



Arlete Milan

Correlação do Citomegalovírus e do Herpesvírus Humano 8 nas Infecções Bacterianas em Pacientes Submetidos à Transplante de Fígado

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

Arlete Milan

Correlação do Citomegalovírus e do Herpesvírus Humano 8 nas Infecções Bacterianas em Pacientes Submetidos à Transplante de Fígado

ORIENTAÇÃO: Profa. Dra. Raquel Silveira Bello Stucchi

COORIENTAÇÃO: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção de título de Doutora em Clínica Médica, na área de Concentração Clínica Médica.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por ARLETE MILAN e orientada pela PROFa. DRa. RAQUEL SILVEIRA BELLO STUCCHI.

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS
2013

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

M589c Milan, Arlete, 1972-
Correlação do citomegalovírus e do Herpesvírus Humano 8 nas infecções bacterianas em pacientes submetidos a transplante de fígado / Arlete Milan. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Raquel Silveira Bello Stucchi.
Coorientador: Sandra Cecília Botelho Costa.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citomegalovírus. 2. Herpesvírus Humano 8. 3. Transplante de fígado. I. Stucchi, Raquel Silveira Bello, 1958-. 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: Correlation of cytomegalovirus and Human Herpesvirus 8 in bacterial infections in patients undergoing liver transplantation

Palavras-chave em inglês:

Cytomegalovirus
Human Herpesvirus 8
Liver transplantation

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Raquel Silveira Bello Stucchi [Orientador]
Ângela Cristina Malheiros Luzo
Luiz Roberto Lopes
Renato Ferreira da Silva
Estela Regina Ramos Figueira

Data de defesa: 27-09-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ARLETE MILAN

ORIENTADORA: PROF. DR. RAQUEL SILVEIRA BELLO STUCCHI

COORIENTADORA: SANDRA CECILIA BOTELHO COSTA

MEMBROS:

1. PROF. DR. RAQUEL SILVEIRA BELLO STUCCHI



2. PROF. DR. ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO



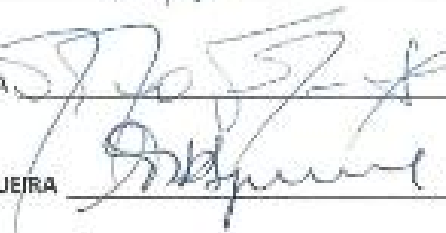
3. PROF. DR. LUIZ ROBERTO LOPES



4. PROF. DR. RENATO FERREIRA DA SILVA



5. PROF. DR. ESTELA REGINA RAMOS FIGUEIRA



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

Data: 27 de setembro de 2013

DEDICATÓRIA

Se minha mãe Marli estivesse presente estaria feliz. Junto a Deus está muito mais. Jamais esquecerei seu olhar de alegria, ternura e suas palavras encorajadoras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com a realização deste trabalho, em especial:

Ao meu companheiro de todas as horas, **Jesus**, que sempre guia os meus passos pela estrada da vida.

Aos meus pais **Dovanil** e **Marli** (in memorian), dos quais eu tenho muito orgulho, por terem me apoiado em todos os momentos de minha vida, me dando segurança e amor. Graças aos ensinamentos que me passaram, hoje tenho este trabalho realizado.

Aos meus irmãos **Sidnei** e **Vanderlei**, às minhas cunhadas **Regiane** e **Silvana** pelo carinho, pela amizade e amor demonstrado.

Aos meus maravilhosos sobrinhos **Vanderlei**, **Leonardo**, **Pietro** e **Enzo**, por tornar a minha vida mais feliz. Eu os amo demais!

À Profa. Dra. **Raquel Silveira Bello Stucchi** por sua orientação sem as quais esta tese não teria sido concluída.

À coorientadora Profa. Dra. **Sandra Cecília Botelho Costa** pela amizade e compreensão.

À Profa. Dra. **Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin** pela contribuição, pelo apoio, pela força, pelo ensinamento, pelas maravilhosas discussões de aprendizado e pela realização na análise estatística dos artigos.

À Profa. Dra. **Maria de Lourdes Rios Barjas de Castro**, ao Prof. Dr. **Luiz Roberto Lopes** e ao Prof. Dr. **Jazon Romilson de Souza Almeida** pelas contribuições e sugestões no exame de qualificação.

À Profa. Dra. **Ângela Cristina Malheiros Luzo**, ao Prof. Dr. **Luiz Roberto Lopes**, à Profa. Dra. **Estela Regina Ramos Figueira**, ao Prof. Dr. **Renato Ferreira da Silva**, ao Prof. Dr. **Jazon Romilson de Souza Almeida**, ao Prof. Dr. **Francisco Hideo Aoki** e ao Prof. Dr. **Enio David Mente** por aceitarem compor a banca de defesa da tese.

À **Ana Maria Sampaio** por ter-me acolhido no laboratório e ter-me apresentado a um projeto pelo qual me encantei.

À **Sandra Helena Alves Bonon** do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia por fornecer os resultados de antigenemia do citomegalovírus.

À **Paula Durante Andrade** do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecto Contagiosas por Técnicas de Biologia Molecular por fornecer os resultados da N-PCR do citomegalovírus.

