



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PAULA FERNANDA GOMES TELLES

DEFINIÇÃO DO PONTO DE CORTE DA CARGA VIRAL QUANTITATIVA DO
CITOMÉGALOVÍRUS PARA O TRATAMENTO PREEMPTIVO BASEADO NA
CORRELAÇÃO COM A ANTIGENEMIA PP65, CINÉTICA VIRAL E DESFECHO
CLÍNICO EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE CARDÍACO

CAMPINAS

2015

PAULA FERNANDA GOMES TELLES

DEFINIÇÃO DO PONTO DE CORTE DA CARGA VIRAL QUANTITATIVA DO
CITOMEGALOVÍRUS PARA O TRATAMENTO PREEMPTIVO BASEADO NA
CORRELAÇÃO COM A ANTIGENEMIA PP65, CINÉTICA VIRAL E DESFECHO
CLÍNICO EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE CARDÍACO

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de mestra em ciências na
área de concentração clínica médica.

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIÂNGELA RIBEIRO RESENDE
COORIENTADORA: Profa. Dra. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA PAULA FERNANDA GOMES TELLES
E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. MARIÂNGELA
RIBEIRO RESENDE.

CAMPINAS

2015

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

T238d Telles, Paula Fernanda Gomes, 1984-
Definição do ponto de corte da carga viral quantitativa do citomegalovírus para o tratamento preemptivo baseado na correlação com a antigenemia pp65, cinética viral e desfecho clínico em receptores de transplante cardíaco / Paula Fernanda Gomes Telles. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Mariângela Ribeiro Resende.
Coorientador: Sandra Cecília Botelho Costa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citomegalovírus. 2. Transplante de coração. 3. Carga viral. 4. Antígeno pp65. I. Resende, Mariângela Ribeiro, 1966-. II. Costa, Sandra Cecília Botelho, 1951-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Threshold of cytomegalovirus quantitative viral load for preemptive therapy based on pp65 antigenemia, viral kinetics and clinical outcome among heart transplant recipients

Palavras-chave em inglês:

Cytomegalovirus
Heart transplantation
Viral load
CMV pp65 antigen

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Mariângela Ribeiro Resende [Orientador]
Raquel Silveira Bello Stucchi
Mauro José Costa Salles

Data de defesa: 29-09-2015

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO
Paula Fernanda Gomes Telles

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIÂNGELA RIBEIRO RESENDE
COORDINADORA: PROFA. DRA. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. MARIÂNGELA RIBEIRO RESENDE
2. PROF.DR. MAURO JOSÉ COSTA SALLES
3. PROFA.DRA. RAQUEL SILVEIRA BELLO STUCCHI

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

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 29/09/2015

AGRADECIMENTOS

- À Profa Dra Mariângela Ribeiro Resende pela inspiração e orientação para o desenvolvimento desse trabalho, pelo companheirismo nos momentos difíceis e principalmente pela amizade e carinho que levarei para toda vida.
- À Profa Dra Sandra Cecília Botelho Costa por ter aberto as portas do Laboratório de Vírus da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.
- À Dra. Sandra Helena Alves Bonon e aos amigos do Laboratório de Vírus da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp por terem me recebido e ensinado com paciência e dedicação as técnicas do mundo novo da biologia molecular, e conseqüentemente participarem de muitos momentos difíceis, porém sem deixar a alegria de lado.
- À equipe da Cirurgia Cardíaca do HC-Unicamp, em especial ao Prof. Dr. Orlando Petrucci e ao Dr. Carlos Fernando Ramos Lavagnoli, por acreditarem na importância do trabalho, pela dedicação na adesão aos protocolos de seguimento, coleta de exames e tratamento, pelo acesso ao banco de dados da equipe e pelo apoio incondicional.
- Ao Dr. Luis Felipe Bachur pela participação na elaboração dos protocolos, seguimento clínico dos pacientes, pela amizade e apoio.
- À Equipe do Serviço de Procura de Órgãos e Tecidos (SPOT) pela disponibilidade e acesso ao banco de dados.
- À Equipe do Hospital Dia do HC-Unicamp, pela participação na coleta de exames, seguimento clínico e obtenção de dados.
- À Sra. Eliene pela ajuda com trâmites de compra de materiais, uso de verbas, entre outros.

- Ao Felipe pelo companheirismo, conselhos e considerações técnicas valiosas para a elaboração da dissertação, aulas e apresentações.
- A todos os pacientes que participaram desse estudo, doadores e seus familiares.

RESUMO

Embora as diferentes estratégias de monitorização do Citomegalovírus (CMV) pós transplante de órgãos sólidos (TOS) sejam baseadas no risco de desenvolvimento de doença ativa, não existe um ponto de corte da carga viral estabelecido universalmente para início de terapia preemptiva (TP). Esse estudo se propõe a determinar o ponto de corte para monitorização do CMV baseado na antigenemia pp65 (Agpp65), cinética viral e desfecho clínico em uma coorte de recetores de transplante cardíaco (RTC) em cenário de alta prevalência. Foi realizado um estudo prospectivo envolvendo pacientes que receberam transplante cardíaco no Hospital de Clínicas da Unicamp no período de dezembro de 2011 a dezembro de 2013. As amostras de plasma foram obtidas semanalmente até 180 dias pós transplante e sempre que houvesse suspeita de doença ativa pelo CMV. A Agpp65 e o teste de amplificação do ácido nucléico quantitativo (QNAT) foram analisados concomitantemente. A concordância entre os testes foi avaliada através do coeficiente Kappa (κ). A curva ROC para os valores de ponto de corte da carga viral foi calculada com base no valor específico da Agpp65 ≥ 5 células positivas/100.000 leucócitos, assim como os demais parâmetros do teste. A estimativa da cinética viral no plasma foi calculada através do *doubling time* (dt).

No período foram avaliados 25 RTC, todos com sorologia IgG positiva para CMV. Durante o seguimento clínico 15 (60%) dos pacientes apresentaram infecção ativa ou doença pelo CMV. Das amostras analisadas, 116 (35,3%) apresentaram resultados discordantes, sendo que 100 (30,3%) foram positivas exclusivamente pelo QNAT. Linearidade foi observada entre os testes e a área sob a curva ROC foi de 0.8686493 (0.8081144 -0.9291842). Em relação aos parâmetros do CMV QNAT, um ponto de corte ≥ 565 UI/ml (1000 cópias/ml) mostrou acurácia

diagnóstica (AD) de 88,4% e valor preditivo negativo (VPN) de 92,9%. Para o ponto de corte ≥ 1695 UI/ml (3000 cópias/ml) a AD foi pouco menor (88,4%), porém o VPN caiu para 88,7% e a sensibilidade para 45%. Em relação à cinética viral, a carga viral inicial foi maior entre os que necessitaram de TP, porém não significativa ($p=0,106$). O dt foi menor no grupo que apresentou doença pelo CMV ($p=0,024$). Após o início do tratamento, o tempo para supressão viral foi maior quando avaliado pelo método QNAT do que pela Agpp65 ($p = 0,023$). Ao analisar retrospectivamente, 54% dos pacientes apresentavam QNAT positivo ao final do tratamento. Os desfechos clínicos nos grupos com e sem CMV ativo foram semelhantes.

Considerando a performance dos parâmetros obtidos, o ponto de corte definido para definir infecção ativa e início da terapia preemptiva em RTC assintomáticos e com risco intermediário para o desenvolvimento de CMV foi de 565 UI/ml (1000 cópias/ml). Em nosso estudo menores dt foram relacionados a maior risco de doença órgão invasiva. A maior sensibilidade e possibilidade de obtenção de dados sobre a cinética viral estão entre as principais razões pelas quais o QNAT tem se firmado como o método de preferência para a monitorização do CMV.

Palavras-chave: Citomegalovírus. Transplante de coração. Carga Viral.

ABSTRACT

Although different surveillance strategies for cytomegalovirus (CMV) after solid organ transplant (SOT) are recommended based on the risk of active disease, a specific quantitative viral load threshold for starting preemptive therapy has not been established universally. This study was performed to determine a viral load threshold for monitoring CMV infection based on antigenemia pp65 (pp65Ag) viral kinetics and the clinical outcome in a cohort of heart transplant recipients (HTR) in a high-prevalence setting.

A prospective study was performed involving HTR at a Clinics Hospital of the State University of Campinas from December 2011 to December 2013. Plasma samples were obtained weekly until 180 days post-transplantation and whenever CMV disease was suspected. Pp65Ag and CMV quantitative nucleic acid amplification testing (QNAT) were analyzed concomitantly. The agreement between tests was evaluated using the kappa coefficient (κ). Receiver-operating characteristic (ROC) curves of viral load cut-off values were calculated for the specific pp65Ag value (≥ 5 positive cells/100,000 leukocytes) as well as others parameters assay. An estimation of CMV plasma viral load kinetics was calculated using the viral doubling time (dt).

Three hundred twenty-nine samples were evaluated from 25 heart transplant recipients with CMV serology reagent pretransplantation. During the follow-up, 15 (60%) patients had active CMV infection or disease. In 116 (35.3%) samples, discordant results were observed, in which 100 (30.3%) were positive by CMV QNAT, exclusively. Linearity was observed between the assays, and the area under the ROC curve was 0.8686493 (0.8081144 -0.9291842). Regarding QNAT CMV parameters, a threshold of ≥ 565 IU/ml (1,000 copies/ml) showed a diagnostic

accuracy (DA) of 88.4% and a negative predictive value of 92.9%. For a threshold higher than ≥ 1695 IU/ml (3,000 copies/ml), DA was slightly reduced (87.2%), the negative predictive value decreased to 88.7% and the sensitivity was 45%. An analysis of viral kinetics showed that patients who developed CMV disease had a significantly lower doubling time ($p = 0.024$). Clinical outcomes were similar between those groups with and without active CMV infection or disease.

Considering the performance parameters, the local threshold chosen for defining active CMV infection and beginning preemptive CMV therapy in asymptomatic HTR at intermediate risk of CMV was $\geq 1,000$ copies/ml. Viral kinetics, expressed as doubling time values, could predict the progression to CMV disease in this group. These results reinforce the necessity of QNAT implementation as a follow-up for solid organ transplant recipients mainly in a preemptive therapy scenario with the continuous reassessment of the adequate threshold based on the risk group and clinical outcome.

Key words: Cytomegalovirus. Heart Transplantation. Viral Load

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras	Página
Figura 1. Microscopia de fluorescência: neutrófilos marcados com fluoresceína (antigenemia pp65 positiva)	46
Figura 2. Representação gráfica das curvas de amplificação das reações para detecção do DNA alvo do CMV nas amostras estudadas	49
Figura 3. População incluída no estudo e desenvolvimento de infecção pelo CMV pós transplante	54
Figura 4. Curva <i>Receiver Operator Characteristic</i> (ROC): comparação entre os parâmetros de desempenho da Agpp65 e do QNAT-CMV	64

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
Tabela 1. Distribuição dos pacientes submetidos a transplante cardíaco de acordo com características demográficas	56
Tabela 2. Distribuição dos pacientes submetidos a transplante cardíaco de acordo com as características clínicas e sorológicas	57
Tabela 3. Pacientes com infecção ativa pelo CMV segundo a monitorização da antigenemia pp65 e o QNAT-CMV pré e pós início do tratamento antiviral	58
Tabela 4. Distribuição dos pacientes submetidos a transplante cardíaco segundo o desfecho clínico da infecção ativa pelo CMV	60
Tabela 5. Distribuição dos pacientes de acordo com o desfecho clínico 15 meses pós transplante cardíaco	60
Tabela 6. Linearidade entre os resultados da Agpp65 e QNAT	62
Tabela 7. Comparação entre os resultados dos testes de Agpp65 e QNAT	62
Tabela 8. Parâmetros do teste de acordo com diferentes pontos de corte para QNAT	63
Tabela 9. Cinética da carga viral para CMV entre os pacientes receptores de transplante cardíaco.	66
Tabela 10. Clareamento viral segundo a recorrência da infecção ativa por CMV	66

LISTA DE QUADROS

Quadros	Página
Quadro 1: Incidência de Citomegalovírus pós transplante de órgãos sólidos	24
Quadro 2: Características dos testes de detecção Agpp65 e QNAT para monitorização e diagnóstico do CMV	26
Quadro 3: Comparação das estratégias de profilaxia universal e terapia preemptiva para manejo do CMV pós transplante de órgãos sólidos	30
Quadro 4: Proposta Terapêutica da Rejeição Aguda Celular Baseada no Grau das Alterações Histológicas	39
Quadro 5: Profilaxia universal para CMV em transplantados cardíacos	40
Quadro 6: Monitorização e tratamento preemptivo para CMV em transplantados cardíacos.	40
Quadro 7: Esquema de tratamento proposto.	40
Quadro 8: Ajuste da dose de acordo com o clearance de creatinina	41
Quadro 9: Padronização dos graus de rejeição aguda em biópsia miocárdica de acordo com a ISHLT, 2004	41
Quadro 10: Definição de doença pelo CMV em receptores de transplante de órgãos sólidos	43
Quadro 11: Parâmetros do ciclo térmico para amplificação do ácido nucleico	47
Quadro 12: Interpretação dos resultados obtidos nas reações de amplificação do DNA alvo do CMV e gene da β - globina humana (controle interno)	49

SUMÁRIO

Conteúdo	Página
1. Introdução	23
1.1. Descrição do patógeno	23
1.2. Infecção por CMV pós TOS	24
1.3. Diagnóstico laboratorial	24
1.3.1. Métodos de detecção direta no compartimento sanguíneo	25
1.3.2. Diagnóstico da Doença Órgão Invasiva	27
1.3.3. Métodos de Monitorização Imunológica	27
1.4. Estratégias de prevenção	28
1.4.1. Profilaxia universal	28
1.4.2. Terapia preemptiva	28
1.4.3. Imunoglobulina anti CMV	30
1.5. Contexto brasileiro	30
2. Objetivos	32
3. Pacientes e Métodos	33
3.1. Delineamento do estudo	33
3.2. Pacientes	33
3.2.1. Critérios de seleção	33
3.2.1.1. Inclusão	33
3.2.1.2. Exclusão	33
3.3. Fonte e coleta de dados	34
3.3.1. Variáveis de interesse	34
3.3.1.1. Demográficas	34

3.3.1.2. Identificação	34
3.3.1.3. Sorológicas	34
3.3.1.3.1. Doador	34
3.3.1.3.2. Receptor	34
3.3.1.4 Doença de base	35
3.3.1.5. Presença de comorbidades	35
3.3.1.6. Dados relativos ao Transplante	35
3.3.1.7. Monitorização clínica pós-transplante	35
3.3.1.8. Monitorização laboratorial pós-transplante	35
3.3.1.9. Desfecho clínico	35
3.4 Protocolo de Imunossupressão e profilaxia de outras infecções oportunistas padronizado no Serviço de Transplante Cardíaco do HC-Unicamp	36
3.4.1. Pré operatório	36
3.4.2. Intra operatório	36
3.4.3. Primeiro pós-operatório	37
3.4.4. Segundo pós-operatório	37
3.4.5. Terceiro pós-operatório	37
3.4.6. Quarto pós-operatório	37
3.4.7. Quinto pós-operatório	37
3.4.8. Regime de manutenção	37
3.4.9. Tratamento da rejeição aguda	38
3.5 Protocolo de realização de biópsias endocárdicas padronizado no Serviço de Transplante Cardíaco do HC-Unicamp	39
3.6 Protocolo de monitorização diagnóstica e manejo terapêutico de Citomegalovírus padronizado no Serviço de Transplante Cardíaco do HC-Unicamp	39

3.7.	Manejo do CMV pós transplante cardíaco	40
3.7.1.	Tratamento da Infecção e doença ativa	40
3.8.	Definições	
3.8.1.	Rejeição aguda	41
3.8.2.	Doença ou infecção por Citomegalovírus	41
3.9.	Métodos laboratoriais	45
3.9.1.	Coleta e processamento inicial	45
3.9.2.	Antigenemia Pp65	45
3.9.3.	Reação em cadeia da polimerase quantitativa para CMV em tempo real (<i>quantitative nucleic acid amplification test</i> - QNAT)	46
3.9.3.1.	Extração do DNA total	46
3.9.3.2.	Teste de quantificação do ácido nucleico (QNAT)	47
3.9.3.2.1.	Interpretação dos resultados	48
3.9.3.2.1.1.	Análise qualitativa dos resultados	48
3.9.3.2.1.2.	Análise quantitativa dos resultados	49
3.9.4.	Análise da cinética viral no plasma	50
3.10.	Análise estatística	51
3.11.	Aspectos éticos	51
4.	Resultados	53
4.1.	Incidência da infecção pelo Citomegalovírus	53
4.2.	Desfecho clínico da infecção pelo Citomegalovírus	55
4.3.	Comparação entre o desempenho da antigenemia pp65 e o QNAT-CMV	61
4.4.	Análise da cinética viral através do QNAT-CMV	64
5.	Discussão	67
6.	Conclusões	72
7.	Perspectivas	73

8. Referências Bibliográficas	74
Apêndice 1- Formulário de seguimento dos pacientes submetidos a transplante cardíaco	88
Apêndice 2 - Resumo do trabalho apresentado no World Transplant Congress 2014	91
Apêndice 3- Manuscrito submetido para publicação em periódico científico	94
Anexo 1 – Parecer do Comitê de ética em pesquisa	112

1. Introdução

1.1. Descrição do patógeno

O Citomegalovírus (CMV) é um β herpesvírus tipo 5 de distribuição mundial. A prevalência é inversamente proporcional ao estado socioeconômico, chegando a infectar aproximadamente 100% da população adulta nos países africanos e em torno de 60-70% nos Estados Unidos (1;2). No Brasil, dados obtidos de doadores de sangue revelam prevalência em torno de 96,4%(3).

A transmissão pode ocorrer através da saliva, contato sexual, transfusão de hemoderivados, transplante de órgãos sólidos (TOS) ou de células tronco hematopoiéticas (TCTH), durante o aleitamento materno e transplacentária, sendo que a infecção primária ocorre em pacientes que não foram infectados pelo CMV previamente (4). Em indivíduos saudáveis geralmente é assintomática, no entanto, pode manifestar-se de formas variadas, como a síndrome da mononucleose-*like em* adultos jovens ou na forma de doença grave e fatal em neonatos (1;4).

Após a infecção aguda o CMV estabelece latência em células da linhagem mielóide, tecido endotelial vascular, células epiteliais renais e glândulas salivares. O mecanismo que controla a latência e a reativação viral permanece pouco conhecido, porém estados de imunossupressão como tratamento quimioterápico, síndrome da imunodeficiência humana adquirida (SIDA) e tratamento anti rejeição em receptores de TOS e TCTH estão claramente implicados (1;4).

A infecção secundária tanto pode representar a reativação em um indivíduo previamente infectado como a reinfeção por um novo subtipo viral em uma pessoa já imune (1).

1.2. Infecção por CMV pós TOS

A despeito das estratégias de prevenção utilizadas, a infecção e doença pelo CMV são uma das complicações mais comuns pós TOS e causam significativa morbidade e mortalidade (5;6).

A incidência varia de 8% a 50% (quadro 1) de acordo com o tipo de órgão transplantado, perfil sorológico pré transplante e imunossupressão (7). O risco é maior em receptores não imunes previamente (R-) que recebem órgão de um doador

positivo (D+) (*mismatch* primário), em pacientes que utilizam terapia anti-rejeição com anticorpo antilinfócito e nos transplantes combinados de rim/pâncreas e pulmão/coração (8;9).

