



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



ANDRÉ GUSMÃO CUNHA

**UTILIZAÇÃO DA ANTIGENEMIA QUANTITATIVA
PARA O DIAGNÓSTICO DA CITOMEGALOVIROSE EM
PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE
FÍGADO**

Salvador, BA

2013

ANDRÉ GUSMÃO CUNHA

**UTILIZAÇÃO DA ANTIGENEMIA QUANTITATIVA
PARA O DIAGNÓSTICO DA CITOMEGALOVIROSE EM
PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE
FÍGADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia – Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento

Co-orientadora: Profa. Dra. Andréa Mendonça
Gusmão Cunha

Salvador, BA

2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

C972 Cunha, André Gusmão

Utilização da antigenemia quantitativa para o diagnóstico da citomegalovirose em pacientes submetidos a transplante de fígado / André Gusmão Cunha – Salvador, 2013.

64 f.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

1. Fígado. 2. Antigenemia. 3. Transplante hepático. I. Meyer Nascimento, Roberto José. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.36



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DO MESTRANDO ANDRÉ GUSMÃO CUNHA

Aos vinte dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e treze às quatorze horas no auditório Ophélia Gaudenzi, 3º andar no Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dr. Roberto José Meyer Nascimento, Orientador, Dr. Raymundo Paraná Ferreira Filho, Dr. Jorge Luiz Andrade Bastos se reúne com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulado: "UTILIZAÇÃO DA ANTIGENEMIA QUANTITATIVA PARA O DIAGNÓSTICO DA CITOMEGALOVIROSE EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE FÍGADO" do Mestrando ANDRÉ GUSMÃO CUNHA. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que o pós-graduando teve a sua defesa de Dissertação APROVADO, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pelo Mestrando e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia. Salvador, 20 de fevereiro de 2013.


Dr. Roberto José Meyer Nascimento
Orientador


Dr. Raymundo Paraná Ferreira Filho
Banca Examinadora


Profa. Dra. Silvia Lima Costa
Coordenadora do PPGIm
ICS-UFBA


Dr. Jorge Luiz Andrade Bastos
Banca Examinadora


André Gusmão Cunha
Mestrando

Dedico este trabalho ao Prof. Dr. Juvenal Ricardo Navarro Góes (*in memoriam*) que sempre acreditou na minha capacidade de ensinar e a quem prometi um fio de cabelo de meu bigode que eu defenderia meu mestrado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, avós e demais familiares, que sedimentaram desde cedo as bases daquilo que me tornei ao longo dos anos.

Aos meus professores, pelos ensinamentos e estímulos ao raciocínio que fizeram minha vida muito mais vibrante e rica.

À minha esposa, pelo companheirismo, carinho, perdão e apoio em todos os momentos de nossa vida, dos fáceis aos difíceis.

Às minhas filhas, razão do meu viver e minha maior e mais bela missão.

Aos meus amigos, pelos momentos de alegria e de suporte, aliviando as angústias naturais da vida.

Aos meus alunos, que fazem com que eu queira me superar, renovando-me na ciência e na profissão, mantendo viva minha fé no futuro.

Aos colegas de pós-graduação, pela parceria, partilhas e torcidas mútuas, fazendo do mestrado uma experiência prazerosa.

Aos doentes, razão da busca de conhecimento da medicina para aliviar seus sofrimentos.

Aos colegas de trabalho, incansáveis em nossa luta conjunta para acolher e tratar os doentes.

Aos pioneiros dos transplantes, verdadeiros desbravadores de mares desconhecidos.

E a Deus, por ter criado o mundo e a vida, tornando tudo isso possível.

“Combati o bom combate, terminei a corrida, guardei a fé.”
2ª Carta de São Paulo a Timóteo 4:7.

RESUMO

Mais de meio século se passou desde os trabalhos pioneiros de transplante experimental de fígado e o estabelecimento do transplante hepático como tratamento. Apesar de avanços, infecções persistem como a principal causa de mortalidade em receptores de fígado, sendo o Citomegalovírus (CMV) a infecção viral mais frequente, atuando como fator imunomodulador para outras infecções oportunistas e rejeição. Este trabalho avaliou a utilização da antigenemia quantitativa para CMV no diagnóstico de infecção ativa em receptores de fígado, determinando seu limiar de positividade e desempenho para o diagnóstico da síndrome citomegalovirótica. Um estudo de coorte prospectiva incluiu 44 receptores de fígado entre Março de 2007 e Abril de 2009, que colheram 344 amostras submetidas a antigenemia quantitativa por imunofluorescência para detecção do antígeno pp65. A síndrome citomegalovirótica foi definida segundo os critérios da literatura. Seu desempenho foi avaliado através da área sob a Curva ROC, utilizando apenas amostras com antigenemia maior ou igual a 1 célula positiva/200.000 leucócitos, sendo analisadas 52 amostras positivas, representando 24 pacientes. A área sob a Curva ROC foi de 0,745 (IC 95% 0,606 – 0,856, $p=0,006$), obtendo boa capacidade discriminatória, estabelecendo como limiar de positividade para o diagnóstico da citomegalovirose um valor de antigenemia superior a 8 células positivas/200.000 leucócitos, com uma sensibilidade de 88,9 (IC 95% 51,8 – 99,7) e especificidade de 74,4 (IC 95% 58,8 – 86,5). Em conclusão, utilizando a antigenemia quantitativa positiva, o cut-off para diagnóstico da síndrome citomegalovirótica foi maior que 8 células positivas/200.000 leucócitos, com uma performance considerada adequada através de sua acurácia.

Palavras-chave: Fígado, Antigenemia, Transplante hepático

ABSTRACT

Over half a century has passed since the pioneering works of experimental liver transplantation and the establishment of liver transplantation as treatment. Despite advances, infections persist as the leading cause of mortality in liver transplant recipients, having Cytomegalovirus (CMV) as its most frequent viral infection, which acts as an immunomodulatory factor for other opportunistic infections and rejection. This study evaluated the use of quantitative CMV antigenemia in the diagnosis of active infection in liver transplant recipients, determining its cut-off and performance for the diagnosis of CMV syndrome. A prospective cohort study included 44 liver transplant recipients between March 2007 and April 2009, who collected 344 samples subjected to quantitative immunofluorescence antigenemia for pp65 antigen detection. CMV syndrome was defined according to the criteria cited by the literature. Its performance was assessed by the area under the ROC curve, using only samples with antigenemia greater than or equal to 1 positive cell / 200,000 leukocytes, analyzing 52 positive samples, representing 24 patients. The area under the ROC curve was 0.745 (95% CI 0.606 to 0.856, $p = 0.006$), obtaining good discriminatory capacity, establishing as a positivity cut-off for the diagnosis of CMV syndrome a value of more than 8 positive cells /200,000 leukocytes, with a sensitivity of 88.9 (95% CI 51.8 to 99.7) and specificity of 74.4 (95% CI 58.8 to 86.5). In conclusion, using positive quantitative antigenemia, the cut-off for diagnosing CMV syndrome was higher than 8 positive cells/200,000 leukocytes, with a performance deemed appropriate through its accuracy.

Keywords: Liver, Antigenemia, Liver Transplantation.

LISTA DE ABREVIACÕES

AUC – “Area Under the Curve – Área sob a curva (ROC)

°C – Graus Celsius

CMV – Citomegalovírus

D- – Doador de órgãos com sorologia não reagente (IgG) para Citomegalovírus

D+ – Doador de órgãos com sorologia reagente (IgG) para Citomegalovírus

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DP – Desvio-padrão

EBV – Vírus Epstein-Barr

EDTA – “Ethylene Diamine Tetraacetic Acid” – Ácido etilenodiaminotetracético

EP – Erro-padrão

HCV – Vírus C da Hepatite

HHV-1 – Herpesvírus Humano Tipo 1

HHV-2 – Herpesvírus Humano Tipo 2

HHV-3 – Herpesvírus Humano Tipo 3

HHV-4 – Herpesvírus Humano Tipo 4

HHV-5 – Herpesvírus Humano Tipo 5

HHV-6 – Herpesvírus Humano Tipo 6

HHV-7 – Herpesvírus Humano Tipo 7

HHV-8 – Herpesvírus Humano Tipo 8

HSV-1 – Herpes Simples Tipo 1

HSV-2 – Herpes Simples Tipo 2

KSHV – Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi

min – Minuto

mL – Mililitro

nm – Nanômetro

pp65 – Proteína matricial de peso molecular 65 kD

pp71 – Proteína matricial de peso molecular 71 kD

pp150 – Proteína matricial de peso molecular 150 kD

R- – Receptor de fígado com sorologia não reagente (IgG) para Citomegalovírus

R+ – Receptor de fígado com sorologia reagente (IgG) para Citomegalovírus

ROC – “Receiver Operating Curve” – Curva do funcionamento do receptor

rpm – Rotação por minuto

RT-PCR – “Real Time Polymerase Chain Reaction” – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SPSS – “Statistical Package for Social Sciences” – Pacote Estatístico para Ciências Sociais

UL32 – Gene da sequência única longa do genoma do Citomegalovírus na posição 32

UL82 – Gene da sequência única longa do genoma do Citomegalovírus na posição 82

UL83 – Gene da sequência única longa do genoma do Citomegalovírus na posição 83

VZV – Vírus Varicela-Zoster

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS, TABELAS E QUADROS

Figura 1. Preparo do fígado doado para transplante.	14
Figura 2. Estrutura do citomegalovírus humano.	19
Figura 3. Antigenemia para CMV (Kit Turbo-IQ Products).	30
Gráfico 1. Curvas de tempo livre de síndrome citomegalovirótica em 180 dias (A) e sobrevividas em 01 (B) e 04 anos (C), segundo a sorologia para CMV do receptor.	35
Gráfico 2. Curva de sobrevivida em quatro anos segundo a sorologia para HCV do receptor.	36
Gráfico 3. Curva ROC (Receiver Operator Curve) para a antigenemia quantitativa e diagnóstico de síndrome citomegalovirótica. AUC: Area Under the Curve.	37
Tabela 1. Características da amostra e apresentação da síndrome citomegalovirótica (n=44)	33
Quadro 1. Família <i>Herpesviridae</i>	20

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 EVOLUÇÃO DO TRANSPLANTE HEPÁTICO	13
1.2 INFECÇÃO E TRANSPLANTE	16
1.3 CITOMEGALOVÍRUS	18
1.4 CITOMEGALOVÍRUS E TRANSPLANTE DE FÍGADO	22
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 DESENHO E POPULAÇÃO DO ESTUDO	28
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	28
4.3 COLETA DE DADOS E VARIÁVEIS DE INTERESSE	28
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5 ASPECTOS ÉTICOS	32
6 RESULTADOS	33
7 DISCUSSÃO	38
8 CONCLUSÕES	44
9 ESTRATÉGIAS PARA A CONDUTA NA INFECÇÃO POR CMV	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE	53
APÊNDICE A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.....	53
PUBLICAÇÃO	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 EVOLUÇÃO DO TRANSPLANTE HEPÁTICO

Há pouco mais de uma geração, o tratamento de doenças hepáticas em estágio final era muito limitado, restrito à tentativa frustrada de aliviar os sintomas da piora clínica dos pacientes afetados. Estes acabariam passando pela insuficiência hepática e hipertensão portal, com hemorragias varicosas, ascites intratáveis, icterícia, peritonites, encefalopatia hepática e coagulopatia, culminando com a disfunção multissistêmica. É tido que a expansão do transplante de fígado transformou a hepatologia de uma disciplina meramente cerebral e acadêmica para uma especialidade ativa e intervencionista (DIENSTAG; COSIMI, 2012).

A evolução da civilização humana tem nos apresentado com avanços inimagináveis em tempos anteriores. A medicina, parte ativa desta civilização, é ambiente propício de desenvolvimento tecnológico surpreendente, onde “o que era inconcebível ontem e pouco viável hoje, muitas vezes torna-se a rotina de amanhã”. (STARZL *et al.*, 1982).

Pouco mais de meio século se passou desde os trabalhos pioneiros de transplante experimental de fígado em modelos caninos (MOORE *et al.*, 1959; STARZL *et al.*, 1961; WELCH, 1955). Atualmente, o transplante hepático ortotópico, que consiste na retirada de um fígado doente e sua substituição, na mesma localização anatômica, por um fígado, ou parte dele, saudável (Figura 1), procedente de um doador cadáver ou vivo (PRADOS; CUERVAS-MONS, 2005), é o tratamento de escolha para várias doenças hepáticas agudas e crônicas, que põem em risco a vida ou causam piora importante da qualidade de vida do paciente e que não são curáveis com outros tratamentos (KEEFFE, 2001; PRADOS; CUERVAS-MONS, 2005). Nesse meio século, a terapia de transplante hepático evoluiu com múltiplas etapas de desenvolvimento e afirmação.

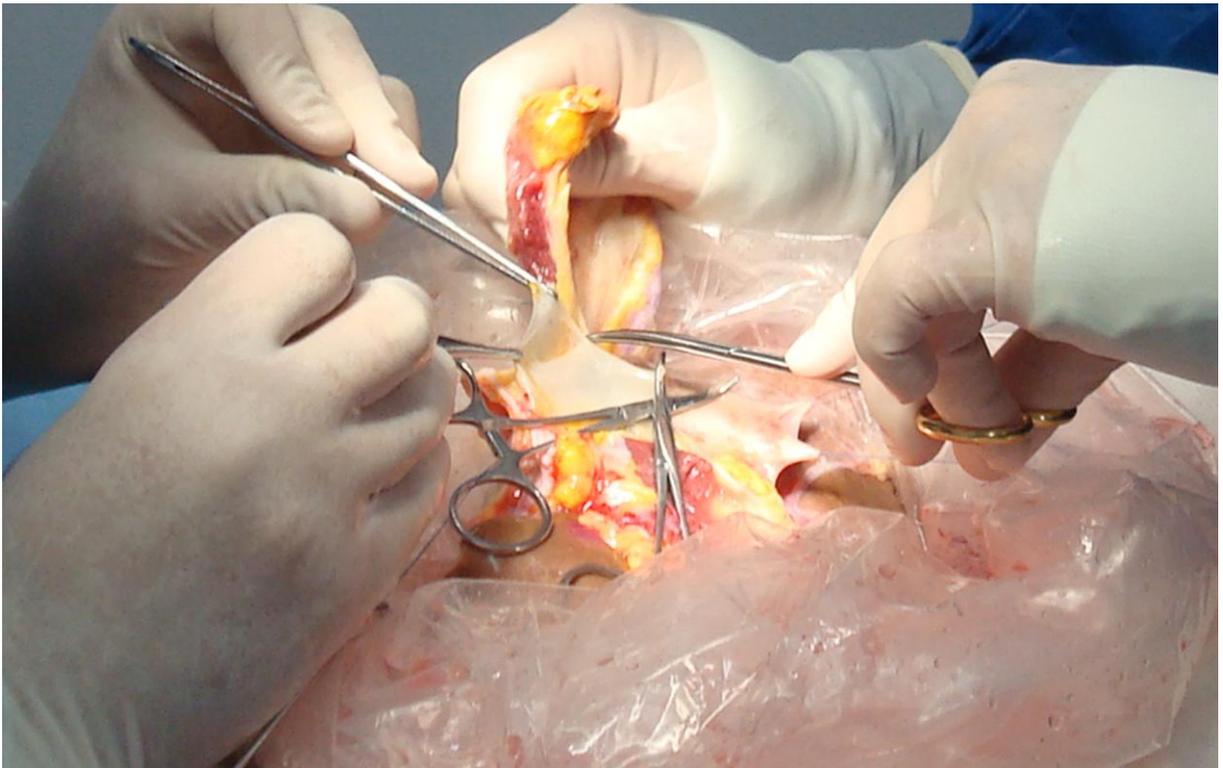


Figura 1. Preparo do fígado doado para transplante.

O primeiro transplante de órgãos sólidos com êxito aconteceu em 1954 com um transplante de rim entre irmãos gêmeos idênticos (SNYDER, 2013). Porém, enquanto as primeiras abordagens para a imunossupressão permitiram o florescimento do transplante renal, os esforços iniciais do transplante de fígado estagnaram, mesmo com as evidências em animais que sugeriam ser o fígado um órgão imunologicamente privilegiado (DIENSTAG; COSIMI, 2012; KAMADA; DAVIES; ROSER, 1981; KAMADA, 1985; ORLANDO; SOKER; WOOD, 2009; THOMSON; KNOLLE, 2010).

Surgiram as primeiras tentativas de transplante hepático ortotópico em humanos, organizadas em ensaios clínicos, e com elas os primeiros insucessos (STARZL *et al.*, 1963). O primeiro receptor, operado por Starzl, sangrou até a morte na mesa cirúrgica. No ano seguinte, mais cinco tentativas foram realizadas por Starzl e mais duas em outros serviços, porém nenhum dos receptores sobreviveu mais de 23 dias. Com estas primeiras mortes, o transplante de fígado parecia ter encontrado obstáculos intransponíveis, como a má função inicial do enxerto resultante de lesão isquêmica e opções limitadas de imunossupressão (azatioprina e prednisona), o que

levavam à coagulopatia grave, infecção e falência de múltiplos órgãos (DIENSTAG; COSIMI, 2012).

