

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Avaliação de métodos diagnósticos para infecção ativa por citomegalovirus em
pacientes transplantados renais.**

Dissertação de Mestrado

Rodrigo Fontanive Franco

Porto Alegre, 2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Avaliação de métodos diagnósticos para infecção ativa por citomegalovirus em
pacientes transplantados renais.**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Medicina:
Ciências Médicas da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul para a obtenção do título de
Mestre.*

Autor: Rodrigo Fontanive Franco

Orientador: Prof. Roberto Ceratti Manfro

Porto Alegre, 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Franco, Rodrigo Fontanive
Avaliação de Métodos Diagnósticos para Infecção
Ativa por Citomegalovírus em Pacientes Transplantados
Renais / Rodrigo Fontanive Franco. -- 2013.
44 f.

Orientador: Roberto Ceratti Manfro.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Citomegalovírus. 2. Métodos Diagnósticos para
Infecção por Citomegalovírus. 3. Infecções em Pacientes
Transplantados Renais. I. Manfro, Roberto Ceratti ,
orient. II. Título.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de obtenção de minha formação acadêmica.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do Grupo de Pós-Graduação e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela disponibilização dos recursos para a execução desse projeto.

Ao Serviço de Nefrologia, Unidade de Transplante Renal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por permitir o acesso aos seus pacientes.

Ao Prof. Dr. Roberto Ceratti Manfro, pela oportunidade, ensinamentos, tempo dispensado em orientações e revisões e auxílio na elaboração deste trabalho.

À minha esposa, Jalusa e filho, João Pedro, pela compreensão e pelo estímulo em continuar, apesar das adversidades.

Lista de Figuras

Figura 1. Infecções em pacientes receptores de transplantes de órgãos sólidos.

Lista de Abreviaturas

CMV = Citomegalovírus

HBV = Vírus da Hepatite B

HCV = Vírus da Hepatite C

HIV = Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humana

OMS = Organização Mundial da Saúde

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase

TCR = Receptor de Células T

Resumo

Introdução. Nas últimas décadas o transplante renal se tornou a melhor opção terapêutica para a doença renal crônica terminal, oferecendo melhora na sobrevida e na qualidade de vida dos pacientes. No entanto, o uso obrigatório de medicamentos imunossupressores predispõe a uma variedade de episódios infecciosos, incluindo, entre as mais importantes, a infecção por citomegalovírus. O objetivo deste estudo é avaliar os métodos diagnósticos para infecção ativa por Citomegalovírus, a antigenemia pp65 e a PCR qualitativa, identificando assim a melhor correlação clínico-laboratorial.

Métodos. Estudo de coorte prospectiva, desenvolvido no Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) utilizando-se amostras de pacientes submetidos a transplante renal no HCPA. A monitorização de infecção por Citomegalovírus foi realizada pelos testes da antigenemia PP-65, PCR qualitativo e PCR quantitativo.

Resultados. Antigenemia pp-65 mostrou-se mais útil na monitorização de infecção ativa por citomegalovírus do que PCR qualitativa. Houve correlação significativa entre o desenvolvimento de infecção ativa diagnosticada por antigenemia pp-65 e transplantes realizados entre doador e receptor com sorologia IgG específica para Citomegalovírus positiva, terapia de indução com anticorpos anti-receptor de Interleucina-2 e o uso de terapia profilática e entre infecção ativa diagnosticada por PCR qualitativa e sorologias positivas do doador e do receptor e com uso de profilaxia.

Conclusão. Ambos os métodos são úteis para diagnóstico da infecção ativa por CMV. No entanto, mais estudos são necessários para estabelecer a melhor correlação clínico-laboratorial em pacientes transplantados renais. A quantificação do DNA viral através dos métodos de PCR quantitativa pode oferecer alternativa útil neste sentido.

Palavras-chave: Citomegalovirus, Transplante Renal, Métodos Diagnósticos, Antigenemia pp-65, PCR qualitativa.

Abstract

Background. In the last decades renal transplantation has become the most effective therapy for end-stage renal diseases offering better survival and quality of life. However, the use of immunosuppressive agents may predispose to a variety of infections including, among the most important, cytomegalovirus infection. The objective of the present study is to evaluate pp65 cytomegalovirus antigenemia and qualitative PCR as diagnostic methods for active CMV disease.

Methods. This is a prospective cohort study enrolling patients that received a kidney transplant at Hospital de Clínicas de Porto Alegre who were monitored for CMV active infection with pp65 cytomegalovirus antigenemia and qualitative PCR over the post-transplant follow-up.

Results. The use of pp65 antigenemia is a more useful method for the diagnosis of active CMV disease. A positive correlation was found between active infection as measured by pp65 cytomegalovirus antigenemia and pre-transplant IgG CMV serology, induction therapy, use of IL-2 receptor antibodies, gancyclovir prophylaxis. PCR diagnosis correlated with donor and recipient CMV IgG serology and gancyclovir prophylaxis.

Conclusions. Both methods are useful for the diagnosis of active CMV disease. However, more studies seem to be necessary to establish the best clinical and laboratory correlation. Quantitative CMV PCR may offer a useful alternative in this clinical scenario.

KEYWORDS: cytomegalovirus, renal transplantation, diagnosis, pp65 antigenemia, qualitative PCR.

Sumário

| | |
|--|--------------------------------------|
| 1. Introdução | <i>Erro! Indicador não definido.</i> |
| 2. Revisão da literatura | <i>Erro! Indicador não definido.</i> |
| 2.1. Histórico | 2 |
| 2.2. Infecções em pacientes transplantados renais | 2 |
| 2.3. Infecção por Citomegalovírus no paciente transplantado renal | 5 |
| 2.3.1. <i>Prevalência</i> | 5 |
| 2.3.2. <i>Formas de desenvolvimento da doença pós-transplante</i> Erro! Indicador não definido. | |
| 2.3.3. <i>Definições</i> | Erro! Indicador não definido. |
| 2.3.4. <i>Impacto no paciente transplantado renal</i> | Erro! Indicador não definido. |
| 2.3.5. <i>Fatores de Risco</i> | Erro! Indicador não definido. |
| 2.3.6. <i>Estratégias de Tratamento</i> | Erro! Indicador não definido. |
| 2.3.7. <i>Métodos diagnósticos da doença ativa</i> | 10 |
| 3. Objetivos | <i>Erro! Indicador não definido.</i> |
| 3.1 Geral | <i>Erro! Indicador não definido.</i> |
| 3.2 Específicos | 13 |
| 4. Referências bibliográficas da revisão | <i>Erro! Indicador não definido.</i> |
| 5. Artigo | <i>Erro! Indicador não definido.</i> |
| 6. Considerações finais | <i>Erro! Indicador não definido.</i> |
| 7. Anexos | <i>Erro! Indicador não definido.</i> |

1. Introdução

O citomegalovirus (CMV) é um vírus pertencente à família dos herpesvirus, que inclui também o Epstein-Barr vírus, o vírus da Varicela-Zoster, o Herpes simples e os Herpes vírus 6,7 e 8. Apesar de não ser muito contagioso, é muito prevalente na população mundial, estimando-se que entre 40 a 100% dos adultos apresentem sorologia positiva para este patógeno (KOTTON, 2010). A transmissão, que pode ser congênita, é muito comum durante a adolescência, coincidindo com o início da vida sexual, ocorrendo por contato pessoal próximo através de fluidos corporais como saliva, urina, sangue, leite materno e sêmen. Tecidos e órgãos usados para transplantes também podem ser fonte de infecção. (TAYLOR, 2003, BOECKH, 2011)

A infecção primária pode ser assintomática ou pode causar sintomas semelhantes à mononucleose com febre alta, mal estar, fadiga e cefaléia. Menos comumente, pode ocorrer um quadro de linfadenopatia, esplenomegalia e eritema faríngeo. As alterações laboratoriais incluem elevação de aminotransferases, leucopenia, anemia, trombocitopenia, elevação de aglutininas frias e linfocitose que pode ser atípica. Assim como outros herpesvírus, o citomegalovírus pode permanecer em estado latente no organismo, ocorrendo reativação em situações de redução da imunidade, principalmente na resposta imune adaptativa, através dos linfócitos T. (TAYLOR, 2003, BOECKH, 2011)

Os fármacos e agentes biológicos imunossupressores utilizados nos transplantes de órgãos sólidos são potentes inibidores dessa resposta pelos linfócitos T (SAITOVITH, 2004). Ademais, no contexto clínico do transplante, indivíduos sem exposição prévia ao CMV podem receber órgão de um doador previamente infectado e assim infectar-se sob o efeito de agentes imunossupressores. Assim sendo, devido a freqüência de infecção na população geral e à peculiaridade da imunossupressão na população de transplantados, a infecção pelo CMV, seu diagnóstico, tratamento e impacto em desfechos relacionados ao enxerto renal tornam-se problemas significativos na transplantação.

2. Revisão da Literatura.

2.1. Histórico

O primeiro transplante renal bem sucedido foi feito na cidade de Boston, nos Estados Unidos da América no ano de 1954 e foi feito entre gêmeos univitelinos (GARCIA, 2012). Nas décadas de 1960 e 1970, com a utilização inicial da imunossupressão ficou claro que os transplantes poderiam vir a ser uma alternativa terapêutica viável. No entanto, seus resultados eram bastante sofríveis e esse quadro só se modificou substancialmente com o advento da droga chamada ciclosporina A, descrita por Borel e colaboradores em 1978 (SAITOVITH, 2004). Com o uso dessa droga os resultados dos transplantes melhoraram significativamente e essa modalidade de tratamento das falências terminais de órgão tornou-se uma realidade clínica. O avanço da compreensão da imunobiologia da resposta aloimune, a melhora introduzida por novas drogas imunossupressoras, melhores antimicrobianos e dos métodos diagnósticos na prática médica geral levaram a um impulso muito grande nos transplantes de órgãos sólidos. *Pari passu* as complicações decorrentes da imunossupressão foram melhor entendidas, diagnosticadas e manejadas.

No Brasil, no ano de 2012 foram realizados 5385 transplantes renais sendo nosso país, atualmente, o segundo no mundo em número de transplantes desse órgão (REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2012).