Sem o uso de estratégias de prevenção, a infecção pelo CMV ocorre habitualmente dentro dos três primeiros meses após o transplante, porém podem ocorrer mais tardiamente em pacientes que recebem profilaxia (10;11).

Quadro 1: Incidência de Citomegalovírus pós transplante de órgãos sólidos(7)

Órgão	Infecção	Doença
Rim	8-32%	8%
Coração	9-35%	25%
Fígado	22-29%	29%
Pulmão, Pulmão/Coração	39-41%	39%
Pâncreas, Rim/Pâncreas	50%	50%

Os efeitos diretos do CMV manifestam-se com sintomas tipo *flu-like* ou doença órgão invasiva como esofagite, colite, hepatite, pneumonia, doença do sistema nervoso central, retinite, entre outras. Além disso, os efeitos indiretos que resultam da resposta imune gerada a partir da replicação viral prolongada podem levar à ocorrência de infecções superpostas, episódios de rejeição aguda e crônica (*cardiac allograft vasculopathy- CAV*) culminando com a lesão do enxerto (5;6;12;13).

1.3. Diagnóstico laboratorial

Dada a magnitude e morbidade da infecção e doença pelo CMV, a monitorização viral pós transplante visando o diagnóstico precoce da viremia e início da terapia antiviral tem sido fortemente recomendada. Além disso a detecção do vírus nos tecidos e fluidos faz se necessário em casos de suspeita de doença órgão invasiva.

Nesse contexto, os testes de detecção e quantificação da carga viral são base fundamental para o diagnóstico e manejo da infecção.

1.3.1. Métodos de detecção direta no compartimento sanguíneo

Tanto a detecção da antigenemia pp65 (Agpp65) como o teste de amplificação do ácido nucléico quantitativo (*quantitative nucleic acid amplification test*- QNAT) no compartimento sanguíneo (DNAemia) podem ser utilizados para diagnóstico da infecção/doença, monitorização da resposta ao tratamento antiviral e para prever o risco de evolução para doença (5;14).

Todavia, diretrizes clínicas mais recentes têm recomendado o uso do QNAT como método de preferência devido a maior sensibilidade diagnóstica, menor tempo de execução, realização em larga escala e pela possibilidade mais acurada de análise da cinética viral (Quadro 2) (5;14;15).

Quadro 2: Características dos testes de detecção Agpp65 e QNAT para monitorização e diagnóstico do CMV

	Agpp65	QNAT
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil padronização • Alta especificidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidade • Alta especificidade • Tempo de execução • Permite armazenamento amostra • Realizado no plasma • Teste em larga escala
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> • Amostra perecível • Tempo de execução • Técnico experiente • Microscópio para imunofluorescencia • Neutropênicos 	<ul style="list-style-type: none"> • Difícil padronização • Equipamentos alto custo • Possibilidade de contaminação

O material utilizado para detecção do CMV também tem sido alvo de discussões (16). Embora diversos estudos tenham demonstrado maior sensibilidade do sangue total (17-19), o plasma vem sendo utilizado por muitos centros para o diagnóstico laboratorial da infecção (20-23).

Lisboa et al demonstraram que a persistência da DNAemia no plasma 21 dias após tratamento foi melhor preditor de recorrência virológica quando comparado ao sangue total (24). Além disso, Babady et al ao analisarem plasma de receptores de TCTH, verificaram maior capacidade de detecção da DNAemia (25).

Assim, estudos mais recentes de determinação de ponto de corte e análise da cinética viral tem utilizado preferencialmente o plasma (21;26), porém cabe ressaltar que independentemente do método utilizado, recomenda-se a adoção do mesmo material para seguimento longitudinal do paciente (5;16).

1.3.2. Diagnóstico da Doença Órgão Invasiva

O diagnóstico da doença órgão invasiva é baseado na detecção do vírus diretamente no tecido acometido, através da visualização de inclusões virais ou detecção de antígenos pelos métodos de cultura, imunohistoquímica ou hibridização *in situ*, exceto nos casos de retinite. Como a detecção pode ser limitada ao órgão alvo, sobretudo na doença gastrointestinal, a utilização exclusiva do plasma ou sangue ou sangue não é recomendada (5;27).

Nos casos em que não é possível a realização da biópsia, o método de QNAT pode ser utilizado para a detecção do vírus em fluidos como lavado broncoalveolar ou líquido cefalorraquídeo, porém os resultados positivos podem refletir apenas excreção viral e não a infecção propriamente dita. Nessa situação o diagnóstico é feito de forma presumida, associado à apresentação clínica da doença.(27).

1.3.3. Métodos de Monitorização Imunológica

Embora seja comum o desenvolvimento de DNAemia em receptores de TOS, muitos pacientes desenvolverão apenas de forma transitória e assintomática e apresentarão resolução espontânea e sem a necessidade do tratamento antiviral (28;29).

Como a resposta das células T específicas parece ser um fator crítico para a resposta imune antiviral durante a reativação pós transplante, foram introduzidos na prática clínica testes capazes de auxiliar na monitorização do risco de cada paciente (5;29). A maior parte se baseia na detecção de IFN – γ após estímulo com antígenos ou peptídeos específicos do CMV (4). Outros marcadores como Interleucina 2 (IL 2) e fator de necrose tumoral α (TNF α) também tem sido utilizados para correlação (5).

Esses testes visam detectar pacientes que possam se beneficiar das diferentes estratégias de prevenção pós transplante através da avaliação do risco de desenvolvimento de CMV tardio, recorrência após tratamento e capacidade de clareamento viral espontâneo (30). Apesar de os dados acumulados sugerirem benefício dessa forma de monitorização, são necessários estudos robustos que comprovem a eficácia e aplicabilidade clínica desses métodos. (30).

1.4. Estratégias de prevenção

Atualmente duas estratégias de prevenção podem ser utilizadas para redução da doença e dos efeitos indiretos do CMV : profilaxia universal e terapia preemptiva, com significativa variação entre os centros (5).

1.4.1. Profilaxia universal

Define-se como profilaxia universal a utilização do antiviral pós-transplante independentemente da detecção de Agpp65 ou QNAT. Esta abordagem suprime a replicação viral e é indicada para pacientes com alto risco de desenvolvimento da doença, como *mismatch* primário (D+/R-), receptores de transplante de pulmão, coração e pulmão/coração (5;15;31). Fatores logísticos como dificuldade de acesso ao serviço de saúde e recursos laboratoriais podem influenciar a escolha da estratégia adequada para cada paciente.

Neste caso os pacientes recebem o antiviral por um período de 3 a 6 meses pós transplante e não necessitam de monitorização laboratorial periódica (9;32). Apesar de muitos antivirais já terem sido utilizados, atualmente o ganciclovir intravenoso ou o valganciclovir oral são as drogas de escolha (5;14;15).

Entre as principais desvantagens desse esquema podemos citar o custo da droga, possível toxicidade, ocorrência de CMV tardio após a suspensão do antiviral e possibilidade de desenvolvimento de resistência viral (quadro 3) (5;32).

Entretanto, o estudo IMPACT, ao comparar a eficácia da profilaxia com valganciclovir por 200 versus 100 dias em receptores de transplante renal (D+/R-), demonstrou que o maior tempo de profilaxia antiviral reduziu significativamente a incidência de DNAemia e doença pelo CMV, com similar tolerabilidade e segurança (9).

1.4.2. Terapia preemptiva

A terapia preemptiva (TP) baseia-se na monitorização sistemática da replicação viral e instituição do tratamento antes do desenvolvimento de sinais ou sintomas da doença ativa, ou seja, assim que detectado o limiar de DNAemia no qual o risco de evolução supere os possíveis efeitos adversos da terapia antiviral.

Deve ser utilizada em pacientes com risco baixo a intermediário para o desenvolvimento do CMV. Possui boa eficácia e tem como principal vantagem evitar a toxicidade e custo do uso prolongado do antiviral, minimizar a ocorrência de CMV tardio e resistência viral (quadro 3) (33-36). Entretanto para o seu sucesso é necessária correta adesão do paciente às coletas periódicas, laboratório especializado e logística para instituição do tratamento em tempo hábil.

Devido as diferenças interlaboratoriais, atualmente não existe um ponto de corte estabelecido para o início da TP, seja o método utilizado a Agpp65 ou o QNAT. As recomendações atuais sugerem que esse valor seja determinado localmente, baseado nas características da população estudada como o estado sorológico pós transplante, o tipo de órgão transplantado, a imunossupressão utilizada e a metodologia laboratorial (5;14;15;32).

De forma geral, recomenda-se a determinação de um limiar mais baixo para grupos com maiores riscos, sendo que alguns autores preconizam o início da TP com qualquer valor detectado de DNAemia (10;37).

Maior concordância entre os diferentes centros deve ser obtida devido ao lançamento do padrão de calibração internacional pela OMS em 2010 para os testes de QNAT, sendo que todos os kits comerciais e testes desenvolvidos *in-house* devem ser recalibrados (38;39). Estudo recente tem mostrado boa correlação entre os testes realizados em diferentes laboratórios utilizando essa metodologia (40;41).

Estratégia híbrida com realização da profilaxia universal e monitorização sistemática após sua suspensão tem sido utilizada por alguns centros (29).

Quadro 3: Comparação das estratégias de profilaxia universal e terapia preemptiva para manejo do CMV pós transplante de órgãos sólidos (5).

	Profilaxia Universal	Terapia Preemptiva
DNAemia precoce	Raro	Comum
Prevenção CMV doença	Boa eficácia	Boa eficácia (Exceto população alto risco)
CMV tardio	Comum	Raro
Resistência	Pouco comum	Pouco comum
Implementação	Relativamente fácil	Mais trabalhosa
Outros herpes vírus	Previne	Não previne
Infecções oportunistas	Pode prevenir	Desconhecido
Custos	Droga	Monitoramento
Segurança	Toxicidade droga	Menor risco toxicidade
Rejeição	Pode prevenir	Desconhecido

1.4.3. Imunoglobulina anti CMV

Dados sobre a utilização da imunoglobulina anti CMV (CMVlg) para profilaxia são limitados, principalmente quando realizada a terapia antiviral adequada, porém meta análise realizada por Bonaros et al em receptores de TOS, revelou que pacientes que receberam CMVlg apresentaram maior sobrevida e menor mortalidade associada ao CMV. Nesse grupo a incidência de doença também foi significativamente reduzida, entretanto episódios de infecção e rejeição não foram influenciados (42).

1.5. Contexto brasileiro

Apesar do número crescente de transplantes de órgãos sólidos no Brasil (43), não existem diretrizes clínicas universalmente padronizadas, para a nossa população, sendo que os centros transplantadores utilizam diferentes estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento para manejo do CMV, baseadas principalmente na literatura internacional (44-47).

Devido à alta prevalência da infecção entre doadores e receptores de TOS, a terapia preemptiva constitui-se em opção viável de monitorização do CMV em nosso meio, o que torna imprescindível a determinação de um ponto de corte para início da terapia antiviral que seja definido localmente e considere fatores clínicos, laboratoriais e características específicas dos receptores.

Assim, esse estudo se propõe a determinar um ponto de corte da carga viral de citomegalovírus para início de terapia preemptiva baseado na correlação com a antigenemia pp65, cinética viral e desfecho clínico entre receptores de transplante cardíaco em cenário de alta prevalência.

2. Objetivos

Objetivo geral

- Definir o limiar de positividade (ponto de corte) da carga viral quantitativa do citomegalovírus para detecção de infecção ativa e início de terapia preemptiva baseado na correlação com a antigenemia pp65, cinética viral e desfecho clínico em receptores de transplante cardíaco.

Objetivos específicos

Entre receptores de transplante cardíaco:

- Avaliar a incidência de infecção ativa e/ou doença por citomegalovírus baseada nos parâmetros da antigenemia pp65.
- Comparar o desempenho da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa e a antigenemia pp65 no diagnóstico de infecção ativa e/ou doença por citomegalovírus
- Avaliar a cinética viral através da mensuração prospectiva da carga viral através da reação em cadeia da polimerase em tempo real;
- Avaliar o desfecho clínico até 15 meses pós transplante.

3. Pacientes e Métodos

3.1. Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo de coorte prospectivo, descritivo, não randomizado, envolvendo pacientes receptores de transplante cardíaco (RTC) no Hospital de Clínicas (HC) da Unicamp no período de dezembro de 2011 a dezembro de 2013.

3.2. Pacientes

3.2.2. Critérios de seleção

3.2.1.1. Inclusão

- Todos os pacientes submetidos a transplante cardíaco no HC UNICAMP no período de dezembro de 2011 a dezembro de 2013.
- Idade maior ou igual a 18 anos.

3.2.1.2. Exclusão

- Óbito antes do sétimo dia pós transplante.

3.3. Fonte e coleta de dados

Foi estruturado um formulário para coleta das variáveis de interesse (Apêndice1). Os dados foram obtidos pelo próprio pesquisador através das seguintes fontes:

- Avaliação durante as consultas de seguimento, internação hospitalar ou com maior frequência se necessário.
- Prontuário médico do HC-Unicamp.
- Arquivo de registro da captação do Serviço de Procura de Órgãos e Tecidos (SPOT).
- Arquivo de dados do Programa de Transplante Cardíaco.

3.3.1. Variáveis de interesse

3.3.1.1. Demográficas:

- Doador: Idade, data de nascimento e sexo.
- Receptor: Idade, data de nascimento e sexo.

3.3.1.2. Identificação:

- Iniciais do nome e número do registro hospitalar.

3.3.1.3. Sorológicas:**3.3.1.3.1. Doador:**

- Sorologia CMV (IgM e IgG).
- Sorologia Toxoplasmose (IgM e IgG).
- Sorologia Epstein-Barr Vírus (IgM e IgG).
- Sorologia para Doença de Chagas.
- Anti HIV.
- Anti HCV.
- Hbsag.
- VDRL.

3.3.1.3.2. Receptor

- Sorologia CMV (IgM e IgG).
- Sorologia Toxoplasmose (IgM e IgG).
- Sorologia Epstein-Bar Vírus (IgM e IgG).
- Sorologia para Doença de Chagas.
- Anti HIV.

- Anti HCV.
- HbsAg.
- VDRL.

3.3.1.4. Doença de base

3.3.1.5. Presença de comorbidades

- Hipertensão arterial e Diabetes mellitus.

3.3.1.6. Dados relativos ao Transplante

- Data transplante.
- Tempo de isquemia.
- Esquema imunossupressor utilizado.

3.3.1.7. Monitorização clínica pós-transplante

- Avaliação clínica mensal ou mais frequente conforme indicação clínica.

3.3.1.8. Monitorização laboratorial pós-transplante

- Antigenemia pp65 e QNAT semanalmente até 180 dias pós transplante ou a qualquer momento se suspeita clínica.

3.3.1.9. Desfecho clínico

- Infecção ativa ou doença por CMV.
- Tratamento antiviral.
- Duração tratamento antiviral.

- Desfecho episódio Infecção ativa ou doença por CMV: Cura, óbito ou recorrência.
- Rejeição.
- Tratamento anti-rejeição
- Outras infecções
- Causa e data do óbito.

3.4. Protocolo de Imunossupressão e profilaxia de outras infecções oportunistas padronizado no Serviço de Transplante Cardíaco do HC-Unicamp (48).

3.4.2. Pré-operatório

- Tratamento profilático para estrogiloidíase com Tiabendazol (25 mg/kg) por 3 dias.
- Pacientes chagásicos: Introduzir alopurinol 300 mg 8/8h indefinidamente.
- Micofenolato (MMF) 720 mg 12/12h quando comunicado a cirurgia.

3.4.2. Intra operatório

- Metilprednisolona 500 mg EV ao despinçamento da aorta.

3.4.3. Primeiro pós-operatório

- Avaliar a necessidade de profilaxia contra toxoplasmose com Sulfametoxazol-trimetopim 400/80 mg 12/12h por 3 meses (doadores com IgG positivo e receptores com IgG negativo para *Toxoplasma gondii*).
- Profilaxia *Pneumocystis jirovecii*: sulfametoxazol-trimetoprim 400/80 mg 12/12h por 3 meses.

- Tiabendazol (25 mg/kg) D2.
- Nistatina 4 mL VO 6/6h por 30 dias.
- Metiprednisolona 250 mg EV 6/6h (D1).
- MMF 720 mg 12/12h.

3.4.4. Segundo pós-operatório

- Tiabendazol (25 mg/kg) D3.
- Metiprednisolona 250 mg EV 6/6h (D2).
- MMF 720 mg 12/12h.

3.4.5. Terceiro pós-operatório

- Metiprednisolona 250 mg EV 6/6h (D3).
- MMF 720 mg 12/12h.
- Ciclosporina (Cya) 5 mg/kg/dia VO em duas tomadas.

3.4.6. Quarto pós-operatório

- MMF 720 mg 12/12h.
- Cya 5 mg/kg/dia VO em duas tomadas
- Prednisona 1 mg/kg/dia.

3.4.7. Quinto pós-operatório

- MMF 720 mg 12/12h.

- Cya: Manter nível sérico de 350-450 ng/mL até 3 meses pós transplante. Após 3 meses 250-350 ng/mL.
- Prednisona: Reduzir a dose 2,5 mg por dia até dose de 0,2 mg/kg/dia.

3.4.8. Regime de manutenção

O regime de manutenção foi inicialmente constituído pelo esquema tríplice MMF (360 a 1080 mg 12/12h), Cya (nível sérico de 350-450 ng/mL até 3 meses pós transplante e entre 250-350 ng/mL após) e prednisona (1 mg/kg/dia).

Quando houve a reativação da Doença de Chagas o MMF foi substituído pela azatioprina (AZA). Em casos de rejeição de difícil controle ou deterioração da função renal, o Sirolimus foi utilizado.

3.4.9. Tratamento da rejeição aguda

O Tratamento das rejeições agudas foi realizado com base nas recomendações da II Diretriz Brasileira de Transplante Cardíaco (Quadro 4).

Quadro 4: Proposta Terapêutica da Rejeição Aguda Celular Baseada no Grau das Alterações Histológicas (49).

Biópsia ISHLT 2005	Disfunção Ventricular	
	Ausente	Presente
1R	Sem tratamento adicional. Rever esquema imunossupressor.	Pesquisar rejeição humoral e doença vascular do enxerto.
2R	PO recente: Metilprednisolona 0,5 – 1,0 g IV por 3-5 dias. PO tardio: Prednisona 1 mg/kg/dia VO por 3-5 dias.	PO recente: Metilprednisolona 0,5 – 1,0 g IV por 3-5 dias. + ATS 1,5 mg/kg/d por 5-7 dias. (Pesquisar rejeição humoral)
3R	PO recente: Metilprednisolona 0,5 – 1,0 g IV por 3-5 dias. + ATS 1,5 mg/kg/d por 5-7 dias.	PO recente: Metilprednisolona 0,5 – 1,0 g IV por 3-5 dias. + ATS 1,5 mg/kg/d por 5-7 dias. (Pesquisar rejeição humoral)

PO: Pós-operatório; ATS: timoglobulina.

3.5. Protocolo da periodicidade de realização de biópsias endocárdicas padronizado no Serviço de Transplante Cardíaco do HC-Unicamp (48)

As biópsias endocárdicas foram realizadas sempre que possível sete dias após a realização do transplante e depois na seguinte periodicidade: Semanalmente no primeiro mês; quinzenalmente no segundo mês e mensalmente até um ano pós transplante (48).

3.6. Protocolo de monitorização diagnóstica e manejo terapêutico de Citomegalovírus padronizado no Serviço de Transplante Cardíaco do HC-Unicamp

- Monitorização semanal com Aggp65 a partir da segunda semana até 180 dias pós Transplante.

