acinetobacter baumnii</i> D+19: <i>Bunkholderia cepacia</i> D+109: diarréia 10x/dia + vômitos 2x/dia	-

9. ASS	D+11	30(+2), 91(+3), 140(+1), 149(+80)	1, 9, 23, 30, 37, 42, 119, 126, 133, 140, 149	37(+766.48), 84(+770.43), 140 (+73084.04), 149(+657.02), 154(+464.94)	D+77: TGI D+82: Boca – agudo grau III D+99: Boca/pele/ intestino/ fígado/olhos – crônico extenso D+149: Músculo – crônico grave	D+80: Doença por HCMV: TGI	D+49	D+76: diarreia D+82: piora do quadro de diarreia D+80: EDA presença de alterações citopáticas virais em células glandulares, compatíveis com infecção por HCMV D+85: diarreia e cólicas	D+252 (Doença por HCMV + infecção bacteriana + DECH)
10. OTFN	D+8	106(+1), 111(+7), 132(+2)	27, 34, 41, 106, 111, 120, 125, 132	106 (+1567.37), 111(897.92), 120 (+12427.76), 132 (+5956.83)	D+96: Pele, boca, fígado e pulmões - agudo	-	D+13	TCTH autólogo prévio D+114: quadro convulsivo isolado	-
11. LPC	D+17	35(+7), 42(+27)	35, 42, 49, 56	35(+1159.66), 42(+7343.73), 49(+6280.84), 147(+822.96)	-	-	D+55	D+5: <i>Streptococcus sanguis</i> D+12: <i>Staphylococcus epidermides</i> D+16: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
12. TRMZ	D+7	56(+70), 63(+1), 98(+1), 105(+3)	35, 44, 49, 56, 63, 70, 91, 98, 105	49(+2289.24), 56(+1176.3), 63(+3505.27), 105(+1011.1)	D+53: TGI e pele – agudo grau III	-	D+50	D+53: diarreia, inapetência e febre D+59: diabetes e hepatite por intoxicação por CSA	D+363 (Progressão da doença - LMA)

13. ACB	D+24	-	33, 42, 54, 61, 133, 140	42(+615.82), 49(1994.71)	D+27: Pele – agudo grau I	-	D+50	TCTH autólogo prévio	-
14. WC	D+21	-	49, 54, 61, 68	61(+700.8), 84(+472.93)	-	-	D+84	D+34: diarreia (5x/dia)	-
15. SAAC	D+19	-	6, 11, 18, 25, 32, 39	48(+555,28)	-	-	D+18	D+24: náuseas e vômitos D+27: febre acompanhada de tosse com muco D+29: quadro de FOI	D+534 (Progressão da doença - LLA)
16. GGR	D+9	-	126, 135	100(+966.12), 105(+4690.94), 112(+3093.34), 119(+753.94)	D+105: Pele e olhos – crônico moderado	-	-	TCTH autólogo prévio	-
17. LP	D+22	-	-	68(+553.43)	-	-	-	D+6: <i>Staphylococcus epidermides</i>	-
18. MCGM	D+19	33(+18), 42(+5), 47(+10)	26, 33, 42	26(+833.05), 33(+1314.80), 42(+455,06), 47(+435.15)	-	-	D+34	D+23: <i>Staphylococcus epidermides</i>	-

19. GAOS	D+4	52(+3)	36, 43, 52, 66, 71	52 (+22327.21), 66(+1212.96)	-	-	D+52	TCTH alogênico prévio (recaída) D+37: diarreia (5x/dia) D+54: episódio de CCTCG	-
20. TSV	D+10	29(+1), 97(+5), 118(+20), 125(+6), 132(+3)	15, 20, 29, 106, 111, 118, 125, 132, 139, 146, 153	34(+498.46), 92(+872.3), 97(+8530.31), 106 (+110136.6), 111 (+15603.11), 118 (+28602.44), 125(+6524.34), 132(+4154.48), 153 (+3194.89)	D+69: Fígado – agudo grau III	-	D+35	TCTH autólogo prévio D+20: febre	D+243 (Progressão da doença - LH)
21. VCR	-	-	-	-	-	-	-	-	D+33 (Sepse por <i>Acinetobacter baumanni</i> e falência de múltiplos órgãos)
22. RVA	D+8	-	-	0(+418.39), 21(+437.23)	-	-	-	TCTH autólogo prévio	-