A introdução clínica, em 1966, do soro antilinfócito fez Starzl ousar tentar mais uma vez e, em 1967, ele realizou o primeiro transplante de fígado bem sucedido em humanos, com sobrevida de 13 meses (STARZL; FUNG, 2010). Em 1968, Calne realizou o primeiro transplante de fígado humano na Europa. (DIENSTAG; COSIMI, 2012).

A evolução do conhecimento da fisiologia e anatomia cirúrgica do fígado, aliado ao desenvolvimento da preservação do fígado extraído, trouxe esperança ao procedimento e produziu as primeiras sobrevidas acima de um mês (STARZL *et al.*, 1968). Ainda assim, a sobrevida média dos transplantados hepáticos era menor que 50% em um ano (STARZL *et al.*, 1982). Devido aos altos riscos e resultados pobres, o transplante de fígado ficava reservado como um ato derradeiro e heroico para pacientes sem outras opções.

Mesmo com o reconhecimento da morte encefálica (BEECHER, 1968), que possibilitou a captação de fígados mais preservados, e levou à melhora da função hepática inicial, a mortalidade permanecia alta (DIENSTAG; COSIMI, 2012).

A conquista seguinte - um melhor controle sobre a imunossupressão - trouxe o avanço da longa sobrevida no pós-transplante. O surgimento da ciclosporina (BOREL *et al.*, 1977; CALNE *et al.*, 1979), seguida pelo tacrolimo (MCMASTER; BUIST, 1993; MCMASTER *et al.*, 1998; STARZL; DEMETRIS; VAN THIEL, 1989), colocou o transplante hepático sob nova perspectiva, permitindo o desenvolvimento de programas de transplante por todo o mundo. A taxa de sobrevida em um ano era de pelo menos 70% (IWATSUKI *et al.*, 1988), com o advento dos primeiros pacientes a sobreviverem por mais de uma década (STARZL, 1996). Este foi o ponto de inflexão da sobrevida, que fez o transplante de fígado ser considerado como aceitável, aplicável clinicamente e salvador de vidas em 1983 (“NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH - CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE STATEMENT,” 1984).

Outros avanços tornaram o transplante hepático mais seguro, organizado, rápido e reprodutível. A técnica operatória evoluiu, com alterações importantes (ADAM *et al.*, 2003). A circulação extracorpórea veno-venosa foi substituída pela técnica de preservação da veia cava retrohepática “piggyback”. A incidência de complicações biliares foi reduzida com a melhor preservação do tecido periductal.

Conhecimentos de coagulação e aprimoramento da técnica operatória diminuíram a necessidade transfusional e suas decorrentes complicações e implicações, além de melhorias na captação, preservação e alocação de órgãos (STARZL; DEMETRIS; VAN THIEL, 1989).

A aplicação do transplante de fígado expandiu-se para incluir favoravelmente pacientes mais saudáveis no início da doença hepática, o que melhorou ainda mais seus resultados. Tal expansão de indicações chegou a ponto de incluir antigas contraindicações, como hepatite B, etilismo crônico, carcinoma hepatocelular, trombose de veia porta, idade avançada, dentre outras (ADAM *et al.*, 2003; STARZL; DEMETRIS; VAN THIEL, 1989). Atualmente o transplante de fígado exhibe taxas de sobrevivência acima de 85% no primeiro ano e acima de 70% em cinco anos (DIENSTAG; COSIMI, 2012), com custos altos, mas que equivalem às reinternações frequentes de pacientes cirróticos descompensados (STARZL *et al.*, 1982).

Ainda assim, novos problemas são sempre motivações para novos avanços. “O transplante de órgãos é vítima de seu próprio sucesso” (POLLARD, 1997), o que tornou a falta de órgãos disponíveis o problema a ser resolvido. Doação intervivos, “split-liver” e o transplante dominó são exemplos de técnicas desenvolvidas para ajudar a solucionar as consequências dessa escassez, além do uso de fígados doados considerados marginais (ADAM *et al.*, 2003; DIENSTAG; COSIMI, 2012).

Atualmente, o Brasil possui o maior programa público de transplante hepático do mundo. Na Bahia, onde o programa de transplante hepático iniciou em 2001 no Hospital Português, esse procedimento encontra-se em franca expansão, sendo o segundo centro do país a usar a técnica piggyback com anastomose cava-caval látero-lateral e o segundo a utilizar o tacrolimo como imunossupressor. No último ano (2012), a sobrevivência pós-operatória foi 89,3% nos transplantes de fígado realizados em nosso estado.

1.2 INFECÇÃO E TRANSPLANTE

Apesar de tantos avanços e sucessos na curta história do transplante hepático, as infecções persistem como uma das principais causas de morbimortalidade no pós-transplante (FISHMAN, 2007). Agentes imunossupressores reduzem a incidência de rejeição do fígado transplantado enquanto aumentam a

susceptibilidade dos pacientes a infecções oportunistas (FISHMAN; RUBIN, 1998; FISHMAN, 2007).

Cerca de dois terços dos pacientes submetidos a transplante hepático apresentarão pelo menos um episódio de infecção importante, consequência da fragilidade do receptor: portador de uma saúde precária no pré-transplante, submetido a um procedimento complexo, e mantido sob imunossupressão no pós-transplante (FISHMAN, 2007). Em uma análise retrospectiva de 321 autopsias realizadas em receptores de transplantes de fígado entre 1982 e 1997, infecção foi a principal causa de morte, responsável por 64% dos óbitos, sendo que dois terços dos casos ocorreram nos primeiros 100 dias após a cirurgia (TORBENSON *et al.*, 1998).

Melhoramentos técnicos do transplante de fígado (ADAM *et al.*, 2003; DIENSTAG; COSIMI, 2012), o surgimento de novos esquemas imunossupressores (MCMASTER; BUIST, 1993; MCMASTER *et al.*, 1998), e o estabelecimento de regimes de profilaxia de infecções bacterianas, virais e fúngicas (FISHMAN, 2007) proporcionaram uma diminuição das complicações infecciosas após o transplante, além da melhora da sobrevida (DIENSTAG; COSIMI, 2012). Entretanto, as casuísticas continuaram a mostrar que mais de 50% dos receptores apresentam pelo menos um episódio infeccioso durante o primeiro ano após o transplante, com 28% a 77% dos óbitos causados direta ou indiretamente por infecção não controlada (CUBIELLA *et al.*, 2001; GARCÍA *et al.*, 1998; LOSADA *et al.*, 2002; PAYA *et al.*, 1993; SAINT-VIL *et al.*, 1991; SINGH *et al.*, 1994; WADE *et al.*, 1995).

Um processo infeccioso não detectado ou não controlado precocemente pode rapidamente evoluir para doença disseminada e ameaçar a vida. Por outro lado, seu diagnóstico pode ser mascarado pela própria imunossupressão (WADE *et al.*, 1995), sendo mais difícil reconhecê-lo em receptores de transplante do que em pessoas com a função imunológica normal, uma vez que os sinais e sintomas de infecção podem ser comuns a outras causas, inclusive não infecciosas (FISHMAN, 2007).

Neste panorama, dificuldades não faltam no manejo clínico do paciente transplantado de fígado. Frequentemente, o receptor apresenta causas não infecciosas de febre, tal como a rejeição do órgão (FISHMAN; RUBIN, 1998). O uso de antimicrobianos traz efeitos tóxicos, além de poder interagir com os agentes imunossupressores (KUYPERS, 2008). O espectro de patógenos potenciais é amplo, e muitas vezes a infecção progride rapidamente, demandando assim um

diagnóstico microbiológico precoce e específico para orientar o tratamento e minimizar o uso desnecessário de antimicrobianos (FISHMAN, 2007).

O risco de infecção se modifica ao longo dos meses de acompanhamento do receptor de órgão-sólido (FISHMAN, 2007). Estas modificações ocorrem em decorrência de fatores como o risco de rejeição ao enxerto, a intensidade da imunossupressão e outros fatores que possam contribuir para a suscetibilidade à infecção. Estratégias de prevenção de infecção (vacinação, profilaxia universal e terapia preemptiva) ajudaram a alterar a incidência e gravidade das infecções no pós-transplante (FISHMAN, 2007; RUBIN, 1991, 2000).

Assim, um padrão temporal das infecções de pacientes no pós-transplante tornou-se conhecido. Infecções oportunistas são menos frequentes no primeiro mês pós-transplante devido a uma imunossupressão ainda incipiente. Em geral, infecções nesse período são originadas do doador ou do receptor ou são fruto de complicações cirúrgicas (FISHMAN, 2007). Entre o segundo e o sexto mês pós-transplante, infecções virais e episódios de rejeição são responsáveis pela maioria dos quadros febris. A profilaxia com sulfametoxazol-trimetropim previne infecções oportunistas bacterianas, enquanto que muitos serviços utilizam profilaxia universal para herpesvírus (ALLICE *et al.*, 2009; GRIFFITHS *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2012; RUBIN, 2000; TRYPHONOPOULOS *et al.*, 2011). Após seis meses de transplante, a imunossupressão é reduzida em receptores com boa função do enxerto, diminuindo bastante o risco de infecção. Ainda assim, esses pacientes permanecem com risco elevado de infecções comunitárias, o que leva a recomendações universais de cuidados higiênico-dietéticos (FISHMAN, 2007).

1.3 CITOMEGALOVÍRUS

O Citomegalovírus (CMV) é um vírus onipresente, de distribuição mundial, com prevalência inversamente proporcional à condição socioeconômica da população estudada (CANNON; SCHMID; HYDE, 2010; CHEN *et al.*, 2012). Este patógeno está associado a doenças oportunistas, geralmente promovendo infecções assintomáticas em situações de integridade do sistema imune. Ocasionalmente, pacientes imunocompetentes apresentam uma síndrome de mononucleose associada ao CMV (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007).

Sua primeira apresentação clínica reconhecida e descrita desde o final do século XIX - a “Doença de Inclusão Citomegálica” - é uma forma grave de doença congênita que era identificada por apresentar inclusões intranucleares (lesões em “olhos de coruja”) (REDDEHASE, 2006), vistas em células de glândulas salivares, fígado, pulmão, rim, pâncreas e tireóide de autópsias de crianças (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007). Como as evidências da época sugeriam uma etiologia viral, o CMV acabou sendo isolado quase simultaneamente por três laboratórios independentes entre si em meados do século passado (ROWE *et al.*, 1956; SMITH, 1956; WELLER *et al.*, 1957).

O CMV pertence à família *Herpesviridae*, sub-família *Betaherpesvirinae* e gênero *Cytomegalovirus*. Desconhecida até a década de 1960, a morfologia dos vírus dessa família foi desvendada através de microscopia eletrônica naquela época (NIL; MORGAN; ROSE, 1968), quando foi observado seu formato icosaédrico (Figura 2).

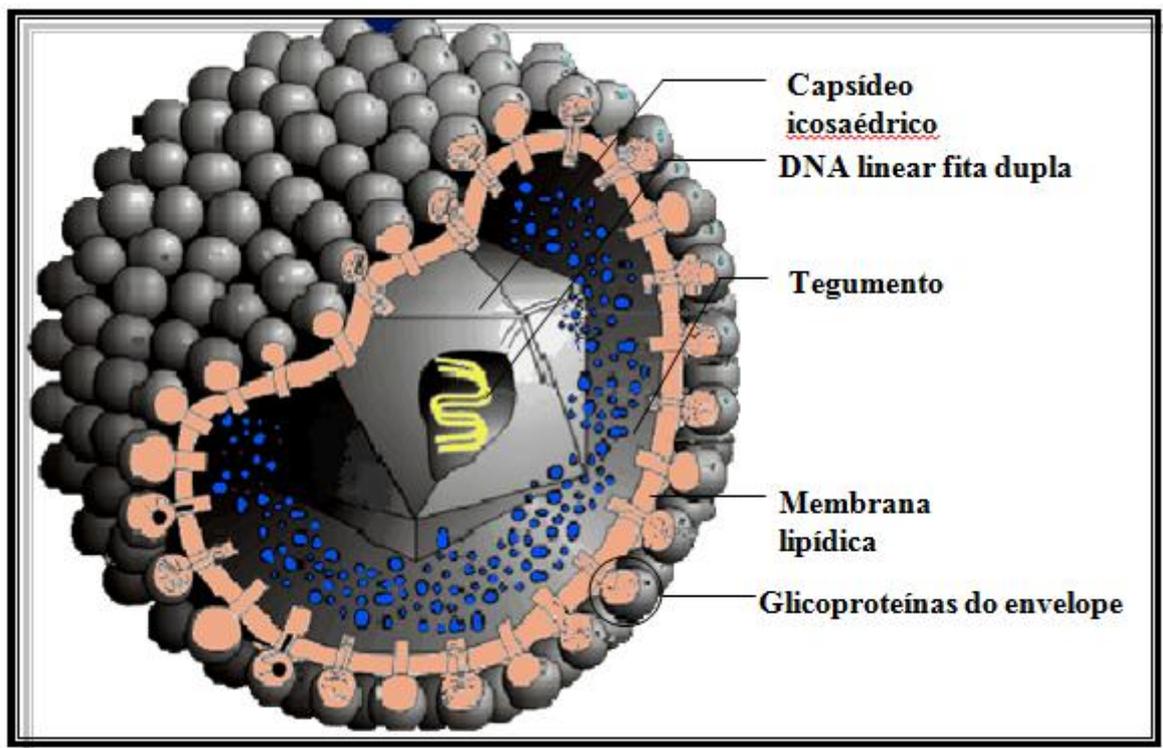


Figura 2. Estrutura do citomegalovírus humano.

Fonte: Adaptado de BIOGRAFIX – '97 Marko Reschke. Disponível em: <http://www.molbio1.princeton.edu/labs/enquist/research/PRVstructure.html>.

A família *Herpesviridae* possui oito diferentes tipos de vírus compostos de dupla fita de DNA, associados a um amplo espectro de doenças (Quadro 1). As

principais características destes vírus são ubiquidade, potencial citotóxico e capacidade de latência no hospedeiro, sendo, por isso, causadores das infecções mais frequentes em pacientes imunocomprometidos (BELL, 1997; BROWN; ABERNATHY, 1998). Desde 1973 o Grupo de Estudos dos Herpesvírus do Comitê Internacional de Taxonomia Viral classificou o CMV como Herpesvírus Humano 5 (HHV-5) (BROWN; ABERNATHY, 1998).

Subfamílias	Espécies
<i>Alfaherpesvirinae</i>	Herpes simples tipo 1 (HSV-1/HHV-1) Herpes simples tipo 2 (HSV-2/HHV-2) Vírus Varicela-Zoster (VZV/HHV-3)
<i>Betaherpesvirinae</i>	Herpesvírus Humano 6 (HHV-6) Herpesvírus Humano 7 (HHV-7) Citomegalovírus (CMV/HHV-5)
<i>Gamaherpesvirinae</i>	Herpesvírus Humano 8 (KSHV/HHV-8) Vírus Epstein-Barr (EBV/HHV-4)

Quadro 1. Família *Herpesviridae*.

Considerado o maior membro desta família, o CMV possui um diâmetro de aproximadamente 200 nm (BROWN; ABERNATHY, 1998; COSTA, 1999; MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007). Seu genoma é constituído por uma fita dupla de DNA, contendo: cerca de 240 quilobases; um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 150 nm de diâmetro contendo 162 capsômeros; um material amórfico e assimétrico rodeando o capsídeo e designado tegumento ou matriz; e um envelope glicolipídico contendo glicoproteínas virais e proteínas integrais em sua superfície (ALFORD; BRITT, 1990; MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007; MOCARSKI *et al.*, 1990).

O capsídeo icosaédrico, é formado por subunidades de capsômeros e é envolvido por um tegumento amorfo, que é constituído por três fosfoproteínas predominantes: pp150, pp65 e pp71, derivados dos genes UL32, UL83 e UL82, respectivamente. Suas funções não são bem conhecidas, entretanto, elas são antigênicas e marcadores recentes de infecção viral, uma característica que está sendo utilizada no diagnóstico, em particular a pp65 na técnica de antigenemia

(BRENNAN, 2001; HOZ; STEPHENS; SHERLOCK, 2002; KERN *et al.*, 2002; MARCHETTI *et al.*, 2011).

O CMV é clinicamente importante em situações onde há alteração da imunidade celular, seja pela sua ausência (como nas infecções congênitas transplacentárias), por seu comprometimento (como na Síndrome de Imunodeficiência Adquirida - SIDA), ou por sua supressão para evitar a rejeição celular a enxertos (como nos receptores de transplantes de órgãos sólidos ou medula óssea) (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007).