- Para o manejo e tomada de decisões clínicas foram utilizados os resultados da detecção do Agpp65 (método padronizado na instituição).
- Não foi realizado imunoglobulina para prevenção de CMV.

3.7. Manejo do CMV pós transplante cardíaco

Quadro 5: Profilaxia universal para CMV em transplantados cardíacos.

Estado sorológico CMV	Rotina HC-Unicamp
D+/R-	Ganciclovir 5 mg/kg IV a cada 24 h por 21 dias; seguida de monitorização semanal de antigenemia até o 6º mês pós-transplante.

Quadro 6: Monitorização e tratamento preemptivo para CMV em transplantados cardíacos.

Estado sorológico	Periodicidade	Limiar de positividade Agpp65 para início tratamento*
D+/R+	Semanal (6 meses pós transplante)	≥ 5
D-/R+	Semanal (6 meses pós transplante)	≥ 5
D+/R-	Semanal após a suspensão da profilaxia universal até 6 meses pós transplante	≥ 2
D-/R-	Agpp65 se manifestação clínica (síndrome febril, doença órgão invasiva ou rejeição)	

*células/100.000 leucócitos

3.7.1. Tratamento da Infecção e doença ativa

Quadro 7: Esquema de tratamento proposto.

Fármaco	Posologia	Duração
Ganciclovir	5 mg/kg de 12 em 12 horas	Mínimo de 21 dias e antigenemia negativa por 2 semanas consecutivas

Quadro 8: Ajuste da dose de acordo com o clearance de creatinina*.

Dose ganciclovir	CICr > 90 ml/min	CICr >50-90	CICr 10-50	CICr <10	Hemodiálise
	5 mg/kg IV q12h	5 mg/kg IV q 12h	1.25-2.5 mg/kg IV q 24h	1.25 mg/kg 3x semana	1.25 mg/kg 3x semana + dose AD

* calculado de acordo com a fórmula de Cockcroft-Gault

3.8. Definições

3.8.1. Rejeição aguda

Foi definida de acordo com a padronização da International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT), 2004 (Quadro 9).

Quadro 9: Padronização dos graus de rejeição aguda em biópsia miocárdica de acordo com a ISHLT, 2004 (50).

Graus	Achados histológicos
0 R*	Ausência rejeição
1R, leve	Infiltrado intersticial e/ou perivascular com até 1 foco de dano aos miócitos
2R, moderado	Dois ou mais focos de infiltrado associado a dano aos miócitos.
3R, grave	Infiltrado difuso multifocal com dano aos miócitos ± edema ± hemorragia ± vasculite

* "R" denota revisado, para diferenciar da classificação de 1990.

3.8.2. Doença ou infecção por Citomegalovírus

Foi realizada de acordo com a padronização da American Society of Transplantation (AST), 2006(27).

- Infecção ativa pelo CMV: Infecção diagnosticada pela detecção do vírus *in vitro*, através de detecção da inclusão viral intra-citoplasmática ou intra-nuclear, colorações baseadas em anticorpos em materiais histopatológicos ou achados que evidenciem replicação viral como QNAT ou Agpp65.

- CMV doença: É definida pela evidência de infecção pelo CMV com sintomas atribuídos. Pode ser subclassificada em síndrome viral pelo CMV ou doença órgão invasiva. As definições propostas estão listadas no quadro 10

Quadro 10: Definição de doença pelo CMV em receptores de transplante de órgãos sólidos(27).

Tipo de doença	Provável	Definida
Síndrome viral pelo CMV	<p>Um ou mais dos seguintes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Febre > 38° por pelo menos 2 dias 2. Início ou aumento de mal-estar 3. Leucopenia 4. ≥ 5% linfócitos atípicos 5. Plaquetopenia 6. Elevação de transaminases >2 vezes o limite superior da normalidade <p>Mais</p> <p>Evidência de infecção pelo CMV in vitro no sangue por antigenemia ou QNAT</p>	<p>Sinais clínicos e laboratoriais como no “provável” sem outras causas identificáveis</p>
Pneumonia	<p>Sinais e/ou sintomas de doença pulmonar sem outras causas identificáveis</p> <p>Mais</p> <p>Evidência de infecção pelo CMV no sangue ou lavado broncoalveolar por antigenemia QNAT ou cultura viral</p>	<p>Sinais e/ou sintomas de doença pulmonar</p> <p>Mais</p> <p>Detecção do CMV em tecido pulmonar por cultura, imunohistoquímica ou hibridização <i>in situ</i></p>

Tipo de doença	Provável	Definida
Doença Gastrointestinal	<p>Sintomas gastrointestinais alto ou baixo</p> <p>Mais</p> <p>Lesões mucosas macroscópicas na endoscopia</p> <p>Mais</p> <p>Evidência de CMV no sangue ou biópsia tecidual por antígenemia, QNAT ou cultura viral</p>	<p>Sinais / sintomas gastrointestinais altos ou baixo</p> <p>Mais</p> <p>Detecção do CMV em tecido gastrointestinal por cultura, imunohistoquímica ou hibridização <i>in situ</i></p>
Hepatite	<p>Elevação da bilirrubina e/ou enzimas hepáticas sem outras causas documentadas de hepatite</p> <p>Mais</p> <p>Evidência de CMV no sangue por antígenemia ou QNAT</p>	<p>Elevação da bilirrubina e/ou enzimas hepáticas sem outras causas documentadas de hepatite</p> <p>Mais</p> <p>Detecção do CMV em tecido hepático por cultura, imunohistoquímica ou hibridização <i>in situ</i></p>
Doença do sistema nervoso central (SNC)	<p>Sintomas neurológicos centrais sem outras causas documentadas</p> <p>Mais</p> <p>Evidência de CMV no líquido cefalorraquideo por QNAT ou cultura viral</p>	<p>Sintomas neurológicos centrais</p> <p>Mais</p> <p>Detecção do CMV em tecido de SNC por cultura, imunohistoquímica ou hibridização <i>in situ</i></p>
Retinite	N/A	Lesões típicas de retinite confirmadas por oftalmologista

Tipo de doença	Provável	Definida
Outras doenças órgão invasivas (nefrite, cistite, miocardite, pancreatite e outras)	Evidência de disfunção do órgão afetado sem outra causa identificável* Mais Evidência de CMV no sangue por antígenemia ou QNAT ou cultura viral	Sinais / sintomas de disfunção orgânica Mais Detecção do CMV no tecido afetado por cultura, imunohistoquímica ou hibridização <i>in situ</i>

*Se o órgão afetado for o enxerto, descartar rejeição aguda.

N/A, não se aplica.

3.9. Métodos laboratoriais

3.9.1. Coleta e processamento inicial

Todas as análises laboratoriais foram realizadas no laboratório de vírus da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. Agpp65 e QNAT foram analisados concomitantemente através da utilização de kits comerciais.

As coletas foram realizadas no posto de coleta do laboratório de patologia clínica, no Hospital –Dia do HC-Unicamp ou nas unidades de internação quando necessário. Foram realizadas em tubo com EDTA com a obtenção do volume final de 5ml de sangue total.

Os espécimes foram encaminhados ao laboratório de vírus da faculdade de Ciências Médicas da Unicamp para processamento até 6 horas após a coleta. No laboratório foram submetidos a centrifugação em 3000 rpm por 5 minutos para a separação do plasma, sendo que do volume obtido foram utilizados:

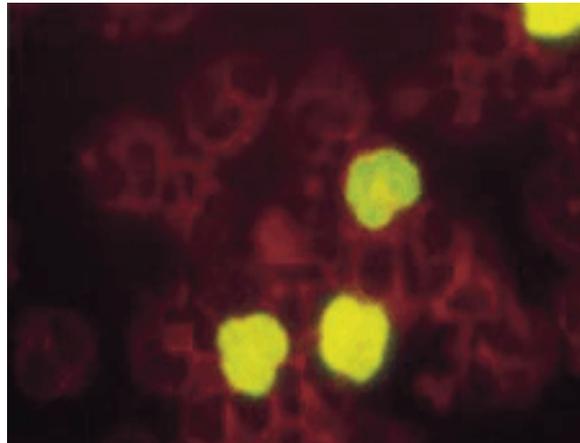
- Dois mililitros para realização da antígenemia pp65 (Agpp65).
- Um mililitro submetido a extração do DNA para a realização da quantificação do ácido nucleico (QNAT).

3.9.2. Antígenemia pp65

Foi utilizado o KIT CMV Brite Turbo® [(IQ Products) BV, Groningen, The Netherlands] que realiza a pesquisa direta em neutrófilos do Agpp65 através de

anticorpos monoclonais marcados com fluoresceína (figura 1), de acordo com protocolo do fabricante (51).

A leitura dos testes foi realizada através da microscopia de fluorescência por pessoal capacitado para a rotina do laboratório de vírus do HC Unicamp.



Fonte: Kit CMV Brite® turbo

Figura 1: Microscopia de fluorescência: Neutrófilos marcados com fluoresceína (antigenemia pp65 positiva).

O resultado final foi expresso em:

$$\frac{\textit{número de células positivas}}{100.000 \textit{ leucócitos}}$$

3.9.3. Reação em cadeia da polimerase quantitativa para CMV em tempo real (*quantitative nucleic acid amplification test- QNAT*)

3.9.3.1. Extração do DNA total

A amostra de plasma aliquoteada foi submetida a extração de material genético com a utilização do KIT QIAMP MINIKIT QIAGEN ® conforme orientações do fabricante (52).

O produto final da extração foi eluído em 50 µL de água destilada livre de DNA e estocada em tubos eppendorf em freezer com temperatura de -80°C até a realização da QNAT.

3.9.3.2. Teste de quantificação do ácido nucleico (QNAT)

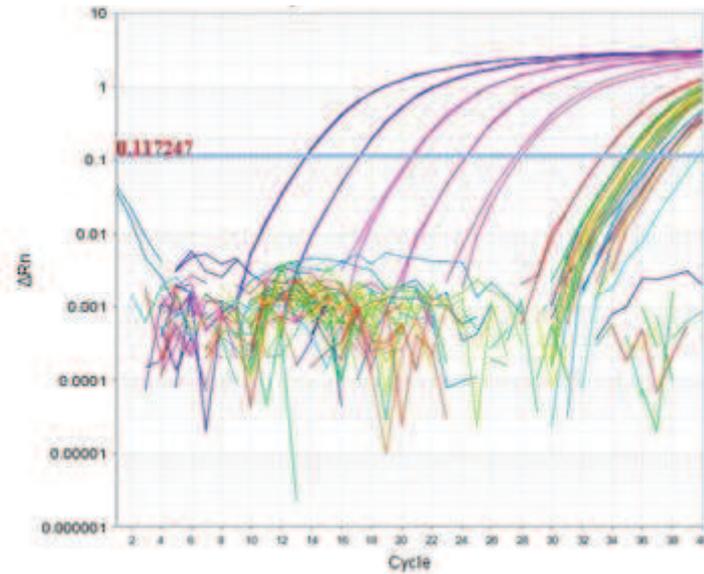
Para a realização do teste de quantificação do ácido nucleico foi utilizado o Kit Q-CMV-Real Time Complete Kit[®] (Nanogen Advanced Diagnostics S.p.A, Buttigliera Alta, Italy) que realiza a detecção e quantificação do CMV através da amplificação do DNA alvo (UL 123) em tempo real e sistema óptico de detecção fluorescente e está apto para quantificar entre 1.000.000 a aproximadamente 20 cópias de DNA alvo por reação de amplificação. Para cada reação foi realizado o controle de inibição interno através da amplificação do gene da β -globulina humana.

Os testes foram realizados de acordo com a instrução do fabricante, com a utilização do termociclador Thermal cycler STEP ONE[®] (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) com parâmetros do ciclo térmico conforme o quadro 11.

Quadro 11: Parâmetros do ciclo térmico para amplificação do ácido nucleico.

Fase	Temperaturas	Tempos
Descontaminação	50°C	2 min
Desnaturação inicial	95°C	10 min
45 ciclos	95°C	15 seg
	60°C	1 min

A amplificação das amostras em estudo foi obtida em tempo real, em cada ciclo térmico da reação e demonstrada graficamente conforme a figura 2.



Fonte: Laboratório de Vírus HC Unicamp

Figura 2: Representação gráfica das curvas de amplificação das reações para detecção do DNA alvo do CMV nas amostras estudadas.

3.9.3.2.1. Interpretação dos resultados

3.9.3.2.1.1. Análise qualitativa dos resultados

Os valores registrados de fluorescência emitidos pela sonda específica para CMV e pela sonda específica do Controle Interno nas reações de amplificação foram analisados por software apropriado e permitiram detectar o ciclo em que a fluorescência atingiu o valor de limiar para detecção (Ct).

Os resultados das reações de amplificação de cada amostra são usados para a detecção de CMV, conforme quadro 12.

Quadro 12: Interpretação dos resultados obtidos nas reações de amplificação do DNA alvo do CMV e gene da β - globina humana (controle interno).

Ct da amostra		Adequação da amostra	Resultado do teste	DNA CMV
CMV (FAM)	Controle Interno(VIC)			
Indeterminado	Ct>35 ou indeterminado	Não adequada	Não válido	-
	Ct≤35	adequada	válido, negativo	NÃO DETECTADO
Determinado	Ct>35 ou indeterminado	adequada	válido, positivo	DETECTADO
	Ct≤35	adequada	válido, positivo	DETECTADO

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra é Ct indeterminado para o DNA do gene do CMV e Ct ≤35 ou indeterminado para a sonda específica do controle interno, não foi possível detectar de modo eficiente o DNA do controle interno. Neste caso, problemas ocorreram na fase de amplificação (amplificação não eficiente ou nula) ou na fase de extração (ausência de DNA ou presença de inibidores) que podem ter levado a resultados incorretos e falsos negativos. A amostra não foi adequada, o teste não foi válido e foi repetido a partir da extração de uma nova amostra.

Quando na reação de amplificação relativa a uma amostra foi detectada a presença de DNA de CMV, a amplificação do controle interno pode ter um Ct >35 ou indeterminado. Segundo o fabricante, a baixa eficiência na reação de amplificação para o controle interno pode ser deslocada pela competição com a alta eficiência da reação para o CMV. Neste caso a amostra foi considerada adequada e o resultado positivo do teste válido.

3.9.3.2.1.2. Análise quantitativa dos resultados

Depois de realizar o procedimento para análise qualitativa dos resultados foi realizada a análise quantitativa das amostras positivas.

Os valores de Ct para sondas específicas para CMV nas reações de amplificação de cada amostra e a curva padrão para a sessão de amplificação foram

usados para calcular a quantidade (Quantity) do DNA alvo presente nas reações de amplificação das amostras.

Os resultados (Quantity) de cada amostra foram usados para calcular o genoma Equivalente de CMV presente na amostra extraída de acordo com a fórmula (10;26;53):

$$Q_{CMV \text{ extração}} = \frac{V_e}{V_c \times V_a \times E_e} \times 1000$$

V_e = volume total produto extração

V_c = Quantidade amostra utilizada na extração

V_a = Volume produto extração utilizado na amplificação

E_e = Eficiência Kit extração

Os resultados foram então convertidos para a unidade cópias/ml de acordo com a fórmula (54) :

$$\frac{\text{Cópias}}{\text{ml}} = Q_{CMV \text{ extração}} \times \text{Quantity}$$

De acordo com informações do fabricante, foi possível realizar a transformação do valor em cópias/ml em UI/ml, através da multiplicação pelo fator de correção 0.5649.

3.9.4. Análise da cinética viral no plasma

O tempo de duplicação viral (*doubling time* -dt) no plasma, foi calculado antes do início do tratamento e com a utilização das duas primeiras cargas virais positivas para o cálculo, através de função exponencial descrita previamente (10;26;53).

Inicialmente a taxa de replicação foi determinada baseada na variação da carga viral ao longo do tempo, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Taxa de replicação viral} = \frac{\ln q2 - \ln q1}{\text{tempo } (t2 - t1)}$$

Sendo $q1$ e $t1$ a carga viral (cópias/ml) no tempo (em dias) da primeira QNAT positiva, e $q2$ e $t2$ a carga viral no momento da segunda QNAT positiva.

Em seguida, o dt foi calculado conforme a seguinte equação:

$$dt = \frac{\ln 2}{\text{taxa de replicação viral}}$$

Essa fórmula assume uma taxa de crescimento constante, que ocorre na fase precoce de replicação viral.

3.10. Análise estatística

Para a comparação entre as variáveis qualitativas nominais ou ordinais foram utilizados os testes de *qui-quadrado* ou teste *exato de Fisher* e para variáveis quantitativas discretas ou contínuas, o teste *t de Student*. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

A concordância entre os testes de Agpp65 e QNAT foi avaliada pelo coeficiente kappa (k).

O desempenho do teste e a definição dos valores de ponto de corte da carga viral foi realizada após a análise da curva *Receiver operating characteristic* (ROC), sendo considerados positivo valores de $\text{Agpp65} \geq 5$ células/100.000 leucócitos.

As análises foram realizados com os programa Epi Info™ (versão 7, Atlanta, Georgia, US) e através do site OpenEpi- Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health (versão 3.03, 2014)(55).

3.11. Aspectos éticos

O projeto foi submetido a análise e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (parecer n° 1241/2011) sob o título “Impacto Clínico de Mutações de Resistência nos genél UL 97 do Citomegalovírus

Humano (HCMV) em pacientes transplantados de órgãos sólidos (SOTR) ou de células tronco hematopoiéticas (HSCT) ” (Anexo 1). Conforme solicitação o pesquisador foi liberado da obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O presente trabalho refere-se à primeira etapa do projeto supracitado e não foram solicitados espécimes clínicos adicionais, além dos já coletados conforme protocolo assistencial de manejo diagnóstico, terapêutico e profilático de infecção por citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante cardíaco.

4. RESULTADOS

4.1. Incidência da infecção pelo Citomegalovírus

Durante o período do estudo, 27 pacientes foram submetidos a transplante cardíaco, sendo que dois casos foram excluídos por óbito precoce (antes do sétimo dia pós transplante). Assim, 25 pacientes foram considerados elegíveis para o estudo e 329 amostras de plasma foram obtidas (figura 3).

Entre os RTC avaliados, 17 (68%) eram do gênero masculino e a mediana de idade foi de 51 anos (32-64). As causas mais frequentes de transplante cardíaco foram as cardiomiopatias dilatada idiopática e chagásica. A sorologia IgG CMV pré-transplante foi reagente em todos os receptores (R+) e em 15 (75%) de 20 doadores, para os quais o dado estava disponível (D+). Terapia imunossupressora padrão (CyA, MMF e PDN) foi utilizada inicialmente em todos os RTC, sendo que na evolução dois pacientes necessitaram de troca do MMF por AZA devido a reativação da doença de chagas e um deles por sirolimus subsequentemente (tabela 1).

Entre os 25 pacientes incluídos no estudo, 15 (60%) apresentaram CMV ativo: 11 (73,3%) infecção ativa e quatro (26,7%) doença pelo CMV; dois classificados como síndrome viral e dois como doença órgão invasiva (figura 3).