2.2. Infecções em pacientes transplantados renais.

Complicações infecciosas estão entre as mais frequentes em pacientes transplantados renais, relacionadas, principalmente, com a potência imunossupressora das drogas usadas contra rejeição. Infecções em pacientes transplantados podem oferecer maior dificuldade no manejo, uma vez que suas manifestações clínicas podem não ser características e a evolução tende a ser mais rápida, exigindo um diagnóstico precoce, frequentemente através de procedimentos invasivos, para evitar o uso desnecessário de agentes antimicrobianos e seus efeitos colaterais, bem como suas interações com os agentes imunossupressores. Além disso, os pacientes

transplantados de rins estão expostos a uma variedade muito maior de agentes infecciosos (FISHMAN, 2007,SNYDMAN, 1999).

Embora a ocorrência de infecções em pacientes transplantados de rim tenha sofrido marcante alteração com o uso de tratamento profilático para *Pneumocistis jirovecii* e citomegalovírus, ao mesmo tempo em que novas possibilidades diagnósticas surgiram com os métodos moleculares quantitativos e com os testes microbiológicos baseados em antígenos, outras dificuldades surgiram como a nefropatia causada pelo Poliovírus e as infecções provocadas por germes multirresistentes (FISHMAN, 2007,SNYDMAN, 1999).

Para avaliar os riscos de infecção relacionados ao transplante renal, devemos considerar o período pós-transplante, a terapia imunossupressora usada e fatores relacionados ao doador, ao receptor, ao ambiente hospitalar e às particularidades epidemiológicas da comunidade (FISHMAN, 2007,SNYDMAN, 1999,CAMARGO, 2004).

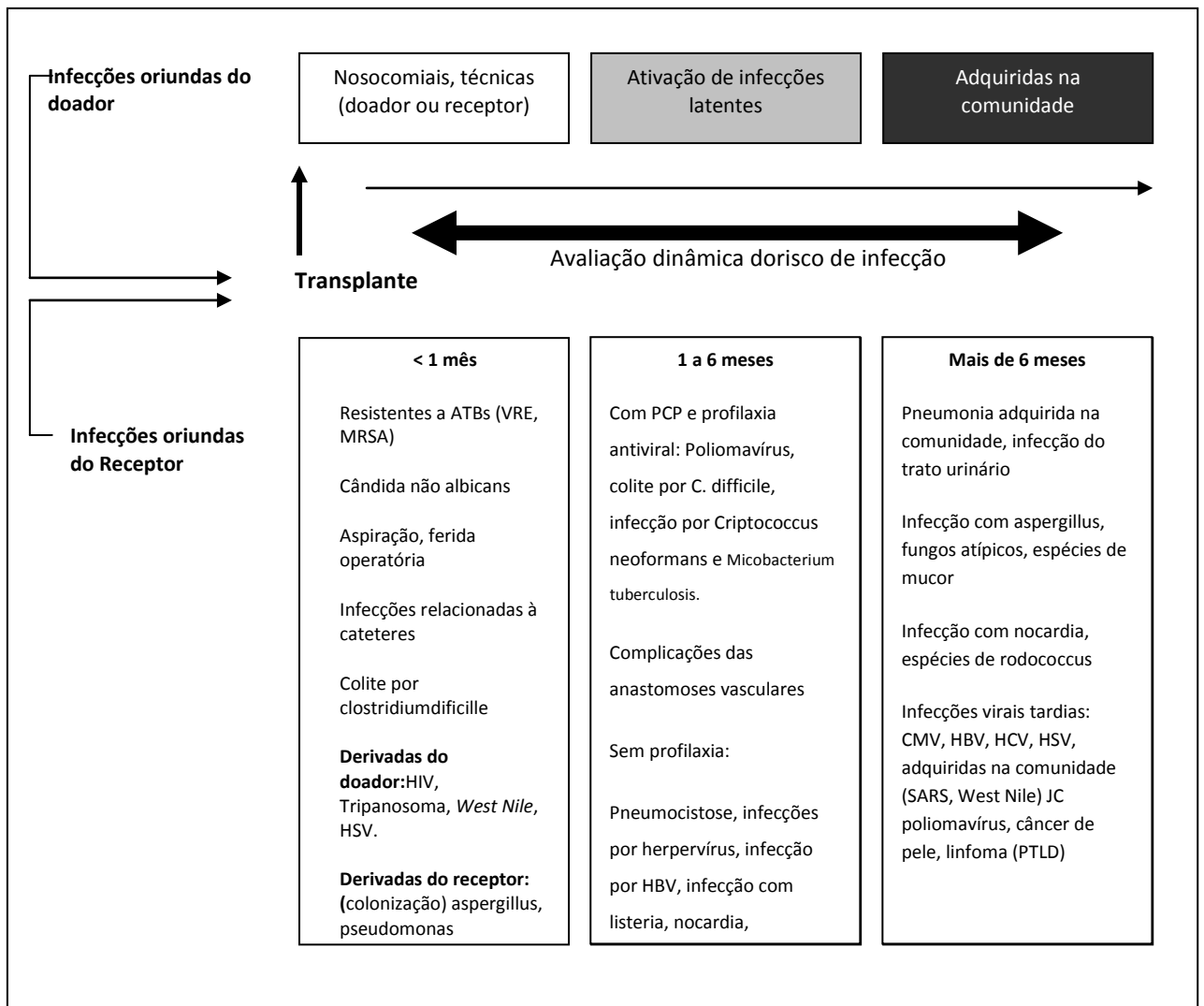
Elementos relacionados ao doador incluem patologias que podem estar em estado latente, como citomegalovirose, tuberculose e doença de Chagas, presença de infecções ativas que não puderam ser adequadamente investigadas devido à urgência relacionada ao procedimento de doação e doenças que não foram descobertas por estarem em fase aguda ou cujos métodos diagnósticos não demonstrem boa sensibilidade. A avaliação do doador exige ainda a pesquisa para sífilis, HIV, citomegalovírus, Epstein-Barr vírus, outros herpes-vírus, vírus da hepatite b (HBV), vírus da hepatite C (HCV) e testes microbiológicos (FISHMAN, 2007,PEGUES, 2010).

Em relação ao receptor, deve-se avaliar sua exposição a *Micobacterium tuberculosis*, doença de Chagas, citomegalovírus, outros herpes-vírus como herpes simples e varicela-zoster, HBV, HCV, HIV, fungos endêmicos e *Estrongiloides stercoralis* (FISHMAN, 2007,PEGUES, 2010).

Além disso, pacientes transplantados renais podem ser portadores prévios de patógenos multirresistentes que, após o procedimento, podem causar pneumonias, infecções urinárias, infecções de feridas operatórias ou relacionadas à cateteres, entre outras (FISHMAN, 2007).

As estratégias preventivas de quadros infecciosos em pacientes transplantados de rim envolvem vacinação, com exceção de vacinas com elementos vivos que podem ocasionar quadros infecciosos no período pós-transplante, terapias profiláticas como o uso de sulfametoxazol + trimetoprim, usado na profilaxia de pneumocistose, toxoplasmose, infecções por isospora, ciclospora, nocardia, listéria, infecções urinárias, gastrointestinais e respiratórias e as terapias preemptivas (FISHMAN, 2007, SNYDMAN, 1999, GAVALDÀ, 2012).

Figura 1. Infecções em pacientes receptores de transplantes de órgão sólidos.



Modificado de Fishman, JA, 2007. ATBs = antibióticos; VRE= enterococo resistente à vancomicina; MRSA = Estafilococos resistente à Meticilina; HSV = Vírus Herpes simples, HBV = Vírus da Hepatite B, CMV = Citomegalovírus; HCV = Vírus da Hepatite C; SARS = Síndrome respiratória aguda severa; PTLD = Leucoencefalopatia progressiva multifocal

A ocorrência de quadros infecciosos varia, em geral, de acordo com o tempo pós-transplante, sendo influenciado também por fatores como as drogas usadas para a imunossupressão, uso de terapias profiláticas e pela melhor sobrevida do enxerto (Figura 1).

Uma vez que o efeito pleno da imunossupressão está ausente no primeiro mês pós-transplante, infecções oportunistas estão, em geral, ausentes neste período, caracterizado principalmente pela ocorrência de quadros infecciosos relacionados a fatores do doador e do receptor e a complicações da técnica cirúrgica, sendo também comum a presença de colite por *Clostridium difficile* (FISHMAN, 2007,SNYDMAN, 1999,CAMARGO, 2004,BERGAMASCO, 2012).

Episódios febris estão relacionados principalmente à ocorrência de quadros de rejeição e por patógenos virais entre o primeiro e o sexto mês pós-transplante. Podem ainda ocorrer infecções devido a fungos endêmicos, aspergillus, criptococo, *Tripanossoma cruzi* ou *Estrongiloides stercoralis*, poliomavírus, adenovírus e reativação de HCV e de Tuberculose (FISHMAN, 2007,HORNE, 2013). Em pacientes transplantados renais, a ocorrência de infecção do trato urinário constitui complicação infecciosa importante, do primeiro ao sexto mês pós-transplante (VIDAL, 2012).

Após o sexto mês pós-transplante, o risco de infecções é menor em função da redução progressiva da imunossupressão nos paciente que apresentam boa função do enxerto. Entretanto permanece um risco aumentado de infecção relacionado a patógenos adquiridos na comunidade. Apesar da redução da imunossupressão, alguns pacientes podem manifestar infecções recorrentes, aumentando o risco de infecções por listeria, nocardia, fungos invasivos como zigomicetos e organismos não usuais como espécies de rodococos e podendo se beneficiar do uso de profilaxia com Sulfametoxazol + Trimetoprin ou profilaxia antifúngica (FISHMAN, 2007,SNYDMAN, 1999).

2.3. Infecção por Citomegalovírus no paciente transplantado renal

2.3.1. Prevalência

Infecção por Citomegalovírus constitui importante causa de morbidade em pacientes transplantados renais. Estima-se que entre 50 a 80% dos pacientes desenvolvam infecção e 20 a 60%, doença citomegálica. Sem que o paciente seja submetido a alguma forma de tratamento preventivo, o quadro infeccioso ocorre primariamente nos primeiros três meses pós-transplante, podendo ocorrer mais tarde se o paciente for submetido a alguma forma de tratamento profilático(HUMAR, 2009,KUTE, 2012,CORDERO, 2012,DE KEYZER, 2011,BRENNAN, 2001).