Sua transmissão ocorre normalmente pelo contato com secreções infectadas, como saliva, urina, leite materno e secreções genitais. Esta é mais comum nos primeiros anos de vida em países em desenvolvimento, e aumenta progressivamente com a idade em países mais desenvolvidos. A infecção primária promove uma resposta imune celular ampla, intensa e duradora em pacientes imunocompetentes (KERN *et al.*, 2002; SYLWESTER *et al.*, 2005), que mantém o vírus em estado de latência, mas não impede as reinfecções por cepas distintas. Quando estas ocorrem, há uma limitação dos padrões agudos de doença tanto em pacientes imunocompetentes quanto em pacientes imunocomprometidos (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007).

O CMV é o único herpesvírus com transmissão transplacentária natural, podendo promover dano neurológico ao recém-nascido (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007). Este tipo de transmissão ocorre menos frequentemente durante a infecção recorrente (BOPPANA *et al.*, 2001) do que na infecção primária devido ao controle imune adaptativo (FOWLER *et al.*, 1992).

Durante a infecção aguda, o vírus infecta células da linhagem mielóide, servindo tanto para sua disseminação para outros tecidos, quanto como local de latência por toda a vida do hospedeiro (HERTEL *et al.*, 2003; KERN *et al.*, 2002; SYLWESTER *et al.*, 2005). Macrófagos e células dendríticas são de origem mielóide e residem em todos os tecidos que são fontes de transmissão viral por transplante de órgãos sólidos (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007). Além disso, no sangue periférico o CMV é altamente associado à presença de células, podendo ser transmitido em transfusões de hemácias, plaquetas e leucócitos, mas não com plasma fresco congelado ou crioprecipitado (CECCHERINI-NELLI *et al.*, 2004).

Por serem células apresentadoras de antígenos e participantes importantes da resposta celular mediada por linfócitos T, macrófagos e células dendríticas

infectados estão sujeitos a imunomodulação por produtos do gene viral (HERTEL *et al.*, 2003; KERN *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2009; SYLWESTER *et al.*, 2005). Isto permite que o vírus escape do clareamento imune, o que contribui com sua persistência no organismo. Além disso, essas funções moduladoras facilitam a infecção primária, sua disseminação pelo organismo e prolongam sua replicação. O controle da replicação ocorre pela resposta imune mediada por linfócitos T após um período prolongado, acarretando em viremia contínua após a infecção primária com aumento do risco de transmissão, que pode durar meses no hospedeiro adulto até anos em crianças (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007).

Assim, além da infecção primária e da reinfecção, através de transmissão pelo órgão doado, transfusões sanguíneas ou mesmo contato interpessoal, pacientes receptores de fígado podem também apresentar reativação do vírus latente celular (BURAK *et al.*, 2002; LAUTENSCHLAGER, 2009; RAZONABLE, 2008). Para tanto, três eventos são fundamentais para o desenvolvimento da doença: um período pró-inflamatório, mediado por citocinas que estimulam células infectadas e reativam o vírus latente a se replicar; a imunossupressão, que permite a amplificação do vírus via replicação produtiva local ou sistemicamente; e finalmente o dano viral direto ou indireto sistêmico ou a um órgão alvo (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007).

1.4 CITOMEGALOVÍRUS E TRANSPLANTE DE FÍGADO

O CMV é uma das infecções mais comuns dos receptores de fígado, e também uma das mais difíceis de diagnosticar, pois necessita determinar-se se o CMV é a causa dos sintomas apresentados. O espectro dos sintomas pode variar desde uma síndrome febril até uma infecção sistêmica fatal (RAZONABLE, 2008).

Existem três manifestações clínicas básicas do CMV em pacientes transplantados de órgãos sólidos (LJUNGMAN; GRIFFITHS; PAYA, 2002; RAZONABLE, 2008): a síndrome CMV, caracterizada por febre associada à astenia, por vezes artralgias e “rash” cutâneo, neutropenia, plaquetopenia e elevação de transaminases; a doença orgânica, que requer a detecção do vírus no tecido, como pneumonite, gastroenterite, hepatite, retinite, pancreatite, miocardite e raramente encefalite ou neuropatia periférica; e os efeitos indiretos, como o risco de infecções

oportunistas virais e bacterianas, a reativação do vírus C da hepatite (HCV) e a rejeição do enxerto (BOSCH *et al.*, 2011).

Esses efeitos indiretos são consequências da mesma imunomodulação que protege o CMV da imunidade do hospedeiro, e de sua predileção por células imunológicas (HERTEL *et al.*, 2003; KERN *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2009; SYLWESTER *et al.*, 2005). Assim, não é incomum que infecções por outros herpesvírus ocorram em pacientes infectados pelo CMV (SAMPAIO *et al.*, 2011).

O risco de manifestações clínicas decorrentes da infecção por CMV varia de acordo com o órgão transplantado, do tipo e intensidade da imunossupressão (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007; ROWSHANI *et al.*, 2005), o que implica na adoção de diferentes métodos de diagnósticos e esquemas preventivos pelos diversos serviços de transplante. O transplante de fígado é considerado como de risco moderado, uma vez que reconhecidamente é um órgão privilegiado imunologicamente (THOMSON; KNOLLE, 2010). Estudos experimentais - principalmente em ratos (KAMADA; DAVIES; ROSER, 1981; KAMADA, 1985) - demonstraram que o fígado é o órgão mais tolerado pelo sistema imune. Em humanos esse fenômeno se repete (PAGE; DAR; KNECHTLE, 2012), podendo chegar a situações onde a imunossupressão pode ser suspensa, não ocorrendo fenômeno de rejeição (ORLANDO; SOKER; WOOD, 2009).

A incidência das manifestações clínicas do CMV em pacientes receptores de fígado é de 18% a 29%, variando de acordo com a sorologia tanto do doador quanto do receptor (RAZONABLE, 2008; TRYPHONOPOULOS *et al.*, 2011). O maior risco ocorre quando há sorologia para CMV reagente no doador (D+) e não reagente no receptor (R-) (BOSCH *et al.*, 2011; LAUTENSCHLAGER, 2009; TRYPHONOPOULOS *et al.*, 2011), mas também pode ocorrer em receptores reagentes (R+), em geral por reativação do próprio vírus latente (LAUTENSCHLAGER, 2009).

A utilização meramente qualitativa de antigenemia ou reação em cadeia da polimerase em tempo real ("real-time PCR" – RT-PCR) para CMV não prevê o risco de se desenvolverem manifestações clínicas associadas ao CMV em receptores de fígado, como ocorre em transplantados de medula óssea (BONON *et al.*, 2006; PERES *et al.*, 2010). Para receptores de fígado não há ainda um valor de corte ("cut-off") determinado para indicar o uso propriamente do tratamento da doença citomegalovirótica (MARCHETTI *et al.*, 2011; SANGHAVI *et al.*, 2008).

Estratégias de prevenção de infecções por CMV têm revolucionado os cuidados pós-transplante (FISHMAN, 2007). Duas condutas preventivas são utilizadas: a profilaxia universal, onde a terapia antiviral é fornecida a todos os pacientes em situação de risco, por um período definido; e a terapia preemptiva, onde ensaios laboratoriais quantitativos - como a antigenemia ou o RT-PCR - são usados para monitorar pacientes em intervalos predefinidos, a fim de detectar a infecção antes de surgirem sintomas. Dependendo dos protocolos de cada serviço, um resultado positivo dá início ao tratamento antiviral ou à redução da imunossupressão, ou a ambos (FISHMAN, 2007; KIM *et al.*, 2012; LAUTENSCHLAGER, 2009; TRYPHONOPOULOS *et al.*, 2011).

Sem prevenção, as infecções por CMV podem ocorrer em receptores de fígado (BOSCH *et al.*, 2011; LAUTENSCHLAGER, 2009; SEEHOFER *et al.*, 2002), principalmente durante os primeiros três meses, quando a imunossupressão é mais intensa (FISHMAN, 2007; LAUTENSCHLAGER, 2009; MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007). Assim, a alternativa às estratégias preventivas - ou seja, o tratamento empírico da doença manifesta - incorre em riscos de complicações para o receptor de fígado, enquanto que a terapia preemptiva aumenta os custos extras com o monitoramento e o atendimento ambulatorial, e a profilaxia universal expõe os pacientes aos efeitos tóxicos da terapia antiviral profilática (FISHMAN, 2007).

Esquemas preventivos geralmente utilizam ganciclovir ou valganciclovir (ALLICE *et al.*, 2009; ASBERG *et al.*, 2009; EID *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2012; TRYPHONOPOULOS *et al.*, 2011). Apesar de reduzirem a incidência de manifestações clínicas do CMV, seu uso é associado à supressão de medula óssea, à indução de resistência aos antivirais e ao desenvolvimento tardio de manifestações pelo CMV (EID *et al.*, 2008; FISHMAN, 2007; KIM *et al.*, 2010). Em nosso meio, resistência ao ganciclovir já foi descrita em transplantado renal (PEIXOTO *et al.*, 2012).

Custos elevados limitam a utilização das estratégias preventivas em receptores de fígado em países em desenvolvimento, que são regiões de alta soroprevalência para CMV (CANNON; SCHMID; HYDE, 2010), onde a população geralmente é infectada desde a infância (CHEN *et al.*, 2012). Informações sobre a infecção por CMV em receptores de fígado dessas regiões e seu comportamento com o uso de ensaios clínicos, como a antigenemia, são importantes para ajudar a racionalizar as estratégias preventivas, reduzindo custos e dando cobertura aos

pacientes em maior risco (KIM *et al.*, 2010). É importante ressaltar que a antigenemia quantitativa é um teste que possui menor custo que o RT-PCR quantitativo e, por isso, tem sido empregada na rotina para triagem do CMV em vários estados brasileiros.

2 JUSTIFICATIVA

Populações de países em desenvolvimento apresentam alta soroprevalência para CMV e geralmente estão em contato com o vírus desde a infância, o que pode alterar o desenvolvendo das manifestações clínicas em situações de reinfecção ou reativação do vírus no seguimento pós-transplante de fígado.

Devido à maior tolerância imunológica, o receptor de fígado apresenta risco moderado de desenvolver manifestações clínicas associadas ao CMV quando comparado a outros transplantes de órgão sólido ou ao transplante de medula óssea. Assim, com o crescente aumento de transplantes de fígado realizados e os custos das estratégias preventivas existentes, é necessário determinar, nas populações de alta soroprevalência para CMV, o risco desta infecção em receptores de fígado e a interpretação da antigenemia quantitativa para aprimorar as estratégias de prevenção nesses pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização e desempenho da antigenemia quantitativa para o diagnóstico da infecção ativa por CMV em receptores de fígado em uma população de alta soroprevalência para CMV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a soroprevalência de CMV em receptores de fígado do estado da Bahia.
2. Estimar a incidência da infecção ativa por CMV nestes receptores.
3. Determinar o período de maior incidência das manifestações clínicas da infecção ativa por CMV nestes receptores.
4. Determinar a sobrevida dos receptores de fígado, avaliando sua relação com a infecção por CMV.
5. Determinar o “cut-off” da antigenemia quantitativa para o diagnóstico de doença ativa por CMV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO E POPULAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo, com coleta retrospectiva, com pacientes transplantados de fígado submetidos à antígenoemia quantitativa para diagnóstico e monitorização da infecção por CMV. Todos os transplantes foram realizados no Hospital Português, na cidade de Salvador – Bahia. Trata-se de um hospital terciário filantrópico, que realiza transplantes de fígado desde 2001, com uma média de 27,3 transplantes por ano à época do estudo, no período de março de 2007 a abril de 2009, com segmento pós-transplante.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram critérios de inclusão: dados completos em prontuários médicos; assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e realização de pelo menos um teste de antígenoemia durante o seguimento pós-transplante.

Foram excluídos os pacientes que não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou que não colheram antígenoemia para diagnóstico e monitorização da infecção por CMV.

4.3 COLETA DE DADOS E VARIÁVEIS DE INTERESSE

A coleta dos dados foi feita de forma retrospectiva a partir de revisão dos prontuários e outros registros médicos. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes foram avaliados à época das coletas das amostras de antígenoemia. Durante o acompanhamento ambulatorial, amostras de sangue total dos receptores foram coletadas em intervalos de tempo não padronizados, a critério do médico assistente com o objetivo de monitorizar e diagnosticar a infecção por CMV. Os desfechos analisados foram o tempo de livre de síndrome citomegalovirótica e sobrevida em um e quatro anos.

A técnica de antigenemia utilizada foi para detecção do antígeno pp65 do CMV através do uso de anticorpos monoclonais primários, referida pelo Kit CMV Brite Turbo Antigenemia (DPM Diagnóstica) (PERCIVALLE *et al.*, 2008). Foram coletados de 2 a 5 ml de sangue periférico em tubo com EDTA, onde as amostras foram processadas no máximo 6 horas após a coleta.

Segue um resumo das principais etapas:

a) Lise de hemácias e preparação da suspensão de leucócitos: Em 2ml de sangue foram adicionados 30mL de solução de lise de hemácias resfriada a 4°C, em casos de neutropenia, foram utilizados 4mL de sangue e o dobro de solução de lise de hemácias. A mistura foi incubada por 5 a 10 min a 4°C. Após centrifugação por 2 min a 2.500rpm, o sobrenadante foi adicionado 5mL de PBS ao pellet de leucócitos. Em pacientes com neutropenia severa foram adicionados apenas 2mL de PBS ao pellet.

b) Preparação das lâminas, coloração e marcação: Foi realizada a contagem de leucócitos em câmara de Neubauer e o ajuste do volume para 2×10^6 células por mL com PBS. As lâminas foram preparadas em triplicatas para cada paciente. Foi realizada a seguir a fixação, permeabilização, coloração e marcação das lâminas, seguindo todas as etapas referidas pelo Kit CMV Brite Turbo Antigenemia (DPM Diagnóstica®) (PERCIVALLE *et al.*, 2008). Em todos os ensaios foram utilizados controles positivos e negativos para todas as reações em paralelo com as amostras para validação dos resultados.

c) Leitura e interpretação das lâminas: para leitura das lâminas foi utilizado um microscópio de fluorescência - Olympus BX 40 - com aumento de 400X, combinação para uso do FITC; Cubo de fluorescência: U – MNB; Comprimento de onda para excitação: 470 – 490 nm; e comprimento de onda para emissão: > 515 nm. Todos os campos foram analisados, as células positivas mostraram coloração verde amarelada no núcleo das células polimorfonucleares (Figura 3), pela detecção do antígeno pp65 e as células negativas não apresentaram esse tipo de coloração. Foi realizada uma contagem global das células positivas com liberação de um resultado quantitativo, sendo indicado o número de células em 200.000 leucócitos analisados, que equivalem aproximadamente 100.000 polimorfonucleares.

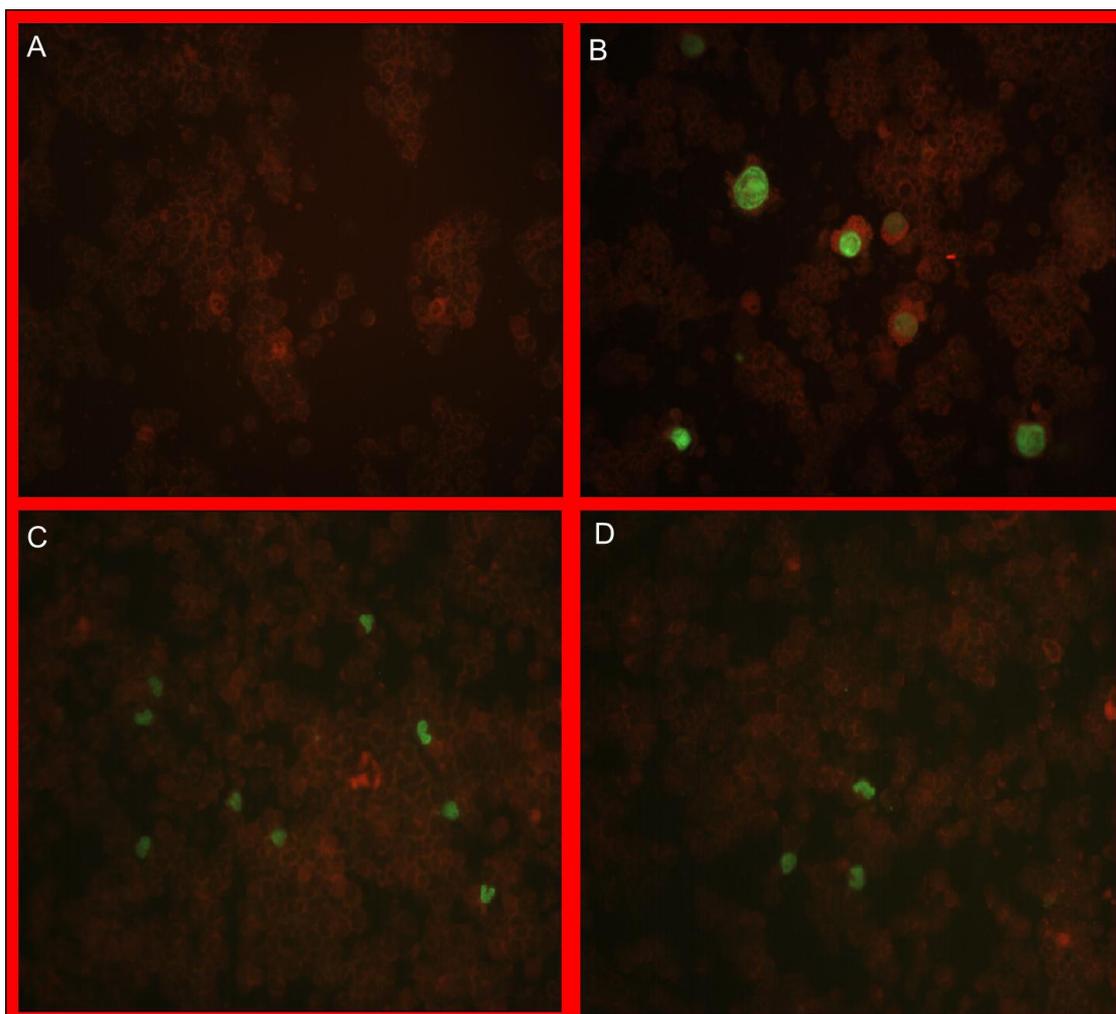


Figura 3. Antigenemia para CMV (Kit Turbo-IQ Products).