À Profa Dra. **Elza Coltrim Soares** e ao Prof. Dr. **José Murilo Robilotta Zeitune** e às queridas colegas do Laboratório de Bacteriologia e Hepatologia que conquistei e pelas quais tenho enorme carinho: **Nanci**, **Natalícia** e **Elizabeth**.

Ao Prof. Dr. **Luis Claudio Rossi** pela imensa contribuição na sorologia do HHV-8 e por fornecer os resultados de sorologia do citomegalovírus.

À **Lisandra Akemi Suzuki** do Laboratório de Imunoquímica, pela ajuda nos procedimentos de sorologia do HHV-8.

À **Elizabeth Maria Afonso Rabelo Gonçalves** pela estimável disponibilidade na padronização das reações de N-PCR`s do HHV-8.

À **Ana Maria Sampaio** e a **Célia Regina Pavan** que auxiliaram na coleta de amostras no ambulatório de transplante hepático, por toda colaboração oferecida..

À **Ana Carolina Guardia da Silva** sempre incentivadora, companheira e pela participação na escrita de trabalhos

À **Ana Carolina Carlini Russo Franco** agradeço pela oportunidade da amizade sincera, exemplo de profissional, de ser humano verdadeiro e pelo apoio emocional nos momentos difíceis.

À amiga **Joselaine Giacomassi Batalha** pela amizade, carinho e estímulo permanente.

À **Michelle Viviane Sa dos Santos Rondon** pela contribuição na formatação da tese.

Ao Dr. **Abnadar Reis Filho** pelo incentivo, carinho e atenção.

Ao Dr. **José Luis Amim Zabeu** pelo carinho, compreensão e apoio na busca da realização.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, processo nº 143186, pela bolsa de doutorado plena PG concedida durante o doutorado.

À equipe da Unidade de Transplante de Fígado, à Profa. Dra. **Ilka**, às cirurgiãs **Elaine** e **Anáisa**, às enfermeiras **Elizabete** e **Fátima**, à assistente social **Cristina**, às psicólogas **Ana Maria** e **Izabel**, à fisioterapeuta **Áurea**, à secretária **Deusa** pela amizade.

A todos os **pacientes**, que desprendidamente compreenderam a importância desse trabalho e aceitaram participar desse estudo, meu profundo respeito e gratidão.

Meus sinceros agradecimentos

EPÍGRAFE

“Eu sou a luz do mundo, quem me segue não andará nas trevas, mas terá a luz da vida”. (Jô 8,12)

RESUMO

O transplante de fígado tornou-se a terapia mais eficaz para o tratamento dos pacientes com doença hepática terminal, sendo que o sucesso pode ser limitado por complicações infecciosas no primeiro ano pós-transplante. O citomegalovírus é o tipo de infecção viral mais comum e está relacionado com a morbidade e mortalidade. A infecção bacteriana é uma séria complicação em pacientes transplantados de fígado. O *Herpesvírus humano 8* tem uma distribuição global heterogênea, poucos estudos existem em pacientes submetidos à transplante de fígado. Nosso objetivo foi correlacionar a infecção do citomegalovírus e do *Herpesvírus Humano 8* com a ocorrência de infecções bacterianas nos pacientes submetidos à transplante de fígado. Foram incluídos pacientes monitorados por seis meses para a detecção da infecção do citomegalovírus e do *Herpesvírus Humano 8*. As amostras foram realizadas no momento da cirurgia e semanalmente até o segundo mês, quinzenalmente no terceiro mês e mensalmente do quarto ao sexto mês. A infecção por citomegalovírus foi definida por antigenemia positiva (> três células) ou dois testes positivos de Nested-Reação em Cadeia de Polimerase com intervalo de 30 dias associada a sintomas clínicos. A metodologia para o diagnóstico de infecção bacteriana foi por meio de cultura de urina e de sangue através de testes bioquímicos e automatizado *BacT / ALERT® 3 D – VITEK® (bioMérieux, França)*. A investigação para o *Hespervírus Humano 8* foi através da Nested-Reação em Cadeia de Polimerase da região Open Reading Frame-26 e confirmado pela sorologia da imunoglobulina G – Enzyme Linked Immunosorbent Assay the *Advanced Biotechnologies Incorporated (Maryland, EUA)*. Teste do qui-quadrado foi utilizado para as variáveis dicotômicas com diferenças significativas quando $p < 0,05$. Cinquenta pacientes foram acompanhados no período de fevereiro de 2008 a janeiro de 2010. Vinte e um (42%) pacientes tiveram infecção bacteriana. Dezesesseis pacientes (32%) apresentaram infecção por citomegalovírus. Dos 16 pacientes, 13 (81%) mostraram infecção bacteriana concomitante. Trinta e quatro pacientes (68%) não tiveram infecção por citomegalovírus e deles, 8 (24%) tiveram infecções bacterianas. Não encontramos em nossa casuística positividade para o *Herpesvírus Humano 8*. As infecções bacterianas pós-transplante de fígado foram associadas a infecção ativa pelo citomegalovírus.