2.3.2. Formas de desenvolvimento da doença pós-transplante

Os pacientes transplantados renais que não apresentam evidência sorológica de exposição prévia ao vírus podem ter primeiro contato com o patógeno no transplante renal de doador que apresente anticorpos da classe IgG reagentes para CMV. Receptores com marcadores sorológicos positivos para o vírus podem desenvolver formas mais leves da doença, a não ser que recebam imunossupressão muito intensa, como por exemplo no tratamento da rejeição aguda com pulsoterapia com corticosteróides ou quando se utiliza anticorpos depletadores de linfócitos T como aglobulina anti-timocitária. Nessas situações ocorre um risco muito elevado de desenvolvimento do quadro infeccioso(BOECKH, 2011,HUMAR, 2009,DE KEYZER, 2011). A reativação do CMV requer a ativação dos genes *ie-1* e *ie-2* por meio da ativação do seu promotor MIEP. A expressão destes genes gera proteínas regulatórias de transcrição que são necessárias em todas as fases subsequentes do ciclo de replicação viral. O fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) media a ativação do fator nuclear KB (NF-KB) que é responsável pela expressão de MIEP. Entre outros fatores, o $TNF\alpha$ pode ser induzido pela resposta alogênica pós-transplante, pelo uso de anticorpos policlonais ou monoclonais anti-linfócitos T, por septicemia e também por quadros de rejeição. A expressão do MIEP viral pode também ser ativada por vias não relacionadas ao $TNF\alpha$ como pela injúria isquemia-reperfusão, pelo stress, inflamação e

por certas drogas como pentoxifilina e catecolaminas (DE KEYZER, 2011, HOFFMANN, 2010, BRENNAN, 2001). O CMV é um potente imunógeno e sua ativação provoca, no organismo do hospedeiro, repostas humorais e celulares robustas. Inicialmente, ocorre ativação de linfócitos B com produção de imunoglobulinas dos isotipos IgM, IgG e IgA. Entretanto, uma vez que o vírus se encontra no interior de células infectadas, a resposta humoral não confere proteção contra o vírus. O controle da infecção viral necessita da reação imunológica celular através da ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ que proporciona proteção mais prolongada. (DE KEYZER, 2011, HOFFMANN, 2010)

Algumas alterações genéticas podem predispor à infecção por Citomegalovírus. O polimorfismo no gene IL-12 p 40 aumenta o risco de infecção citomegálica (HOFFMANN, 2010). A expressão do gene PD-1, uma molécula associada à membrana de linfócitos ativos, possui papel importante na regulação da resposta imune, inibindo a ativação do receptor de células T (TCR) e a produção de citocinas em células T efetoras diretamente, ou indiretamente, através da sua expressão em células T regulatórias (T reg). A substituição de guanina por adenosina no nucleotídeo 7809, íntron 4 do gene PD-1 provoca uma alteração importante, sendo este polimorfismo chamado PD-13. Esta substituição enfraquece o gene PD-1 e tem sido associada a várias doenças autoimunes como Lupus Eritematoso Sistêmico e Esclerose Múltipla. O PD-13 é forte e independentemente associado à ocorrência de infecção por Citomegalovírus em pacientes soropositivos que não recebem profilaxia (KOTTON, 2010, HOFFMANN, 2010).

2.3.3. Definições

Define-se infecção latente por CMV pela demonstração de exposição prévia, em geral evidenciada pela presença de anticorpos anti-CMV de classe IgG, sem a presença de sintomas clínicos ou alterações laboratoriais associadas à infecção. A infecção ativa é pela evidência de replicação viral ou pela presença de anticorpos anti-CMV de classe IgM, sem que o paciente desenvolva sintomas relacionados. Por fim, a doença citomegálica refere-se à evidência de infecção viral associada a sintomas como síndrome viral constituída de febre, mal estar, leucopenia, trombocitopenia ou com

doença invasiva, causando pneumonite, hepatite, retinite ou doença gastrointestinal (KOTTON, 2013).

2.3.4. Impacto no paciente transplantado renal

A infecção citomegálica constitui fator de risco independente para mortalidade nos primeiros três meses pós-transplante. A presença de infecção assintomática está relacionada a aumento da mortalidade não cardiovascular nos primeiros 100 dias pós-transplante e a presença de doença por CMV a aumento da mortalidade cardiovascular neste período. Estas duas situações também constituem fator de risco independente para o desenvolvimento de diabetes melito pós-transplante (HUMAR, 2009, KUTE, 2012, CORDERO, 2012, DE KEYZER, 2011, KOTTON, 2013, BRENNAN, 2001).

Esse vírus tem predileção pela invasão do enxerto, provavelmente relacionado à resposta imune alterada neste local. Também se atribui a este agente infeccioso, um efeito imunomodulatório, constituindo fator de risco independente para o desenvolvimento de outros quadros infecciosos como infecções bacterianas, virais, fúngicas invasivas e infecções oportunistas, como por exemplo, a pneumocistose e a aspergilose (HUMAR, 2009, KUTE, 2012, DE KEYZER, 2011, KOTTON, 2013).

A ocorrência de infecção por CMV provoca, mais comumente, do ponto de vista anatomopatológico, ao exame do tecido renal, uma nefrite túbulo intersticial, podendo ocorrer também envolvimento glomerular com evidência de invasão celular pelo vírus neste compartimento, assim como envolvimento vascular arterial levando à microangiopatia trombótica (RANE, 2012). Ademais, o desenvolvimento de infecção por citomegálica aumenta o risco de rejeição aguda, nefropatia crônica do enxerto, doenças linfoproliferativas pós-transplante e de estenose de artéria do enxerto renal. (CORDERO, 2012, DE KEYZER, 2011, KOTTON, 2013)

2.3.5. Fatores de risco

Os principais fatores de risco associados com o desenvolvimento de infecção por CMV são: o status sorológico do doador e do receptor, sendo que se desenvolve principalmente nos casos em que o doador possui sorologia reagente e o receptor não apresenta evidência sorológica de infecção prévia pelo vírus, idade avançada,

imunossupressão, co-morbidades associadas, neutropenia, exposição a imunossupressão, episódios de rejeição, incompatibilidade HLA, uso de altas doses de corticosteróides e perda de função do enxerto. O uso de anticorpos depletadores de linfócitos T, tais como a globulina anti-timocitária, o OKT3 e o alentuzumabe, principalmente quando usada para o tratamento da rejeição aguda também se associa ao desenvolvimento de infecção citomegálica. Em pacientes que não apresentam sorologia compatível com exposição prévia ao vírus, a melhor maneira de evitar a infecção citomegálica seria o uso de doadores que também não apresentassem evidência de contato prévio com o patógeno. Como isto não é muitas vezes possível dada a escassez de órgãos ofertados para transplante, estes receptores apresentam risco elevado de desenvolvimento da infecção. Receptores com evidência sorológica prévia de contato com o CMV tem risco de desenvolvimento de infecção moderado, desde que não recebam anticorpos depletadores de linfócitos T que poderá provocar o aparecimento de formas mais graves da doença (CHAPMAN, 2000, DE KEYZER, 2011, KOTTON, 2013). Outra potencial fonte de contaminação é o uso de hemoderivados obtidos de doadores soro reagentes em receptores com ou sem exposição prévia ao vírus (KOTTON, 2013).

2.3.6. Estratégias de tratamento

A identificação de indivíduos infectadas pelo CMV envolve a detecção de anticorpos das classes IgM e IgG específicos contra o vírus, métodos de cultura viral, identificação da fosfoproteína 65 (pp-65) intracelular em leucócitos infectados e métodos que detectam o DNA viral por meio de técnicas de amplificação de ácidos nucléicos pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Através destes métodos e considerando-se também o status sorológico do doador, é possível identificar pacientes que apresentam risco elevado de apresentar replicação vírus após a realização de um transplante renal. Os pacientes de maior risco são os que mais se beneficiariam do uso de medicamentos anti-virais utilizados com o objetivo de evitar o desenvolvimento de doença sintomática. A identificação do risco pode também evitar o uso desnecessário de drogas em pacientes com baixo risco de replicação viral, com redução dos efeitos colaterais associados e dos custos relacionados ao uso desses medicamentos (CHAPMAN, 2000, KOTTON, 2010, DE LA CÁMARA, 2007).

Baseados nos métodos diagnósticos foram desenvolvidas, nos últimos anos, três estratégias para o manejo terapêutico da infecção pelo CMV em transplante de órgãos: (a) **profilaxia universal**: terapêutica utilizada para todos os pacientes sob risco de infecção antes que se detecte replicação viral ativa; (b) **terapia preemptiva**: consiste da monitorização da replicação viral com instituição da terapia anti-viral quando a replicação é detectada, antes do desenvolvimento de sinais ou sintomas; (c) **tratamento**: instituído quando há detecção de proliferação ativa do vírus associado a sinais e sintomas atribuíveis ao patógeno.

2.3.7. Métodos diagnósticos da doença ativa

O diagnóstico de replicação viral, cuja presença aumenta o risco de desenvolvimento de doença sintomática, pode ser realizado pelo método da antigenemia pp-65, em leucócitos do sangue periférico, ou os métodos que utilizam a amplificação de ácidos nucleicos pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Os métodos sorológicos para detecção de imunoglobulinas das classes IgM e IgG e as culturas virais não são adequadas para o uso na prática clínica devido a sua baixa acurácia e tempo excessivo para a obtenção do resultado (DE KEYZER, 2011, KOTTON, 2010, KOTTON, 2013).

A antigenemia pp-65 é um método semi-quantitativo em que se detecta, através de imunohistoquímica ou imunofluorescência, a presença da fosfoproteína 65, expressa em leucócitos do sangue periférico, infectados pelo CMV, sendo usado para detecção de infecção ativa há vários anos (VAN DER BIJ, 1988). Os resultados são expressos em número de células positivas pelo total analisado. Apresenta como vantagens alta sensibilidade e especificidade, baixo custo e fácil realização sem necessidade de equipamentos específicos. Entretanto, exige pessoal treinado para este fim, coleta de sangue total que deve ser processado dentro de 6 a 8 horas após a coleta e perde sensibilidade na presença de neutropenia (neutrófilos menores que de 200/ μ l). Além disso, antigenemia pode ser negativa ou com baixas contagens em

situações de doença tecidual invasiva. Por fim esse método é de demorada execução e demanda trabalho intenso por parte do pessoal de laboratório (DE KEYZER, 2011, KOTTON, 2010, RHEE, 2011, KOTTON, 2013).