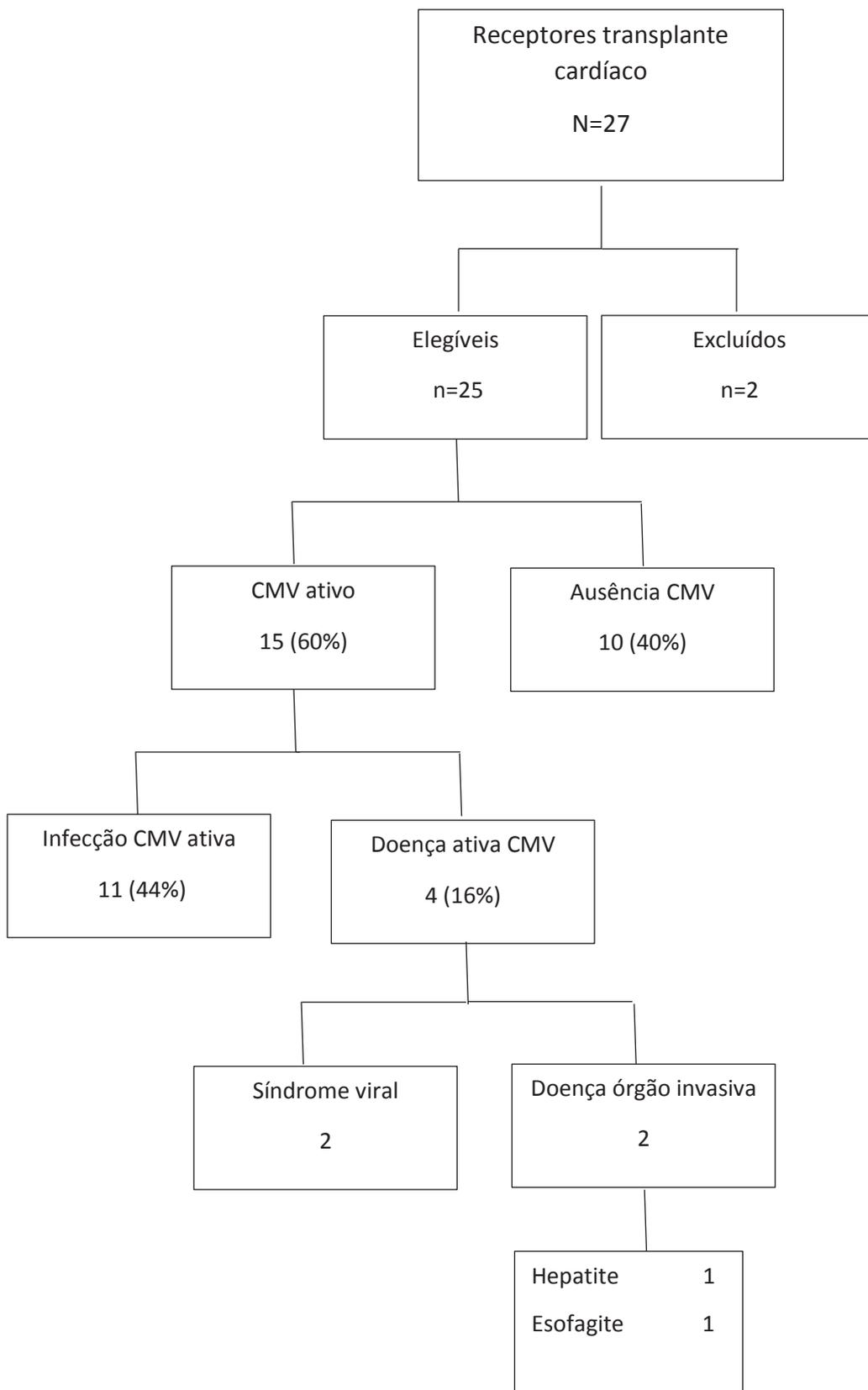


Figura 3: Distribuição da população do estudo segundo os critérios de inclusão e desenvolvimento de infecção ativa e/ou doença pelo CMV pós transplante.

4.2. Desfecho clínico da infecção pelo Citomegalovírus

No que diz respeito aos fatores para a ocorrência da infecção ativa pelo CMV, em nossa coorte não foram identificados fatores de risco estatisticamente significantes entre os grupos com e sem doença ativa (Tabelas 1 e 2). Destaca-se que cinco (20%) pacientes receberam pulsoterapia com metilprednisolona, sendo que três (12%) apresentaram infecção pelo CMV após uma mediana de tempo de cinco semanas. Uma vez que todos os receptores possuíam imunidade prévia contra o CMV (R+), o estado sorológico do doador (D+) também não foi associado ao maior risco de infecção ativa por CMV ($p=0,612$) nessa população.

Dentre os 15 pacientes com CMV ativo, todos evoluíram para a cura após o tratamento antiviral com ganciclovir intravenoso por 21 dias. Não houve necessidade de interrupção ou troca da medicação por toxicidade ou suspeita de falha terapêutica. A duração foi baseada nos resultados da Agpp65 colhida semanalmente após o início da terapia antiviral (tabela 3). Episódios de recorrência foram observados em seis (40%) pacientes, cinco dos quais dentro dos primeiros 180 dias pós transplante (tabela 4).

Em relação ao desfecho clínico final 15 meses após o transplante não foi observado nenhum óbito entre o grupo com CMV e houve tendência de associação entre a ocorrência de infecções associadas e CMV ativo ($p= 0,061$). Entretanto, a incidência de rejeição aguda não foi diferente para os dois grupos e a vasculopatia do enxerto não foi detectada nesse estudo (tabela 5).

Tabela 1: Distribuição dos pacientes submetidos a transplante cardíaco de acordo com a ocorrência de citomegalovírus ativo e as características demográficas.

	Grupo		Grupo sem		Valor de P	OR	IC95%
	CMV		CMV				
	N	%	N	%			
Pacientes	15	60	10	40	---	---	---
Dados receptores							
Mediana idade anos	51		50,5		0,390	---	-10,65, 4,31
(mín-máx)	(32-63)		(39-64)				
Gênero masculino	9	60	8	80	0,400	0,390	0,03, 3,07
Dados doadores							
Mediana idade anos	29		23,5		0,401	---	-4,26, 10,26
(mín-máx)	(17-45)		(17-40)				
Gênero masculino	14	93	7	70	0,267	5,560	0,37, 336,90

OR, odds ratio.

Tabela 2: Distribuição dos pacientes submetidos a transplante cardíaco de acordo com as características clínicas e sorológicas.

	Grupo CMV		Grupo sem CMV		Valor de P	OR	IC95%
	N	%	N	%			
Cardiomiopatia							
Idiopática	6	40	3	30	0,939	1,530	0,22, 12,95
Chagásica	3	20	3	30	0,911	0,596	0,06, 5,73
Valvular	2	13	2	20	>0,999	0,628	0,04, 10,28
Isquêmica	2	13	---	--	0,700	Indefinido	0,12, indefinido
Outras*	2	13	2	20	>0,999	0,628	0,04, 10,28
CMV IgG							
D-/R+	3	20	2	20	>0,999	1	0,09, 14,54
D+/R+	11	73	4	40	0,212	3,875	0,57, 31,58
D (ig) / R+	1	7	4	40	0,128	0,118	0,00, 1,51
Imunossupressão							
Básico: CyA+MMF+PDN	15	100	10	100	---	---	---
Substituição:							
CyA+AZA+ PDN [‡]	2	13	---	---	---	---	---
Inibidores da mTOR (sirolimus) [§]	1	7	---	---	---	---	---

¹ Cardiomiopatia congênita, viral, familiar e puerperal. [‡] Dois pacientes mudaram para azatioprina devido a reativação da Doença de Chagas. [§] Um paciente mudou para sirolimus devido a insuficiência renal. Ig, ignorado; OR, odds ratio; CyA, ciclosporina; MMF, micofenolato mofetil; AZA, azatioprina; PDN, prednisona

Tabela 3: Pacientes com infecção ativa pelo CMV segundo a monitorização da antigenemia pp65 e o QNAT-CMV pré e pós início do tratamento antiviral.

Identificação		Pré tratamento antiviral		Pós início tratamento antiviral		
		Semana 1	Semana 2	D+7	D+14	D+21
4	Agpp65*	ND	11	ND	0	0
	QNAT (UI/ml)	ND	17412	ND	266	134
	Log 10 (UI/ml)	ND	4.2	ND	2.4	2.1
9	Agpp65	ND	17	0	0	0
	QNAT	ND	3019	37	0	31
	Log 10	ND	3.5	1.6	-	1.5
11	Agpp65	6	15	8	0	0
	QNAT	95	784	110	25	0
	Log 10	2.0	2.9	2.0	1.4	-
14‡	Agpp65	5	16	0	0	0
	QNAT	3279	1107	48	0	0
	Log 10	3.5	3.0	1.7	-	-
15‡ [§]	Agpp65	5	75	245	80	6
	QNAT	527	2355	4477	7829	376
	Log 10	2.7	3.4	3.7	3.9	2.6
17	Agpp65	36	11	3	0	1
	QNAT	18672	10179	5588	34	14
	Log 10	4.3	4.0	3.7	1.5	1.1
19	Agpp65	32	25	0	0	1
	QNAT	749	1499	228	0	0
	Log 10	2.9	3.2	2.4	-	-

Continuação Tabela 3

Identificação		Pré tratamento antiviral		Pós início tratamento antiviral		
		Semana 1	Semana 2	D+7	D+14	D+21
20‡	Agpp65*	13	15	0	0	0
	QNAT	1518	2729	0	0	34
	Log 10	3.2	3.4	-	-	1.5
21‡	Agpp65	5	16	1	0	0
	QNAT	3169	1884	0	0	0
	Log 10	3.50	3.28	-	-	-
22	Agpp65	24	57	0	0	0
	QNAT	1143	2332	32	0	0
	Log 10	3.06	3.37	1.51	-	-
24‡	Agpp65	34	440	0	0	0
	QNAT	945	56664	1293	28	53
	Log 10	2.98	4.75	3.11	1.45	1.72
25‡	Agpp65	6	44	3	0	0
	QNAT	478	907	286	44	0
	Log 10	2.68	2.96	2.46	1.65	-
26	Agpp65	8	16	10	0	0
	QNAT	456	2184	891	5768	51
	Log 10	2.66	3.34	2.95	3.76	1.71
28	Agpp65	232	226	3	ND	4
	QNAT	24736	49210	5230	ND	ND
	Log 10	4.39	4.69	3.72	ND	ND

Continuação Tabela 3

Identificação		Pré tratamento antiviral		Pós início tratamento antiviral		
		Semana 1	Semana 2	D+7	D+14	D+21
29	Agpp65*	17	9	0	0	0
	QNAT	ND	ND	ND	ND	ND
	Log 10	ND	ND	ND	ND	ND

*células/100.000 leucócitos, ‡ Pacientes que apresentaram 2º episódio de CMV, § Tratamento suspenso após 7 dias por suspeita de hepatotoxicidade; ND, não disponível;

Tabela 4. Distribuição dos pacientes submetidos a transplante cardíaco segundo o desfecho clínico da infecção ativa pelo CMV.

Desfecho clínico CMV	N	%
Cura	15	100
Recorrência	6	40
Mediana tempo após 1º episódio (semanas) (mín-máx)	14 (11- 57)	—
Mediana tempo do após transplante (semanas) (mín-máx)	20 (13-62)	—

Tabela 5: Distribuição dos pacientes de acordo com o desfecho clínico 15 meses pós transplante cardíaco.

	Grupo		Grupo		Valor de P	OR	IC95%
	CMV		Sem CMV				
	N	%	N	%			
Desfecho clínico 15 meses pós Tx							
Óbito	0	0	7	70	0,002	0,037	0,00, 0,44
Rejeição aguda	8	53	2	20	1	1,668	0,14, 25,60
Infecção associada	9	60	5	50	0,061	Indefinido	0,69, indefinido

OR, odds ratio.

4.3. Comparação entre o desempenho da antigenemia pp65 e o QNAT-CMV

Durante a monitorização dos 25 RTC incluídos no estudo, 329 amostras de plasma foram analisadas para Agpp65 e QNAT-CMV, com média de 13,2 amostras por paciente. A mediana do tempo de seguimento laboratorial foi de 19 semanas por paciente.

Os testes apresentaram linearidade (tabela 6) e entre as amostras avaliadas, 207 (62,9%) foram positivas em pelo menos um dos métodos e 122 (37,1%) foram negativas para ambos. Discordância foi observada em 116 (35,3%) amostras, das quais 100 (30,3%) foram exclusivamente positivas no teste QNAT (tabela 7): Quarenta e seis (46%) após a instituição do tratamento antiviral, 38 (38%) não relacionadas à necessidade de tratamento, ou seja, são de pacientes não diagnosticados com infecção pelo CMV pelo critério da Agpp65 e 16 (16%) antes do início do tratamento, sendo quatro (25%) com valores ≥ 1000 cópias/ml (565 UI/ml).

Os valores das medianas de QNAT para detecção de infecção ativa, segundo os limites pré-estabelecidos de Agpp65 e doença pelo CMV foram respectivamente 1883 UI/ml (3.334 cópias/ml) e 9883 UI/ml (17.496 cópias/ml).

Os parâmetros de desempenho do QNAT-CMV segundo diferentes pontos de corte foram avaliados (tabela 8) e foi construída a curva ROC (figura 4). A partir desta avaliação foram examinados diferentes limiares de positividade. Observa-se que o valor de QNAT-CMV ≥ 565 UI/ml (1000 cópias/ml) mostrou acurácia diagnóstica (AD) de 88,4%, valor preditivo negativo (VPN) de 92,9% e razão de verossimilhança de teste positivo de 9,675 enquanto que para um ponto de corte de ≥ 1695 UI/ml (3000 cópias/ml), a AD foi pouco inferior (87,2%) e VPN caiu para 88,7%, porém a sensibilidade foi de apenas 45% (tabela 8). A área sob a curva ROC foi de 0.8686493 (0.8081144 - 0.9291842) (figura 4).

Tabela 6: Linearidade entre os resultados da Agpp65 e QNAT.

	Intervalo valores Agpp65 (Células/100.000 leucócitos)			
	<2	2-4	5-9	≥10
Mediana valores QNAT (UI/ml)	0	64,4	350,8	2258
Número de amostras	243	26	18	42

Tabela 7: Comparação entre os resultados dos testes de Agpp65 e QNAT.

	Agpp65+	%	Agpp65 -	%	Total
QNAT+	91	27,6	100	30,3	191
QNAT -	16	4,9	122	37,0	138
Total	107	32,5	222	67,4	329

Tabela 8: Parâmetros do teste de acordo com diferentes pontos de corte para QNAT

Parâmetros	Pontos de corte QNAT (UI/ml)		
	≥282	≥565	≥1695
Sensibilidade	81,67%	68,33%	45%
Especificidade	90,33%	92,94%	96,65%
Valor Preditivo Positivo	65,33%	68,33%	75%
Valor Preditivo Negativo	95,67%	92,94%	88,74%
Acurácia Diagnóstica	88,75%	88,45%	87,23%
Razão de Verossimilhança de Teste Positivo	8,449	9,675	13,45
Razão de Verossimilhança de Teste Negativo	0,203	0,340	0,569
Coeficiente kappa	0,656	0,612	0,493
Número de infecções pelo CMV ¹	15	13	7

¹por paciente

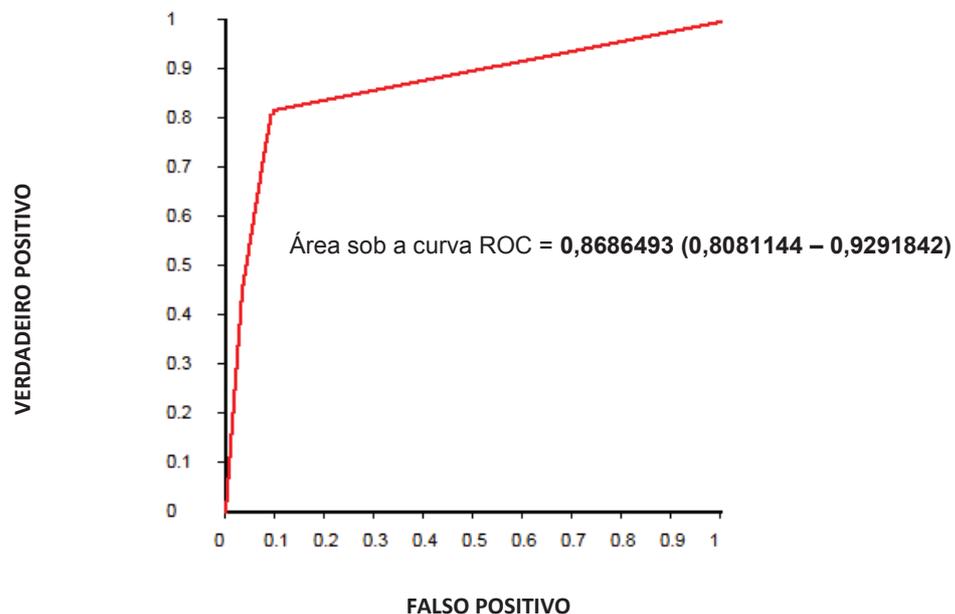


Figura 4: Curva *Receiver Operator Characteristic* (ROC) comparação entre os parâmetros de desempenho Agpp65 e QNAT-CMV.

4.4. Análise da cinética viral através do QNAT-CMV

Para a avaliação da cinética viral foram comparados os grupos que receberam terapia preemptiva/ tratamento para CMV com aqueles que não receberam terapia, devendo ser ressaltado que na vigência do seguimento estavam disponíveis apenas os resultados da Agpp65, sendo utilizado o protocolo padronizado na instituição, com a instituição de TP após dois exames positivos em semanas consecutivas com resultado maior ou igual 5 cels positivas/100.000 leucócitos.

Dentre os 15 (60%) RTC que apresentaram CMV ativo (11 infecções ativa e quatro episódios de doença pelo CMV) a detecção de qualquer resultado positivo ocorreu na mediana de tempo de cinco semanas pós transplante para ambos os métodos ($p=0,966$). O grupo que recebeu terapia preemptiva baseada no Agpp65, apresentou carga viral inicial maior que no grupo que não recebeu ganciclovir, entretanto esta diferença não foi estatisticamente significativa na nossa população ($p=0,106$).

Devido a falha da coleta semanal das amostras de plasma, foi possível obter dados para o cálculo do *doubling time* de 12 e sete pacientes que apresentaram e não apresentaram CMV respectivamente. Dessa forma, o *doubling time* da carga viral para CMV detectada pelo QNAT foi semelhante ($p=0,340$) nos grupos com e sem terapia preemptiva. Com relação ao perfil sorológico pré transplante, o grupo D+/R+ exibiu um *doubling time* similar ao grupo D-/R+ ($p=0,317$) (tabela 9).

Entre todos os pacientes que apresentaram CMV, o grupo que desenvolveu doença ativa pelo CMV apresentou um dt significativamente menor do que os que apresentaram apenas infecção ativa ($p=0,024$).

Após o início do tratamento antiviral, a mediana de tempo para supressão viral do CMV foi maior quando avaliada pelo método QNAT do que pela Agpp65 (21 versus 14 dias, $p = 0,023$; IC95 -19,8297 a 1,71025). Como o parâmetro para determinar início e término da TP nesse estudo foi a Agpp65, ao analisar retrospectivamente, observamos que após o tratamento do primeiro episódio de CMV apenas 46,1% (6/13) dos pacientes apresentavam carga viral negativa ao final do tratamento. Quando consideramos todos os episódios, esse valor foi de 36,8% (7/18).

Quando analisamos o grupo que apresentou recorrência do CMV, a carga viral inicial no primeiro episódio não foi maior do que os não apresentaram recorrência ($p=0,221$), e o tempo para o clareamento viral não foi diferente tanto para o método da Agpp65 ($p=0,386$) quanto para o QNAT ($p=0,633$). Ao comparar diretamente o tempo de clareamento para Agpp65 versus QNAT, observamos que o tempo para negatificação do QNAT não foi significativamente maior nos pacientes que tiveram recorrência da infecção ($p=0,255$), porém quando observamos individualmente constatamos que dos seis pacientes que recorreram, 50% ainda apresentavam QNAT positiva ao final do tratamento com ganciclovir (tabela 10).