23. JAP	D+20	47(+10)	-	54(+872.3), 70(+733.46), 98(+6963.17)	D+63: Pele e TGI – agudo grau III	-	D+48	Durante aplasia medular apresentou crises convulsivas parciais D+59: diarreia D+63: piora da diarreia (8x/dia) D+117: recaída precoce pós TCTH alológico	D+125 (Infecção fúngica por <i>Fusarium</i>)
24. NFS	D+8	35(+2), 49(+12), 56(+503), 133(+1)	30, 35, 42, 49, 56, 65, 77, 84, 91, 98, 105, 114, 126, 133, 140	35(+1754.34), 56(+16495.24), 65(+4609.05), 72(+733.46), 105(+455.02), 126(+4919.62), 133(+5621.25), 140(+1710.5)	D+38: Pele e fígado – agudo grau I D+45: Pele e intestino – agudo grau III	-	D+36	TCTH autólogo prévio (recaída) D+14: apresentou FOI D+107: diarreia 3x/semana	D+348 (Infecção fúngica)
25. MMB	D+7	40(+5), 145(+5)	33, 40, 49	33(+16495.24), 40(+2047.31)	D+89: Pele – agudo	-	D+57	TCTH autólogo prévio (recaída) D+6: <i>Staphylococcus aureus</i>	-
26. SSML	D+23	-	-	40 (+17454.58)	-	-	-	D+89: TVP	-
27. APS	D+11	37(+1), 56(+1), 132(+5),	13, 20, 27, 37, 98, 105,	0(+753.94), 20(+2845.65), 27(+8487.29),	D+92: Intestino e fígado – agudo grau III	D+93: Doença por HCMV: esôfago/	D+27	D+3: <i>Klebsiella pneumoniae</i> D+5: insuficiência	D+214 (Sinusite fúngica)

		146(+15)	118, 125, 132, 139	49(2009.50), 132(+1499.03), 139 (+28721.38), 146 (+35406.32), 153 (+10391.48)		estômago duodeno/jejuno		respiratória aguda D+36: diarreia D+93: biópsia esôfago/estômago duodeno/jejuno D+92: ↑ enzimas hepáticas	
28. ACB	-	-	-	57 (+10435.77)	-	-	-	1 TCTH autólogo e 1 TCTH alogênico prévio Rejeição do enxerto do TCTH alogênico	D+203 (Progressão da doença - Mielofibrose)
29. MCJ	D+19	119(+8)	-	119 (+9414.18), 126 (+2887.04)	D+84: Pele D+97: Estômago – agudo	-	D+122	D/R: incompatibilidade ABO D+37: hemólise 2 ^{ária}	D+139 (Fusariose sistêmica)
30. FFMF	D+20	-	-	-	-	-	-	D+5: <i>Streptococcus oralis</i> D+15: ↑ enzimas hepáticas D+33: diarreia D+40: febre D+117: linfonodomegalia necrótico cervical	-

HCMV: citomegalovírus humano; TCTH: transplante de células tronco hematopoéticas; D+: dia pós-TCTH; Antigenemia: Dia pós-TCTH (nº de células positivas); Nested-PCR: Dia pós-TCTH em que houve 2 amplificações positivas consecutivas; Real-time PCR: Dia pós-TCTH (nº cópias de DNA viral amplificados – valor ≥ “cut-

off” padronizado); DECH: doença do enxerto contra hospedeiro; TTO: tratamento; GCV: Ganciclovir; IVAS: infecção das vias aéreas superiores; EDA: endoscopia digestiva alta; CSA: Ciclosporina; FOI: febre de origem indeterminada; CCTCG: crise convulsiva tônico-clônica generalizada; TVP: trombose venosa profunda.