A detecção e quantificação do DNA viral no plasma ou sangue total fornecem informações diagnósticas e prognósticas, sendo os resultados expressos como positivo/negativo ou quantificados em número de cópias de DNA viral/ μL . Dois tipos de testes estão atualmente disponíveis: a PCR convencional de natureza qualitativa e a PCR em tempo-real, de natureza quantitativa (KOTTON, 2010). Existe boa correlação entre os níveis de PCR quantitativo e os resultados de antigenemia, com maior sensibilidade do PCR mas com redução da especificidade (CALIENDO, 2000).

Na comparação com a antigenemia, a realização de PCR tem a vantagem de não exigir pessoal altamente treinado, poder ser realizada em pacientes leucopênicos, possibilidade de automatização com processamento de várias amostras juntas e de usar material com tempo de coleta superior a 8 horas. Entretanto, essas técnicas exigem equipamentos e reagentes de alto custo, em especial na modalidade de PCR em tempo-real. A alta sensibilidade da PCR faz com que seja necessária uma alteração de valores de no mínimo três vezes (e de no mínimo 5 vezes em contagens muito baixas) para que haja significância biológica. Ademais, PCR qualitativa é uma opção para diagnóstico apenas se este é o único método disponível, devido à sua baixa especificidade (KOTTON, 2010).

Em outubro de 2010 a Organização Mundial da Saúde (OMS) disponibilizou um padrão de referência padrão obtido a partir do *National Institutes of Biological Standards and Controls* do Reino Unido (KOTTON, 2013). O título do padrão é de 5×10^6 IU/ml devendo os testes comerciais e os desenvolvidos por laboratórios ser recalibrados de modo a apresentar colinearidade com esta referência. (KOTTON, 2013)

Vários estudos mostram boa correlação entre a carga viral medida através de PCR quantitativa e a antigenemia pp-65. Atualmente considera-se que tanto a antigenemia quanto PCR quantitativa podem ser utilizados para a monitorização em terapia preemptiva, diagnóstico de doença ou para monitorização de resposta a terapia antiviral. A escolha entre um dos métodos depende basicamente da

disponibilidade de recursos humanos e econômicos nas diferentes instituições. (DE KEYZER, 2011,KOTTON, 2010,RHEE, 2011,KOTTON, 2013) O PCR qualitativo tem boa sensibilidade mas em geral, baixo valor predictivo, tornando-o menos útil para prever doença citomegálica (MEYER-KOENIG,2004,TONG, 2000,TANABE, 1997).

Sugere-se que a monitorização da resposta imune específica de células T, através da dosagem de citocinas por elas produzidas, poderá fornecer mais informações acerca da predisposição individual ao desenvolvimento de infecção por Citomegalovírus pós-transplante podendo auxiliar nas decisões nas terapias profiláticas e preemptivas, bem como sobre a taxa de queda da viremia após início do tratamento (KOTTON, 2013).

Para diagnóstico de doença tecidual invasiva, é necessária comprovação através de culturas, imunohistoquímica ou hibridização de DNA *in situ*. O uso de PCR para pesquisa de DNA é considerado método rápido, sensível e quantitativo para pesquisa de CMV em amostras de lavado bronco-alveolar, líquido céfalo-raquidiano ou materiais de biópsias. (DE KEYZER, 2011,KOTTON, 2010).

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar a incidência de infecção ativa por CMV em pacientes transplantados renais.

3.2 Específicos

- Comparar os métodos diagnósticos para infecção por CMV: PCR qualitativa e antigenemia pp65.

- Identificar a melhor correlação clínico-laboratorial, com os métodos testados, avaliar fatores de risco para o desenvolvimento de infecção ativa, o uso de terapia profilática, ocorrência de rejeição aguda e a taxa de filtração glomerular.

4. Referências bibliográficas da revisão

1-Bergamasco MD, Barbosa MB, Garcia DD, Cipullo R, Moreira JCM, et al. Infection with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in solid organ transplantation. **Transpl Infect Dis** 2012;14:198-205.

2-Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: Pathogen, paradigm, and puzzle. **J Clin Invest** 2011; 121:1673-1680.

3-Boucher A, Lord H, Collette S, Morin M, Dandavino R. Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients: Evolution of Approach Through Three Eras. **Transplant Proc** 2006; 38:3506-3508.

4-Brennan DC. Cytomegalovirus in renal transplantation. **J Am Soc Nephrol** 2001; 12:848-855

5-Caliendo AM, Kirsten S, Shaw-Yi K, Allegra J, Banhock T, et al. Comparison of Quantitative Cytomegalovirus (CMV) PCR in Plasma and CMV Antigenemia Assay: Clinical Utility of the Prototype AMPLICOR CMV MONITOR Test in Transplant Recipients. **J Clin Microbiol** 2000; 2122–2127.

6-Camargo LFA, Gomes PS, Boschioli AM, Carpinelli, CC. Complicações infecciosas do Transplante Renal. In: Manfro RC, Noronha IL, Silva Filho AP: **Manual de Transplante Renal**. 1ª Edição, 2004:220-252.

7-Cariani E, Pollara CP, Valloncini B, Perandin F, Bonfanti C, Manca N. Relationship between pp65 antigenemia levels and real-time quantitative DNA PCR for Human Cytomegalovirus (HCMV) management in immunocompromised patients. **Bmc Infect Dis** 2007;7:138

8-Chapman JR. Effective strategies to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. **Transplant Proc** 2000; 32:1508-1509.

9-Cordero E, Casasola C, Ecarma R, Danguilan R. Cytomegalovirus Disease in Kidney Transplant Recipients: Incidence, Clinical Profile, and Risk Factors. **Transplant Proc** 2012; 44:694-700.

10-De la Cámara R, López-Jiménez J, Vallejo C, Vázquez L, Luis Pérez J, et al. Update on viral infections in immunocompromised patients. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 2007; 25:2-11.

11-De Keyzer K, Van Laecke S, Peeters P, Vanholder R. Human Cytomegalovirus and Kidney Transplantation: A Clinician's update. **Am J Kidney Dis** 2011; 58:118-126.

12-Fishman JA, Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. **N Engl J Med** 2007;357:2601-14.

13-Garcia G, Harden P, Chapman J, The Global Role of Kidney Transplantation. **Lancet** 2012; 379:36-38.

14-Gavaldà J, Vidal E, Lumbreras C. Infection prevention in solidorgantransplantation. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 2012; 30:27-33.

15-Hoffmann TW, Halimi JM, Buchler M, Velge-Roussel F, Goudeau A, et al. Association between a polymorphism in the humanprogrammeddeath-1 (PD-1) gene and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. **J Med Genet** 2010; 47:54-58.

16-Horne DJ, Narita M, Spitters CL, Parimi S, Dodson S, Limaye AP. Challenging Issues in Tuberculosis in SolidOrganTransplantation. **Clin Infect Dis** 2013; 57:1473-1482.

17-Humar A, Snyderman D. The AST Infectious Diseases Community of Practice, Cytomegalovirus in Solid Organ Transplant Recipients. **Am J Transplant** 2009; 9: S78–S86.

18-Kotton CN. Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. **Nat Rev Nephrol** 2010; 6:711-721.

19-Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Åsberg A, Chou S, et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. **Transplantation** 2010; 89:779-795.

20-Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, et al. Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplantation. **Transplantation** 2013;96:333-360.

21-Kute VB, Vanikar AV, Shah PR, Gumber MR, Patel HV, et al. Post-Renal Transplant Cytomegalovirus Infection: Study of Risk Factors. **Transplant Proc** 2012; 44:706-709.

22-Meyer-koenig U, Weidmann M, Kirste G, Hufert FT. Cytomegalovirus infection in organ-transplant recipients: diagnostic value of pp65 antigen test, qualitative polymerase chain reaction (PCR) and quantitative Taqman PCR. **Transplantation** 2004; 77:1692-8.

23-Noronha IL. Imunossupressão com Agentes Farmacológicos. In: Manfro RC, Noronha IL, Silva Filho AP: **Manual de Transplante Renal 1ª Edição**, 2004:85-140.

24-Pegues DA, Kubak BM, Maree CL, Gregson AL. Infections in Kidney Transplantation, In: **Handbook of Kidney Transplantation 5ª edição**, 2010:251 – 279.

25-Ponticelli C. **Medical Complications of Kidney Transplantation 1ª Edição**, 2007;p. 205

26-Rane S, Nada R, Minz M, Sakhuja V, Joshi K. Spectrum of Cytomegalovirus-Induced Renal Pathology in Renal Allograft Recipients. **Transplant Proc** 2012; 44:713-716.

27-**Registro Brasileiro de Transplante de Órgãos**, Janeiro a Dezembro/2012, nº 04, p 05.

28-Rhee JY, Peck KR, Lee NY, Song JH. Clinical Usefulness of Plasma Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay: Diagnosis of Cytomegalovirus Infection in Kidney Transplant Recipients. **Transplant Proc** 2011;43:2624-2629.

26-Snydman DR, Infection in solid organ transplantation. **Transpl Infect Dis** 1999; 1:21-28.

30-Tanabe K, Tokumoto T, Ishikawa N, Koyama I, Takahashi K, et al. Comparative study of cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay, polymerase chain reaction, serology, and shell vial assay in the early diagnosis and monitoring of CMV infection after renal transplantation. **Transplantation** 1997;64:1721-1725.

31-Taylor, GH. Cytomegalovirus. **Am Fam Physician** 2003; 67:519-524.

32-Tong CY, Cuevas LE, Williams H, Bakran A. Prediction and diagnosis of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients using qualitative and quantitative polymerase chain reaction. **Transplantation** 2000; 69:985-91.

33-Van der Bij W, Schirm J, Torensma R, Van Son WJ, Tegzess AM. Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. **J Clin Microbiol** 1988; 26: 2531–2535.

34-Vidal E, Torre-Cisneros J, Blanes M, Montejo M, Cervera C, et al. Bacterial urinary tract infection after solid organ transplantation in the RESITRA cohort. **Transpl Infect Dis** 2012;14:595-603.

5. Paper

Valuation of diagnostic tests for Cytomegalovirus active infection in renal transplant patients.

Authors:

Rodrigo Fontanive Franco^{1,2}

Rosangela Munhoz Montenegro¹

Alice B. M. P. Machado³

Fernanda de Paris³

Roberto Ceratti Manfro^{1,2,4}

¹ Renal Transplant Unit, Nephrology Service, Hospital de Clínicas of Porto Alegre

² Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, College of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul.