Tabela 9: Cinética da carga viral para CMV entre os pacientes receptores de transplante cardíaco.

	Mediana dos resultados		p
	Com TP N=12	Sem TP N=7	
Carga viral inicial (cópias/ml) (min-max)	1096 (8-87,114)	32 (29-328)	0,106
Tempo de duplicação CMV (dias)	5,48 (1,67-24,81)	2,47 (0,68-77,60)	0,340
D+/R+	4,43 (1,67-24,81)	NA ¹	---
D (desconhecido) /R+	NA ¹	NA ¹	---
D-/R+	11,57(9,04-14,11)	NA ¹	---

¹ Apenas 1 paciente incluído no grupo para o cálculo

Tabela 10: Clareamento viral segundo a recorrência da infecção ativa por CMV.

	Recorrência CMV N=6	Não Recorrência CMV N=9	p
Carga viral inicial Mediana, mín, máx (cópias/ml)	1809 (51-5808)	1034(27-87114)	0,221
Tempo para negativação viral Agpp65 (dias)	7(7-14)	14(7-14)	0,386
Tempo para negativação viral QNAT (dias)	14(7-63)	24,5(14-63)	0,633
QNAT positiva ao final do tratamento 1º episódio	3/6 (50%)	3/7 • (42,9%)	0,061
<i>Doubling time</i> Mediana, mín,máx (dias)	3,95 (1,79-24.81)	8,79 (1,67-14,11)	0,009

*p=0,255 • pacientes com dados disponíveis para análise

5. Discussão

Esse estudo de coorte prospectivo permitiu a avaliação crítica da determinação de um ponto de corte para monitorização e início de terapia preemptiva em RTC, descreveu a cinética viral e analisou o desfecho clínico desses pacientes.

De acordo com o critério padronizado na instituição para os RTC, baseado na Agpp65, 60% dos pacientes desenvolveram infecção ativa pelo CMV. Esse valor foi maior do que os citados por outros autores, como Mendez-Eirin, Munoz, Delgado e Senechal et al, que variou entre 15-50% (8;56-58). Cabe ressaltar que a maior parte dos pacientes apresenta replicação viral do CMV pós transplante de órgãos sólidos; segundo dados de Potena et al, 88% dos RTC que receberam profilaxia antiviral apresentaram algum nível de viremia detectada, assim, a incidência pode variar, entre outros fatores, pelo ponto de corte da carga viral utilizado em cada centro, limitando a comparabilidade entre os estudos (28). Já a incidência de doença ativa foi de 16%, semelhante ao descrito por outros autores em RTC (8;56-58).

A população desse estudo foi considerada com risco intermediário para o desenvolvimento de CMV, visto que todos os receptores eram imunes previamente e não ocorreu o despareamento primário entre doador (D+) e receptor (R-), considerado o principal fator de risco para desenvolvimento de doença, o que permitiu a adoção da estratégia preemptiva. O status sorológico do doador variou, porém não foi observado maior ocorrência de infecção entre os D+/R+.

No contexto de terapia preemptiva, a determinação do ponto de corte para início do tratamento é uma questão clínica decisiva e que deve considerar a toxicidade da terapia antiviral, custos e os desfechos da prevenção efetiva do CMV.

Embora tanto o QNAT quanto a Agpp65 sejam considerados métodos válidos para monitorização do CMV após TOS, as diretrizes terapêuticas mais recentes como o da “*The Transplantation Society International CMV Consensus Group*” publicado em 2013 tem recomendado o QNAT como preferencial, principalmente para centros que adotam a estratégia preemptiva (5;14;32). As vantagens apontadas são a maior precisão, a maior linearidade nos resultados, o menor tempo de execução, o maior rendimento e o fato de não ser influenciado pela

contagem de neutrófilos, além do menor risco de contaminação quando comparado aos métodos não automatizados (5;60;61).

Como descrito anteriormente, os dados apresentados nesse estudo confirmaram que o QNAT foi mais sensível do que a Agpp65, uma vez que a maioria dos resultados discordantes foram positivos exclusivamente para o QNAT, principalmente durante a monitorização após o início do antiviral. Além disso, das amostras que foram discordantes antes do diagnóstico da infecção ativa pelo CMV pelo critério da Agpp65, 25% (4/16) apresentaram resultado $\geq 565\text{UI/ml}$ (1000 cópias/ml), ou seja, o tratamento poderia ter sido iniciado mais precocemente. Esse dado pode justificar o fato de um dos três pacientes aos quais pertenciam essas amostras ter sido diagnosticado já com doença pelo CMV. A mediana global de tempo para a primeira detecção do CMV, contudo, foi semelhante nos dois testes, o que pode ser explicado por características específicas de cada método, que avaliam diferentes alvos de replicação viral (4;62).

Com relação a taxa de replicação, a carga viral inicial e o *doubling time* não foram associados ao desenvolvimento de infecção ativa e necessidade de tratamento nessa coorte. Em contrapartida, entre os pacientes que apresentaram CMV, o grupo que desenvolveu doença clínica apresentou *doubling time* significativamente menor do que aqueles diagnosticados apenas como infecção ativa, ou seja, a taxa de replicação viral foi mais elevada. Além disso, foi possível observar que menores *doubling times* também foram associados a maior risco de recorrência viral pós tratamento. Esses dados revelam que o conhecimento do comportamento viral além de identificar pacientes sob maior risco, poderia influenciar o manejo clínico através da introdução do tratamento precoce, ajuste da imunossupressão e intensificação da monitorização viral, entretanto, os benefícios clínicos e a custo-efetividade dessas medidas a longo prazo ainda não são conhecidos (26;64-66).

Nós acreditamos que as diferenças observadas em nossa coorte podem ser atribuídas às diferentes características da população estudada, como alta prevalência de CMV, órgão transplantado e estratégia imunossupressora, além do tipo de teste utilizado e o intervalo de tempo da coleta das amostras (10). Outra

consideração importante é que nesse estudo os resultados do QNAT não foram considerados para tomada de decisão clínica no manejo do RTC.

A obtenção desses dados é uma das razões pelas quais o QNAT tem se tornado o método de preferência e o mais utilizado para a monitorização do CMV (5;63-67), entretanto, devido à falta de padronização entre os centros, os pontos de corte para início da TP ainda são determinados localmente de acordo com características específicas dos receptores, deste modo, diferentes valores para determinação do melhor ponto de corte para início da TP baseado nos valores de QNAT foram avaliados nesse estudo.

Como todos os pacientes incluídos apresentaram risco intermediário para desenvolvimento do CMV (R+), refletindo a alta prevalência da infecção na população, o objetivo primário foi priorizar a especificidade e o valor preditivo positivo do QNAT para evitar tratamentos desnecessários, internações hospitalares, toxicidade e custos. Dessa forma, baseado na especificidade, o valor mais apropriado para determinar o início da TP seria maior ou igual a 1695 UI/ml (3000 cópias/ml), entretanto, nessa situação seis casos deixariam de ser tratados quando comparado ao valor de 565 UI/ml (1000 cópias/ml) e oito quando comparado a 282 UI/ml (500 cópias/ml), o que permitiria evolução de maior número de casos para doença ativa. Assim, empiricamente foi definido o valor maior ou igual a 565 UI/ml (1000 cópias/ml) como ponto de corte da QNAT para início de TP em nosso centro. Este valor deve ser validado de forma prospectiva em nossa população.

Embora os valores obtidos em diferentes estudos não sejam comparáveis, citaremos a seguir dados de outros autores para embasar a discussão. Li et al definiram pontos de corte de 1000, 4000 e 10.000 cópias /ml em amostras de sangue total para início de terapia antiviral em grupos de alto, intermediário e baixo risco respectivamente (20). Kalpoe et al propuseram o ponto de corte de 10.000 cópias/ml para receptores de TCTH e 6.300 cópias/ml para receptores de transplante de órgãos sólidos, em amostras de plasma (22). Utilizando plasma de pacientes receptores de transplante de fígado, Humar et al determinaram valores 2000 a 5000 cópias/ml (23). Mais recentemente, Martin-Gandul et al avaliaram amostras de plasma de pacientes receptores de transplante renal, hepático e cardíaco e

estabeleceram o ponto de corte de 3983 UI/ml (2600 cópias/ml) para início de TP (21).

Maior concordância entre os diferentes centros é esperada num futuro próximo, devido ao lançamento do padrão de calibração internacional pela OMS em 2010 (38;39), entretanto, até o momento apenas poucos kits comerciais dispõem dessa tecnologia.

Ao analisar o desfecho clínico observamos que a infecção/doença pelo CMV ocorreu em 40% (6/15) dos pacientes que receberam tratamento antiviral, taxa que é um pouco maior do que a registrada por outros autores para diferentes tipos de TOS (65;68-71), reforçando a possibilidade de suspensão precoce do tratamento baseado num método menos sensível de monitorização, pois conforme demonstrado, a maior parte dos resultados discordantes foi devido a Agpp65 negativa/ QNAT positiva após o início do antiviral e de acordo com as recomendações mais recentes, a suspensão do tratamento deve ocorrer apenas após um ou dois testes de QNAT negativos, o que minimiza o risco de recorrência e o desenvolvimento de resistência (5;65).

Devido a característica imunossupressora, outros autores já apontaram para a associação entre infecção ativa pelo CMV e outras infecções bacterianas, fúngicas e virais (7;44;72;73). No presente estudo houve tendência a maior ocorrência de infecções em pacientes com infecção ativa por CMV prévia. Falagas et al observaram que a exposição ao CMV foi fator de risco para desenvolvimento de bacteremia em receptores de transplante de fígado ortotópico (TFO) (74). Além disso, Munoz-Price et al relataram em estudo de 2004 que a profilaxia com ganciclovir oral foi associada a redução de bacteremias em receptores de TFO (75).

Em estudo para a análise de fatores de risco para o desenvolvimento de infecção fúngica invasiva em receptores de TFO, Patel et al encontraram que a ocorrência de CMV prévio foi relacionada ao desenvolvimento de infecções criptocócicas (76).

Especificamente em receptores de transplante cardíaco, um estudo prospectivo que incluiu 278 indivíduos para identificar quais pacientes poderiam se beneficiar de profilaxia antifúngica, encontrou que a doença pelo CMV foi fator de risco independente para o desenvolvimento de aspergilose invasiva (58).

Embora estudos anteriores tenham demonstrado relação entre a ocorrência de CMV e aumento do risco de rejeição aguda, vasculopatia do enxerto e mortalidade, tais associações não foram demonstradas em nossos pacientes (77-84). Mesmo no estudo IMPACT, que avaliou a eficácia e a segurança da profilaxia com valganciclovir por 200 dias em 326 receptores de transplante renal, foi demonstrado que o aumento do tempo de profilaxia antiviral reduziu significativamente a incidência de DNAemia e doença pelo CMV, porém apresentou apenas tendência a menos episódios de rejeição aguda quando comparado ao grupo que recebeu 100 dias de profilaxia (9).

Nós acreditamos que os resultados discordantes possam estar relacionados ao número de pacientes incluídos, tempo de seguimento pós transplante e o risco intermediário para desenvolvimento do CMV no presente estudo.

Entre outras limitações que podem ter influenciado nossos resultados, destacamos a falta de dados sorológicos dos doadores (IgG para CMV não realizado rotineiramente no programa de captação de órgãos), a classificação da doença como presumida devido à falta de dados histológicos, a dificuldade de adesão a monitorização semanal do CMV e a alta mortalidade do grupo não CMV.

Concluindo, foi estabelecido o ponto de corte da carga viral maior ou igual a 565 UI/ml (1000 cópias/ml) no plasma como o valor ótimo para início de terapia preemptiva para citomegalovírus em receptores de transplante cardíaco com risco intermediário para desenvolvimento de CMV. Validação e reavaliação devem ser realizadas periodicamente para assegurar o correto diagnóstico da infecção ativa localmente. Considerando o recente padrão de calibração internacional da OMS para o método QNAT a comparação interlaboratorial deve tornar-se mais fidedigna e possivelmente determinar um ponto de corte mais homogêneo.

6. Conclusões

- Considerando os parâmetros de desempenho e a prevalência de citomegalovírus na população estudada, o ponto de corte da carga viral quantitativa do citomegalovírus definido para a detecção de infecção ativa e início de terapia preemptiva em receptores de transplante cardíaco assintomáticos foi 565 UI/ml (≥ 1000 cópias/ml).
- A incidência de infecção ativa e doença por citomegalovírus baseada nos parâmetros da antigenemia pp65 foi de 44% e 16%, respectivamente
- O QNAT para citomegalovírus apresentou um desempenho acurado quando comparado a antigenemia pp65. Foi observado menor *doubling time* nos receptores de transplante cardíaco que apresentaram doença ativa pelo citomegalovírus na avaliação prospectiva da cinética viral.
- A ocorrência de infecção ativa por citomegalovírus não foi associada à mortalidade, à rejeição aguda e à ocorrência de outras infecções até 15 meses pós transplante cardíaco.

7. Perspectivas

Este estudo levanta questões relevantes no que diz respeito a monitorização da infecção ativa e doença por CMV em receptores de transplante cardíaco que merecem a consideração e avaliação em populações maiores, de outros centros brasileiros na tentativa de validar o limiar de positividade sugerido e estabelecer correlações clínicas na perspectiva de utilização do padrão de calibração da Organização Mundial de Saúde com vistas a homogeneização dos parâmetros do QNAT e comparação interlaboratorial entre os diversos centros.

8. Referências

1. Crumpacker CS, Zhang JL. Cytomegalovirus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and Practices of Infectious Diseases. seventh ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 1971-87.
2. Coehen JI. Introduction to Herpesviridae. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and Practices of Infectious Diseases. seventh edition ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 1937-42.
3. Souza MA, Passos AM, Treitinger A, Spada C. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2010 Jul;359-61.
4. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin.Microbiol.Rev.* 2009 Jan;76-98, Table.
5. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013 Aug 27;333-60.
6. Snyderman DR, Limaye AP, Potena L, Zamora MR. Update and review: state-of-the-art management of cytomegalovirus infection and disease following thoracic organ transplantation. *Transplant.Proc.* 2011 Apr:S1-S17.
7. McDevitt LM. Etiology and impact of cytomegalovirus disease on solid organ transplant recipients. *Am.J.Health Syst.Pharm.* 2006 Oct 1:S3-S9.
8. Delgado JF, Manito N, Almenar L, Crespo-Leiro M, Roig E, Segovia J, Vazquez de Prada JA, Lage E, Palomo J, Camprecios M, et al. Risk factors associated with cytomegalovirus infection in heart transplant patients: a prospective, epidemiological study. *Transpl.Infect.Dis.* 2011 Apr;136-44.
9. Humar A, Lebranchu Y, Vincenti F, Blumberg EA, Punch JD, Limaye AP, Abramowicz D, Jardine AG, Voulgari AT, Ives J, et al. The efficacy and safety

- of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *Am.J.Transplant.* 2010 May:1228-37.
10. Atabani SF, Smith C, Atkinson C, Aldridge RW, Rodriguez-Peralvarez M, Rolando N, Harber M, Jones G, O'Riordan A, Burroughs AK, et al. Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. *Am.J.Transplant.* 2012 Sep:2457-64.
 11. Humar A, Snyderman D. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Am.J.Transplant.* 2009 Dec:S78-S86.
 12. Koskinen PK, Kallio EA, Tikkanen JM, Sihvola RK, Hayry PJ, Lemstrom KB. Cytomegalovirus infection and cardiac allograft vasculopathy. *Transpl.Infect.Dis.* 1999 Jun:115-26.
 13. Weill D. Role of cytomegalovirus in cardiac allograft vasculopathy. *Transpl.Infect.Dis.* 2001:44-8.
 14. Torre-Cisneros J, Farinas MC, Caston JJ, Aguado JM, Cantisan S, Carratala J, Cervera C, Cisneros JM, Cordero E, Crespo-Leiro MG, et al. GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 2011 Dec:735-58.
 15. Andrews PA, Emery VC, Newstead C. Summary of the British Transplantation Society Guidelines for the Prevention and Management of CMV Disease After Solid Organ Transplantation. *Transplantation* 2011 Dec 15;92(11):1181-7.
 16. Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clin.Infect.Dis.* 2012 Jun;54(12):1793-7.
 17. Mengelle C, Sandres-Saune K, Pasquier C, Rostaing L, Mansuy JM, Marty M, Da S, I, Attal M, Massip P, Izopet J. Automated extraction and quantification of human cytomegalovirus DNA in whole blood by real-time PCR assay. *J.Clin.Microbiol.* 2003 Aug;41(8):3840-5.

18. Razonable RR, Brown RA, Wilson J, Groettum C, Kremers W, Espy M, Smith TF, Paya CV. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation* 2002 Mar 27;73(6):968-73.
19. Garrigue I, Doussau A, Asselineau J, Bricout H, Couzi L, Rio C, Merville P, Fleury H, Lafon ME, Thiebaut R. Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients. *J.Clin.Microbiol.* 2008 Feb;46(2):493-8.
20. Li H, Dummer JS, Estes WR, Meng S, Wright PF, Tang YW. Measurement of human cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients. *J.Clin.Microbiol.* 2003 Jan:187-91.
21. Martin-Gandul C, Perez-Romero P, Sanchez M, Bernal G, Suarez G, Sobrino M, Merino L, Cisneros JM, Cordero E. Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection. *J.Clin.Virol.* 2013 Jan:13-8.
22. Kalpoe JS, Kroes AC, de Jong MD, Schinkel J, de Brouwer CS, Beersma MF, Claas EC. Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. *J.Clin.Microbiol.* 2004 Apr:1498-504.
23. Humar A, Gregson D, Caliendo AM, McGeer A, Malkan G, Krajden M, Corey P, Greig P, Walmsley S, Levy G, et al. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Transplantation* 1999 Nov 15:1305-11.
24. Lisboa LF, Asberg A, Kumar D, Pang X, Hartmann A, Preiksaitis JK, Pescovitz MD, Rollag H, Jardine AG, Humar A. The clinical utility of whole blood versus plasma cytomegalovirus viral load assays for monitoring therapeutic response. *Transplantation* 2011 Jan 27:231-6.

25. Babady NE, Cheng C, Cumberbatch E, Stiles J, Papanicolaou G, Tang YW. Monitoring of cytomegalovirus viral loads by two molecular assays in whole-blood and plasma samples from hematopoietic stem cell transplant recipients. *J.Clin.Microbiol.* 2015 Apr;53(4):1252-7.
26. Gimenez E, Munoz-Cobo B, Solano C, Amat P, Navarro D. Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients in the era of highly sensitive real-time PCR assays: does it have any clinical value? *J.Clin.Microbiol.* 2014 Feb:654-6.
27. Humar A, Michaels M. American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am.J.Transplant.* 2006 Feb:262-74.
28. Potena L, Holweg CT, Vana ML, Bashyam L, Rajamani J, McCormick AL, Cooke JP, Valantine HA, Mocarski ES. Frequent occult infection with Cytomegalovirus in cardiac transplant recipients despite antiviral prophylaxis. *J.Clin.Microbiol.* 2007 Jun:1804-10.
29. Lisboa LF, Kumar D, Wilson LE, Humar A. Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation* 2012 Jan 27:195-200.
30. Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin.Infect.Dis.* 2012 Dec;55(12):1678-89.
31. Potena L, Grigioni F, Magnani G, Lazzarotto T, Musuraca AC, Ortolani P, Coccolo F, Fallani F, Russo A, Branzi A. Prophylaxis versus preemptive anti-cytomegalovirus approach for prevention of allograft vasculopathy in heart transplant recipients. *J.Heart Lung Transplant.* 2009 May:461-7.
32. Preiksaitis JK, Brennan DC, Fishman J, Allen U. Canadian society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *Am.J.Transplant.* 2005 Feb:218-27.