Palavras chaves: Citomegalovírus, *Herpesvírus Humano 8* e Transplante de Fígado

ABSTRACT

Liver transplantation has become the most effective therapy for the treatment of patients with end-stage liver disease but its success can be limited by infectious complications during the first year post-transplant. Cytomegalovirus is the most common viral infection and it is associated with morbidity and mortality. Bacterial infection is a serious complication in liver transplant patients. *Human Herpesvirus 8* has a global distribution heterogeneous; there are few studies in patients undergoing liver transplantation. Our objective was to correlate infection of cytomegalovirus and with the occurrence of bacterial infections in patients undergoing liver transplantation. This study included patients monitored for six months for detection of cytomegalovirus and of *Human Herpesvirus 8* infection. The sample collections were performed at the time of surgery, weekly until the second month, twice a month in the third month, and monthly from the fourth to the sixth month. Cytomegalovirus infection was defined by positive antigenemia (> three cells) or two positive Nested-Polymerase Chain Reaction tests associated with clinical symptoms. The methodology for the diagnosis of bacterial infection was through biochemical tests and the automated *BacT / ALERT® 3 D* – VITEK® (*bioMérieux*, França) for identification and antibiogram using samples of urine and blood cultures. Research for *Human Herpesvirus 8* was by Nested-Polymerase Chain Reaction region Open Reading Frame-26 and confirmed by serology IgG – Enzyme Linked Immunosorbent Assay the *Advanced Biotechnologies Incorporated* (Maryland, EUA). Chi-square test was used for dicotomic variables with significant differences when $p < 0,05$. Fifty patients were followed up from february 2008 to january 2010. Twenty-one (42%) patients had bacterial infection. Sixteen patients (32%) had citomegalovirus infection. Of the 16 patients, 13 (81%) showed concomitant bacterial infection. Thirty-four patients (68%) had no citomegalovirus infection, and of them, 8 (24%) had bacterial infections. Not found in our sample positive for *Human Herpesvirus 8*. Bacterial infections after liver transplantation were associated with cytomegalovirus active infection.

Keywords: Cytomegalovirus, *Human Herpesvirus 8* and Liver Transplantation

LISTA DE ABREVIATURAS

CMV	Citomegalovírus
HHV-8	<i>Herpesvírus Humano 8</i>
SK	Sarcoma de Kaposi
AGM	Antigenemia
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
QNAT	Teste de Ácido Nucléico Quantitativo
N-PCR	Nested-Reação em Cadeia de Polimerase
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ORF	Open Reading Frame
HC	Hospital de Clínicas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
IgG	Imunoglobulina G
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTH	Unidade de Transplante de Fígado
°C	Graus Celsius
mg	Miligrama
kg	kilograma

Continuação LISTA DE ABREVIATURAS

L	Litro
mL	Mililitro
gr	Grama
EV	Endovenoso
h	Hora
LPC	Laboratório de Patologia Clínica
CO ₂	Dióxido de Carbono
+	Positivo
-	Negativo
NaOH	Hidróxido de Sódio
Tris-HCL	Hidroximetil-Ácido Clorídrico
NH ₄ HCL ₃	Bicarbonato de Sódio
M	Molar
NH ₄ CL	Cloreto de Amônio
rpm	Rotações por Minuto
μL	Microlitro
KCL	Cloreto de Potássio
MgCL ₂	Cloreto de Magnésio
mM	Milimolar
μM	Micromolar
PCO ₃	Iniciador PCO ₃ (Primer)

Continuação...

Continuação LISTA DE ABREVIATURAS

PCO4	Iniciador PCO4 (Primer)
DNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatados
dATP	Desoxirribonucleotídeo Adenina Trifosfato
dCTP	Desoxirribonucleotídeo Citosina Trifosfato
dGTP	Desoxirribonucleotídeo Guanina Trifosfato
dTTP	Desoxirribonucleotídeo Timidina Trifosfato
Taq	Thermmus Aquaticus
PBS	Tampão Fosfato Salino
β	Beta
MIE4	Iniciador MIE4 (Primer)
MIE5	Iniciador MIE5 (Primer)
pb	Pares de Bases
IE1	Iniciador IE1 (Primer)
IE2	Iniciador IE2 (Primer)
KS4	Iniciador KS4 (Primer)
KS5	Iniciador KS5 (Primer)
KS1	Iniciador KS1 (Primer)
KS2	Iniciador KS2 (Primer)
N	Negativo
S	Positivo
Pc	Paciente

Continuação...

Continuação LISTA DE ABREVIATURAS

D+	Dia Pós Transplante
FA	Fosfatase Alcalina
TGO	Aspartato Aminotransferase
TGP	Alanina Aminotransferase
ABI	<i>Advanced Biotechnologies Incorporated</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
nm	Nanômetro
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FAEPEX	Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão
PROAP	Projeto de Orientação e Atualização Profissional
IgM	Imunoglobulina M
Nº	Número
INF. BACT.	Infecção Bacteriana
χ^2	Teste Qui-Quadrado
<i>P</i>	Teste de Fischer
CMV+	Citomegalovírus Positivo
CMV-	Citomegalovírus Negativo
FK	Tracolimus
SIR	Sirolimus
NSI	Nível Sérico Imunossupressor
AH	Alta Hospitalar