³ Biomedical Research Laboratory - SPC of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre

⁴ Author for correspondence

Author for correspondence:

Roberto Ceratti Manfro

Unidade de Transplante Renal, Serviço de Nefrologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Av. Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

Background. In the last decades renal transplantation has become the most effective therapy for end-stage renal diseases offering better survival and quality of life. However, the use of immunosuppressive agents may predispose to a variety of infections, including cytomegalovirus infection among the most important ones. The objective of this study is to evaluate cytomegalovirus pp-65 antigenemia and qualitative PCR as diagnostic methods for active CMV disease.

Methods. This is a prospective cohort study enrolling patients that received a kidney transplant at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and were monitored for CMV active infection with cytomegalovirus pp-65 antigenemia and qualitative PCR over the post-transplant follow-up.

Results. The use of pp-65 antigenemia is a more useful method for the diagnosis of active CMV disease. A positive correlation was found between active infection as measured by cytomegalovirus pp-65 antigenemia and pre-transplant IgG CMV serology, induction therapy, use of IL-2 receptor antibodies, ganciclovir prophylaxis, PCR diagnosis correlated with donor and recipient CMV IgG serology and ganciclovir prophylaxis.

Conclusions. Both methods are useful for the diagnosis of active CMV disease. However, more studies seem to be necessary to establish the best clinical and laboratory correlation. Quantitative CMV PCR may offer a useful alternative in this clinical scenario.

KEYWORDS: cytomegalovirus, renal transplantation, diagnosis, pp-65 antigenemia, qualitative PCR.

Introduction

Cytomegalovirus is a Herpesviridae family member, very prevalent in general population. In cases where there is no reduction in the activity of the immunological system, it is not a cause of a significant disease. However, in renal transplant patients, it is a very important cause of morbid-mortality and active infection occurs in 40% to 100% of cases. Patients without previous exposure to the virus (with negative specific IgG serology) who receive an organ from a person with a latent infection (positive specific IgG serology) and receivers with serologic evidence of latent infection who are treated with T-lymphocyte depleting antibodies show a high risk of developing an active infection. For this population the development of efficient diagnostic tests is necessary for the rapid and accurate detection of active infections or diseases and better therapeutic management.

For this time, the available tests for monitoring cytomegalovirus active infections are pp-65 antigenemia, which detects phosphoprotein pp-65 in peripheral blood leucocytes, and the detection of viral DNA with qualitative and quantitative PCR.

Material and methods

This study was approved in terms of technical and methodological aspects by the Ethical Committee for Clinical Research of the Post-Graduation Program Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and registered under number 11-0666.

Three hundred and thirty-eight (338) peripheral blood samples prospectively collected from 40 kidney transplant patients in the Nephrology Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Clinic Hospital of Porto Alegre) were studied. The samples were collected sequentially from April 2012 to February 2013, on days 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 and 180 after transplant. Viral replication was detected by determination of pp-65 antigenemia and detection of viral DNA by qualitative PCR.

It included 22 men (55%), 35 patients (87.5%) received kidneys from deceased donors, 33 (82.5%) were white and 5 (12,5%) had pre-transplant diabetes mellitus. The immunosuppressive regimen consisted of the combination of Tacrolimus, Mycophenolate Sodium and Prednisone, with patients that had received kidneys from deceased donors were given an induction therapy with Basiliximab or T-lymphocyte depleting antibodies. In addition to the sampling protocol, additional samples were

taken as needed for clinical management. The specific IgM and IgG serology for cytomegalovirus was obtained from donor and recipient before transplantation. Patients at high risk for developing infections, CMV/IgG- recipient receiving an organ from a CMV/IgG+ donor and those receiving T-lymphocyte depleting antibodies for prophylaxis or acute rejection treatment were managed with IV Ganciclovir followed by treatment with Ganciclovir PO until three months after transplantation, where available. Patients with moderate risk, CMV/IgG+ donor and recipient or just CMV/IgG+ recipient were followed up with serial antigenemia and treated in case it was positive. The cytomegalovirus infection diagnosis was made according to the clinical picture and when the pp-65 antigenemia result reached 01 or more positive cells per 200,000 cells analyzed. Active infection treatment was accomplished by IV administration of Ganciclovir at doses adjusted for the graft function and monitoring of side effects.

Methods

pp-65 Antigenemia. 3-5 ml of peripheral venous blood, or 10 ml of it in leukopenic patients, were collected by aseptic venipuncture into a tube containing EDTA. The sample was quickly sent to the laboratory and maintained at room temperature (20 to 25 °C), being processed within 6 to 8 hours after collection. The first step of the technique involves the peripheral blood RBC lysis. Thus, "reagent A" of the CMV Brite Turbo (a Kit for detecting cytomegalovirus antigenemia) is diluted 1:10 with distilled water and cooled to 4 °C. Then, 2 ml of peripheral blood is mixed with 30 ml of the diluted and cooled solution for RBC lysing in a conical tube with a capacity of 50 ml and incubated for 5 minutes at 4 °C, and then centrifuged for 2 minutes at 2500 rpm and the supernatant is discarded. The RBC lysis step was repeated in case it was not enough. The resulting cell concentrate volume is resuspended in a phosphate-buffered saline (PBS) solution and subjected to centrifugation for 2 minutes at 2500 rpm and the supernatant is discarded. The cells are again resuspended in 1 ml of PBS and counted using a hemocytometer or automated cell counting. The concentration is adjusted to 200,000 cells/ml using dilution in PBS. Next, 100ul of the suspension of 200,000 cells/ml is centrifuged at approximately 600 rpm for 4 minutes for glass slides by means of a cytopspin. At least 3 slides are prepared per patient sample (2 for testing

plus one additional slide for backup). The slides remain drying for 5 minutes. The area containing the cells on the slide is circled with a laboratory marker pen. The slides may be kept at room temperature before fixation. For fixation, "Reagents B and C" are diluted 1:5 in PBS. Two (2) slides are immersed in the diluted reagent B for 5 minutes at room temperature. Next, the slides are dipped three times in a PBS (wash) solution and left in the wash solution for 3 minutes, and then immersed in the diluted C reagent at room temperature for one minute. The slides are dipped again and left immersed in PBS solution for 5 minutes. The Kit control slides are rehydrated in PBS solution for 1-2 minutes. A slide at a time is removed from the wash solution and the area around the cell concentration is carefully dried. Then, 35 µl of the solution with C10/C11 monoclonal antibodies ("Reagent D") are applied and incubated for 20 min at 37 °C. After that, the slides are dipped 3 times in the wash solution (PBS) and placed in a fresh wash solution for 3 minutes. A slide at a time is removed and the area around the cell concentration is dried again. Next, 35 µl of "Reagent E" are applied and incubated at 37 °C. The slides are washed 3 times with fresh PBS and water and covered with glass slides. Leukocytes with positive antigenemia show a greenish-yellow homogeneous nuclear pattern when viewed using a fluorescence microscope.

Polymerase chain reaction. The recommended samples for collection are of whole blood (collected with EDTA anticoagulant). The separation of leukocytes from whole blood was performed using density gradient. The extraction of the genetic material is carried out in the cell suspension resulting from the separation. For DNA extraction with 140 µL of each dilution, the commercial QIAmp kit (Qiagen[®], Valencia, USA) was used, according to manufacturer's instructions. The purified DNA was removed from the QIAmp columns with 70µL of elution buffer by centrifugation.

The DNA samples were subjected to the "nested" PCR technique, which uses two amplification reactions with two pairs of different "primers". Each PCR reaction in the first step contained 16mM (NH₄)₂SO₄, 67mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25 °C), 1.5mM MgCl₂, 0.01% (w/v) of Tween-20 (buffer, Southern Cross Biotechnology Ltd., Cape Town, South Africa), 200nM dNTPmix (ABgene[®], Epson, UK), 100 nM of external "primers" (Invitrogen[®], Carlsbad, USA), 1.25U of Super-Therm DNA polymerase enzyme

(Southern Cross Biotechnology Ltd., Cape Town, South Africa) and 10 μ L of clinical sample extracted. The final volume of the reaction was 50 μ L and the amplification was performed on a thermocycler, using an initial denaturation time of 1 minute and 40 seconds at 94 °C, followed by 33 cycles of 30 seconds at 94 °C, 30 seconds of annealing at 50 °C and 30 seconds of polymerization at 72 °C. In the second amplification reaction, we used the pair of internal "primers". This reaction used a mixture identical to the previous one, except that the total volume was 24 μ L and 2 μ L of the amplicon obtained in the first PCR reaction with the target DNA were used. The amplification program consisted of a denaturation time of 45 seconds at 94 °C, followed by 33 cycles of 20 seconds at 94 °C, 20 seconds of annealing at 55 °C and 30 seconds of polymerization at 72°C.

The end products of amplifications were detected by electrophoresis using 10 μ L of the second reaction in 2% agarose gel, containing the SYBR Safe dye. Viewing was done using an ultraviolet transilluminator. A 100 bp molecular weight marker (Invitrogen[®], Carlsbad, USA) and a positive control for CMV were used to evaluate the PCR products.

The procedures for reagent preparation, sample processing, amplification, product transfer from the first to the second PCR step and amplified product detection were conducted in four different environments to eliminate the possibility of contamination. Moreover, tips with barrier filters and negative controls were used in each reaction.

Statistical Analyses

Data was analyzed and reported using descriptive statistics. Chi-square or Fisher's Exact tests were used to analyze the association between infection and the variables of gender, race, prophylaxis, donor and recipient IgG serology, induction therapy, pre- and post-transplant diabetes mellitus and rejection episodes, and the Mann-Whitney test for the ratio between mean creatinine and mean MDRD with infection. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

The average number of samples per patient was 8.3 ± 0.4 , and 20 (50%) patients underwent all 9 sample collections, 11 (27.5%) had 8 collections and 9 (22.5%) patients totaled 07 collections.

The demographics of the sample are shown in Table 1.

Under the antigenemia criterion, 19 patients (47.5%) developed active Cytomegalovirus infection throughout the observation period. Specific IgG-class antibodies against Cytomegalovirus were present in 39 (97.5%) recipients prior to transplant. Among the donors, 21 (52.5 %) out of a total of 31 (77.5 %), in which the information was provided by the Rio Grande do Sul State Transplant Center, showed the same type of antibody. The positive donor/positive recipient combination occurred in 21 transplants (52.5%) (Table 2). Of these, 15 (71.4%) developed active infection. In 10 (25%) transplants with the negative serology donor/positive serology recipient combination, the active infection occurred in two patients (20% incidence). The active infection incidence was significantly higher when donors were infected ($p < 0.05$). There were eight recipients with reactive IgG serology and one recipient with nonreactive IgG serology who received organs from donors with unknown serology. In these, the active infection incidence was 25% and 0, respectively, in recipients with positive and negative CMV/IgG serology, respectively.