33. Khoury JA, Storch GA, Bohl DL, Schuessler RM, Torrence SM, Lockwood M, Gaudreault-Keener M, Koch MJ, Miller BW, Hardinger KL, et al. Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *Am.J.Transplant.* 2006 Sep;6(9):2134-43.
34. Reischig T, Jindra P, Hes O, Svecova M, Klabocho J, Treska V. Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Am.J.Transplant.* 2008 Jan;8(1):69-77.
35. Spinner ML, Saab G, Casabar E, Bowman LJ, Storch GA, Brennan DC. Impact of prophylactic versus preemptive valganciclovir on long-term renal allograft outcomes. *Transplantation* 2010 Aug 27;90(4):412-8.
36. Reischig T, Hribova P, Jindra P, Hes O, Bouda M, Treska V, Viklicky O. Long-term outcomes of pre-emptive valganciclovir compared with valacyclovir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus in renal transplantation. *J.Am.Soc.Nephrol.* 2012 Sep;23(9):1588-97.
37. Sun HY, Cacciarelli TV, Wagener MM, Singh N. Preemptive therapy for cytomegalovirus based on real-time measurement of viral load in liver transplant recipients. *Transpl.Immunol.* 2010 Aug;23(4):166-9.
38. Beam E, Dioverti V, Razonable RR. Emerging cytomegalovirus management strategies after solid organ transplantation: challenges and opportunities. *Curr.Infect.Dis.Rep.* 2014 Sep:419.
39. Collaborative Study Group Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)-Based Assays. WHO/BS/10.2138 Fryer J F.Heath AB ARMP. Geneva: 2010 Oct 18.
40. Rychert J, Danziger-Isakov L, Yen-Lieberman B, Storch G, Buller R, Sweet SC, Mehta AK, Cheeseman JA, Heeger P, Rosenberg ES, et al. Multicenter comparison of laboratory performance in cytomegalovirus and Epstein-Barr

- virus viral load testing using international standards. *Clin.Transplant.* 2014 Dec;28(12):1416-23.
41. Mannonen L, Loginov R, Helantera I, Dumoulin A, Vilchez RA, Cobb B, Hirsch HH, Lautenschlager I. Comparison of two quantitative real-time CMV-PCR tests calibrated against the 1st WHO international standard for viral load monitoring of renal transplant patients. *J.Med.Virol.* 2014 Apr;86(4):576-84.
 42. Bonaros N, Mayer B, Schachner T, Laufer G, Kocher A. CMV-hyperimmune globulin for preventing cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients: a meta-analysis. *Clin.Transplant.* 2008 Jan;22(1):89-97.
 43. Registro Brasileiro de Transplante. Vol. XX, 2014.
 44. Milan A, Sampaio AM, Guardia AC, Pavan CR, Andrade PD, Bonon SH, Costa SC, Ataide EC, Boin IF, Stucchi RS. Identification of bacterial infections and clinical manifestation associated with cytomegalovirus in liver transplantation patients. *Transplant.Proc.* 2013 Apr:1130-2.
 45. Peixoto M, Mascarenhas L, Cunha A, Dutra M, Miranda E, Silva I, Costa S, Galvao B, Cunha A. Recurrent and persistent cytomegalovirus infection in a kidney recipient caused by the L595S mutation in UL97 phosphotransferase gene. *Antivir.Ther.* 2012;17(3):585-8.
 46. Costa FA, Soki MN, Andrade PD, Bonon SH, Thomasini RL, Sampaio AM, Ramos MC, Rossi CL, Cavalcanti TC, Boin IF, et al. Simultaneous monitoring of CMV and human herpesvirus 6 infections and diseases in liver transplant patients: one-year follow-up. *Clinics.(Sao Paulo)* 2011;66(6):949-53.
 47. Bugano DD, Campos SV, Afonso JE, Jr., Caramori ML, Teixeira RH, Carraro RM, Strabelli TM, Machado CM, Samano MN, Pego-Fernandes P, et al. Impact of cytomegalovirus infection in lung transplant patients under universal prophylaxis: single-center experience in Brazil. *Transplant.Proc.* 2010 Mar;42(2):525-30.
 48. Série de Manuais do Hospital de Clínicas da Unicamp- Manual de Processos de Trabalho do Transplante Cardíaco. 1[1], 1-32. 2011. Campinas.

49. Bacal F, Neto JD, Fiorelli AI, Mejia J, Marcondes-Braga FG, Mangini S, Oliveira JL, Jr., de Almeida DR, Azeka E, Dinkhuysen JJ, et al. [II Brazilian Guidelines for Cardiac Transplantation]. *Arq Bras.Cardiol.* 2010;94(1 Suppl):e16-e76.
50. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, Andersen CB, Angelini A, Berry GJ, Burke MM, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J.Heart Lung Transplant.* 2005 Nov:1710-20.
51. CMV Brite Turbo. CMV antigenemia detection test. International package insert. Rozenburglaan 13a 9727 DL Groningen The Netherlands, IQ Products.
52. QIAamp DNA Mini Kit.For isolation of genomic, mitochondrial, bacterial, parasite, or viral DNA. Hilden, Germany, QIAGEN.
53. Emery VC, Cope AV, Bowen EF, Gor D, Griffiths PD. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J.Exp.Med.* 1999 Jul 19:177-82.
54. Q-CMV Real Time Complete Kit- identification and quantification of CMV DNA. 2009. Buttigliera Alta.
55. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. 2014 Sep 22.
56. Mendez-Eirin E, Paniagua-Martin MJ, Marzoa-Rivas R, Barge-Caballero E, Grille-Cancela Z, Canizares A, Naya-Leira C, Gargallo-Fernandez P, Castro-Beiras A, Crespo-Leiro M. Cumulative incidence of cytomegalovirus infection and disease after heart transplantation in the last decade: effect of preemptive therapy. *Transplant.Proc.* 2012 Nov:2660-2.
57. Senechal M, Dorent R, du Montcel ST, Fillet AM, Ghossoub JJ, Dubois M, Pavie A, Gandjbakhch I. Monitoring of human cytomegalovirus infections in heart transplant recipients by pp65 antigenemia. *Clin.Transplant.* 2003 Oct:423-7.

58. Munoz P, Rodriguez C, Bouza E, Palomo J, Yanez JF, Dominguez MJ, Desco M. Risk factors of invasive aspergillosis after heart transplantation: protective role of oral itraconazole prophylaxis. *Am.J.Transplant.* 2004 Apr:636-43.
59. Potena L, Humar A. Cytomegalovirus in Cardiothoracic Transplantation. In: Mooney LM, Hannan M, Husain S, et al., editors. *Diagnosis and Management of Infectious Diseases in Cardiothoracic Transplantation and Mechanical Circulatory Support.* 1st ed. Philadelphia: Elsevier; 2011. p. 223-35.
60. Alice T, Enrietto M, Pittaluga F, Varetto S, Franchello A, Marchiaro G, Ghisetti V. Quantitation of cytomegalovirus DNA by real-time polymerase chain reaction in peripheral blood specimens of patients with solid organ transplants: comparison with end-point PCR and pp65 antigen test. *J.Med.Virol.* 2006 Jul:915-22.
61. Piiparinen H, Hockerstedt K, Gronhagen-Riska C, Lautenschlager I. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. *J.Clin.Virol.* 2004 Jul:258-66.
62. Gentile G, Picardi A, Capobianchi A, Spagnoli A, Cudillo L, Dentamaro T, Tendas A, Cupelli L, Ciotti M, Volpi A, et al. A prospective study comparing quantitative Cytomegalovirus (CMV) polymerase chain reaction in plasma and pp65 antigenemia assay in monitoring patients after allogeneic stem cell transplantation. *BMC.Infect.Dis.* 2006:167.
63. Caliendo AM, St GK, Allega J, Bullotta AC, Gilbane L, Rinaldo CR. Distinguishing cytomegalovirus (CMV) infection and disease with CMV nucleic acid assays. *J.Clin.Microbiol.* 2002 May:1581-6.
64. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 2000 Jun 10:2032-6.

65. Humar A, Kumar D, Boivin G, Caliendo AM. Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with CMV disease. *J.Infect.Dis.* 2002 Sep 15:829-33.
66. Lao WC, Lee D, Burroughs AK, Lanzani G, Rolles K, Emery VC, Griffiths PD. Use of polymerase chain reaction to provide prognostic information on human cytomegalovirus disease after liver transplantation. *J.Med.Virol.* 1997 Mar:152-8.
67. Razonable RR, van CH, Brown RA, Wilson JA, Harmsen WS, Wiesner RH, Smith TF, Paya CV. Dynamics of cytomegalovirus replication during preemptive therapy with oral ganciclovir. *J.Infect.Dis.* 2003 Jun 1:1801-8.
68. Falagas ME, Snyderman DR, Griffith J, Werner BG, Freeman R, Rohrer R. Clinical and epidemiological predictors of recurrent cytomegalovirus disease in orthotopic liver transplant recipients. Boston Center for Liver Transplantation CMVIG Study Group. *Clin.Infect.Dis.* 1997 Aug:314-7.
69. Humar A, Uknis M, Carlone-Jambor C, Gruessner RW, Dunn DL, Matas A. Cytomegalovirus disease recurrence after ganciclovir treatment in kidney and kidney-pancreas transplant recipients. *Transplantation* 1999 Jan 15:94-7.
70. Shanahan A, Malani PN, Kaul DR. Relapsing cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transpl.Infect.Dis.* 2009 Dec:513-8.
71. van den Berg AP, van Son WJ, Haagsma EB, Klompaker IJ, Tegzess AM, Schirm J, Dijkstra G, van der Giessen M, Slooff MJ, The TH. Prediction of recurrent cytomegalovirus disease after treatment with ganciclovir in solid-organ transplant recipients. *Transplantation* 1993 Apr:847-51.
72. Fishman JA, Emery V, Freeman R, Pascual M, Rostaing L, Schlitt HJ, Sgarabotto D, Torre-Cisneros J, Uknis ME. Cytomegalovirus in transplantation - challenging the status quo. *Clin.Transplant.* 2007 Mar:149-58.
73. Paya CV. Indirect effects of CMV in the solid organ transplant patient. *Transpl.Infect.Dis.* 1999:8-12.

74. Falagas ME, Snyderman DR, Griffith J, Werner BG. Exposure to cytomegalovirus from the donated organ is a risk factor for bacteremia in orthotopic liver transplant recipients. Boston Center for Liver Transplantation CMVIG Study Group. *Clin.Infect.Dis.* 1996 Sep;468-74.
75. Munoz-Price LS, Slifkin M, Ruthazer R, Poutsika DD, Hadley S, Freeman R, Rohrer R, Angelis M, Cooper J, Fairchild R, et al. The clinical impact of ganciclovir prophylaxis on the occurrence of bacteremia in orthotopic liver transplant recipients. *Clin.Infect.Dis.* 2004 Nov 1:1293-9.
76. Patel R, Portela D, Badley AD, Harmsen WS, Larson-Keller JJ, Ilstrup DM, Keating MR, Wiesner RH, Krom RA, Paya CV. Risk factors of invasive *Candida* and non-*Candida* fungal infections after liver transplantation. *Transplantation* 1996 Oct 15:926-34.
77. Snyderman DR, Kistler KD, Ulsch P, Bergman GE, Vensak J, Morris J. The impact of CMV prevention on long-term recipient and graft survival in heart transplant recipients: analysis of the Scientific Registry of Transplant Recipients (SRTR) database. *Clin.Transplant.* 2011 Jul:E455-E462.
78. Arthurs SK, Eid AJ, Pedersen RA, Kremers WK, Cosio FG, Patel R, Razonable RR. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clin.Infect.Dis.* 2008 Mar 15:840-6.
79. Johansson I, Martensson G, Andersson R. Cytomegalovirus and long-term outcome after lung transplantation in Gothenburg, Sweden. *Scand.J.Infect.Dis.* 2010:129-36.
80. Linares L, Sanclemente G, Cervera C, Hoyo I, Cofan F, Ricart MJ, Perez-Villa F, Navasa M, Marcos MA, Anton A, et al. Influence of cytomegalovirus disease in outcome of solid organ transplant patients. *Transplant.Proc.* 2011 Jul:2145-8.
81. Monforte V, Lopez C, Santos F, Zurbano F, de la Torre M, Sole A, Gavalda J, Ussetti P, Lama R, Cifrian J, et al. A multicenter study of valganciclovir

- prophylaxis up to day 120 in CMV-seropositive lung transplant recipients. *Am.J.Transplant.* 2009 May:1134-41.
82. Sagedal S, Rollag H, Hartmann A. Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients is associated with impaired survival irrespective of expected mortality risk. *Clin.Transplant.* 2007 May:309-13.
83. Seehofer D, Rayes N, Tullius SG, Schmidt CA, Neumann UP, Radke C, Settmacher U, Muller AR, Steinmuller T, Neuhaus P. CMV hepatitis after liver transplantation: incidence, clinical course, and long-term follow-up. *Liver Transpl.* 2002 Dec:1138-46.
84. Doesch AO, Repp J, Hofmann N, Erbel C, Frankenstein L, Gleissner CA, Schmidt C, Ruhparwar A, Zugck C, Schnitzler P, et al. Effects of oral valganciclovir prophylaxis for cytomegalovirus infection in heart transplant patients. *Drug Des Devel.Ther.* 2012:289-95.

APÊNDICE 1

Formulário seguimento pacientes TX cardíaco

Identificação:

Nome:

HC: _____

D/N: _____ Sexo: M/F

ID estudo: _____

Data início seguimento: _____

História Transplante:

Data TX:

Doença de base:

Comorbidades:

Tratamento:

Tempo de Isquemia _____

Imunossupressão:

Doador:

Idade _____ Sexo _____

Comorbidades _____

Causa Morte _____

Status CMV

CMV receptor: IgM _____ IgG: _____

CMV doador: IgM _____ IgG: _____

Terapia indução

DATA	SEMANA PÓS TX	TRATAMENTO	DESFECHO

CMV doença- Diagnóstico e Tratamento

	EPISÓDIO 1	EPISÓDIO 2	EPISÓDIO 3
DATA			
APRESENTAÇÃO CLÍNICA*			
ANTIGENEMIA Pp65			
CRITÉRIO INÍCIO TTO•			
TRATAMENTO			
DURAÇÃO TTO			
IMUNOSSUPRESSÃO#			
INDUÇÃO?			

*:1 CMV infecção (viremia sem sintomas); 2 CMV síndrome (febre, fadiga, leucopenia, linfocitose atípica, plaquetopenia, ↑ transaminases) ; 3 Dça órgão invasiva 3

• :1 Clínico, 2 antigenemia, 3 anatomopatológico

#: Micofenolato 1; Ciclosporina 2; Prednisona 3

Monitoramento CMV após diagnóstico

	DATA	ANTIGENEMIA
BASELINE		
1ª SEMANA		
2ª SEMANA		
3ª SEMANA		
4ª SEMANA		
RESISTÊNCIA?		

Desfecho (após infecção CMV)

Cura: S/N **Data:** _____
Óbito: S/N **Data:** _____
Rejeição: S/N **Data:** _____
Perda enxerto: S/N **Data:** _____

Infecção: S/N **Qual?** _____

Follow up pós TX

- **Infecção oportunista**

DATA	SEMANA PÓS TX	DIAGNÓSTICO	TRATAMENTO	DESFECHO

EVOLUÇÃO

30 DIAS:

Imunossupressão _____

Comorbidades _____

Tratamento _____

90 DIAS:

Imunossupressão _____

Comorbidades _____

Tratamento _____

180 DIAS:

Imunossupressão _____

Comorbidades _____

Tratamento _____

360 DIAS:

Imunossupressão _____

Comorbidades _____

Tratamento _____

Anual data: / / _____

Imunossupressão _____

Comorbidades _____

Tratamento _____

Anual data: / / _____

Imunossupressão _____

Comorbidades _____

Tratamento _____

APÊNDICE 2

SAN FRANCISCO

2014

**World
Transplant
Congress**

Moscone West
Convention Center
July 26-31, 2014

2014
WTC
WORLD TRANSPLANT CONGRESS

ASTS
TTS
The Transplantation Society
AST
AMERICAN SOCIETY
OF TRANSPLANTATION

Poster Session D - Wednesday, July 30**9:30 AM — 6:30 PM**

Poster Viewing: 5:30 PM - 6:30 PM
Presenters in Attendance: 5:30 PM - 6:30 PM
Exhibit Hall

- † Those posters identified as an WTC Poster of Distinction by this symbol have received review scores that place them in the top 20% of their topic. The Planning Committee encourages you to make them a priority when you visit the poster session.

B-cell Responses and Alloantibody Production**9:30 AM — 6:30 PM**

- #D2298 † **Successful Desensitization With Combination of Costimulation Blockade and Bortezomib Via Regulating Plasma Cells and Follicular Helper T Cells in Sensitized Rhesus Model.**
Jean Kwun, Christopher Burghuber, Eugenia Page, Adriana Gibby, Neal Iwakoshi, Stuart J. Knechtle Atlanta, GA.
- #D2299 † **Targeting the BAFF/APRIL Signalling Axis for Prevention of Antibody-Mediated Allograft Rejection.**
Manu Chhabra, Mekhola Mallik, Margaret Negus, Sylvia Rehakova, Jason Ali, Saeed Qureshi, Eleanor Bolton, John Andrew Bradley, Gavin Pettigrew Cambridge, United Kingdom.
- #D2300 † **B Cell Dependent Control of Allograft Tolerance Through Expansion of Thymic CD4⁺ Foxp3⁺ T Cells.**
Stacey N. Walters, Kylie E. Webster, Stephen Daley, Shane T. Grey Sydney, Australia; Canberra, Australia.
- #D2301 † **Distinct Differentiation Pathways of Endogenous Alloreactive Memory and Naive B Cells in Transplantation.**
Jianjun Chen, Vinh Vu, James Young, Dengping Yin, Rebecca Pompano, Qiang Wang, Roger Scimmas, Anita Chong Chicago; Huston.
- #D2302 † **The Dynamic Changes in Alloreactive Plasma Cells By Acute and Chronic Viral Infection.**
Christopher K. Burghuber, Ravi Ruhil, Byoungchol Oh, Stuart J. Knechtle, Neal N. Iwakoshi Atlanta, GA; Vienna, Austria.
- #D2303 † **B Cell Depletion Is Not Required for Prolongation of Renal Allograft Survival in Non-Human Primates Using a Novel Anti-CD40 Blocking Antibody.**
James S. Rush, Francisco Cordoba, Grazyna Wieczorek, Maxime Audet, Martin A. Schneider, Dhavalkumar Patel, Christoph Heusser, Christian Bruns, Peter Ulrich, Alan Slade, Jochen Klupp Basel, Switzerland; East Hannover; Strasbourg, France.
- #D2304 † **Thymus, Bone and CD34⁺ Cell Requirements for Functional Follicular Lymphoid Structures and Antibody Responses in Humanized Mice.**
Yun Shin Chung, Hyojun Park, Kyo Won Lee, Jae Berm Park, Sung Joo Kim Seoul, Korea, Republic of.
- #D2305 † **Contribution of Donor and Host CD4 T Cell Populations to Initiation and Diversification of Transplant-Associated Autoantibody Responses.**
Muhammad Saeed Qureshi, Reza Motallebzdeh, Sylvia Rehakova, Margaret Negus, Eleanor Bolton, J. A. Bradley, Gavin Pettigrew Cambridge, England, United Kingdom.
- #D2306 † **Apoptotic Endothelial Cell-Derived Nanovesicles Trigger the Production of Anti-LG3 Antibodies.**
Julie Turgeon, Melanie Dieudé, Christina Bell, Shijie Qi, Matthieu Rousseau, Luc Pomerleau, Claude Perrault, Pierre Thibault, Eric Boilard, Marie-Josée Hebert Montreal, Canada; Quebec, Canada.