A. Controle Negativo

B. Controle Positivo

C. Paciente 1 (Antigenemia positiva)

D. Patient 2 (Antigenemia positiva)

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas foram expressas através de suas proporções. Foram calculadas médias e desvios padrão para as variáveis contínuas com distribuição normal e medianas, e quartis para as não normais.

Para a análise da sobrevida em um e quatro anos foram considerados os óbitos (data do óbito) por qualquer causa. Foram censurados, ao final do estudo, os pacientes que permaneceram vivos após um e quatro anos do transplante hepático. Para os pacientes com acompanhamento perdido, a data da censura foi aquela do último registro em prontuário médico ou último contato dos pesquisadores. Foram

calculadas as funções de sobrevida empregando-se o método de Kaplan-Meier, no qual foram estimadas curvas, agrupando-se os pacientes segundo as variáveis selecionadas para o estudo e tendo sido utilizado o teste de Log-rank (Mantel-Cox) ou Breslow (Generalized Wilcoxon) para comparação das funções de sobrevida para cada variável. O tempo livre de síndrome citomegalovirótica foi analisado com a mesma metodologia.

Para avaliar o desempenho da antígenoemia quantitativa para CMV no diagnóstico de infecção ativa em pacientes transplantados de fígado e determinar o seu *cut-off*, foi analisada a capacidade discriminatória do exame, ou seja, sua capacidade de distinguir os doentes dos não doentes, através do cálculo da área sob a curva ROC (AUC ROC). A ausência de células positivas na antígenoemia quantitativa é compatível com a ausência de doença. Para aqueles cuja antígenoemia apresenta um resultado positivo, ou seja, maior que 0 células / 200.000 leucócitos, é que existe dúvida acerca da presença ou não de doença citomegalovirótica. Assim nesta análise, apenas os casos com antígenoemia positiva foram considerados.

Todos os testes foram bicaudados e foram considerados estatisticamente significantes resultados com valores de $p \leq 0,05$. Os dados foram analisados com auxílio dos softwares Statistical Package for Social Sciences (SPSS, versão 20.0, Chicago, IL, USA) e MedCalc (versão 12.1.4.0, Bélgica).

5 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo respeitou os princípios éticos de pesquisa previstos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz (CEP/CPqGM/Fiocruz), e todos os pacientes incluídos no presente estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

6 RESULTADOS

Foram realizados 60 transplantes de fígado no período analisado, sendo que 44 receptores realizaram ao menos uma antigenemia quantitativa no período de acompanhamento pós-transplante (com um mínimo de um e máximo de 17 exames realizados). Os dados desses pacientes estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Características da amostra e apresentação da síndrome citomegalovirótica (n=44)

Variável	n (%)
Sexo do receptor – masculino	35 (79,5)
Idade ao transplante (média ± DP)	60,8 ± 7,2
Etiologia da doença hepática (n=64)	
Hepatite C ^a	20 (31,3)
Doença Alcoólica do Fígado ^a	15 (23,4)
Hepatocarcinoma ^a	7 (10,9)
Criptogênica	5 (7,8)
Hepatite auto-imune	3 (4,7)
Hepatite fulminante	1 (1,6)
Cirrose biliar primária	1 (1,6)
Budd-Chiari	1 (1,6)
Hepatite B	1 (1,6)
Sorologia positiva para HCV (receptor)	20 (45,5)
Recidiva do HCV	5 (25,0)
Sorologia positiva para CMV (receptor)	40 (90,9)
Desenvolvimento de síndrome citomegalovirótica em até 180 dias	18 (40,9)
Tempo livre de sínd. citomegalovirótica até 180 dias (média ± EP)	148,4 ± 7,6
Sinais / sintomas associados à síndrome citomegalovirótica	
Leucócitos (média ± DP)	2.677,2 ± 921,4
Plaquetopenia (< 1 x 10 ⁵)	36 (70,6)
Fraqueza	22 (45,8)
Cefaléia	20 (43,5)
Diarréia	18 (36,7)
Mialgia	10 (21,3)
Artralgia	10 (21,3)
Azia	9 (19,1)
Dor abdominal	9 (18,8)
Cólica	8 (17,4)
Vômitos	8 (17,0)
Exantema	5 (10,6)
Febre	2 (4,1)
Rejeição	1 (2,3)
Retransplante	1 (2,3)
Óbito em 01 ano	6 (13,6)
Sobrevida em 01 ano, em dias (média ± EP)	338,2 ± 11,4
Óbito em 04 anos	12 (27,3)
Sobrevida em 04 anos, em dias (média ± EP)	1195,2 ± 72,5
Causa do óbito	
Sepse	3 (25,0)
Disfunção do enxerto	1 (8,3)
Metástase de Hepatocarcinoma	1 (8,3)
Recidiva de HCV	1 (8,3)
Doença citomegalovirótica	1 (8,3)
Infarto Agudo do Miocárdio	1 (8,3)
Acidente Vascular Cerebral	1 (8,3)
Tuberculose miliar	1 (8,3)
Câncer de cólon	1 (8,3)
Leptospirose	1 (8,3)

* DP: desvio padrão; EP: erro padrão; ^a Hepatite C associado a Hepatocarcinoma estava presente em 05 pacientes e Hepatite C associado a Doença Alcoólica do Fígado estava presente em outros 05 pacientes.

A maioria dos receptores foi do sexo masculino (79,5%), apresentando idade média de 60,8 anos ao transplante e tendo a infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV) como principal etiologia da doença hepática. Dos 44 pacientes avaliados, todos realizaram sorologia para CMV na avaliação pré-transplante, sendo que 40 apresentavam sorologia positiva (R+), representando 90,9% do total. Entre os doadores, 32 (72,8%) não constava a sorologia para CMV. Entre aqueles com sorologia registrada, nove foram positivos (D+) e apenas três foram negativos (D-).

A definição clínica de infecção por CMV foi a apresentação de quadro viral (febre e/ou astenia) associado à leucopenia (leucócitos < 4.000/mL) e/ou plaquetopenia (plaquetas < 100.000/mL), e/ou sintomas gastrointestinais, enterite, hepatite, artralgia, retinite, pneumonite, colite, esofagite, encefalite (LJUNGMAN; GRIFFITHS; PAYA, 2002). Dos pacientes estudados, 18 (40,9%) apresentaram quadro clínico compatível com infecção ativa por CMV no período de acompanhamento até 180 dias, com tempo médio livre de doença de $148,4 \pm 7,6$ dias.

Ao estratificarmos a análise segundo a sorologia para CMV do receptor (R+ e R) (Gráfico 1, painel A), obtém-se curvas que tendem a se distanciar numa fase precoce (primeiros dois meses) dos 180 dias (Generalized Wilcoxon test, $p = 0,058$), com menor tempo livre de doença naqueles com sorologia negativa. No entanto, as curvas voltam a se aproximar até o final do período (Log Rank test, $p = 0,106$), o que sugere uma relevância maior do estado sorológico quanto ao CMV nos primeiros dois meses pós-transplante. Dois receptores com sorologia negativa (R-) apresentaram quadro clínico de infecção por CMV (50% neste subgrupo), sendo os outros 16 casos de receptores com sorologia positiva (D+) (40% neste subgrupo).

A sobrevida média em um ano foi de $338,2 \pm 11,4$ dias, com seis pacientes falecidos nesse período. Em quatro anos, a sobrevida média foi de $1195,2 \pm 72,5$ dias, com 12 óbitos nesse período. As causas dos óbitos estão relacionadas na Tabela 1 e incluem sepse, disfunção do enxerto, recidiva de HCV e um quadro de doença viral citomegalovirótica. Receptores com sorologia negativa para CMV apresentaram menor sobrevida (Gráfico 1, painéis B e C), tanto para um ano de acompanhamento, quanto para um acompanhamento de quatro anos ($p = 0,022$ e $p = 0,004$, respectivamente).

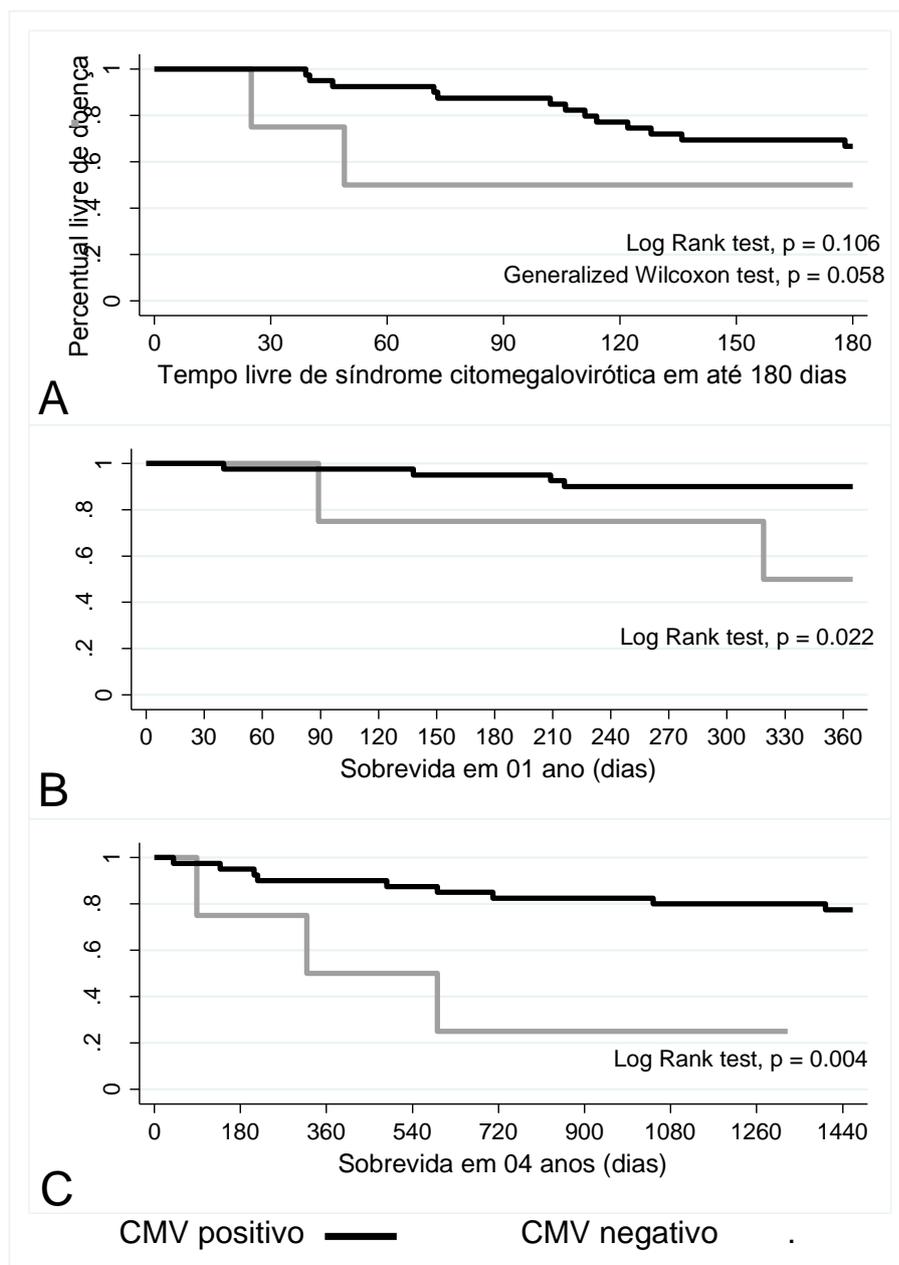


Gráfico 1. Curvas de tempo livre de síndrome citomegalovirótica em 180 dias (A) e sobrevidas em 01 (B) e 04 anos (C), segundo a sorologia para CMV do receptor.

Dos 44 receptores de fígado, 20 apresentavam sorologia positiva para HCV (45,5%). Destes pacientes, cinco apresentaram recidiva do HCV (25%), sendo tratados de acordo com o protocolo local. Um destes pacientes foi a óbito em consequência de cirrotização do enxerto (Tabela 1). Houve ainda um caso de rejeição, tratada de acordo com o protocolo do serviço e um retransplante por estenose biliar tardia.

Houve uma tendência à menor sobrevida em quatro anos no subgrupo de pacientes com sorologia positiva para HCV ($p = 0,089$), com 40% mortalidade ao final do período (Gráfico 2).

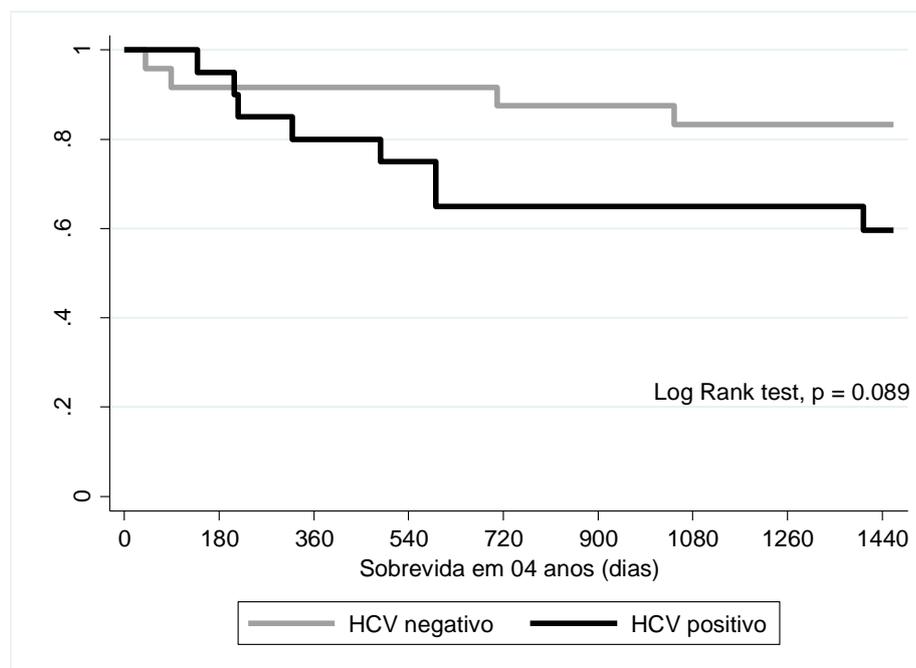


Gráfico 2. Curva de sobrevida em quatro anos segundo a sorologia para HCV do receptor.

Dos 44 receptores, houve um total de 344 amostras submetidas à antigenemia, com um mínimo de uma e máximo de 17 amostras por paciente, respectivamente. Destas, apenas 52 amostras foram positivas (≥ 1 célula positiva) pela antigenemia, representando 24 pacientes. A mediana da antigenemia foi de 3 células positivas/200.000 leucócitos, com Intervalo Interquartil 1,0 – 26,75.

A área sob a Curva ROC foi de 0,745 (IC 95% 0,606 – 0,856, $p = 0,006$), o que representa uma boa capacidade discriminatória, e foi estabelecido como limiar de positividade para o diagnóstico da citomegalovirose um valor de antigenemia superior a 8 células positivas/200.000 leucócitos, com uma sensibilidade de 88,9 (IC 95% 51,8 – 99,7) e especificidade de 74,4 (IC 95% 58,8 – 86,5). Este limiar resultou numa razão de probabilidade (RP) ou razão de verossimilhança positiva de 3,47 (IC 95% 2,6 – 4,6) e RP negativa de 0,15 (IC 95% 0,02 – 1,0) (Gráfico 3).

7 DISCUSSÃO

O transplante hepático tem cada vez mais se estabelecido como tratamento de escolha para doenças hepáticas incuráveis por outros métodos, e não apenas para estágios terminais de doença (ADAM *et al.*, 2003; DIENSTAG; COSIMI, 2012; KEEFFE, 2001). Sua frequência vem aumentando no mundo inteiro, incluindo os países em desenvolvimento, regiões onde a soroprevalência para o CMV é alta desde a infância (KIM *et al.*, 2010).