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1:	Sequência nucleotídica dos iniciadores (“primers”) utilizados para a detecção do gene humano da β -globina para o citomegalovírus e para o <i>Herpesvírus Humano 8</i>	112
Tabela 2:	Sequência nucleotídica dos iniciadores (“primers”) utilizados para a detecção do citomegalovírus na primeira reação da Reação em Cadeia de Polimerase	115
Tabela 3:	Sequência nucleotídica dos iniciadores (“primers”) utilizados para a detecção do citomegalovírus na segunda reação da Nested-Reação em Cadeia de Polimerase	115
Tabela 4:	Sequência nucleotídica dos iniciadores (“primers”) utilizados para a detecção da região ORF-26 do <i>Herpesvírus Humano 8</i> na primeira reação da Reação em Cadeia de Polimerase	117
Tabela 5:	Sequência nucleotídica dos iniciadores (“primers”) utilizados para a detecção da região ORF-26 do <i>Herpesvírus Humano 8</i> na segunda reação da Nested-Reação em Cadeia de Polimerase	118
Tabela 6:	Composição dos reagentes do kit de sorologia da imunoglobulina G do <i>Herpesvírus Humano 8</i> da <i>Advanced Biotechnologies Incorporated</i>	120
Tabela 7:	Distribuição das etiologias da cirrose hepática	69
Tabela 8:	Freqüência dos exames realizados nas amostras dos pacientes monitorizados para o citomegalovírus	70
Tabela 9:	Freqüência da infecção do citomegalovírus por antigenemia e por Nested-Reação em Cadeia de Polimerase dos pacientes durante o monitoramento	70
Tabela 10	Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, <i>Herpesvírus Humano 8</i> e infecção bacteriana – Semana zero	121
Tabela 11:	Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, <i>Herpesvírus Humano 8</i> e infecção bacteriana – Semanas um e dois	123
Tabela 12:	Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, <i>Herpesvírus Humano 8</i> e infecção bacteriana – Semanas três e quatro	125

Continuação...

	Pág.
Tabela 13: Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, <i>Herpesvírus Humano 8</i> e infecção bacteriana – Semanas cinco e seis.....	127
Tabela 14: Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, <i>Herpesvírus Humano 8</i> e infecção bacteriana – Semanas sete e oito	129
Tabela 15: Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, <i>Herpesvírus Humano 8</i> e infecção bacteriana – Semanas 10 e 12	131
Tabela 16: Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, <i>Herpesvírus Humano 8</i> e infecção bacteriana – Semanas 14 e 20	133
Tabela 17: Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, <i>Herpesvírus Humano 8</i> e infecção bacteriana – Semana 24	135
Tabela 18: Frequência dos microrganismos encontrados nos 50 pacientes do estudo	73
Tabela 19: Manifestações clínicas, alterações laboratoriais, sítio cirúrgico e imunossupressão observadas nos prontuários dos pacientes em estudo	137

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Estrutura morfológica dos <i>Herpesvírus</i>	42
Figura 2: Gel de agarose visto à luz ultravioleta exibindo a Nested-Reação em Cadeia de Polimerase para <i>Herpesvírus Humano 8</i>	75
Figura 3: Placa de ELISA mostrando duas colunas de teste para IgG do <i>Herpesvírus Humano 8</i>	76

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1: Número de episódios de positividade dos exames para citomegalovírus em Nested-Reação em Cadeia de Polimerase, em antigenemia e em infecção bacteriana de acordo com a semana de coleta	71
Gráfico 2: Freqüência de infecção por citomegalovírus observada no período de fevereiro de 2008 à janeiro de 2010 associadas ou não à infecção bacteriana ($\chi^2 = 12,61$; $P = 0,0004$)	72
Gráfico 3: Freqüência de agentes etiológicos encontrados em hemoculturas e uroculturas de acordo com a positividade do citomegalovírus	74

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo	xv
Abstract	xix
Lista de abreviaturas	xxiii
Lista de tabelas	xxvii
Lista de figuras	xix
Lista de gráficos	xxxí
Introdução	37
1.Características biológicas do citomegalovírus e do HHV-8	41
2.Características morfológicas e estruturais do citomegalovírus e do HHV-8	41
3.Transmissão e epidemiologia do citomegalovírus e do HHV-8	42
4.Manifestações clínicas do citomegalovírus e do HHV-8	44
5.Diagnóstico laboratorial para o citomegalovírus e para o HHV-8	46
5.1.Método imuno-histoquímico para o citomegalovírus: Detecção do antígeno pp 65 viral – antigenemia	47
5.2.Teste de Ácido Nucléico Quantitativo para o citomegalovírus	48
5.3.Métodos moleculares para o citomegalovírus e para o HHV-8	49
5.3.1.Reação em Cadeia de Polimerase em <i>Tempo Real</i>	49
5.3.2.Reação em Cadeia de Polimerase	49
5.3.3.Nested-Reação em Cadeia de Polimerase	49
5.4.Método sorológico para o HHV-8	50
Objetivos	51
1.Geral	53
2.Específico	53
Métodos	55
1.Casuística	57
1.1.Critérios de inclusão	57
1.2.Critérios de exclusão	57