- #D2414 **Leucopenia in the First Year After Renal Transplantation During Valganciclovir Prophylaxis.**
O. Rissling, M. Naik, S. Brakemeier, D. Schmidt, A. Hohberger, H. H. Neumayer, K. Budde Berlin, Germany.
- #D2415 **Incidence of Infections in People With HIV/AIDS Compared With Immunosuppressed Transplant Recipients: A Meta-Analysis.**
Zhiyong Guo, Mengyao Qiu, Dongping Wang, Weiqiang Ju, Xiaoshun He Guangzhou, China.
- #D2416 **Serological Survey and Risk Factors for Brucellosis in Renal Transplant Recipients in Antalya, Turkey.**
Filiz Guren, Filiz Gunseren, Betul Ozhak Baysan, Gozde Ongut, Dilara Ogunc, Hafize Kilinckaya, Aydan Karagul, Ibrahim Aliosmanoglu, Huseyin Kocak, Ayhan Dinckan Antalya, Turkey; Ankara, Turkey.
- #D2417 **Kinetics of Cytomegalovirus (CMV) Viral Replication in Tacrolimus (TAC) Treated Kidney Transplant Recipients Receiving Everolimus (EVR) or Mycophenolate (MPA).**
Luciana Gusukuma, Claudia Felipe, Taina Sandes-Freitas, Alexandra Ferreira, Marina Cristelli, Nagilla Oliveira, Marcello Franco, Helio Tedesco, Jose Medina-Pestana Sao Paulo, Brazil.
- #D2418 **The Impact of a Pharmacist-Directed Program to Improve Vaccination Documentation, Knowledge, and Compliance in Renal, Liver, and Pancreas Transplant Candidates.**
Amanda I. Ingemi, Kristine S. Schonder, Carolyn T. Thorpe, Amit D. Tevar Norfolk, VA; Pittsburgh, PA.
- #D2419 **Human Metapneumovirus, a Neglected Respiratory Viral Infection in Abdominal Transplant Recipients.**
Brian Masters, T. Sparkes, W. Manitisitkul, H. Nace, N. Costa, A. Haririan Baltimore, MD.
- #D2420 † **TEMRA V δ 2^{neg} $\gamma\delta$ T Cell Analysis to Predict Post-Transplant CMV DNAemia.**
Lionel Couzi, Louis De Laforcade, Isabelle Garrigue, Xavier Sicard, Pierre Merville, Jean-Francois Moreau, Julie Dechanet-Merville, Vincent Pitard Bordeaux, France.

Infectious Diseases

9:30 AM — 6:30 PM

- #D2421 † **Urinary Tract Infections in Kidney Transplant Recipients: Types, Risk Factors and Consequences and the Threat of ESBL Organisms.**
Basu Gopal, Riyaz A. Asad, Golla Sudhakar, Anjali Mohapatra, Balaji Veeraraghavan, Anna T. Valson, Suceena Alexander, Shibu Jacob, Santosh Varughese, Chakko K. Jacob, Veerasamy Tamilarasi Vellore, Tamil Nadu, India.
- #D2422 † **Short Course of Low Dose Valganciclovir Prophylaxis for Cytomegalovirus Disease in Kidney Transplant Recipients.**
Basu Gopal, Golla Sudhakar, Anjali Mohapatra, Asha M. Abraham, Anna T. Valson, Suceena Alexander, Shibu Jacob, Santosh Varughese, Chakko K. Jacob, Veerasamy Tamilarasi Vellore, Tamil Nadu, India.
- #D2423 † **Clinical Outcomes and Virus Characteristics of Dengue in Kidney Transplant Recipients: Report of 11 Cases From a Single Center.**
Ida Maria M. Fernandes-Charpiot, Gabriela R. Souza, Mauricio L. Nogueira, Maria Alice S.F. Baptista, Adriana Sorrenti, Mario Abbud-Filho Sao Jose do Rio Preto, Sao Paulo, Brazil; Sao Jose do Rio Preto, Sao Paulo, Brazil.
- #D2424 † **Definition of CMV Quantitative PCR Threshold for Preemptive Therapy Among Heart Transplant Recipients in a High Prevalence Setting.**
Paula F.G. Telles, Carlos F.R. Lavagnoli, Pedro P.M. Oliveira, Lindemberg M. Silveira Filho, Karlos A. de S. Vilarinho, Luis F. Bachur, Sandra C.B. Costa, Sandra H.A. Bonon, Orlando Petrucci, Mariangela R. Resende Campinas, Brazil.
- #D2425 **Incidence and Outcome of Disseminated Varicella Zoster Infection Post Kidney Transplantation.**
Maria Chitasombat, Siriorn Watcharananun Bangkok, Thailand.

APÊNDICE 3

Threshold of CMV Quantitative Viral Load for Preemptive Therapy based on pp65 Antigenemia, Viral Kinetics and Clinical Outcome among Heart Transplant Recipients.

Authors: Paula Fernanda Gomes Telles¹, Carlos Fernando Ramos Lavagnoli², Pedro Paulo Martins de Oliveira², Lindemberg da Mota Silveira Filho², Karlos Alexandre de Sousa Vilarinho², Luis Felipe Bachur¹, Sandra Cecilia Botelho Costa³, Sandra Helena Alves Bonon⁴, Orlando Petrucci², Mariângela Ribeiro Resende¹.

¹ Discipline of Infectious Diseases at the Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil; ²Surgery Department, Heart Surgery Division, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil; ³ Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil; ⁴Laboratory of Diagnosis of Infectious Diseases and Antigenemia, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil.

Corresponding author: Mariângela Ribeiro Resende MD, PhD, Assistant Professor of Infectious Diseases, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas.

Tessália Vieira de Camargo, 126. Cidade Universitária -Barão Geraldo Campinas, SP – Brasil, 13083970

Tel: 55 19 35217098

Fax: 55 19 32894107 E mail: mresende@fcm.unicamp.br

Threshold of CMV Viral Load for Preemptive Therapy

Abstract

BACKGROUND: Although different surveillance strategies for cytomegalovirus (CMV) after solid organ transplant are recommended, a threshold for starting preemptive therapy has not been established.

OBJECTIVE: This study evaluated a viral load threshold for preemptive therapy (PT) in heart transplant recipients (HTR) based on pp65 antigenemia (pp65Ag) viral kinetics and clinical outcome in a high-prevalence setting.

METHODS: A prospective study was performed involving 25 HTR. Plasma samples were obtained weekly until 180 days post-transplantation. Pp65Ag and CMV quantitative nucleic acid amplification testing (QNAT) were analyzed concomitantly.

RESULTS: Of the 329 samples tested, 100 (30.3%) were positive by CMV QNAT, exclusively. Fifteen (60%) patients had active CMV infection or disease. Linearity was observed between the assays, and the area under the ROC curve was 0.8686493 (0.8081144 - 0.9291842). Regarding parameters, a threshold of ≥ 565 IU/ml (1,000 copies/ml) showed a diagnostic accuracy (DA) of 88.4% and a negative predictive value (NPV) of 92.9%. For a threshold ≥ 1695 IU/ml (3,000 copies/ml), DA was slightly reduced (87.2%), the NPV decreased to 88.7% and the sensitivity was 45%. After the antiviral treatment, the median time to total viral suppression of CMV was longer when measured by QNAT compared to pp65Ag ($p = 0.023$), although it was no longer among those who relapsed ($p=0.255$).

CONCLUSION: The local threshold chosen for beginning PT in asymptomatic HTR at intermediate risk was ≥ 565 IU/ml (1,000 copies/ml). Viral kinetics data suggested the possibility of an early suspension of the specific antiviral treatment based on a less-sensitive method (pp65Ag).

Key words: cytomegalovirus; heart transplantation; viral load; pp65 antigenemia;

Introduction

Despite the efficacy of preventive strategies, cytomegalovirus (CMV) remains one of the most common viral infections after heart transplant, with significant morbidity and occasional mortality, with an incidence between 9% and 35% (1;2).

The direct effects of CMV manifest as CMV disease (flu-like symptoms or tissue invasive disease) and the indirect effects results from an immune response in the context of prolonged viral replication, which can lead to opportunistic superinfection, increased incidence of acute rejection and cardiac allograft vasculopathy (CAV) (1-4).

The risk of CMV infection is highest in seronegative recipients (R-) of a seropositive donor organ (D+), and in patients who are heavily immunosuppressed, such as those receiving anti-lymphocyte antibody therapy as induction or for treatment of rejection (5;6). High CMV seroprevalence of more than 90% has been reported in the Brazilian adult population (7). Two major strategies are commonly employed for the prevention of CMV: universal prophylaxis and preemptive therapy. A preemptive strategy could be an option among R+ population according the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) and the Transplantation Society International CMV Consensus Group (1;7;8).

Given the magnitude and morbidity of CMV, viral monitoring has been strongly recommended. Either the pp65 antigenemia (pp65Ag) assay or a quantitative nucleic acid amplification testing (QNAT) can be used for the rapid diagnosis of CMV active infection/disease, for monitoring the response of CMV disease to antiviral treatment and for predicting CMV disease risk. However, recent guidelines have recommended QNAT as the preferred method due to its higher sensitivity, faster turnaround time, higher throughput and more accurate quantification of viral kinetics (1;9-11).

Considering that there are large interlaboratorial differences, a threshold for starting therapy cannot be established and should be defined at the local level through the combined efforts of laboratory personnel and clinicians considering specific characteristics of recipients. Thus, this study was performed to propose a threshold of viral load for monitoring CMV infection based on correlations among

pp65Ag results, viral kinetics and clinical outcome in a cohort of heart transplant recipients (HTR) in a high-prevalence setting.

Methodology

Patients and study design

A prospective study was performed, involving heart transplant recipients (HTR) from a Brazilian reference center from December 2011 to December 2013. The study was approved by the institutional ethical board. Plasma samples were obtained at weekly intervals until 180 days post-transplantation and whenever CMV disease was suspected. After transplantation, immunosuppressive treatment was based on cyclosporine, mycophenolate mofetil (or azathioprine) plus corticosteroids and sirolimus when necessary. Trimethoprim-sulfamethoxazole was used for *Pneumocystis jirovecii* prophylaxis and allopurinol when transplant was due to Chagas cardiomyopathy. No patients received intravenous immunoglobulins, ganciclovir, foscarnet, cidofovir or acyclovir for CMV prevention.

Data collection

The data were obtained prospectively during hospitalization and outpatient clinic for twelve months after heart transplantation. CMV serology data were obtained from recipient's medical records and from database of solid organ donors. Definitions of CMV disease were based on the American Society of Transplantation recommendations for use in clinical study in organ transplant recipients (12). Active CMV infection was defined at local level as the detection of pp65Ag ≥ 5 cells/100,000 leucocytes in two consecutive tests, regardless of symptoms. CMV disease was defined by evident attributable clinical symptoms to CMV and could be further categorized as a viral syndrome with fever, malaise, leukopenia and thrombocytopenia or as a tissue-invasive disease. Acute rejection was defined based on ISHLT, 2005 (13).

Preemptive therapy for prevention of CMV disease

Pre-emptive therapy was initiated when pp65Ag was ≥ 5 cells/100,000 leucocytes in two consecutive tests. Results of plasma CMV QNAT were not considered for clinical decision-making. Antiviral therapy was based on intravenous

ganciclovir 10 mg/kg/day for 21 days or 14 days after the last positive pp65Ag test. After the specific treatment, plasma samples continued to be obtained routinely.

Virological assays

A 5 ml volume of EDTA treated blood was collected from each patient. Two milliliter were used for the CMV Ag assay and processed within 4 to 6 hours of sample collection; plasma obtained from the remaining blood was used for the CMV QNAT assay. Pp65Ag and CMV QNAT were analyzed concomitantly, using commercial available kits. The CMV antigenemia test was carried out with commercially available monoclonal antibodies directed against CMV lower matrix protein pp65, according to the standard protocol [CMV Brite™ Turbo Kit (IQ Products) BV, Groningen, The Netherlands]. The number of CMV antigen-positive cells was counted per duplicate stain. The pp65Ag results were reported as the total number of positive cells/100,000 leukocytes. CMV quantitative polymerase chain reaction (CMV-DNA) was quantified on plasma samples by using the Q-CMV-Real Time Complete Kit (Nanogen Advanced Diagnostics S.p.A, Buttigliera Alta, Italy) according to the manufacturer's instructions. The assay consists of a real-time amplification reaction in a microplate with a programmable thermostat provided with a fluorescence detection optical system (thermal cycle for real time amplification). An amplification reaction specific for a region of the CMV MIEA gene (major immediate early antigen, HCMVUL123) and for a region of the human beta globin gene (promoter and 5'UTR region of the human beta globin gene), which is an internal control of inhibition, was performed in each well using DNA extracted from the samples. As the specific product of the amplification reaction increases, the fluorescence emission increases and is measured and recorded by the instrument. The processing of the data allows for the detection of the presence and titer of the CMV-DNA in the starting sample. The analytical sensitivity of this assay, in the linear measuring range, allows the quantification of between approximately 1,000,000 and approximately 20 molecules of target DNA in 5 µL of extracted DNA added to the amplification reaction.

Statistical analysis

The agreement between pp65Ag and CMV-QNAT was evaluated using the kappa coefficient (κ). Receiver-operating characteristic (ROC) curves for QNAT

optimal cut-off values were calculated for the specific pp65 antigenemia value (≥ 5 positive cells/100,000 leukocytes) as well as other assayed parameters. For categorical variables, chi-square and Fisher's exact tests were used when appropriate, and Student's t-test was employed for continuous variables. P-values less than 0.05 were considered statistically significant. The analysis was performed using Epi InfoTM (version 7, Atlanta, Georgia, US) and OpenEpi (Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, version 3.03).

Results

During the study period, 27 patients underwent heart transplant surgery, with two cases subsequently excluded because of early death, which occurred at less than 7 days after transplantation. Therefore, 25 patients were considered eligible and 329 plasma samples were obtained. Among the 25 HTR evaluated, 17 (68%) were male, with a median age of 51 years old (range 32-64). Idiopathic and Chagas cardiomyopathy were the most frequent baseline conditions. Pretransplantation CMV IgG serology was positive in 100% of recipients (R+) and in 75% of donors (D+) whose serology was available. Standard immunosuppressive therapy (cyclosporine plus mycophenolate mofetil plus corticosteroids) was used in all HTR. Two patients were switched from MMF to azathioprine due to Chagas disease reactivation and one subsequently to sirolimus (Table 1).

Clinical outcome

Of the 25 eligible patients, 15 (60%) had active CMV: 11 (73.3%) developed an active CMV infection, 4 (26.7%) had CMV disease; two were categorized with viral syndrome and two with tissue invasive disease. Recurrent CMV active episodes occurred in 6 (40%) patients, 5 of whom presented within 180 days post-transplantation (Table 2).

Comparison between pp65 antigenemia and QNAT

Of the 329 samples tested, 207 (62.9%) were positive by a single or both methods and 122 (37.1%) were negative. Results were discordant in 116 (35.3%) samples, of which 100 (30.3%) were CMV QNAT-positive exclusively. Median values of QNAT for detection of CMV infection and disease were 1883.4(3,334 copies/ml) and 9883.5 IU/ml (17,496 copies/ml), respectively ($p = 0.321$). Linearity was shown

between both methods, with the following median values of viral load corresponding to pp65Ag assay (positive cells/100,000 leukocytes): 0 (0-1); 64.4 (2-4); 350.8 (5-9) and 2258 (>10) IU/ml. Regarding the comparison of QNAT CMV parameters assay to pp65Ag, a threshold of ≥ 565 IU/ml (1,000 copies/ml) showed a diagnostic accuracy of 88.4%, a negative predictive value of 92.9%, and a level-specific likelihood ratio of a positive test of 9.675. For a threshold of > 1695 IU/ml (3,000 copies/ml), DA was slightly worse (87.2%) and NPV decreased to 88.7%, but sensitivity was only 45% (Table 3). The area under the ROC curve was 0.8686493 (0.8081144 - 0.9291842) (Figure 1).

Viral kinetics

Detection of any positive result with pp65Ag as well as QNAT was observed in a median interval of five weeks posttransplant ($p=0.966$). The initial viral load was higher in the group that received preemptive therapy, but the difference was not statistically significant (619 versus 584 UI/ml; $p=0.106$). After the antiviral treatment, the median time to total viral suppression of CMV was longer when measured by QNAT compared to pp65Ag (21 vs 14 days, $p = 0.023$; IC95 -19.8297 to -1.71025). At the moment of undetectable pp65Ag, the median decrease in CMV viral load was -1.73 log₁₀. Undetectable plasma viral loads were achieved in 46, 1% (6/13) of all first episodes at the end of ganciclovir therapy. Including all episodes, 36, 8% (7/18) of the total were negative at that time point.

Comparing the relapsing to the non-relapsing group, the initial viral load was not higher ($p=0.221$), and the time of viral clearance in the first episode was not different by either pp65Ag ($p=0.386$) or QNAT ($p=0.633$) assay (table 4). The time to undetectable viral load was not longer than pp65Ag among those who relapsed ($p=0.255$).

Discussion

This prospective cohort study allowed us to critically evaluate a viral load threshold for monitoring HTR, describe the viral kinetics and evaluate its clinical outcome. According to our pp65 antigenemia criteria, 60% of patients developed CMV active infection. This incidence is higher than that cited by McDevitt and Patel and Paya and Sénéchal et al, which was between 9 and 35% (14-16). Despite the

incidences cited above, it has been shown that most patients (88%) had some level of CMV DNAemia detected during the study period, as shown by Potena et al. (17). Four (16%) patients developed CMV disease, which is similar to previous HTR findings (15;16;18).

Our population was considered of intermediate risk for developing CMV disease, which allowed us to adopt a preemptive strategy. In this scenario, the determination of adequate threshold is a decisive clinical issue that should weigh the antiviral therapy toxicity and costs versus the effects of effective CMV prevention. Although both QNAT and pp65Ag are accepted as valid tools for monitoring CMV replication after solid organ transplant (SOT), more recent guidelines such as those of The Transplantation Society International CMV Consensus Group, published in 2013, have recommended QNAT over pp65Ag, mainly for centers which adopt preemptive strategies (1;10;19). This method has higher precision, a broader linear range, faster turnaround time, higher throughput, no influence from neutrophil count and less risk of contamination compared with qualitative methods (1;9;11).

As described previously, our data confirm that QNAT is more sensitive given that in the majority of discordant tests that were exclusively QNAT positive. Moreover, we demonstrated linearity and high accuracy between both methods. Our results showed similar CMV detection median time for both assays, although they evaluate different targets of virus replication (20;21)

Considering that the pp65Ag was our parameter for initiating preemptive therapy, as in the study by Gimenez et al in allogenic stem cell transplant recipients, higher initial viral loads were not predictive of the eventual need for treatment in this cohort (22;23). In contrast, Emery et al. demonstrated that the initial viral load and the rate of increase could identify patients at risk of developing high peak values and clinical disease among liver, kidney and bone marrow transplant patients (24). We hypothesize that this difference could be attributable to different characteristics of the study population, including receptor CMV status, type of transplantation, immunosuppression strategies, assay parameters and the time point of sample collection (25). Another consideration is that for this study, the viral load is not considered in clinical decisions regarding HTR management.