A infecção por CMV tem sido uma realidade desde o início dos transplantes de fígado, causando morbimortalidade considerável (FISHMAN; RUBIN, 1998). A instituição de estratégias preventivas em países desenvolvidos ajudou a reduzir seu impacto, melhorando ainda mais seus resultados (FISHMAN, 2007). Esses locais, porém, possuem uma menor soroprevalência para o CMV, que aumenta com a idade (CANNON; SCHMID; HYDE, 2010).

Na profilaxia primária, todos os pacientes utilizam medicação por um período determinado do pós-transplante, geralmente nos três meses iniciais (FISHMAN, 2007). Pode-se utilizar drogas antivirais, como ganciclovir ou valganciclovir, ou anticorpos monoclonais anti-CMV (ALLICE *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2012; RUBIN *et al.*, 2000; TRYPHONOPOULOS *et al.*, 2011). Sua eficácia é alta, com redução das manifestações clínicas relacionadas ao CMV e suas consequências (FISHMAN, 2007). Há, porém, os riscos de efeitos adversos das medicações, a indução de resistência ao ganciclovir (ALLICE *et al.*, 2009; EID *et al.*, 2008; GRIFFITHS *et al.*, 2008) e o surgimento de manifestações tardias do CMV quando a profilaxia é suspensa (FISHMAN, 2007; KIM *et al.*, 2010; LAUTENSCHLAGER, 2009). Seu uso em países em desenvolvimento também é limitado pelo alto custo das medicações.

Já no tratamento preemptivo, o paciente é monitorizado por um período de tempo através de exame laboratorial, seja antigenemia ou RT-PCR, que determina não apenas a presença de inclusões virais ou cópias virais, mas também as quantificam (CORTEZ *et al.*, 2003; HUMAR *et al.*, 1999; MARCHETTI *et al.*, 2011). Caso a monitorização revele a presença de CMV, mesmo antes que o paciente desenvolva sintomas relacionados, é iniciado seu tratamento como prevenção à doença citomegalovirótica. Do mesmo modo, a incidência de manifestações clínicas relacionadas ao CMV e suas consequências são reduzidas, contudo também podem ser observadas as consequências do uso universal das medicações antivirais

(efeitos adversos, resistência a ganciclovir e as manifestações tardias ao CMV) (KIM *et al.*, 2012; PETIGNAT *et al.*, 2000; RAYES *et al.*, 2001; TRYPHONOPOULOS *et al.*, 2011). Países em desenvolvimento encontram limitações quanto ao custo dos exames laboratoriais, uma vez que cada paciente realiza exames com frequência semanal até três meses pós-transplante.

Assim, regiões com alta soroprevalência para CMV pouco realizam em termos de estratégia preventiva contra a infecção por CMV em receptores de fígado, permitindo uma “evolução natural da doença” e o tratamento de pacientes que apresentam manifestações óbvias ou sugestivas de CMV (KIM *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, aproveitamos a implantação da antigenemia quantitativa para CMV em um serviço de transplante de fígado da cidade de Salvador, no nordeste do Brasil, e avaliamos seus resultados. No início do estudo o grupo já havia realizado 40 transplantes ortotópicos de fígado, tendo completado 100 transplantes ao final do período estudado. Dos 60 pacientes que realizaram transplantes no período, 44 realizaram pelo menos uma antigenemia quantitativa para CMV.

Durante o período de implantação, não existia um protocolo de prevenção, uma vez que o tratamento específico para CMV era baseado em manifestações clínicas decorrentes da infecção ativa, sendo a antigenemia uma confirmação laboratorial da infecção por CMV. As modalidades de tratamento variaram desde a simples redução da imunossupressão até a internação para o uso de ganciclovir intravenoso.

Nesse período, de acordo com a definição clínica, 18 receptores (40,9%) desenvolveram manifestações clínicas de infecção por CMV, apesar de 24 receptores (54,5%) apresentarem antigenemia positiva em algum momento do acompanhamento. Esses resultados são um pouco acima da incidência descrita na literatura (RAZONABLE, 2008; TRYPHONOPOULOS *et al.*, 2011), mas corroboram o fato de que nem todo receptor infectado desenvolve manifestações clínicas da infecção por CMV (FISHMAN, 2007; LAUTENSCHLAGER, 2009; RAZONABLE, 2008).

Todos os 18 pacientes foram submetidos a tratamento para CMV com manejo da imunossupressão e o uso de ganciclovir. O período de desenvolvimento de doença ocorreu nos primeiros meses de transplante, com tempo médio de 148,4 \pm 7,6 dias, compatível com o descrito para as manifestações de infecção por CMV

em pacientes transplantados hepáticos (FISHMAN, 2007; LAUTENSCHLAGER, 2009; RAZONABLE, 2008; RUBIN, 2000).

Receptores com sorologia negativa para CMV (R-) apresentam maior risco para o desenvolvimento de manifestações clínicas de infecção por CMV (BOSCH *et al.*, 2011; TRYPHONOPOULOS *et al.*, 2011). Em nosso estudo, apenas quatro receptores (10%) apresentaram sorologia negativa para CMV, o que corrobora a esperada alta soroprevalência para CMV em nosso meio (CANNON; SCHMID; HYDE, 2010). Destes, dois (50%) apresentaram manifestações clínicas de infecção por CMV (BOSCH *et al.*, 2011; RAZONABLE, 2008; TRYPHONOPOULOS *et al.*, 2011). Dividindo os pacientes em dois grupos de acordo com sua sorologia, notamos que houve uma tendência a menor tempo livre de doença em receptores com sorologia negativa (R-), principalmente nos primeiros dois meses pós-transplante, fato não observado em locais onde a profilaxia é padronizada (FISHMAN; RUBIN, 1998; FISHMAN, 2007).

Receptores com sorologia negativa (R-) não apresentam imunidade ao CMV e, além do risco de infecção ativa, geralmente apresentam manifestações mais graves (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007; TRYPHONOPOULOS *et al.*, 2011). A sobrevivência de receptores com sorologia negativa para CMV foi menor tanto para o seguimento de um ano, quanto para o seguimento de quatro anos, denotando um pior resultado global desses pacientes, assim como descrito por Bosch *et al.* (2011).

Receptores com sorologia positiva para CMV têm menos chances de desenvolverem manifestações da infecção pelo vírus (LAUTENSCHLAGER, 2009; RAZONABLE, 2008; TRYPHONOPOULOS *et al.*, 2011). Mesmo assim, essa imunidade não é completamente efetiva, uma vez que reativações e até mesmo reinfecções por cepas distintas podem ocorrer nesses pacientes (FISHMAN, 2007; MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007). Em nosso estudo, 40% dos receptores com sorologia positiva desenvolveram manifestações de infecção por CMV. Suas consequências, no entanto, apresentam menor gravidade devido a alguma proteção da imunidade adquirida (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007).

Dentre as consequências da infecção por CMV em pacientes transplantados de fígado, encontram-se as que são decorrentes da imunomodulação que o vírus promove (HERTEL *et al.*, 2003; KERN *et al.*, 2002; SYLWESTER *et al.*, 2005). Assim, infecções oportunistas, rejeição, estenose de via biliar e recidiva de HCV são consequências da manifestação da infecção por CMV (FISHMAN, 2007).

Em nosso estudo, apenas um receptor, portador de HCV e com sorologia negativa para CMV, apresentou quadro clínico compatível com rejeição, tratado de acordo com o protocolo do serviço. Esse mesmo paciente apresentou manifestações clínicas de infecção por CMV, sendo tratado com ganciclovir. É o único com sorologia negativa desse estudo que permanece vivo (25%).

Dos vinte receptores portadores de HCV, cinco apresentaram recidiva. Todos possuíam sorologia positiva para CMV e nenhum apresentou manifestação de infecção pelo CMV. Por consequência, nenhum foi submetido a tratamento antiviral. Destes, quatro apresentaram alguma antigenemia positiva para CMV, com um mínimo de uma célula positiva e um máximo de cinco células positivas em 200.000 leucócitos, podendo caracterizar uma manifestação indireta da infecção por CMV (LJUNGMAN; GRIFFITHS; PAYA, 2002; RAZONABLE, 2008). Três desses pacientes faleceram, um com cirrotização do enxerto, outro por AVC e um terceiro por tuberculose miliar.

Apenas um receptor necessitou de retransplante, também portador de HCV, devido à estenose de via biliar. Esse paciente apresentou manifestações clínicas de infecção por CMV, além de úlceras esofágicas, sendo submetido a tratamento com ganciclovir. Suas antigenemias apresentaram valores baixos, com máximo de três células positivas, mas geralmente negativa. Evoluiu com estenose biliar não anastomótica, que pode estar associada à infecção por CMV como descrita em literatura (LLADÓ *et al.*, 2012). Foi submetido à retransplante e faleceu por disfunção primária do enxerto.

Receptores portadores de HCV formam um grupo especial de receptores de fígado (PASQUALE *et al.*, 2005; RIEDIGER *et al.*, 2007). Apesar de não ter atingido a significância estatística, provavelmente pelo reduzido poder de análise devido ao tamanho amostral, a diferença absoluta em sobrevida e mortalidade em quatro anos é relevante. São pacientes com alto risco de recidiva do HCV, com comprometimento do enxerto, e risco de retransplante. Mesmo quando não apresentou manifestações clínicas de infecção por CMV, a presença deste na antigenemia se associou às complicações que surgiram em receptores portadores de HCV, assim como descrito em manifestações indiretas da infecção por CMV (FISHMAN, 2007; LJUNGMAN; GRIFFITHS; PAYA, 2002; RAZONABLE, 2008).

Dos receptores que faleceram, 50% (6/12) apresentaram uma causa infecciosa associada, sendo três por sepse por infecções bacterianas, um por

tuberculose miliar, um por leptospirose e por fim um por síndrome viral citomegalovirótica grave, mantendo as infecções como a principal causa de óbito pós-transplante de fígado (CUBIELLA *et al.*, 2001; GARCÍA *et al.*, 1998; LOSADA *et al.*, 2002; PAYA *et al.*, 1993). Destes, quatro pacientes apresentaram manifestações clínicas de infecção por CMV e foram tratados com ganciclovir, sendo que apenas um destes não apresentava células positivas à antigenemia (1/6). Assim, 83,3% dos receptores falecidos por infecção (5/6) apresentaram antigenemia positiva para CMV, o que os deixa suscetíveis à sua imunomodulação e consequente risco de infecções oportunistas (HERTEL *et al.*, 2003; KERN *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2009; SYLWESTER *et al.*, 2005). Dos seis receptores que faleceram por causa infecciosa, dois possuíam sorologia negativa para CMV, sendo que um foi tratado com ganciclovir e outro não, pois apresentou uma evolução clínica rápida e fulminante, com resultado de antigenemia *post-mortem*.

Os outros seis óbitos ocorreram de causas não infecciosas, sendo dois receptores com complicações associadas ao CMV (BOSCH *et al.*, 2011; FISHMAN, 2007) (cirrotização do enxerto por recidiva de HCV e estenose biliar não anastomótica tardia) sem apresentarem manifestações clínicas de infecção por CMV, mas com antigenemia positiva no acompanhamento. Mais dois receptores apresentaram doenças cardiovasculares (IAM e AVC) e outros dois faleceram por doença neoplásica (metástase de CHC e câncer de cólon avançado). Nenhum dos quatro apresentou manifestações clínicas de infecção por CMV nem antigenemias positivas.

O uso da antigenemia ajuda a identificar inclusões celulares em leucócitos de sangue periférico presente quando à replicação do CMV (MARCHETTI *et al.*, 2011; PERCIVALLE *et al.*, 2008). Além disso, é possível quantificar o número de células positivas tomando um número base de leucócitos como padrão, geralmente 200.000 leucócitos. Suas limitações são a necessidade de ser realizada com sangue total, tempo curto para preparo e limitações em pacientes leucopênicos (MARCHETTI *et al.*, 2011).

Comparativamente, o uso da RT-PCR é mais sensível e específico em receptores de transplantes de órgãos sólidos e de medula óssea com infecção ativa por CMV (CORTEZ *et al.*, 2003; MARCHETTI *et al.*, 2011); pode utilizar diversas amostras, como soro e sangue total, e também é quantitativo pelo número de cópias virais, não necessita de processamento imediato das amostras biológicas e não é

dependente do número mínimo de leucócitos. Seu uso, porém, envolve maior custo que o uso da antigenemia.

Em nosso estudo, a antigenemia foi positiva em 52 das 344 amostras obtidas (15%), em 24 dos 44 receptores (55%). Manifestações clínicas de infecção por CMV ocorreram em 18 dos 44 receptores (41%), sendo esse o padrão para o tratamento antiviral.

Marchetti *et al.* compararam RT-PCR e antigenemia para o diagnóstico de infecção por CMV e encontraram uma área sob a curva ROC significativamente maior para o RT-PCR ($p,0,0001$) (MARCHETTI *et al.*, 2011). Os autores, porém, utilizaram 793 amostras de sangue total de 230 receptores de transplante, sendo 126 receptores de medula óssea, 92 receptores renais, 11 receptores de fígado e um receptor cardíaco, misturando pacientes com diferentes esquemas imunossupressores e com diferentes riscos à infecção por CMV de acordo com o órgão ou tecido transplantado. Pacientes receptores de medula óssea possuem altíssimo risco de infecção por CMV. Assim, os autores não conseguem estabelecer um “cut-off” para diagnóstico para a infecção por CMV.

Em nosso estudo, encontramos um “cut-off” para o diagnóstico de infecção ativa por CMV em receptores de fígado, utilizando apenas os exames positivos e excluindo os negativos. Diferente de Marchetti *et al.* (2011) nossos pacientes foram submetidos a um único tipo de transplante. Assim, o limiar de positividade da antigenemia quantitativa para infecção ativa por CMV em receptores de fígado foi de 8 células positivas por 200.000 leucócitos. Esse resultado apresentou boa sensibilidade e especificidade, com uma área sob a curva ROC adequada para sua utilização.

O uso da análise das razões de probabilidade tem maior relevância para a aplicabilidade prática de um teste diagnóstico. Neste estudo, encontramos uma RP positiva de 3,5, com um intervalo de confiança relativamente estreito, traduzindo um aumento moderado sobre a probabilidade pré-teste de doença. Quanto à RP negativa (0,15), esta também apresentou um moderado efeito sobre a probabilidade pré-teste, mas com um largo intervalo de confiança. Assim, o uso do “cut-off” de > 8 células positivas/200.000 leucócitos na antigenemia quantitativa tem aplicabilidade clínica para o diagnóstico da infecção ativa pelo CMV em receptores de fígado.

8 CONCLUSÕES

A soroprevalência para CMV dos receptores de fígado é alta em nossa região, com apenas 10% de receptores com sorologia negativa para CMV.

A infecção por CMV apresentou alta incidência em receptores de transplante de fígado em uma região com alta soroprevalência para CMV, tanto diagnosticados pelas manifestações clínicas (41%) quanto pela antigenemia (55%), com associação importante com complicações infecciosas, de recidiva de HCV, rejeição, retransplante e óbitos.

Receptores de fígado com sorologia negativa para CMV apresentam um tempo sem doença citomegalovirótica e uma taxa de sobrevida menor.

Receptores de fígado portadores de HCV apresentaram tendência a sobrevida menor, com incidências de recidiva de HCV, retransplante e óbitos associados à antigenemia positiva para CMV sem manifestações clínicas da infecção por CMV.

Utilizando a antigenemia quantitativa positiva, o “cut-off” para diagnóstico da síndrome citomegalovirótica foi > 8 células/200.000 leucócitos, com um desempenho considerado adequado através de sua sensibilidade, especificidade e área sob a curva ROC. Através da análise de suas razões de probabilidade, evidenciou-se uma maior aplicabilidade clínica quando positiva, para a confirmação da doença, sendo necessários outros estudos para melhor avaliação da utilidade da mesma quando negativa.

9 ESTRATÉGIAS PARA A CONDUTA NA INFECÇÃO POR CMV

Ao final desse estudo, podemos sugerir estratégias para a conduta na infecção por CMV em receptores de fígado em regiões com alta soroprevalência. Essas regiões se localizam em países em desenvolvimento, onde as questões de alto custo são importantes para o andamento dos programas de transplante.

Receptores de fígado com sorologia negativa para CMV (R-) poderiam realizar profilaxia universal com ganciclovir ou valganciclovir por um período de pelo menos três meses. Esses pacientes comprovadamente apresentam pior resultado com quadros relacionados à infecção por CMV. É importante estabelecer protocolos para início da terapia profilática, avaliação da dose e monitoramento clínico e, se necessário, realização de antigenemia quantitativa ou RT-PCR.

Receptores de fígado portadores de HCV deverão ser monitorados regularmente por pelo menos três meses seguindo o protocolo para o tratamento preemptivo, seja por antigenemia ou por RT-PCR. Esses pacientes compõem um grupo com tendência a um pior resultado global, podendo apresentar evidência de infecção por CMV à antigenemia, mas sem apresentar manifestações clínicas de infecção ativa. Apresentam, também, maior risco de complicações relacionadas como a recidiva do HCV, rejeição, estenose biliar e retransplante, refletindo em seu pior resultado final.