1.3.População de estudo	58
1.4.Coleta das amostras	59
1.5.Protocolo Pós-Transplante	60
2.Cultura de líquidos biológicos	60
2.1.Critérios para caracterizar infecção bacteriana	61
3. Extração do DNA de leucócitos de sangue periférico com NaOH e Tris-CL	61
4. Reação em Cadeia de Polimerase para detecção do gene humano de β -globina para o citomegalovírus e para o HHV-8	62
5. Citomegalovírus	62
5.1.Antigenemia - Detecção do antígeno pp65 viral do citomegalovírus em neutrófilos do sangue periférico	62
5.2.Dupla Reação em Cadeia de Polimerase para detecção do DNA do citomegalovírus em leucócitos de sangue periférico	62
5.3.Critérios para diagnóstico de infecção do citomegalovírus	62
6. <i>Herpesvírus Humano 8</i>	63
6.1.Amplificação gênica pela PCR e pela N-PCR para detecção da região ORF-26 do HHV-8	63
6.2.Sorologia por técnica da imunoperoxidase IgG ELISA para HHV-8	63
6.3.Critérios para diagnóstico da infecção pelo HHV-8	64
6.4.Critérios para diagnóstico de co-infecção por citomegalovírus e por HHV-8 ...	64
7.Normas aplicadas para se evitar contaminação	64
8.Análise estatística	65
9.Apoios recebidos	65
Resultados	67
Discussão	77
Conclusão	83
Referências bibliográficas	87
Anexos	101

Continuação...

ANEXO I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa / FCM	103
ANEXO II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	105
ANEXO III: Protocolo de cultura de líquidos biológicos	107
ANEXO IV: Protocolo de extração de DNA de leucócitos de sangue periférico com NaOH e Tris-HCL	109
ANEXO V: Protocolo de Reação em Cadeia de Polimerase para detecção do gene da β -globina para o citomegalovírus e para o HHV-8	111
ANEXO VI: Protocolo de diagnóstico do citomegalovírus	113
ANEXO VII: Protocolo de diagnóstico do HHV-8	117
ANEXO VIII: Tabela 10: Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, HHV-8 e infecção bacteriana – Semana 0	121
ANEXO IX: Tabela 11: Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, HHV-8 e infecção bacteriana – Semanas um e dois	123
ANEXO X: Tabela 12: Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, HHV-8 e infecção bacteriana – Semanas três e quatro	125
ANEXO XI: Tabela 13: Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, HHV-8 e infecção bacteriana – Semanas cinco e seis	127
ANEXO XII: Tabela 14: Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, HHV-8 e infecção bacteriana – Semanas sete e oito	129
ANEXO XIII: Tabela 15: Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, HHV-8 e infecção bacteriana – Semanas 10 e 12	131
ANEXO XIV: Tabela 16: Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, HHV-8 e infecção bacteriana – Semanas 14 e 20	133
ANEXO XV: Tabela 17: Análise descritiva do monitoramento dos <i>Herpesvírus</i> : citomegalovírus, HHV-8 e infecção bacteriana – Semana 24	135
ANEXO XVI: Tabela 19: manifestações clínicas, alterações laboratoriais, sítio cirúrgico e imunossupressão observadas nos prontuários dos pacientes em estudo	137
ANEXO XVII: Identification of Bacterial Infections and Clinical Manifestation Associated With Cytomegalovirus in Liver Transplantation Patients	147

INTRODUÇÃO

O transplante de fígado é um procedimento padrão para o tratamento de muitas doenças hepáticas terminais ^{1, 2, 3}.

O sucesso deste procedimento pode ser limitado por complicações infecciosas ^{4, 5, 2}, sendo as principais causas de mortalidade e morbidade, ocorrendo em até 80% dos pacientes ^{6, 3, 7}, durante o primeiro ano pós-transplante ^{8, 2, 9}. Infecções bacterianas atingem 60% dos pacientes transplantados de fígado ¹⁴, seguidas por infecções virais 20% ^{10, 6} e fúngicas 8% ⁶ apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas, imunossupressão e uso de estratégias antimicrobianas profiláticas ¹¹.

Os episódios de complicações infecciosas em transplantados de órgãos sólidos ocorrem principalmente no primeiro ano após o transplante, particularmente no primeiro mês ¹².

O transplante de fígado possui uma das mais altas taxas de infecção pós-operatória entre todos os procedimentos de transplante de órgãos sólidos ¹³.

A maioria das infecções bacterianas durante o primeiro mês após o transplante é adquirida em hospitais, havendo normalmente uma elevada incidência de infecções bacterianas multirresistentes. A maior incidência de complicações de infecções bacterianas no primeiro mês pós-transplante pode ser associado com elevada morbidade ^{15, 16}. Infecções de feridas, infecções urinárias, infecções da corrente sanguínea, pneumonias e diarreia associada ao *Clostridium* são comuns durante este período ². Depois de seis meses, os pacientes transplantados de órgãos sólidos costumam desenvolver infecções bacterianas comunitárias, infecções do trato urinário e pneumonia ¹⁵.

Em 2013, Hsieh et al. (8) descreveram os fatores de risco relacionados a infecções por bactérias gram-negativas, mostrando que as infecções por bactérias gram negativas apresentam alta taxa de mortalidade. Segundo eles, as infecções por bactérias gram-negativas são mais graves e com maior risco de evolução para sepse ou choque pós-transplante ¹⁶.