Induction therapy was used in 35 (87.5%) patients, including 18 (45%) patients who received anti-interleukin-2 receptor antibodies (Basiliximab®) and 17 (42,5%) patients who received T-lymphocyte depleting antibodies (Thymoglobulin®). Active infection occurred in 15 patients who received induction (42.8%), compared to four (80%) among those who did not receive it ($p > 0.05$). Among the patients receiving anti-thymocyte antibodies, 1 (5.9%) patient developed active infection under the antigenemia criterion, if compared to 14 (77.8%) of the patients who received anti-interleukin-2 receptor antibodies ($p < 0, 05$).

There was no difference between patients who developed infections and those who did not in relation to gender, race and presence of pre- or post-transplant diabetes mellitus, rejection or serum creatinine values and glomerular filtration rate estimated by the MDRD equation.

Taking the positive qualitative PCR as a diagnostic criterion for active infection, 30 (75%) patients presented it during the study period. Active infection occurred in 18 (85.7%) among the 21 pairs that had a positive donor and positive recipient combination. Among the seropositive patients who received kidneys from seronegative donors, active infection occurred in 7 (70%) ($p>0.05$). Among the recipients who received organs with unknown serology, the active infection incidence was 62.5% and 0 among recipients with positive and negative CMV IgG serology, respectively.

Under the PCR criterion, among those who received induction therapy, 26 (74.2%) patients developed infection in the same way four (80%) of those patients who did not receive it ($p>0.05$). Ten patients receiving anti-thymocyte antibodies (58.8%) showed positive PCR versus 16 (88.9%) of those who received anti-interleukin-2 receptor antibodies ($p>0.05$).

Again under this criterion, the group of patients who developed active infection showed no statistically significant difference in relation to the development of active infection, as compared to the same variables described for the pp-65 antigenemia method above.

All patients with positive antigenemia during the observation period also showed positive qualitative PCR. However, 11 patients who never had positive antigenemia showed positive qualitative PCR (Table 3). The kappa coefficient of agreement between pp-65 antigenemia and PCR was 0.463 ($P = 0.001$). Figure 1 shows the distribution of positive results both for antigenemia and for PCR of all patients during the post-transplant follow-up period.

In this group of patients no correlation between acute rejection incidence and active cytomegalovirus infection was observed using the two diagnostic methods.

Among patients who were treated with IV Ganciclovir, only one developed active infection as assessed by both antigenemia and PCR after treatment of acute rejection picture with Methylprednisolone pulse therapy.

Prophylaxis with Ganciclovir was used orally with 21 patients. Considering positive antigenemia as a diagnostic criterion, three patients (14.3%) developed active infection, while 16 (84.2%) patients not receiving prophylactic therapy developed active infection ($p < 0.001$). Taking into PCR, 12 (57.14%) patients who received prophylaxis developed active infection compared with 18 (94.7%) patients not receiving prophylaxis ($p < 0.05$).

Variables related to the development of active infection measured by the two diagnostic tests are analyzed in Table 4. Taking pp-65 antigenemia as a diagnostic criterion, the risk of developing active infection was significantly higher in patients whose donors had positive CMV IgG serology and those patients who received induction therapy with anti-interleukin-2 receptor antibodies (Basiliximab®), and was significantly lower in those receiving prophylactic therapy with oral Ganciclovir. Considering qualitative PCR, there was also significantly higher incidence of active infection in recipients of kidneys from donors with positive CMV IgG serology and significantly lower risk of infection in those patients who were treated with prophylactic therapy.

Of the patients who were considered as having active infection, five received preemptive Ganciclovir treatment, based on the number of positive cells in the antigenemia test. No patient had signs or symptoms related to infection and there was no invasive disease development.

Discussion

Cytomegalovirus is a virus of the genus Herpesviridae, family Herpesviridae, subfamily β -herpesvirinae, with high prevalence in the world population and is the leading cause of viral infection in kidney transplant recipients. Statistics show that, without some type of prophylactic therapy, between 40% and 100% of patients may develop active infection, occurring mainly between 30 and 90 days after

transplantation, and the CMV disease can occur in up to approximately 70% of cases. Aside from the direct effects of viral tissue invasion, Cytomegalovirus can cause indirect changes, related to the stimulation of immune response and release of cytokines, which can cause the appearance of vascular disorder cases and acute and chronic rejections, as well as reduced immunity and inflammatory response, resulting in susceptibility to opportunistic infections (GIAKOUSTIDIS, 2012, CORONA, 2009, BRENNAN, 2001, KOTTON, 2005, AGUADO, 2012, FISHMAN, 2007).

Moreover, the occurrence of CMV infection or disease in renal transplant patients is correlated with a reduced survival of the patient and the graft, especially when used with elderly donors and in the presence of delayed graft function. These effects can occur even in cases of late infections, which occur over a year after transplantation (SMEDBRAATEN, 2012, BROWNE, 2010, KANTER, 2009).

Previous studies suggest a relationship between the occurrence of Cytomegalovirus infection and acute rejection episodes, most commonly preceding the infection picture, but which may also occur after it. The possible relationship between acute rejection and Cytomegalovirus infection can be explained by a change in the expression of surface antigens in the renal tissue after Cytomegalovirus infection, by stimulating T-cells with cross-reactivity directed against common or similar antigens between the virus and the graft (molecular mimicry) or also due to new antigens expressed in the graft due to viral infection. In addition, growth factors, cytokines and other inflammatory mediators released by T-cells may trigger the alloreactivity of non-specific T-cells. When viral infection occurs after a rejection episode, it may be related to the enhancement of immunosuppression in the acute rejection treatment, as well as it may be caused by the release of inflammatory mediators, especially when lymphocyte-depleting antibodies, such as anti-thymocyte globulin, are used. Both acute rejection and Cytomegalovirus infection are risk factors for poor survival of grafts and the occurrence of the two events together constitutes a risk factor even greater than each one of them individually (KOTTON, 2005, SMEDBRAATEN, 2012, SAGEDAL, 2004, KANTER, 2009, NETT, 2004).

Given the clinical impact that Cytomegalovirus infection represents to renal transplant patients, accurate diagnostic methods that can identify early viral replication (active infection) and CMV disease are required, so that one can intervene with an earlier and more effective therapy. The methods most frequently used today for detecting viral replication are the detection of pp-65 antigenemia in peripheral blood leukocytes and methods to detect and quantify the viral DNA as qualitative and quantitative PCR, also in the peripheral blood (CALIENDO, 2000, MEYER-KOENIG, 2004, TONG, 2000).

The present study was aimed at evaluating the diagnostic methods for active cytomegalovirus infection, correlating it with risk factors for the development of the disease and with the infection impact on the graft and on the survival of renal transplant patients. Just like in the literature, there was no difference between patients who developed active infection and those who did not, in terms of sex, race or the presence of pre-transplant diabetes mellitus. Regarding age, also there was no difference between the groups according to the two diagnostic methods studied, although there are reports that CMV infection is more common in elderly recipients (SMEDBRAATEN, 2012, KANTER, 2009, KUTE, 2012, HJELMESAETH, 2005).

The measurable pre-transplant risk factors for the development of CMV infection includes IgG-isotype serology specific for Cytomegalovirus in donors and recipients. Transplants that are most at risk are those in which the donor has IgG-class antibodies and the recipient has never been exposed to cytomegalovirus and, therefore, does not have preformed antibodies. However, transplants in which both patients have positive serology also present a considerable risk for developing active CMV infection and CMV disease, both by the possibility of reactivation of latent viral subtypes of the donor and the recipient and by genetic alterations that may lead to the infection. In the present study, the active infection incidence was 71.4% under the diagnostic criterion of antigenemia and 85.7% in the evaluation by qualitative PCR, showing that the population of kidney transplant patients is at high risk of developing CMV disease (BRENNAN, 2001, KOTTON, 2013, HOFFMANN, 2010, NEUMANN, 1997).

Another important risk factor for the disease development is the use of induction therapy or treatment of rejection episodes with T-lymphocyte depleting antibodies, such as anti-thymocyte globulin. However, in this study there was no significant difference in the development of active infection, under both diagnostic criteria, in patients who had received induction therapy with this biological agent. On the other hand, patients receiving induction therapy with anti-interleukin-2 receptor antibodies had high incidence of active infection, 77.8% and 88.9 %, respectively, when evaluated by antigenemia and qualitative PCR, a finding that is in disagreement with that described in the literature (18, 19). This discrepancy is probably due to the prophylactic therapy protocol, used whenever patients receive T-lymphocyte depleting antibodies. While patients induced with anti-interleukin-2 receptor antibodies only receive prophylaxis with Ganciclovir in the combination of high risk, CMV IgG positive donor and CMV IgG negative recipient or in the treatment of acute rejection episodes (KOTTON, 2005, KANTER, 2009, KUTE, 2012, KOTTON, 2013, MCKEAGE, 2010, GABARDI, 2011, FOLKMANE, 2001).

Regarding active infection prophylaxis, the use of oral Ganciclovir showed a positive impact in reducing its incidence, through the two diagnostic methods, antigenemia and qualitative PCR. This confirms the findings in the literature, according to which both prophylactic and preemptive therapies significantly reduce the occurrence of active infection and disease when compared to placebo or no therapy, and the prophylactic therapy is related to a lower incidence of disease, acute rejection, bacterial and fungal infectious events, with lower mortality and greater cost-effectiveness, although with greater risk of disease development after cessation of therapy (GABARDI, 2011, KALI, 2005, REISCHIG, 2012, KOETZ, 2001, MONTEJO, 2010, LUAN, 2011, JUNG, 2010).

We did not find any relationship between the occurrence of rejection episodes and cytomegalovirus infection, as assessed by both methods. This is in disagreement with what is reported in the literature, which reports increased risk of acute rejection episodes related to CMV infection (REISCHIG, 2009, LINARES, 2011, REINKE, 1994, CHEN, 2005).

Our study has some weaknesses. Initially, the caseload studied is restricted and there was also a sizable number of donors with IgG serology not available, which compromised the analysis of this risk factor. Additionally, the follow-up time could have been lengthened to one year and finally there were no cases of CMV disease. Despite these limitations, we believe that the present series is suitable for the evaluation of the diagnostic methods tested.