REFERÊNCIAS

- ADAM, R. et al. Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. **Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society**, v. 9, n. 12, p. 1231-43, dez. 2003.
- ALFORD, C. A.; BRITT, W. J. Cytomegalovirus. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, M. D. (Eds.). **Virology**. 2nd. ed. New York: Raven Press, 1990. p. 1981-2010.
- ALLICE, T. et al. Valganciclovir as pre-emptive therapy for cytomegalovirus infection post-allogenic stem cell transplantation: implications for the emergence of drug-resistant cytomegalovirus. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 63, n. 3, p. 600-8, mar. 2009.
- ASBERG, A et al. Long-term outcomes of CMV disease treatment with valganciclovir versus IV ganciclovir in solid organ transplant recipients. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 9, n. 5, p. 1205-13, maio. 2009.
- BEECHER, H. K. **Ethical problems created by the hopelessly unconscious patient.** **The New England journal of medicine**, 27 jul. 1968. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5652626>>
- BELL, L. M. Herpesvirus infections in immunocompromised hosts. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 169-177, jul. 1997.
- BONON, S. H. A. et al. Comparison of serology, antigenemia assay and the polymerase chain reaction for monitoring active cytomegalovirus infections in hematopoietic stem cell transplantation patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 5, p. 275-8, 2006.
- BOPPANA, S. B. et al. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. **The New England journal of medicine**, v. 344, n. 18, p. 1366-71, 3 maio. 2001.
- BOREL, J. F. et al. Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. **Immunology**, v. 32, n. 6, p. 1017-25, jun. 1977.
- BOSCH, W. et al. Association of cytomegalovirus infection and disease with death and graft loss after liver transplant in high-risk recipients. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 11, n. 10, p. 2181-9, out. 2011.
- BRENNAN, D. C. Cytomegalovirus in renal transplantation. **J. Am. Soc. Nephrol**, p. 848-55, 2001.

BROWN, H. L.; ABERNATHY, M. P. Cytomegalovirus infection. **Semin Perinatol.**, v. 22, n. 4, p. 260-6, 1998.

BURAK, K. W. et al. Impact of Cytomegalovirus Infection, Year of Transplantation , and Donor Age on Outcomes After Liver Transplantation for Hepatitis C. **Liver Transplantation**, v. 8, n. 4, p. 362-369, 2002.

CALNE, R. Y. et al. Cyclosporin A Initially as the Only Immunosuppressant in 34 Recipients of Cadaveric Organs: 32 Kidneys, 2 Pancreases, and 2 Livers. **Lancet**, v. 2, n. November, p. 1033-6, 1979.

CANNON, M. J.; SCHMID, D. S.; HYDE, T. B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. **Rev Med Virol**, v. 20, n. 4, p. 202-13, 2010.

CECCHERINI-NELLI, L. et al. The risk of contracting an infectious disease from blood transfusion. **Transplantation proceedings**, v. 36, n. 3, p. 680-2, abr. 2004.

CHEN, J. et al. Kinetics of IgG antibody to cytomegalovirus (CMV) after birth and seroprevalence of anti-CMV IgG in Chinese children. **Virology journal**, v. 9, n. 1, p. 304, 10 dez. 2012.

CORTEZ, K. J. et al. Clinical trial of quantitative real-time polymerase chain reaction for detection of cytomegalovirus in peripheral blood of allogeneic hematopoietic stem-cell transplant recipients. **The Journal of infectious diseases**, v. 188, n. 7, p. 967-72, 1 out. 2003.

COSTA, S. C. B. Infecção por citomegalovírus (CMV): epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Rev. Bras. Clin. Ter.**, v. 25, n. 1, p. 18-28, 1999.

CUBIELLA, J. et al. Complicaciones infecciosas asociadas al trasplante hepático: análisis de 104 pacientes. **Gastroenterol Hepatol**, v. 24, n. 4, p. 186-90, 2001.

DIENSTAG, J.; COSIMI, A. Liver Transplantation - A Vision Realized. **The New England journal of medicine**, v. 367, n. 16, p. 1483-5, 18 out. 2012.

EID, A. J. et al. Emergence of drug-resistant cytomegalovirus in the era of valganciclovir prophylaxis: therapeutic implications and outcomes. **Clinical transplantation**, v. 22, n. 2, p. 162-70, 2008.

FISHMAN, J. A. Infection in solid-organ transplant recipients. **The New England journal of medicine**, v. 357, n. 25, p. 2601-14, 20 dez. 2007.

FISHMAN, J. A.; RUBIN, R. H. Infection in Organ-Transplant Recipients. **The New England journal of medicine**, v. 338, p. 1741-1751, 1998.

FOWLER, K. B. et al. The Outcome of Congenital Cytomegalovirus Infection in Relation to Maternal Antibody Status. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 10, p. 633-7, 1992.

GARCÍA, S. et al. Infection and associated risk factors in the immediate postoperative period of pediatric liver transplantation: a study of 176 transplants. **Clin Transplant**, v. 12, n. 3, p. 190-7, 1998.

GRIFFITHS P, WHITLEY R, SNYDMAN DR, SINGH N, B. M. I. H. M. F. Contemporary management of cytomegalovirus infection in transplant recipients: guidelines from an IHMF workshop, 2007. **Herpes**, v. 15, n. 1, p. 4-12, 2008.

HERTEL, L. et al. Susceptibility of Immature and Mature Langerhans Cell-Type Dendritic Cells to Infection and Immunomodulation by Human Cytomegalovirus. **Jornal of Virology**, v. 77, n. 13, p. 7563-7574, 2003.

HOZ, R. E.; STEPHENS, G.; SHERLOCK, C. Diagnosis and treatment approaches to CMV infections in adult patients. **Journal of Clinical Virology**, p. 1-12, 2002.

HUMAR, A. et al. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. **Transplantation**, v. 68, n. 9, p. 1305-11, 1999.

IWATSUKI, S. et al. Experience in 1,000 liver transplants under cyclosporine-steroid therapy: a survival report. **Transplant Proc**, v. 20, n. Suppl 1, p. 498-504, 1988.

KAMADA, N. The immunology of experimental liver transplantation in the rat. **Immunology**, v. 55, n. 3, p. 369-89, jul. 1985.

KAMADA, N.; DAVIES, H. FF. S.; ROSER, B. Reversal of Transplantation Immunity by Liver Grafting. **Nature**, v. 292, p. 840-2, 1981.

KEEFFE, E. B. Liver Transplantation: Current Status and Novel Approaches to Liver Replacement. **Gastroenterology**, v. 120, n. 3, p. 749-762, fev. 2001.

KERN, F. et al. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 12, p. 1709-16, 15 jun. 2002.

KIM, J. M. et al. Early and delayed onset cytomegalovirus infection of liver transplant recipients in endemic areas. **Transplantation proceedings**, v. 42, n. 3, p. 884-9, abr. 2010.

KIM, S. I. et al. Antiviral prophylaxis versus preemptive therapy to prevent cytomegalovirus infection and related death in liver transplantation: a retrospective study with propensity score matching. **Transplantation proceedings**, v. 44, n. 3, p. 787-90, abr. 2012.

KUMAR, D. et al. Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 9, n. 5, p. 1214-22, maio. 2009.

KUYPERS, D. R. Influence of interactions between immunosuppressive drugs on therapeutic drug monitoring. **Ann Transplant**, v. 13, n. 3, p. 11-18, 2008.

LAUTENSCHLAGER, I. CMV infection, diagnosis and antiviral strategies after liver transplantation. **Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation**, v. 22, n. 11, p. 1031-40, nov. 2009.

LJUNGMAN, P.; GRIFFITHS, P.; PAYA, C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 34, n. 8, p. 1094-7, 15 abr. 2002.

LLADÓ, L. et al. [Biliary complications after liver transplant]. **Cirugía española**, v. 90, n. 1, p. 4-10, jan. 2012.

LOSADA, I. et al. Early infection in liver transplant recipients: incidence, severity, risk factors and antibiotic sensitivity of bacterial isolates. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 20, n. 9, p. 422-30, 2002.

MARCHETTI, S. et al. Comparison of real-time PCR and pp65 antigen assays for monitoring the development of Cytomegalovirus disease in recipients of solid organ and bone marrow transplants. **The new microbiologica**, v. 34, n. 2, p. 157-64, abr. 2011.

MCMASTER, P. et al. Liver transplantation: changing goals in immunosuppression. **Transplant Proc**, v. 30, n. 5, p. 1819-21, 1998.

MCMASTER, P.; BUIST, L. FK 506 in transplantation. **Transplant Proc**, v. 25, n. 4, p. 2684-5, 1993.

MOCARSKI, E. S. J. et al. Molecular genetic analysis of cytomegalovirus gene regulation in growth, persistence and latency. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v. 154, p. 47-74, 1990.

MOCARSKI, E. S. J.; SHENK, T.; PASS, R. F. Cytomegaloviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Field's Virology**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2701-72.

MOORE, F. D. et al. One-stage homotransplantation of the liver following total hepatectomy in dogs. **Transplant Bull**, v. 6, n. 1, p. 103-7, 1959.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH - CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE STATEMENT. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 4, n. suppl, p. 107S-110S, 1984.

NIL, S.; MORGAN, C.; ROSE, H. M. Electron Microscopy of Herpes Simplex Virus II . Sequence of Development. **Journal of Virology**, v. 2, n. 5, p. 517-536, 1968.

ORLANDO, G.; SOKER, S.; WOOD, K. Operational Tolerance after Liver Transplantation. **J Hepatol**, v. 50, n. 6, p. 1247-57, 2009.

PAGE, E. K.; DAR, W. A; KNECHTLE, S. J. Tolerogenic therapies in transplantation. **Frontiers in immunology**, v. 3, n. July, p. 198, jan. 2012.

PASQUALE, G. et al. Reinfeczione da virus dell'epatite C nei pazienti per cirrosi da HCV HCV reinfection after liver transplantation for HCV cirrhosis. **Infez Med**, v. 13, n. 4, p. 215-228, 2005.

PAYA, C. V et al. Risk factors for cytomegalovirus and severe bacterial infections following liver transplantation: A prospective multivariate time-dependent analysis. **J Hepatol**, v. 18, p. 185-95, 1993.

PEIXOTO, M. et al. Recurrent and persistent cytomegalovirus infection in a kidney recipient caused by the L595S mutation in UL97 phosphotransferase gene. **Antivir Ther**, v. 17, n. 3, p. 585-8, 2012.

PERCIVALLE, E. et al. Comparison of a new Light Diagnostics and the CMV Brite to an in-house developed human cytomegalovirus antigenemia assay. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 43, n. 1, p. 13-7, set. 2008.

PERES, R. M. B. et al. Surveillance of active human cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation (HLA sibling identical donor): search for optimal cutoff value by real-time PCR. **BMC infectious diseases**, v. 10, p. 147, jan. 2010.

PETIGNAT, C. et al. Preemptive treatment approach to cytomegalovirus (CMV) infection in solid organ transplant patients : relationship between compliance with the guidelines and prevention of CMV morbidity. **Transplant Infectious Disease**, v. 2, n. 3, p. 118-126, 2000.

POLLARD, S. Nephrology Dialysis Transplantation The impact of state legislation on organ donation — results of a US pilot scheme. p. 2510-2511, 1997.

PRADOS, E.; CUERVAS-MONS, V. Transplante hepático. Indicaciones y contraindicaciones generales. Elección del momento. In: BERENGUER, J. et al. (Eds.). **Tratamiento de las Enfermedades Hepáticas y Biliares. Asociación Española para el Estudio del Hígado**. Madrid: Elba: [s.n.]. p. 411-23.

RAYES, N. et al. Is preemptive therapy for CMV infection following liver transplantation superior to symptom-triggered treatment? **Transplant Proc**, v. 33, n. 1, p. 1804, 2001.

RAZONABLE, R.-R. Cytomegalovirus infection after liver transplantation: Current concepts and challenges. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 31, p. 4849, 2008.

REDDEHASE, M. J. From Protozoan to Proteomics. In: REDDEHASE, M. J. (Ed.). **Cytomegaloviruses: Molecular Biology And Immunology**. Norfolk, U.K.: Caister Academic Press, 2006. p. xxiii-xxvii.

RIEDIGER, C. et al. Prophylaxis and treatment of recurrent viral hepatitis after liver transplantation. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 22 Suppl 8, p. viii37-viii46, set. 2007.

ROWE, W. P. et al. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 92, n. 2, p. 418-424, 1956.

ROWSHANI, A. T. et al. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. **Transplantation**, v. 79, n. 4, p. 381-6, 2005.

RUBIN, R. H. Preemptive Therapy in Immunocompromised Hosts. **The New England journal of medicine**, v. 324, p. 1057-9, 1991.

RUBIN, R. H. Prevention of Cytomegalovirus Infection in Organ Transplant Recipients. **Transplant Infectious Disease**, v. 2, p. 99-100, 2000.

RUBIN, R. H. et al. Prevention of primary cytomegalovirus disease in organ transplant recipients with oral ganciclovir or oral acyclovir prophylaxis. **Transplant Infectious Disease**, v. 2, p. 112-117, 2000.

SAINT-VIL, D. et al. Infectious complications of pediatric liver transplantation. **J Pediatr Surg**, v. 26, p. 908-13, 1991.

SAMPAIO, A M. et al. Cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and human herpesvirus-7 in adult liver transplant recipients: diagnosis based on antigenemia. **Transplantation proceedings**, v. 43, n. 4, p. 1357-9, maio. 2011.

SANGHAVI, S. K. et al. Relationship of cytomegalovirus load assessed by real-time PCR to pp65 antigenemia in organ transplant recipients. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 42, n. 4, p. 335-42, ago. 2008.

SEEHOFER, D. et al. CMV hepatitis after liver transplantation: incidence, clinical course, and long-term follow-up. **Liver Transplantation**, v. 8, n. 12, p. 1138-46, 2002.

SINGH, N. et al. Infectious Complications in Liver Transplant Recipients on Tacrolimus. **Transplantation**, v. 58, n. 7, p. 774-8, 1994.

SMITH, M. G. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 92, n. 2, p. 424-30, 1956.

SNYDER, A. Joseph E Murray. **The Lancet**, v. 381, n. 9861, p. 110, 2013.

STARZL, T. E. et al. Studies on the rejection of the transplanted homologous dog liver. **Surg Gynecol Obstet.**, v. 112, p. 135-144, 1961.

STARZL, T. E. et al. HOMOTRANSPLANTATION OF THE LIVER IN HUMANS. **Surg Gynecol Obstet.**, v. 117, p. 659-676, 1963.

STARZL, T. E. et al. Orthotopic Homotransplantation of the Human Liver. **Annals of Surgery**, v. 168, n. 3, p. 392-414, 1968.

STARZL, T. E. et al. Evolution of Liver Transplantation. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 2, p. 614-36, 1982.

STARZL, T. E. History of Liver and Other Splanchnic Organ Transplantation. In: BUSUTTIL, R. W.; KLINTMALM, G. B. (Eds.). **Transplantation of the liver**. [S.l.: s.n.]. p. 3-22.

STARZL, T. E.; DEMETRIS, A. J.; VAN THIEL, D. Liver transplantation. **The New England journal of medicine**, v. 321, p. 1014-22, 1989.

STARZL, T. E.; FUNG, J. J. **Themes of liver transplantation. Hepatology (Baltimore, Md.)**, jul. 2010. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20235333>>

SYLWESTER, A. W. et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. **The Journal of experimental medicine**, v. 202, n. 5, p. 673-85, 5 set. 2005.

THOMSON, A. W.; KNOLLE, P. A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 11, p. 753-66, nov. 2010.

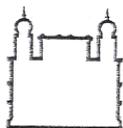
TORBENSON, M. et al. Causes of death in autopsied liver transplantation patients. **Mod Pathol**, v. 11, p. 37-46, 1998.

TRYPHONOPOULOS, P. et al. The effect of donor-recipient cytomegalovirus serology on adult liver transplantation: a single center experience. **Transplantation**, v. 92, n. 9, p. 1051-7, 15 nov. 2011.

WADE, J. J. et al. Bacterial and Fungal Infections after Liver Transplantation: An analysis of 284 Patients. **Hepatology**, v. 21, n. 5, p. 1328-36, 1995.

WELCH, C. S. A note on transplantation of the whole liver in dogs. **Transplant Bull**, v. 2, p. 54-5, 1955.

WELLER, T. H. et al. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 94, n. 1, p. 4-12, 1957.