These data on the kinetics are the rationale for why QNAT has become the preferred and most widely used method for monitoring CMV (1;24;26-29). However, a lack of standardization between centers is a challenge, and a threshold for initiating therapy should be defined at the local level considering the specific characteristics of recipients.

In our study, the parameters of the QNAT CMV assay considering different thresholds were evaluated to start preemptive therapy. Because all enrolled patients included had an intermediate risk for CMV active infection/disease (R+), our primary objective was to improve the specificity and the positive predictive value to avoid a large number of unnecessary treatments, drug toxicity and admissions. Based on specificity, the most appropriate threshold should be greater than or equal to 1695 IU/ml (3000 copies/ml). However with this cut-off, six and eight cases would not have been treated compared to situations using thresholds of 565 and (1,000 copies/ml) 282 IU/ml (500 copies/ml), respectively. This choice could impact a large number of CMV active disease cases. Empirically, we choose greater than or equal to 565 IU/ml (1,000 copies/ml) as a threshold for our center. Although this level was defined in the present study, it will be validated in a prospective analysis in our population.

Although the different studies are not comparable, we cite below some thresholds defined by other authors. Li et al. defined thresholds of 1,000, 4,000, and 10,000 copies/ml in whole blood samples as cutoffs for starting antiviral therapy in groups with high, intermediate, and low risk of CMV disease, respectively (30). Kalpoe et al. defined an optimal cutoff value of 10,000 copies/ml for bone marrow-transplanted patients and 6,300 copies/ml in plasma samples for SOT patients (31). Humar et al., using plasma samples from a group of liver transplant recipients, described an optimal cut-off value for initiating therapy that was within the range of 2,000–5,000 copies/ml (32). More recently, Martín-Gandul et al. performed a prospective cohort study of consecutive CMV seropositive SOT patients undergoing kidney, liver and heart transplantation and established a viral load of 3983 IU/ml (2,600 copies/ml) as the optimal cut-off for initiating preemptive therapy (33). Greater agreement between the thresholds in different centers has been expected since 2010, when the World Health Organization released an international calibration standard for CMV QNAT (34;35). The definition of our threshold was particularly addressed to intermediate risk groups among adult populations with a high

prevalence of CMV, but clinical outcome correlations are the most appropriate parameter for validating the optimal value.

In terms of clinical outcome, recurrence of CMV infection/disease after treatment was experienced by 40% (6/15) of our patients, which is a slightly higher rate (19-30%) than that observed by other authors for different types of SOT (29;36-38). These data suggested the possibility of an early suspension of the specific antiviral treatment based on a less-sensitive method (pp65Ag). In our study, the median total duration of CMV DNAemia in the 1st episode was longer with QNAT than with pp65Ag. According to recent recommendations for treatment discontinuation, patients should have a minimum of one or two negative QNAT results, which minimizes the risk of recurrence and development of resistance (1;39). However we did not show an association between higher viral clearance time and recurrence (29;37).

In conclusion, we have established a threshold viral load of greater than or equal to 565 IU/ml (1,000 copies/ml) in plasma as the optimal value for starting preemptive therapy for CMV-seropositive HTR at intermediate risk. Validation and periodic reassessment of thresholds for the diagnosis of CMV active infection should be implemented at the local level. Considering the recent WHO CMV-QNAT standardization, inter-laboratorial comparison has become more reliable to establish more homogeneous thresholds in solid organ transplant recipients.

Reference List

1. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013 Aug 27:333-60.
2. Snyderman DR, Limaye AP, Potena L, Zamora MR. Update and review: state-of-the-art management of cytomegalovirus infection and disease following thoracic organ transplantation. *Transplant.Proc.* 2011 Apr:S1-S17.
3. Weill D. Role of cytomegalovirus in cardiac allograft vasculopathy. *Transpl.Infect.Dis.* 2001:44-8.
4. Koskinen PK, Kallio EA, Tikkanen JM, Sihvola RK, Hayry PJ, Lemstrom KB. Cytomegalovirus infection and cardiac allograft vasculopathy. *Transpl.Infect.Dis.* 1999 Jun:115-26.
5. Humar A, Lebranchu Y, Vincenti F, Blumberg EA, Punch JD, Limaye AP, Abramowicz D, Jardine AG, Voulgari AT, Ives J, et al. The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *Am.J.Transplant.* 2010 May:1228-37.
6. Delgado JF, Manito N, Almenar L, Crespo-Leiro M, Roig E, Segovia J, Vazquez de Prada JA, Lage E, Palomo J, Camprecios M, et al. Risk factors associated with cytomegalovirus infection in heart transplant patients: a prospective, epidemiological study. *Transpl.Infect.Dis.* 2011 Apr:136-44.
7. Souza MA, Passos AM, Treitinger A, Spada C. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2010 Jul:359-61.
8. Potena L, Humar A. Cytomegalovirus in Cardiothoracic Transplantation. In: Mooney LM, Hannan M, Husain S, et al., editors. *Diagnosis and Management of Infectious Diseases in Cardiothoracic Transplantation and Mechanical Circulatory Support*. 1st ed. Philadelphia: Elsevier; 2011. p. 223-35.
9. Piiparinen H, Hockerstedt K, Gronhagen-Riska C, Lautenschlager I. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. *J.Clin.Virol.* 2004 Jul:258-66.
10. Torre-Cisneros J, Farinas MC, Caston JJ, Aguado JM, Cantisan S, Carratala J, Cervera C, Cisneros JM, Cordero E, Crespo-Leiro MG, et al. GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 2011 Dec:735-58.
11. Allice T, Enrietto M, Pittaluga F, Varetto S, Franchello A, Marchiaro G, Ghisetti V. Quantitation of cytomegalovirus DNA by real-time polymerase chain reaction in peripheral blood specimens of patients with solid organ transplants: comparison with end-point PCR and pp65 antigen test. *J.Med.Virol.* 2006 Jul:915-22.

12. Humar A, Michaels M. American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am.J.Transplant.* 2006 Feb:262-74.
13. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, Andersen CB, Angelini A, Berry GJ, Burke MM, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J.Heart Lung Transplant.* 2005 Nov:1710-20.
14. Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin.Microbiol.Rev.* 1997 Jan:86-124.
15. McDevitt LM. Etiology and impact of cytomegalovirus disease on solid organ transplant recipients. *Am.J.Health Syst.Pharm.* 2006 Oct 1:S3-S9.
16. Senechal M, Dorent R, du Montcel ST, Fillet AM, Ghossoub JJ, Dubois M, Pavie A, Gandjbakhch I. Monitoring of human cytomegalovirus infections in heart transplant recipients by pp65 antigenemia. *Clin.Transplant.* 2003 Oct:423-7.
17. Potena L, Holweg CT, Vana ML, Bashyam L, Rajamani J, McCormick AL, Cooke JP, Valentine HA, Mocarski ES. Frequent occult infection with Cytomegalovirus in cardiac transplant recipients despite antiviral prophylaxis. *J.Clin.Microbiol.* 2007 Jun:1804-10.
18. Casquero S, Rangel D, Lage E, Sobrino M, Cristobo P, Cordero E, Cisneros JM. Preemptive therapy in the prevention of cytomegalovirus disease in high- and low-risk heart transplant recipients. *Transplant.Proc.* 2012 Sep:2113-4.
19. Preiksaitis JK, Brennan DC, Fishman J, Allen U. Canadian society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *Am.J.Transplant.* 2005 Feb:218-27.
20. Gentile G, Picardi A, Capobianchi A, Spagnoli A, Cudillo L, Dentamaro T, Tendas A, Cupelli L, Ciotti M, Volpi A, et al. A prospective study comparing quantitative Cytomegalovirus (CMV) polymerase chain reaction in plasma and pp65 antigenemia assay in monitoring patients after allogeneic stem cell transplantation. *BMC.Infect.Dis.* 2006:167.
21. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin.Microbiol.Rev.* 2009 Jan:76-98, Table.
22. Munoz-Cobo B, Solano C, Costa E, Bravo D, Clari MA, Benet I, Remigia MJ, Montoro J, Navarro D. Dynamics of cytomegalovirus (CMV) plasma DNAemia in initial and recurrent episodes of active CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation setting: implications for designing preemptive antiviral therapy strategies. *Biol.Blood Marrow Transplant.* 2011 Nov:1602-11.
23. Gimenez E, Munoz-Cobo B, Solano C, Amat P, Navarro D. Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients in the era of highly sensitive real-time PCR assays: does it have any clinical value? *J.Clin.Microbiol.* 2014 Feb:654-6.

24. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 2000 Jun 10:2032-6.
25. Atabani SF, Smith C, Atkinson C, Aldridge RW, Rodriguez-Peralvarez M, Rolando N, Harber M, Jones G, O'Riordan A, Burroughs AK, et al. Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. *Am.J.Transplant.* 2012 Sep:2457-64.
26. Lao WC, Lee D, Burroughs AK, Lanzani G, Rolles K, Emery VC, Griffiths PD. Use of polymerase chain reaction to provide prognostic information on human cytomegalovirus disease after liver transplantation. *J.Med.Virol.* 1997 Mar:152-8.
27. Caliendo AM, St GK, Allega J, Bullotta AC, Gilbane L, Rinaldo CR. Distinguishing cytomegalovirus (CMV) infection and disease with CMV nucleic acid assays. *J.Clin.Microbiol.* 2002 May:1581-6.
28. Razonable RR, van CH, Brown RA, Wilson JA, Harmsen WS, Wiesner RH, Smith TF, Paya CV. Dynamics of cytomegalovirus replication during preemptive therapy with oral ganciclovir. *J.Infect.Dis.* 2003 Jun 1:1801-8.
29. Humar A, Kumar D, Boivin G, Caliendo AM. Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with CMV disease. *J.Infect.Dis.* 2002 Sep 15:829-33.
30. Li H, Dummer JS, Estes WR, Meng S, Wright PF, Tang YW. Measurement of human cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients. *J.Clin.Microbiol.* 2003 Jan:187-91.
31. Kalpoe JS, Kroes AC, de Jong MD, Schinkel J, de Brouwer CS, Beersma MF, Claas EC. Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. *J.Clin.Microbiol.* 2004 Apr:1498-504.
32. Humar A, Gregson D, Caliendo AM, McGeer A, Malkan G, Krajden M, Corey P, Greig P, Walmsley S, Levy G, et al. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Transplantation* 1999 Nov 15:1305-11.
33. Martin-Gandul C, Perez-Romero P, Sanchez M, Bernal G, Suarez G, Sobrino M, Merino L, Cisneros JM, Cordero E. Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection. *J.Clin.Virol.* 2013 Jan:13-8.
34. Beam E, Dioverti V, Razonable RR. Emerging cytomegalovirus management strategies after solid organ transplantation: challenges and opportunities. *Curr.Infect.Dis.Rep.* 2014 Sep:419.
35. Collaborative Study Group Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)-Based Assays. WHO/BS/10.2138 Fryer JF HAARMP. Geneva: 2010 Oct 18.
36. Falagas ME, Snyderman DR, Griffith J, Werner BG, Freeman R, Rohrer R. Clinical and epidemiological predictors of recurrent cytomegalovirus disease in orthotopic liver transplant

recipients. Boston Center for Liver Transplantation CMVIG Study Group. Clin.Infect.Dis. 1997 Aug:314-7.

37. Humar A, Uknis M, Carlone-Jambor C, Gruessner RW, Dunn DL, Matas A. Cytomegalovirus disease recurrence after ganciclovir treatment in kidney and kidney-pancreas transplant recipients. Transplantation 1999 Jan 15:94-7.
38. Shanahan A, Malani PN, Kaul DR. Relapsing cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. Transpl.Infect.Dis. 2009 Dec:513-8.
39. Humar A, Snyderman D. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. Am.J.Transplant. 2009 Dec:S78-S86.

Table 1. Distribution of heart transplanted patients according demographic and clinical characteristic data.

	CMV group		Non CMV group		P-Value	OR	CI95%
	N	%	N	%			
Patients	15	60	10	40	---	---	---
Transplant recipient data							
Age y Median (range)	51(32-63)		50.5 (39-64)		0.390	---	-10.65, 4.31
Gender male	9	60	8	80	0.400	0.390	0.03, 3.07
Transplant donor data							
Age y Median (range)	29(17-45)		23.5(17-40)		0.401	---	-4.26, 10.26
Gender male	14	93.3	7	70	0.267	5.560	0.37, 336.90
Pretransplantation cardiomyopathy							
Idiopathic-dilated	6	40	3	30	0.939	1.530	0.22, 12.95
Chagas-dilated	3	20	3	30	0.911	0.596	0.06, 5.73
Valvular-dilated	2	13.3	2	20	>0.999	0.628	0.04, 10.28
Ischemic- dilated	2	13.3	---	--	0.700	undefined	0.12, undefined
Others ¹	2	13.3	2	20	>0.999	0.628	0.04, 10.28
CMV serostatus (donor /recipient)							
D-/R+	3	20	2	20	>0.999	1	0.09, 14.54
D+/R+	11	73.3	4	40	0.212	3.875	0.57, 31.58
D (unknown)/ R+	1	6.67	4	40	0.128	0.118	0.00, 1.51
Immunosuppression							
Standard regimen							
CyA+MMF+ PDN	15	100	10	100	---	---	---
Switched regimen							
CyA+AZA+ PDN ²	2	13.3	---	---	---	---	---
mTOR inhibitors (sirolimus) ³	1	6.7	---	---	---	---	---

¹ Congenital, viral, familial and puerperal cardiomyopathy ²Two patients switched to azathioprine due to reactivation of Chagas disease ³ One patient switched to sirolimus due to renal failure. OR, odds ratio; CYa, cyclosporine; MMF, mycophenolate mofetil; AZA, azathioprine; PDN, prednisone.

Table 2. Distribution of heart transplanted recipients with CMV infection/disease according clinical outcome.

Clinical outcome	N	%
CMV active infection	11	73.3
CMV disease	4	26.7
Viral syndrome	2	13.3
Tissue invasive disease	2	13.3
Interval from HTx to CMV infection (weeks)		
Median (range)	7 (3-22)	
Outcome of CMV infection after antiviral treatment		
Cure	15	100
New episode of CMV infection	6	40
Interval from first episode and recurrence (weeks)		
Median (range)	14 (11- 57)	
Interval from HTx and second episode (weeks)		
Median (range)	20(13-62)	

HTx, Heart Transplantation

Table 3. Assay parameters of QNAT for CMV according different thresholds.

Parameters	Threshold QNAT (International Units/ml)		
	≥282	≥565	≥1695
Sensitivity	81.67%	68.33%	45.00%
Specificity	90.33%	92.94%	96.65%
Positive Predictive Value	65.33%	68.33%	75.00%
Negative Predictive Value	95.67%	92.94%	88.74%
Diagnostic Accuracy	88.75%	88.45%	87.23%
Likelihood ratio of a Positive Test	8.449	9.675	13.450
Likelihood ratio of a Negative Test	0.203	0.341	0.569
Cohen's kappa (Unweighted)	0.656	0.613	0.493
Number of CMV infection detected ¹	15	13	7

¹per patient

Table 4: Comparison of viral kinetics in relapsing versus non-relapsing group

	Relapsing Group N=6	Non Relapsing Group N=9	p
Initial viral load (median; min-max) UI/ml	1022 (29-3281)	584 (16-49219)	0.221
Time to negativation Agpp65 (days)	7(7-14)	14(7-14)	0.386
Time to negativation QNAT (days)	14(7-63)	24.5(14-63)	0.633
Number of patients with detectable viral load after treatment of the 1 st episode	3/6 (50%)	3/7 •(42,9%)	0.825

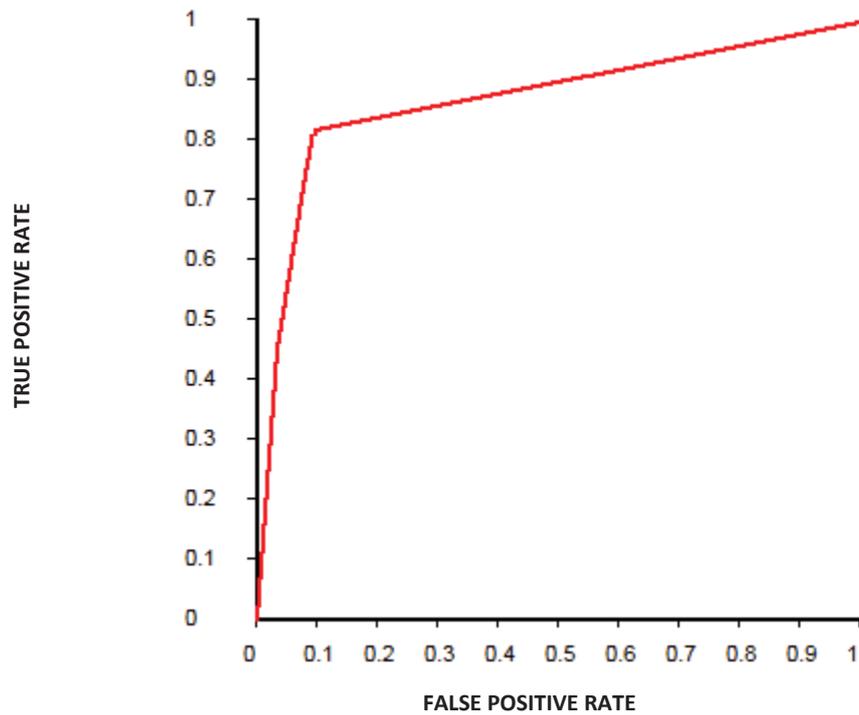


Figure 1: Receive Operator Characteristic (ROC) curve to validate CMV viral load threshold for preemptive therapy.

ANEXO 1



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 20/12/11
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1241/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 1126.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “IMPACTO CLÍNICO DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA NOS GENES UL97 DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO (HCMV) EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE ÓRGÃOS SÓLIDOS (SOTR) OU DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (HSCT)”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Paula Fernanda Gomes Telles

INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 01/12/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 20/12/12 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II – OBJETIVOS.

Investigar a presença de mutações nos genes UL97 do citomegalovírus humano (HCMV), em pacientes que receberam transplantes de órgãos sólidos ou de células hematopoiéticas e que apresentaram falência clínica ou virológica pós tratamento com ganciclovir. Estabelecer os fatores de risco e de evolução clínica desses pacientes, segundo a presença de mutações de resistência nos genes UL97.

III – SUMÁRIO.

O presente estudo pretende analisar a prevalência de resistência genotípica ao ganciclovir, estabelecendo os fatores de risco associados a esta condição. Para tanto, pacientes maiores de 18 anos, que receberam transplantes SOT ou TCTH serão avaliados segundo antigenemia para CMV real time PCR. Espera-se estabelecer prevalência de resistência genotípica deste grupo de pacientes, selecionados entre fevereiro/2012 e dezembro de 2013. Cronograma e orçamento adequados ao estudo. Os autores solicitam dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, uma vez que não haverá coleta de material adicional àquele normalmente utilizado na rotina diagnóstica. Tal material é rotineiramente armazenado no lab. de doenças infecciosas e segue regulamento em vigor desde 25.04.2006 e aprovados por este CEP.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após análise crítica do protocolo não encontramos riscos ou prejuízos para os sujeitos da pesquisa (possibilidade e gravidade). Os autores do projeto se mostram com o compromisso de cumprir as exigências da Resolução 196/96 e suas complementares. O trabalho está elaborado dentro das normas éticas e científicas. A dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é adequada.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