Finally, we conclude that more robust studies are needed to determine the best clinical-laboratory correlation of active infection and CMV disease. Additionally, the use of quantitative methods of nucleic acid amplification, i.e. quantitative PCR, could potentially be a more accurate method.

6. Final remarks

Cytomegalovirus infection is highly prevalent in the world population, though often without significant clinical impact. In renal transplant patients, due to immunosuppression, the primary infection, reactivation of latent infection of both the donor and the recipient or superinfection with another virus strain, is an important cause of morbidity and mortality. With the purpose of reducing active cytomegalovirus infection and disease episodes, treatment strategies which depend on effective diagnostic methods for their implementation were established. As such, both pp-65 antigenemia and qualitative PCR are able to contribute to the early detection of viral proliferation. More studies are needed to better establish the clinical-laboratory correlation for the diagnosis of active cytomegalovirus infection, and it is also necessary to evaluate the viral DNA quantification using the quantitative PCR methods.

7. Annexes

I – Data collection instrument

PROTOCOL

Patient Identification:

Medical Records:

Age:

Sex:

Race:

Immunosuppressive Therapy:

Date of the transplant:

Transplanted organ:

Pre-transplant donor CMV IgM and IgG serology:

Pre-transplant receiver CMV IgM and IgG serology:

Pre-transplant DM diagnosis: () yes () no Date:

Post-transplant DM diagnosis: () yes () no Date:

Monthly serum creatinine until the 6th month after transplantation.

Monthly creatinine (MDRD-7) glomerular filtration until the 6th month after TX.

pp65 antigenemia for CMV, pre-transplant qualitative and quantitative PCR, fortnightly from the 1st to the 3rd month and monthly from the 4th to the 6th month after TX.

Date of CMV infection:

Antiviral drug used for the treatment and usage time:

Prophylaxis used: () yes () no Drug:

Period used:

Hospitalization for treatment of CMV infection: () yes () no Period:

Stay in the ICU due to CMV infection: () yes () no Period:

Dialysis required during infection: () yes () no Period:

Mechanical ventilation required during infection: () yes () no Period:

Acute rejection: () yes () no Date:

Graft loss: () yes () no Date:

Death: () yes () no Date:

II – Statement of Informed Consent

STATEMENT OF INFORMED CONSENT FOR PARTICIPATION IN THE COST-EFFECTIVENESS EVALUATION STUDY OF DIAGNOSTIC METHODS FOR ACTIVE CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN SOLID ORGAN AND BONE MARROW TRANSPLANT PATIENTS.

Transplant patients have altered cellular immunity, being susceptible to cytomegalovirus infection. The form of presentation of this infection ranges from a nonspecific viral picture to a severe dysfunction of the body that can be deadly.

The viral syndrome is characterized by fever and a reduction in the number of white blood cells and platelets.

The clinical diagnosis of cytomegalovirus infection requires laboratory testing. The existing methods for the diagnosis of CMV infection also predict the development of the disease. Several tests can be used for diagnosis, such as pp65 antigenemia, real-time PCR and in situ hybridization of DNA-RNA-CMV. Through these methods, CMV infection can be detected before the development of the disease.

You are invited to participate in a study where we will evaluate three diagnostic methods for cytomegalovirus infection (pp65 antigenemia, qualitative and quantitative PCR for CMV) through peripheral blood collections before transplantation, fortnightly from the 1st to the 3rd month, and monthly from the 4th to 6th month after transplantation. The sample collections for the study material will be taken at the same time as those needed for clinical management and will not require any additional venipuncture.

During the study implementation period, clinical decisions regarding the diagnosis of active CMV infection will be made according to the best judgment of the attending physicians using the laboratory methods currently available (pp65

antigenemia, qualitative PCR and research of IgG and IgM antibodies against Cytomegalovirus).

My doubts about this study can be settled by Dr. Rosangela Montenegro or Dr. Rodrigo Franco through telephones 3359-8121 or 3359-8275.

I, _____
_____, in a free and informed manner, want to participate in this study and hereby AUTHORIZE blood extraction and its analysis. I also declare that I was duly informed and warned about the risks and benefits of my participation in this study.

I have read the above information and carefully heard the explanations of Dr. _____. I have had the opportunity to ask questions and all were answered satisfactorily.

I know that my right to withdraw at any time from participation in this study is ensured, without prejudice to the outpatient care that I am submitted periodically.

Participant's name Date Participant's signature

Person obtaining consent Date Signature

Legal witness, if required Date Witness' signature

References:

- 1 - Aguado JM, Navarro D, Juan RS, Castón JJ. Cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.** 2012; 30:57-62.
- 2 - Brennan DC. Cytomegalovirus in renal transplantation. **J. Am. Soc. Nephrol.** 2001; 12:848-855.
- 3 - Browne BJ, Young JA, Dunn TB, Matas AJ. The impact of cytomegalovirus infection \geq 1 year after primary renal transplantation. **Clin. Transplant.** 2010; 24:572-577.
- 4 - Caliendo AM, Kirsten S, Shaw-Yi K, Allegra J, Banhock T, et al. Comparison of Quantitative Cytomegalovirus (CMV) PCR in Plasma and CMV Antigenemia Assay: Clinical Utility of the Prototype AMPLICOR CMV MONITOR Test in Transplant Recipients. **J. Clin. Microbiol.** 2000; 2122–2127.
- 5 - Chen JH, Mao YY, He Q, Wu JY, Lv R. The impact of pretransplant cytomegalovirus infection on acute renal allograft rejection. **Transplant Proc.** 2005; 37:4203-4207.
- 6 - Corona-Nakamura AL, Monteón-Ramos^b FJ, Troyo-Sanromán^c R, Arias-Merino^d MJ, Anaya-Prado^e R. Incidence and Predictive Factors for Cytomegalovirus Infection in Renal Transplant Recipients. **Transplant Proc.** 2009;41:2412–2415.
- 7 - Folkmane I, Bicans J, Amerika D, Chapenko S, Murovska M, Rosentals R. Low rate of acute rejection and cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients with basiliximab. **Transplant Proc.** 2001;33:3209-3210.
- 8 - Fishman JA. Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. **N. Engl. J. Med.** 2007;357:2601-2614.
- 9 - Gabardi S, Martin ST, Roberts KL, Grafals M. Induction immunosuppressive therapies in renal transplantation. **Am. J. Health Syst. Pharm.** 2011;68:211-218.
- 10 - Giakoustidis D, Antoniadis A, Fouzas I, Sklavos A, Giakoustidis A, et al. Prevalence and clinical impact of cytomegalovirus infection and disease in renal transplantation: Ten years of experience in a single center. **Transplant Proc.** 2012; 44:2715-2717.
- 11 - Hjelmessaeth J, Muller F, Jenssen T, Rollag H, Sagedal S, Hartmann A. Is there a link between cytomegalovirus infection and new-onset post-transplantation diabetes mellitus? Potential mechanisms of virus induced beta-cell damage. **Nephrol. Dial. Transplant.** 2005; 20:2311-2315.
- 12 - Hoffmann TW, Halimi JM, Buchler M, Velge-Roussel F, Goudeau A, et al. Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (PD-1) gene and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. **J. Med. Genet.** 2010; 47:54-58.

- 13 - Jung GO, Kim SJ, Choi GS, Moon JI, Kim JM, et al. The Effect of Cytomegalovirus Antigenemia Titer on the Efficacy of Preemptive Therapy for the Prevention of Cytomegalovirus Disease After Kidney Transplantation. **Transplant Proc.** 2010;42:804-810.
- 14 - Kali AC, Levitsky J, Lyden E, Stoner J, Freifeld AG. Meta-analysis: The efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. **Ann Intern Med** 2005;143:870-880.
- 15 - Kanter J, Pallardó L, Gavela E, Escudero V, Beltrán S, et al. Cytomegalovirus Infection Renal Transplant Recipients: Risk Factors and Outcome. **Transplant Proc** 2009;41:2156-2158.
- 16 - Koetz AC, Delbruck R, Furtwangler A, Hufert FT, Neumann-Haefelin D, et al. Cytomegalovirus PP65 antigen-guided preemptive therapy with ganciclovir in solid organ transplant recipients: A prospective, double-blind, placebo-controlled study. **Transplantation** 2001; 72:1325-1327.
- 17 - Kotton CN, Fishman JA. Viral infection in the renal transplant recipient. **J Am Soc Nephrol** 2005;16:1758-1774.
- 18 - Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, et al. Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplantation. **Transplantation** 2013;96:333-360.
- 19 - Kute VB, Vanikar AV, Shah PR, Gumber MR, Patel HV, et al. Post-Renal Transplant Cytomegalovirus Infection: Study of Risk Factors. **Transplant Proc.** 2012;44:706-709
- 20 - Linares L, Sanclemente G, Cervera C, Hoyo I, Cofan F, et al. Influence of Cytomegalovirus Disease in Outcome of Solid Organ Transplant Patients. **Transplant Proc.** 2011; 43:2145-2148.
- 21 - Luan FL, Kommareddi M, Ojo AO. Universal Prophylaxis is Cost Effective in Cytomegalovirus Serology-Positive Kidney Transplant Patients. **Transplantation** 2011;91:237-244.
- 22 - McKeage K, McCormack PL. Basiliximab: A review of its use as induction therapy in renal transplantation. **BioDrugs** 2010; 24:55-76.
- 23 - Meyer-koenig U, Weidmann M, Kirste G, Hufert FT. Cytomegalovirus infection in organ-transplant recipients: diagnostic value of pp65 antigen test, qualitative polymerase chain reaction (PCR) and quantitative Taqman PCR. **Transplantation** 2004; 77:1692-8.
- 24 - Montejo M, Porto M, Carmon O, Zárraga S, Gainza J, et al. Prophylactic Therapy With Valganciclovir in High-Risk (Cytomegalovirus D +/R -) Kidney Transplant Recipients: A Single-Center Experience. **Transplant Proc.** 2010; 42:2947-2949.

25 - Nett PC, Heisey DM, Fernandez LA, Sollinger HW, Pirsch J., Association of cytomegalovirus disease and acute rejection with graft loss in kidney transplantation. **Transplantation** 2004;78:1036-41.