Entre os fatores que influenciam a ocorrência das infecções são os diferentes níveis de imunossupressão em cada momento, proximidade com o procedimento cirúrgico, a permanência na unidade de terapia intensiva, as exposições ambientais e, claro, o risco de infecções relacionadas com o doador. Retransplante em si, que envolve cirurgia complexa e imunossupressão anterior, é também um grande fator de risco para o desenvolvimento de infecção ^{13, 16, 17, 22}.

Infecções da corrente sanguínea são frequentes entre transplantados de órgãos sólidos, uma das principais causas de morbidade; a sepse é uma das principais causas de morte após o transplante. Fatores incluem a manipulação do trato biliar, hospitalização prolongada, ventilação mecânica ou cateter urinário ^{19, 12, 3, 20}. A mortalidade é de até 50% quando é acompanhado por choque séptico no receptor de transplante de órgãos sólidos ^{17, 18}.

A infecção urinária é uma das infecções bacterianas mais frequentes em pacientes, afetando até 30% dos transplantados ²¹.

As infecções virais também continuam sendo complicações frequentes após transplante de órgão sólido. O citomegalovírus (CMV) é o mais comum de todas as infecções virais ^{23, 24} e está relacionado com a morbidade, mortalidade e sobrevida do enxerto ^{25, 26}, apesar da disponibilidade de novas drogas antivirais e melhorias nas estratégias profiláticas. Ocorre em até 80% dos órgãos transplantados e sua incidência varia de acordo com diversos aspectos, tais como, o tipo de transplante, a presença de fatores de riscos associados e ao uso de medidas profiláticas ^{27, 28, 36, 38}. Na ausência de medidas preventivas, os receptores desenvolvem a infecção sintomática por CMV em torno de 20% a 30% e em pacientes assintomáticos essa porcentagem é maior ²⁹.

As alterações laboratoriais frequentemente identificadas à infecção ativa pelo CMV incluem leucopenia, trombocitopenia, linfocitose atípica e discreta elevação das enzimas hepáticas ²³.

Pacientes com infecção ativa pelo CMV apresentam maior risco de apresentarem infecções bacterianas, virais e fúngicas; disfunção do enxerto, insuficiência aguda, rejeição, nefropatia crônica do enxerto, fibrose intersticial e atrofia; diabetes e mortalidade ²⁴.

A infecção por CMV pode continuar a ocorrer durante o primeiro ano pós transplante em 12% a 30% dos receptores ³⁰. Já a incidência da infecção do HHV-8 varia de acordo com a população e região estudada ³¹.

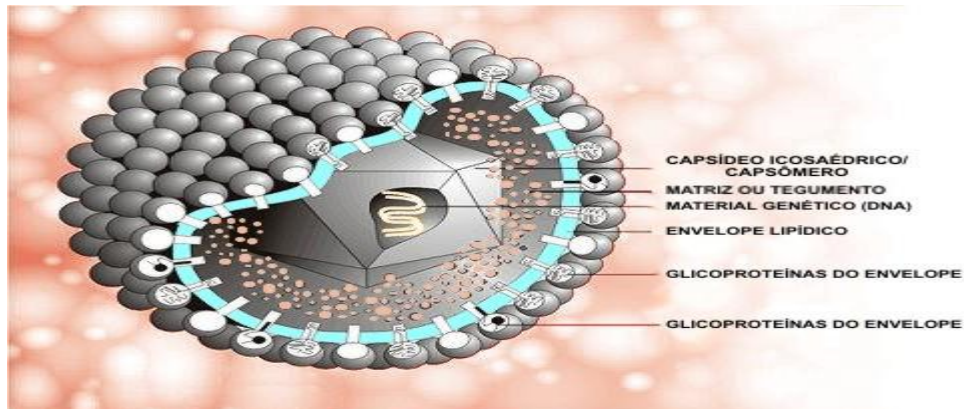
No período de um a seis meses após o transplante, o desenvolvimento de infecções oportunistas parece ser impulsionado em grande parte pela co-infecção viral ³¹.

1.Características biológicas do citomegalovírus e do *Herpesvírus Humano 8*

As características básicas desses vírus são: contêm DNA envolto por envelope, permanecem latentes após infecção primária podendo reativar-se devido à imunossupressão e possuem potencial oncogênico.

2.Características morfológicas e estruturais do citomegalovírus e do *Herpesvírus Humano 8*

O CMV e o *Herpesvírus Humano 8* (HHV-8) apresentam aspecto morfológico típico dos *Herpesvírus*, como ilustra a Figura 1 ³³.



Fonte: www.biografix.de/hcmv/html/metaframe/htm

Figura 1: Estrutura morfológica dos *Herpesvírus*

Os *Herpesvírus* têm a capacidade de infectar diferentes tipos celulares, apresentando tropismo por determinados tecidos. O CMV compartilha com outros *Herpesvírus* a capacidade de permanecer em estado latente no hospedeiro, disseminar-se célula a célula, reativando em condições de imunossupressão e induzindo imunossupressão transitória ³³.

A transmissão da infecção por CMV ocorre através da reativação do vírus latente ou através de um doador soropositivo para um receptor soronegativo ³⁵.