APÊNDICE**APÊNDICE A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA**

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

PARECER Nº 82/2006

Protocolo: 177

Projeto de Pesquisa: Detecção e Monitorização do Citomegalovírus (CMV) e do Herpesvírus Humano 8 (HHV-8) em Pacientes Transplantados Hepático e Renal no Estado da Bahia

Pesquisador Responsável: Dra. Andréa Mendonça Gusmão Cunha

Instituição ou Departamento: LASP/FIOCRUZ

Considerações:

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados pelo responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Salvador, 16 de março de 2006

Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Coordenadora
CEP – CPqGM/FIOCRUZ

PUBLICAÇÃO

UTILIZAÇÃO DA ANTIGENEMIA QUANTITATIVA PARA O DIAGNÓSTICO DA CITOMEGALOVIROSE EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE FÍGADO

Cunha, A. G.^{1,2,3,4}; **Cunha, A. M. G.**^{1,4}; **Solla, D. J. F.**¹; **Chaves, R. Z. T.**¹; **Galvão-Castro, B.**^{2,4}; **Meyer, R.**¹

¹ Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (ICS-UFBA); ² Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM / FIOCRUZ/BA);

³ Hospital Português; ⁴ Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP). *E-mail: andre_gusmao@ig.com.br*

INTRODUÇÃO

O Citomegalovírus (CMV) permanece como a principal infecção viral em receptores de fígado, contribuindo para sua morbidade e mortalidade [1]. Possui distribuição mundial, com prevalência inversamente proporcional à condição sócio-econômica da população estudada [2], promovendo infecções assintomáticas em situações de integridade do sistema imune e obtendo importância clínica quando há alteração da imunidade celular [3].

Receptores de fígado apresentam três manifestações clínicas da infecção por CMV [1,4]: a síndrome viral do CMV, a doença de órgão-alvo e os efeitos indiretos. A incidência dessas manifestações varia de acordo com a sorologia tanto do doador quanto do receptor [1], sendo maior quando há sorologia para CMV reagente no doador e não reagente no receptor (D+/R-) [5-7].

Duas estratégias de prevenção de infecções por CMV têm sido utilizadas nos cuidados pós-transplante [8,9]: a profilaxia universal e a terapia preemptiva. Sem prevenção, a infecção pelo CMV ocorre nos primeiros três meses pós-transplante [5], a maioria apresentando viremia assintomática, com um subgrupo desenvolvendo as manifestações clínicas [8].

Assim, o tratamento empírico da doença manifesta incorre em riscos de complicações para o receptor de fígado, enquanto que estratégias preventivas aumentam os custos extras ao transplante de fígado, além de expor os receptores aos efeitos adversos da terapia antiviral profilática [8]. Esses custos elevados limitam a utilização das estratégias preventivas em receptores de fígado em países em desenvolvimento, que são regiões de alta soroprevalência para CMV. Informações sobre a infecção por CMV em receptores de fígado dessas regiões e seu comportamento com o uso de ensaios clínicos, como a antigenemia, são importantes para ajudar a racionalizar as estratégias preventivas, reduzindo custos e dando cobertura aos pacientes em maior risco.

OBJETIVOS

Avaliar a utilização e desempenho da antigenemia quantitativa para CMV no diagnóstico de infecção ativa em pacientes transplantados de fígado, estimando a incidência da infecção pelo CMV e suas manifestações clínicas em receptores de fígado em uma população de alta soroprevalência para CMV, e determinando seu cut-off para o tratamento da doença citomegalovirótica.

MÉTODOS

Desenho e população do estudo

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo, com coleta retrospectiva, com receptores de fígado submetidos a antígenemia quantitativa para diagnóstico e monitorização da infecção por CMV. Todos os transplantes foram realizados em um hospital terciário filantrópico, que realiza transplantes de fígado desde 2001, com uma média de 25 transplantes por ano à época do estudo, no período de março de 2007 a abril de 2009, com segmento pós-transplante.

Crítérios de inclusão e exclusão

Foram critérios de inclusão: disponibilidade das amostras biológicas conservadas; dados completos em prontuários médicos; assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido;

Foram excluídos os pacientes – ou responsável legal - que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido ou que não colheram antígenemia para diagnóstico e monitorização da infecção por CMV.

Coleta de dados e variáveis de interesse

A coleta dos dados foi feita de forma retrospectiva a partir de revisão dos prontuários e outros registros médicos. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes foram avaliados à época das coletas das amostras de antígenemia. Durante o acompanhamento ambulatorial, amostras de soro e sangue total dos receptores foram coletadas em intervalos de tempo não padronizados, a critério do médico assistente, com o objetivo de monitorizar e diagnosticar a infecção por CMV. Os desfechos analisados foram o tempo de livre de síndrome citomegalovirótica e sobrevida em um e quatro anos.

A técnica de antígenemia utilizada foi a detecção do antígeno pp65 do CMV através de anticorpos monoclonais primários, referida pelo Kit CMV Brite Turbo Antígenemia (DPM Diagnóstica) [10]. Eram coletados 2 a 5 mL de sangue periférico em tubo com EDTA, onde as amostras eram processadas no máximo 6 horas após a coleta.

Segue um resumo das principais etapas:

a) Lise de Hemácias e Preparação da Suspensão de Leucócitos:

Em 2mL de sangue foi adicionado 30mL de solução de lise de hemácias resfriada a 4° C, em casos de neutropenia, foi utilizado 4mL de sangue e o dobro de solução de lise de hemácias. A mistura foi incubada por 5 a 10 min a 4° C. Após centrifugação por 2 min a 2.500rpm, o sobrenadante foi adicionado 5mL de PBS ao pellet de leucócitos. Em pacientes com neutropenia severa foi adicionado apenas 2mL de PBS ao pellet.

b) Preparação das lâminas, coloração e marcação:

Foi realizada a contagem de leucócitos em câmara de Neubauer e o ajuste do volume para 2×10^6 células por ml com PBS. As lâminas foram preparadas em triplicatas para cada pacientes. Foi realizado a seguir a fixação, permeabilização, coloração e marcação das lâminas, seguindo todas as etapas referidas pelo Kit CMV Brite Turbo Antígenemia (DPM Diagnóstica) [10]. Em todos os ensaios foram utilizados controles positivos e negativos para todas as reações em paralelo com as amostras para validação dos resultados.

c) Leitura e interpretação das lâminas: para leitura das lâminas foi utilizado um microscópio de fluorescência, - Olympus BX 40, com aumento de 400X, combinação para uso do FITC; - Cubo de fluorescência: U – MNB; - Comprimento de onda para excitação: 470 – 490 nm e comprimento de onda para emissão: > 515 nm. Todos os campos foram analisados, as células positivas mostraram coloração verde-amarelado no núcleo das células polimorfonucleares, pela detecção do antígeno PP-65 e as células negativas não apresentaram esse tipo de coloração. Foi realizada uma contagem global das células positivas com liberação de um resultado quantitativo, sendo indicado o número de células em 200.000 leucócitos analisados, que equivalem aproximadamente 100.000 polimorfonucleares.

Análise estatística

As variáveis categóricas foram expressas através de suas proporções. Calculou-se médias e desvios-padrão para as variáveis contínuas com distribuição normal e medianas e quartis para as não-normais.

Para a análise da sobrevida em 01 e 04 anos foram considerados os óbitos (data do óbito) por qualquer causa. Foram censurados, ao final do estudo, os pacientes que permaneceram vivos após um e quatro anos do transplante hepático. Para os pacientes com acompanhamento perdido, a data da censura foi aquela do último registro em prontuário médico ou último contato dos pesquisadores. Foram calculadas as funções de sobrevida empregando-se o método de Kaplan-Meier, no qual foram estimadas curvas agrupando os pacientes segundo as variáveis selecionadas para o estudo e tendo sido utilizado o teste de Log-rank (Mantel-Cox) ou Breslow (Generalized Wilcoxon) para comparação das funções de sobrevida para cada variável. O tempo livre de síndrome citomegalovirótica foi analisado com a mesma metodologia.

Para avaliar o desempenho da antigenemia quantitativa para CMV no diagnóstico de infecção ativa em pacientes transplantados de fígado e determinar o seu cut-off, foi analisada sua capacidade discriminatória, ou seja, sua capacidade de distinguir os doentes dos não-doentes, através do cálculo da área sob a curva ROC (AUC ROC). A ausência de células positivas na antigenemia quantitativa é compatível com a ausência de doença. Para aqueles cuja antigenemia apresenta um resultado positivo, ou seja, maior que 0 células / 200.000 leucócitos, é que existe dúvida acerca da presença ou não de doença citomegalovirótica. Assim nesta análise, apenas os casos com antigenemia positiva foram considerados.

Todos os testes foram bicaudados e foram considerados estatisticamente significantes resultados com valores de $p \leq 0,05$. Os dados foram analisados com auxílio dos softwares Statistical Package for Social Sciences (SPSS, versão 20.0, Chicago, IL, USA) e MedCalc (versão 12.1.4.0, Bélgica).

Aspectos éticos

Este estudo respeitou os princípios éticos de pesquisa previstos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz (CEP/CPqGM/Fiocruz) e todos os pacientes incluídos no presente estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

RESULTADOS

Foram realizados 60 transplantes de fígado no período analisado, sendo que 44 receptores realizaram ao menos uma antigenemia quantitativa no período de acompanhamento pós-transplante (com um mínimo de 1 e máximo de 17 exames realizados). Os dados desses pacientes estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Características da amostra e apresentação da síndrome citomegalovirótica (n=44)

Variável	n (%)
Sexo do receptor – masculino	35 (79,5)
Idade ao transplante (média ± DP)	60,8 ± 7,2
Etiologia da doença hepática (n=64)	
Hepatite C ^a	20 (31.3)
Doença Alcoólica do Fígado ^a	15 (23.4)
Hepatocarcinoma ^a	7 (10.9)
Criptogênica	5 (7.8)
Hepatite auto-imune	3 (4.7)
Hepatite fulminante	1 (1.6)
Cirrose biliar primária	1 (1.6)
Budd-Chiari	1 (1.6)
Hepatite B	1 (1.6)
Sorologia positiva para HCV (receptor)	20 (45.5)
Recidiva do HCV	5 (25.0)
Sorologia positiva para CMV (receptor)	40 (90.9)
Desenvolvimento de síndrome CMV em até 180 dias	18 (40,9)
Tempo livre de síndrome CMV até 180 dias (média ± EP)	148.4 ± 7.6
Sinais / sintomas associados à síndrome CMV	
Leucócitos (média ± DP)	2.677,2 ± 921,4
Plaquetopenia (< 1 x 10 ⁵)	36 (70,6)
Fraqueza	22 (45,8)
Cefaléia	20 (43,5)
Diarréia	18 (36,7)
Mialgia	10 (21,3)
Artralgia	10 (21,3)
Azia	9 (19,1)
Dor abdominal	9 (18,8)
Cólica	8 (17,4)
Vômitos	8 (17,0)
Exantema	5 (10,6)
Febre	2 (4,1)
Rejeição	1 (2,3)
Retransplante	1 (2,3)
Óbito em 01 ano	6 (13,6)

Sobrevida em 01 ano, em dias (média ± EP)	338.2 ± 11.4
Óbito em 04 anos	12 (27.3)
Sobrevida em 04 anos, em dias (média ± EP)	1195.2 ± 72.5
Causa do óbito	
Sepse	3 (25.0)
Disfunção do enxerto	1 (8.3)
Metástase de Hepatocarcinoma	1 (8.3)
Recidiva de HCV	1 (8.3)
Doença citomegalovirótica	1 (8.3)
Infarto Agudo do Miocárdio	1 (8.3)
Acidente Vascular Cerebral	1 (8.3)
Tuberculose miliar	1 (8.3)
Câncer de colon	1 (8.3)
Leptospirose	1 (8.3)

* DP: desvio padrão; EP: erro padrão; ^a Hepatite C associado a Hepatocarcinoma estava presente em 05 pacientes e Hepatite C associado a Doença Alcoólica do Fígado estava presente em outros 05 pacientes.

A maioria dos receptores foram do sexo masculino (79,5%), apresentando idade média de 60,8 anos ao transplante. A infecção pelo vírus da Hepatite C foi a principal etiologia da doença hepática. Dos 44 pacientes avaliados, 40 apresentavam sorologia positiva para CMV na avaliação pré-transplante, representando 90,9% do total.

A definição clínica de infecção por CMV foi a apresentação de quadro viral (febre e/ou astenia), associado a leucopenia (leucócitos < 4.000/mL) e/ou plaquetopenia (plaquetas < 100.000/mL), e/ou sintomas gastrointestinais, enterite, hepatite, artralgia, retinite, pneumonite, colite, esofagite, encefalite [4].

Dos pacientes estudados, 18 (40,9%) apresentaram quadro clínico compatível com infecção por CMV no período de acompanhamento até 180 dias, com tempo médio livre de doença de 148,4 ± 7,6 dias. Ao estratificarmos esta análise segundo a sorologia para CMV do receptor (Gráfico 1, painel A), obtém-se curvas que tendem a se distanciar numa fase precoce (primeiros dois meses) dos 180 dias (Generalized Wilcoxon test, p=0,058), com menor tempo livre de doença naqueles com sorologia negativa. No entanto, as curvas voltam a se aproximar até o final do período (Log Rank test, p=0,106), o que sugere uma relevância maior do estado sorológico quanto ao CMV nos primeiros dois meses pós transplante. Dois receptores com sorologia negativa apresentaram quadro clínico de infecção por CMV (50% neste subgrupo), sendo os outros 16 casos de receptores com sorologia positiva (40% neste subgrupo).

A sobrevida média em um ano foi de 338,2 ± 11,4 dias, com 6 pacientes falecidos nesse período. Em quatro anos, a sobrevida média foi de 1195,2 ± 72,5 dias, com 12 óbitos nesse período. As causas dos óbitos estão relacionadas na tabela 1 e incluem sepse, disfunção do enxerto, recidiva de HCV e um quadro de doença viral citomegalovirótica. Receptores com sorologia negativa para CMV apresentaram menor sobrevida, tanto para um ano de acompanhamento, quanto para um acompanhamento de quatro anos (p=0,022 e p=0,004, respectivamente).

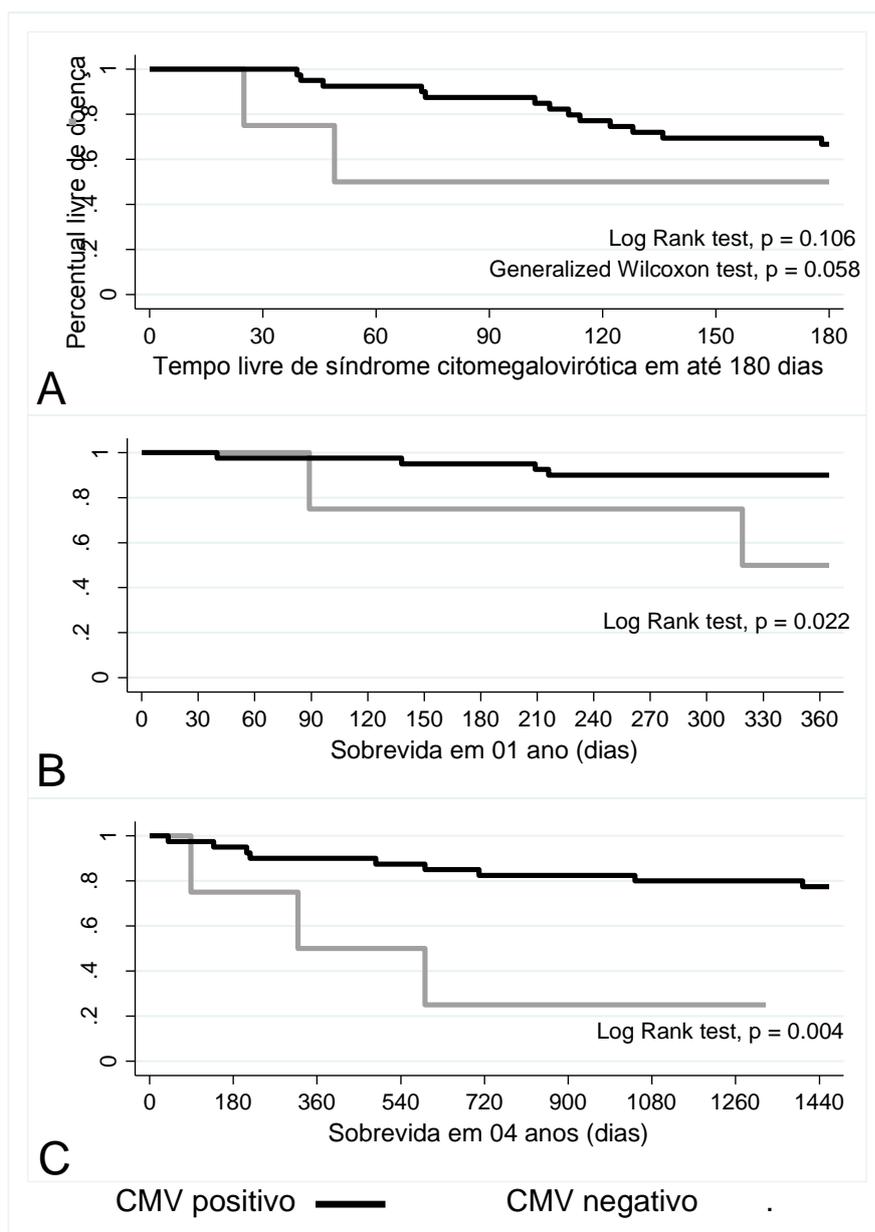


Gráfico 1. Curvas de tempo livre de síndrome citomegalovirótica em 180 dias (A) e sobrevidas em 01 (B) e 04 anos (C), segundo a sorologia para CMV do receptor.