26 - Neumann UP, Knoop M, Langrehr JM, Jonas S, Bechstein WO, et al. Positive donor cytomegalovirus IgG status as a major risk factor for liver allograft recipient infection. **Transplant Proc** 1997;29:2859-2860

27 - Reinke P, Fietze E, Ode-Hakim S, Prösch S, Lippert J, et al. Late-acute renal allograft rejection and symptomless cytomegalovirus infection. **Lancet** 1994;344:1737-1738.

28 - Reischig T, Jindra P, Hes O, Bouda M, Kormunda S, Treska V. Effect of Cytomegalovirus Viremia on Subclinical Rejection or Interstitial Fibrosis and Tubular Atrophy in Protocol Biopsy at 3 Months in Renal Allograft Recipients Managed by Preemptive Therapy or Antiviral Prophylaxis. **Transplantation** 2009;87:436-444.

29 - Reischig T. Advances in cytomegalovirus-preventive strategies in solid organ transplantation: Defending pre-emptive therapy. **Expert Rev. Anti Infect Ther.** 2012; 10:51-61.

30 - Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP, Osnes K, Leivestad T, et al. Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. **Kidney Int** 2004;66:329-37.

31 - Smedbraaten YV, Hartmann A, Rollag H, Leivestad T, Foss A, et al. Long-Term Impact of early Cytomegalovirus Infection After Kidney Transplantation. **Nephrol. Dial. Transplant** 2012; 27:68-69.

32 - Tong CY, Cuevas LE, Williams H, Bakran A. Prediction and diagnosis of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients using qualitative and quantitative polymerase chain reaction. **Transplantation** 2000; 69:985-91.

Table 1. Demographic and initial immunosuppression data

| | Frequency | (%) |
|----------------------------|-----------|------------------|
| Receiver's Data | | |
| Mean age (in years) | 48.5+-13 | (range: 14 - 64) |
| White/non-white race | 33/7 | (82.5/17.5) |
| Males/Females | 22/18 | (55/45) |
| IgG+ CMV | 39 | (97.5) |
| IgG- CMV | 1 | (2.5) |
| Pre-TX DM | 5 | (12.5) |
| Donor's Data | | |
| Alive/Deceased | 05/35 | (12.5/87.5) |
| IgG+ CMV | 21 | (52.5) |
| IgG- CMV | 10 | (25) |
| IgG not informed | 9 | (22.5) |
| Immunosuppression | | |
| No induction | 5 | (12.5) |
| Induction with Basiliximab | 18 | (45) |
| Induction with ATG | 17 | (42.5) |

Induction with ATG – Induction therapy with lymphocyte-depleting antibodies.

Table 2 – Donor and Receiver's Cytomegalovirus IgG serology

| Do no r | Receiver | | |
|---------------|-----------|-------|---|
| | IgG + | IgG - | |
| | CMV IgG + | 21 | - |
| | CMV IgG - | 10 | - |

In nine transplants performed, Donor's IgG serology was not known, and 8 receivers had IgG+ serology and 1 patient had IgG- serology.

Table 3 – Degree of agreement between tests

| Positive Antigenemia | | Negative Antigenemia |
|-----------------------------|-----------|-----------------------------|
| PCR + | 19 | 11 |
| PCR - | 0 | 10 |

Kappa coefficient of agreement: 0.463, p=0.001

Table 4 – Risk factors for the development of active Cytomegalovirus disease

| Variable | pp-65Antigenemia | | | Qualitative PCR | | |
|-------------------|------------------|--------------|---------|-----------------|--------------|---------|
| | Active infect. | No infection | p-value | Active infect. | No infection | p-value |
| Age (years) | 49 | 48 | 0.818 | 47.5 | 51 | 0.248 |
| Sex (M/F) | 11/8 | 11/10 | 0.761 | 17/13 | 5/5 | 0.731 |
| Race(W/NW) | 17/2 | 16/5 | 0.412 | 24/06 | 9/1 | 0.656 |
| Pre-TX DM (Y/N) | 3/16 | 2/19 | 0.654 | 5/25 | 0/10 | 0.217 |
| D+/R+//D-R+ | 15/02 | 6/8 | 0.008 | 18/7 | 3/3 | 0.206 |
| Prophylaxis (Y/N) | 3/16 | 18/3 | <0.001 | 12/18 | 9/1 | 0.009 |
| Ind. ATG (Y/N) | 1/18 | 16/5 | <0.001 | 10/20 | 7/3 | 0.066 |
| Rejection (Y/N) | 5/14 | 4/17 | 0.712 | 7/23 | 2/8 | 0.825 |

M= Male, F= Female, W= White, NW= Non-White, DM= Diabetes Mellitus, ATG= Anti-thymocyte globulin.

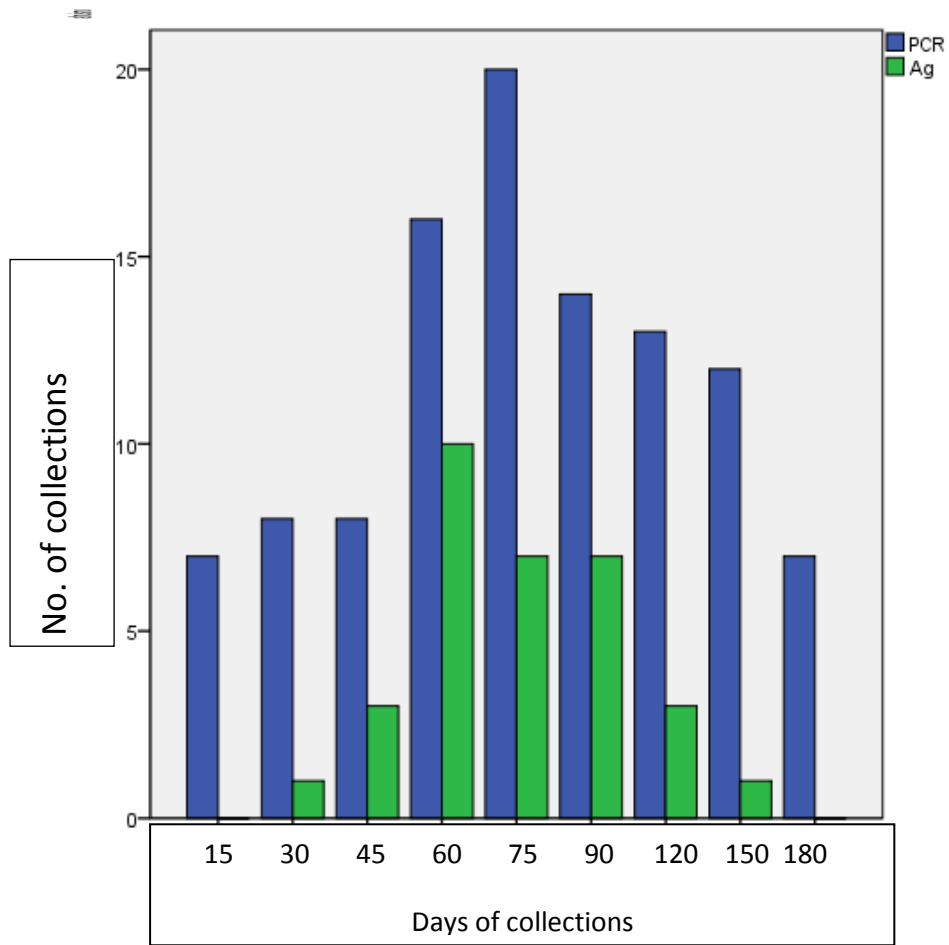
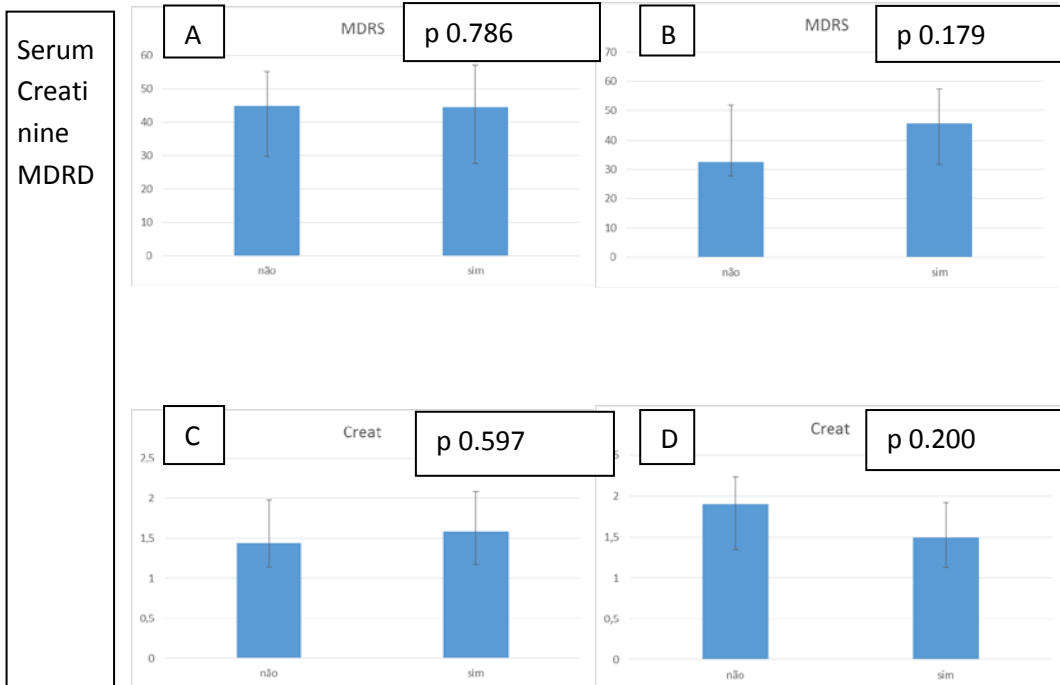


Figure 1

Figure 2



Active Cytomegalovirus Infection

Legends of Figures

Figure 1. Frequency of tests with positive result over the collection period. Qualitative PCRs and pp65 antigenemias.

Figure 2. Renal function, creatinine and MDRD equation-estimated glomerular filtration parameters. Panel **A.** MDRD equation-estimated glomerular filtration, patients with and without active infection evaluated by pp65 antigenemia; Panel **B.** MDRD equation-estimated glomerular filtration, patients with and without active infection evaluated by qualitative PCR; Panel **C.** Serum creatinine, patients with and without active infection evaluated by pp65 antigenemia; Panel **D.** Serum creatinine, patients with and without active infection evaluated by qualitative PCR.

GFR= Glomerular Filtration Rate, MDRD= Molecular filtration calculation using the MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) method.