3. Transmissão e epidemiologia do citomegalovírus e do *Herpesvírus Humano 8*

A infecção pelo CMV ocorre praticamente em todas as regiões do mundo. A prevalência de anticorpos aumenta com a idade, atingindo níveis máximos após 25 anos. Existe uma nítida relação entre a prevalência de anticorpos numa determinada população adulta e seu nível sócioeconômico.

A prevalência do CMV pode variar de 40% à 60% entre as populações de um nível socioeconômico elevado e é de 80% à 100% para populações em níveis

socioeconômicos mais baixos. Este vírus é universal, permanece latente após uma infecção primária e pode ser reativado com imunossupressão, como no transplante de órgãos ³⁷.

A infecção por CMV se desenvolve de 36% a 100% nos receptores de órgãos sólidos transplantados. A doença sintomática ocorre de 11% à 72%. A maioria dos episódios da doença aparece durante os primeiros seis meses após o transplante, com a incidência mais elevada no primeiro e no segundo mês ^{28, 35}.

Na ausência de terapia preventiva, de 30% a 70% dos pacientes transplantados desenvolvem infecção por CMV ³⁹.

A prevalência do HHV-8 apresenta uma variação considerável em diferentes regiões geográficas e populações ^{39, 40, 41}.

A soroprevalência de HHV-8 na região do Amazonas foi de 79,1% em ameríndios e 6,1% em não-Ameríndios ⁴². Alta prevalência foi observada entre as populações indígenas que vivem em tribos remotas da Amazônia e Papua-Nova Guiné ^{39,47}.

O maior percentual de soroprevalência do HHV-8 ocorreu em populações de doadores de sangue saudáveis, superior à 50% na África sub-saariana ^{39, 43}.

Na Itália, a prevalência é intermediária cerca de 14%, com a maior prevalência registada no Sul da Itália (até 18,3%) ^{44, 39} e outras áreas do Mediterrâneo. A prevalência é muito baixa em muitos países do Sudeste Asiático (0% à 3%) e no Japão, onde o sarcoma de Kaposi (SK) é muito raro. Na maioria das províncias da China, a soroprevalência do HHV-8 foi inferior a 8%. No entanto, a área de Xinjiang, localizada a noroeste da China, exibiu um padrão distinto. Mais de 95% dos casos de SK na China ocorreu em Xinjiang ⁴⁵.

A prevalência da infecção por HHV-8 é muito elevada (50%) em crianças mais velhas e adultas na África e partes da Bacia Amazônica, intermediária (5% - 20%) no Mediterrâneo e nos Países do Oriente Médio e do Caribe, baixo (5%) no

Norte da América, Europa do Norte e na Ásia (5%)^{40, 41}. Em Israel a soropositividade do HHV-8 varia de 8,4% a 22% em indivíduos saudáveis.

Estudos realizados no Brasil revelaram taxas de prevalência do HHV-8 entre homens homossexuais / bissexuais de São Paulo de 30,4% - 34%⁴⁶.

A transmissão do HHV-8 ocorre provavelmente através da saliva ou sexualmente, aumentando durante a infância e atingindo um patamar na adolescência^{48, 41}.

Além disso, existe uma forte evidência de que HHV-8 pode ser transmitido por transfusão de sangue, com soroconversão ocorrendo da terceira à décima semana após a transfusão^{48, 41}. A transmissão viral está também associada à injeção de drogas e transplante de órgãos infectados⁴⁸. Existem poucos dados disponíveis sobre a infecção de HHV-8 em receptores de transplante de órgãos sólidos, principalmente em transplantados de fígado⁴⁸.

4. Manifestações clínicas do citomegalovírus e do *Herpesvírus Humano*

8

O impacto da infecção por CMV é amplo e pode variar de infecção com poucos sintomas de uma doença sistêmica, rejeição de transplante de órgãos, a perda de enxerto, a susceptibilidade a infecções oportunistas e até mesmo a morte do paciente ou outras causas associadas ao CMV⁴⁹.

As manifestações clínicas do CMV são: mal-estar, febre, artralgias, mialgia e laboratorialmente: leucopenia, trombocitopenia (denominado síndrome citomegálica), mas pode também apresentar-se com evidência de envolvimento de órgãos, com diarreia e dor abdominal (doença gastrointestinal), tosse e hipóxia (pneumonia), visão turva ou moscas volantes (retinite) e confusão mental (encefalite). O enxerto transplantado é comumente envolvido, assim pode ocorrer

hepatite (em receptores de fígado), nefrite (em receptores de rins), pancreatite (em receptores de pâncreas), cardite (em receptores de coração), pneumonia (em receptores de pulmão). A manifestação invasiva mais comumente observada é o acometimento do trato gastrintestinal^{50, 51, 28}.

Os "efeitos indiretos" do CMV são clinicamente os mais graves, aumentando a morbidade e mortalidade e diminuindo a sobrevida do enxerto pós-transplante de órgãos²⁴.