Dos 20 pacientes submetidos a transplante hepático por HCV, cinco apresentaram recidiva do HCV (25%), sendo tratados de acordo com o protocolo local. Um destes pacientes foi a óbito em consequência de cirrotização do enxerto (tabela 1). Houve ainda um caso de rejeição, tratada de acordo com o protocolo do serviço e um retransplante por estenose biliar tardia.

Houve uma tendência a menor sobrevida em 04 anos no subgrupo de pacientes com sorologia positiva para HCV ($p=0,089$), com 40% mortalidade ao final do período (Gráfico 2).

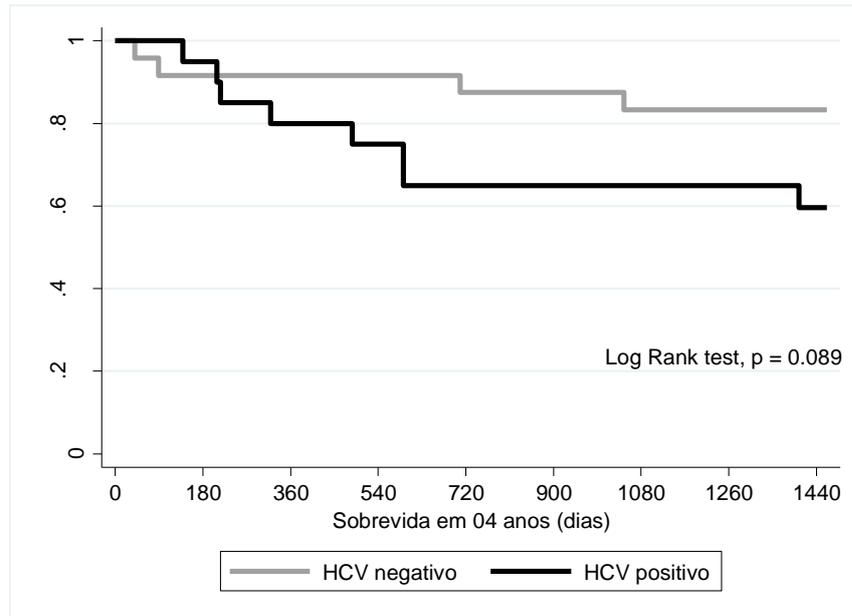


Gráfico 2. Curva de sobrevivência em 04 anos segundo a sorologia para HCV do receptor.

Nos 44 pacientes, houve um total de 344 amostras submetidas a antigenemia, com um mínimo de máximo de 1 e 17 amostras por paciente, respectivamente. Destas, apenas 52 amostras foram positivas (>0 células positivas) pela antigenemia, representando 24 pacientes. A mediana da antigenemia foi de 3 células positivas/200.000 leucócitos, com Intervalo Interquartil 1,0 – 26,75.

A área sob a Curva ROC foi de 0,745 (IC 95% 0,606 – 0,856, $p=0,006$), o que representa uma boa capacidade discriminatória, e foi estabelecido como limiar de positividade para o diagnóstico da citomegalovirose um valor de antigenemia superior a 8 células positivas/200.000 leucócitos, com uma sensibilidade de 88,9 (IC 95% 51,8 – 99,7) e especificidade de 74,4 (IC 95% 58,8 – 86,5) (Gráfico 3).

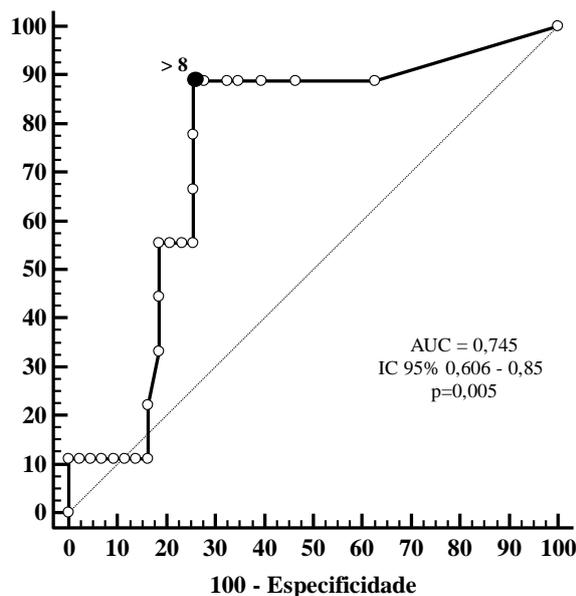


Gráfico 3. Curva ROC (Receiver Operator Curve) para a antigenemia quantitativa e diagnóstico de síndrome citomegalovirótica. AUC: Area Under the Curve.

DISCUSSÃO

Em nosso estudo, aproveitamos a implantação da antigenemia quantitativa para CMV em um serviço de transplante hepático da cidade de Salvador, no nordeste do Brasil. No início do estudo o grupo já havia realizado transplante ortotópico de fígado em 40 receptores, tendo completado 100 procedimentos ao final do período. Dos 60 receptores do período, 44 realizaram pelo menos uma antigenemia quantitativa para CMV.

Durante o período de implantação, os pacientes não eram submetidos à profilaxia universal, nem ao tratamento preemptivo, uma vez que o tratamento específico para CMV era baseado em manifestações clínicas, sendo a antigenemia uma confirmação laboratorial da infecção por CMV. As modalidades de tratamento variaram desde a simples redução da imunossupressão até a internação para o uso de ganciclovir intravenoso.

Nesse período, de acordo com a definição clínica, 18 pacientes desenvolveram manifestações clínicas de infecção por CMV, apesar de 24 pacientes apresentarem antigenemia positiva em algum momento do acompanhamento. Todos os 18 pacientes foram submetidos a tratamento para CMV com redução da imunossupressão e o uso de ganciclovir. O período de desenvolvimento de doença ocorreu nos primeiros meses de transplante, com tempo médio de $148,4 \pm 7,6$ dias, compatível com o descrito para as manifestações de infecção por CMV em pacientes transplantados hepáticos [5].

Receptores com sorologia negativa para CMV apresentam maior risco para o desenvolvimento de manifestações clínicas de infecção por CMV [5–7]. Esses pacientes não desenvolvem imunidade ao CMV e, além do risco de infecção por CMV, geralmente apresentam manifestações mais graves.

Em nosso estudo, apenas 4 receptores (10%) apresentaram sorologia negativa para CMV, o que corrobora a esperada alta soroprevalência para CMV em nosso meio [2]. Dois desses receptores (50%) apresentaram manifestações clínicas de infecção por CMV, com uma tendência a menor tempo livre de doença, principalmente nos primeiros dois meses pós-transplante. A sobrevida de receptores com sorologia negativa para CMV foi menor tanto para o seguimento de um ano, quanto para o seguimento de quatro anos, denotando um pior resultado global desses pacientes.

Receptores com sorologia positiva para CMV têm menos chance de desenvolver manifestações da infecção pelo vírus [5–7]. Mesmo assim, essa imunidade não é completamente efetiva [3]. Em nosso estudo, 40% dos receptores com sorologia positiva desenvolveram manifestações de infecção por CMV. Suas consequências, no entanto, são menos importantes devido à alguma proteção da imunidade adquirida.

Efeitos indiretos da infecção por CMV em receptores de fígado são decorrentes da imunomodulação que o vírus promove [1]. Assim, infecções oportunistas, rejeição, estenose de via biliar e recidiva de HCV podem ser consequências de infecção por CMV.

Cinco receptores apresentaram recidiva de HCV (25%). Todos possuíam sorologia positiva para CMV e nenhum apresentou manifestações de infecção pelo CMV. Por consequência, nenhum foi submetido a tratamento antiviral. Destes, 4 apresentaram alguma antigenemia positiva para CMV, com um mínimo de uma célula positiva e um máximo 5 células positivas

em 200.000 leucócitos. Três desses pacientes faleceram, um com cirrotização do enxerto, outro por AVC e um terceiro por tuberculose miliar.

Em nosso estudo, apenas um receptor, portador de HCV e com sorologia negativa para CMV, apresentou quadro clínico compatível com rejeição, tratado de acordo com o protocolo do serviço. Esse mesmo paciente apresentou manifestações clínicas de infecção por CMV, sendo tratado com ganciclovir. É o único com sorologia negativa desse estudo que permanece vivo.

Apenas um receptor necessitou de retransplante, também portador de HCV, devido à estenose de via biliar. Esse paciente apresentou manifestações clínicas de infecção por CMV, além de úlceras esofágicas, sendo submetida a tratamento com ganciclovir. Sua antigenemia apresentou valores baixos, com máximo de 3 células positivas, mas geralmente negativa. Evoluiu com estenose biliar não-anastomótica, falecendo por disfunção primária após o retransplante.

Receptores portadores de HCV formam um grupo especial de receptores de fígado. Apesar de não ter atingido a significância estatística, a diferença absoluta em sobrevida e mortalidade em 04 anos é relevante. São pacientes com alto risco de complicações, como recidiva do HCV, com comprometimento do enxerto, e risco de retransplante. Mesmo sem apresentar manifestações clínicas de infecção por CMV, a presença deste na antigenemia se associou às complicações que surgiram em receptores portadores de HCV.

Dos receptores que faleceram, metade (6/12) apresentaram uma causa infecciosa associada, sendo três por sepse por infecções bacterianas, um por tuberculose miliar, um por leptospirose e por fim um por síndrome viral citomegalovirótica grave. Destes, quatro pacientes apresentaram manifestações clínicas de infecção por CMV e foram tratados com ganciclovir, sendo que apenas um destes não apresentava células positivas à antigenemia. Dos seis receptores que faleceram por causa infecciosa, dois possuíam sorologia negativa para CMV, sendo que um foi tratado com ganciclovir e outro não.

Os outro seis óbitos ocorreram de causas não-infecciosas, sendo dois receptores com complicações associadas ao CMV (cirrotização do enxerto por recidiva de HCV e estenose biliar não-anastomótica tardia) sem apresentarem manifestações clínicas de infecção por CMV, mas com antigenemia positiva no acompanhamento. Mais dois receptores sofreram doenças cardiovasculares (IAM e AVC) e outros dois faleceram por doença neoplásica (metástase de CHC e câncer de cólon avançado). Nenhum dos quatro apresentou manifestações clínicas de infecção por CMV nem antigenemias positivas.

O uso da antigenemia ajuda a identificar inclusões celulares em leucócitos de sangue periférico relacionadas à replicação do CMV, quantificando o número de células positivas tomando um número base de leucócitos como padrão. Suas limitações são a necessidade de ser realizada com sangue total, tempo curto para preparo e limitações em pacientes leucopênicos [11]. Comparativamente, o uso da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (real-time Polymerase Chain Reaction – rt-PCR) é mais sensível e específico em receptores de transplantes com manifestações clínicas de infecção por CMV [11], [12], permitindo o uso de amostras de soro, com um preparo de tempo mais longo, não dependente do número de leucócitos e sendo quantitativo pelo número de cópias virais. Seu uso, porém, envolve maior custo que o uso da antigenemia.

Em nosso estudo, a antigenemia foi positiva em 52 das 344 amostras obtidas (15%), em 24 dos 44 receptores (55%). Manifestações clínicas de infecção por CMV ocorreram em 18 dos 44 receptores (41%), sendo esse o padrão para o tratamento antiviral.

Utilizando apenas as antigenemias positivas, uma vez que as negativas são forte indicativo de ausência de doença, encontramos um cut-off de 8 células positivas por 200.000 leucócitos para determinar a presença de manifestações clínicas de infecção por CMV. Outros estudos também procuraram estabelecer um cut-off da antigenemia, mas poucos o realizaram exclusivamente em receptores de fígado.

MARCHETTI ET AL. compararam rt-PCR e antigenemia para o diagnóstico de infecção por CMV e encontraram uma área sob a curva ROC significativamente maior para o rt-PCR ($p,0,0001$) [11]. Os autores, porém, utilizaram 793 amostras de sangue total de 230 receptores de transplante, sendo 126 receptores de medula óssea, 92 receptores renais, 11 receptores de fígado e um receptor cardíaco, misturando pacientes com diferentes esquemas imunossupressores e com diferentes riscos à infecção por CMV de acordo com o órgão ou tecido transplantado, sem conseguir estabelecer um cut-off para diagnóstico para a infecção por CMV.

Ao final desse estudo, podemos sugerir estratégias para a conduta na infecção por CMV em receptores de fígado em regiões com alta soroprevalência. Essas regiões se localizam em países em desenvolvimento, onde as questões de alto custo são importante para o andamento dos programas de transplante.

Receptores de fígado com sorologia negativa para CMV poderiam realizar profilaxia universal com ganciclovir ou valganciclovir por um período de pelo menos 3 meses. Esses pacientes comprovadamente apresentam pior resultado com quadros relacionados à infecção por CMV.

Receptores de fígado portadores de HCV poderiam ser monitorados regularmente por pelo menos 3 meses para tratamento preemptivo, seja por antigenemia ou por rt-PCR. Esses pacientes apresentam uma tendência a pior resultado, porém com evidência de infecção por CMV à antigenemia mas sem apresentar manifestações clínicas dessa infecção. Apresentam, porém, complicações relacionadas como recidiva de HCV, rejeição, estenose biliar e retransplante, refletindo em seu pior resultado final.

CONCLUSÕES

A infecção por CMV apresentou alta incidência em receptores de fígado em uma região com alta soroprevalência para CMV (90%), tanto diagnosticados pelas manifestações clínicas (41%) quanto pela antigenemia (55%), com associação importante com complicações infecciosas, de recidiva de HCV, rejeição, retransplante e óbitos, principalmente em receptores com sorologia negativa e receptores portadores de HCV.

Utilizando a antigenemia quantitativa positiva, o cut-off para diagnóstico da síndrome citomegalovirótica foi > 8 células/200.000 leucócitos, com uma performance considerada adequada através de sua acurácia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] R.-R. Razonable, "Cytomegalovirus infection after liver transplantation: Current concepts and challenges," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 14, no. 31, p. 4849, 2008.

- [2] M. J. Cannon, D. S. Schmid, and T. B. Hyde, "Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection.," *Rev Med Virol*, vol. 20, no. 4, pp. 202–13, 2010.
- [3] E. S. J. Mocarski, T. Shenk, and R. F. Pass, "Cytomegaloviruses," in *Field's Virology*, 5th ed., D. M. Knipe and P. M. Howley, Eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp. 2701–72.
- [4] P. Ljungman, P. Griffiths, and C. Paya, "Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients.," *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 34, no. 8, pp. 1094–7, Apr. 2002.
- [5] I. Lautenschlager, "CMV infection, diagnosis and antiviral strategies after liver transplantation.," *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, vol. 22, no. 11, pp. 1031–40, Nov. 2009.
- [6] W. Bosch, M. G. Heckman, N. N. Diehl, J. a Shalev, S. Pungpapong, and W. C. Hellinger, "Association of cytomegalovirus infection and disease with death and graft loss after liver transplant in high-risk recipients.," *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, vol. 11, no. 10, pp. 2181–9, Oct. 2011.
- [7] P. Tryphonopoulos, D. Wepler, M. I. Morris, C. Russo, S. Nishida, D. M. Levi, J. Moon, A. Tekin, G. Selvaggi, E. Island, L. Arosemena, P. Ruiz, and A. G. Tzakis, "The effect of donor-recipient cytomegalovirus serology on adult liver transplantation: a single center experience.," *Transplantation*, vol. 92, no. 9, pp. 1051–7, Nov. 2011.
- [8] J. A. Fishman, "Infection in solid-organ transplant recipients.," *The New England journal of medicine*, vol. 357, no. 25, pp. 2601–14, Dec. 2007.
- [9] J. Levitsky, N. Singh, M. M. Wagener, V. Stosor, M. Abecassis, and M. G. Ison, "A survey of CMV prevention strategies after liver transplantation.," *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, vol. 8, no. 1, pp. 158–61, Jan. 2008.
- [10] E. Percivalle, E. Genini, A. Chiesa, and G. Gerna, "Comparison of a new Light Diagnostics and the CMV Brite to an in-house developed human cytomegalovirus antigenemia assay.," *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, vol. 43, no. 1, pp. 13–7, Sep. 2008.
- [11] S. Marchetti, R. Santangelo, S. Manzara, S. D'onghia, G. Fadda, and P. Cattani, "Comparison of real-time PCR and pp65 antigen assays for monitoring the development of Cytomegalovirus disease in recipients of solid organ and bone marrow transplants.," *The new microbiologica*, vol. 34, no. 2, pp. 157–64, Apr. 2011.
- [12] K. J. Cortez, S. H. Fischer, G. a Fahle, L. B. Calhoun, R. W. Childs, a J. Barrett, and J. E. Bennett, "Clinical trial of quantitative real-time polymerase chain reaction for detection of cytomegalovirus in peripheral blood of allogeneic hematopoietic stem-cell transplant recipients.," *The Journal of infectious diseases*, vol. 188, no. 7, pp. 967–72, Oct. 2003.