Em relação ao HHV-8, as lesões mucocutâneas têm sido relatadas em mais de 90% de todos os casos de HHV-8 e são conhecidas como SK. Essas lesões cutâneas tem uma cor azul escura ou arroxeadas. Elas começam como máculas que progridem e podem se aglutinar para formar grandes placas ou tumores nodulares e fungiformes. Elas são principalmente localizadas nos membros inferiores, mas podem aparecer também em tronco e nos membros superiores; o envolvimento no rosto é menos freqüente³⁹. Algumas lesões podem estar localizadas sobre cicatrizes, especialmente cicatriz de transplante. Edema dos membros inferiores, muitas vezes precede as lesões da pele por alguns meses. Na fase inicial edematosa, sem lesões de pele, testes sorológicos para HHV-8 podem ser úteis para o diagnóstico de SK. Lesões orais envolvem predominantemente o palato, podendo ocorrer também hiperplasia gengival³⁹.

Na maioria dos casos, as lesões de SK são detectadas no exame endoscópico. O envolvimento pulmonar é menos frequente e aparece em um estágio mais avançado da doença. Pode causar dispneia, hipoxemia e hipocapnia com infiltrado intersticial difuso, nódulos pulmonares ou derrame pleural⁵². O envolvimento ósseo é raro e o acometimento cerebral, excepcional³⁹.

O SK iatrogênico pós-transplante está associado à imunossupressão em longo prazo⁵³. Pacientes transplantados renais são os grupos mais propensos a desenvolver essa forma de SK⁵⁴.

O SK visceral afeta predominantemente os gânglios linfáticos em 20%, o trato gastrointestinal em 50%, os pulmões em 20% ⁴¹. Embora o SK pode estar presente ao longo de todo trato gastrointestinal é mais comum se localizar no estômago e no duodeno. As lesões raramente causam sintomas clínicos (náuseas, hemorragia, perfuração ou obstrução devido a compressão tumoral) ⁴¹.

5. Diagnóstico laboratorial para o citomegalovírus e para o *Herpesvírus Humano 8*

Para os pacientes transplantados o diagnóstico é difícil por causa dos sinais serem geralmente leves ou muitas vezes os sintomas de infecção são ausentes. No entanto, mesmo infecções leves em pacientes imunocomprometidos pode produzir efeito catastrófico ³.

Os recursos diagnósticos têm melhorado significativamente, proporcionando métodos mais precisos e rápidos para diagnosticar a doença pelo CMV ²⁴. Os testes de diagnósticos adequados são capazes de identificar fases iniciais da replicação do CMV ⁵⁶.

Existem vários exames laboratoriais para diagnóstico de infecção pelo CMV, sendo os mais comuns a identificação de antígenos virais (AGM – antigenemia), a detecção molecular do DNA (Ácido Desoxirribonucléico) viral utilizando a técnica da N-PCR (Nested-Reação em Cadeia de Polimerase) e métodos sorológicos. A AGM tem sido utilizado como um guia para a "terapia preemptiva" em pacientes que apresentam risco de desenvolver a doença do CMV e para monitorar o tratamento antiviral⁵⁷.

Segundo Boaretti et al. (6), em 2012, a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) *real time* é uma abordagem promissora para o diagnóstico da infecção por CMV em receptores de órgãos sólidos, uma vez que é mais

adequada para a normatização e automação do que a tradicional AGM. Seu custo, porém, é ainda muito alto ⁵⁶.

Em relação ao diagnóstico da infecção pelo HHV-8 para a triagem de doadores e receptores, a pesquisa de anticorpos não são úteis, mostrando baixa sensibilidade e especificidade ⁵⁸. Outros métodos disponíveis (PCR quantitativa utilizando sangue total, plasma ou soro) também ainda não estão recomendados devido à falta de estudos ⁵⁹.

O diagnóstico de SK cutâneo ou visceral deve ser baseada na biópsia, devido às suas características histopatológicas, demonstrando a presença do HHV-8 nas lesões por imuno-histoquímica ⁵⁹. Nos casos em que se suspeita de SK e a lesão não é acessível para biópsia, a detecção do HHV-8 no sangue pode ser útil, apesar de um resultado não excluir o diagnóstico ⁴¹.

5.1. Método imuno-histoquímico para o citomegalovírus: Detecção de antígenos pp65 virais – antigenemia

As diretrizes atuais recomendam a AGM para o diagnóstico e monitorização da infecção por CMV em pacientes transplantados ²⁶. A AGM é um teste quantitativo que informa o número de células mononucleares circulantes com replicação viral presentes na amostra analisada. O resultado permite o diagnóstico de infecção ativa e tem valor prognóstico para o desenvolvimento de doença em pacientes de risco.

A AGM é um marcador de viremia ou replicação viral ativa e nunca é detectada em casos de infecção latente. É uma técnica que se baseia na detecção de proteínas estruturais encontradas no CMV através da coloração direta de polimorfonucleares com anticorpo monoclonal contra a fosfoproteína pp65 expressa desde a fase precoce da replicação viral e detectada em grandes quantidades após 48 a 72 horas da replicação ⁶⁰.

A AGM é um dos testes que mais precocemente tem resultados positivos para detectar a infecção ativa^{61, 60, 62}, tornando-se positiva em média de nove a 18 dias antes do estabelecimento da doença. Tem sido amplamente utilizada para a detecção precoce da infecção ativa em transplantados de órgãos, para monitorização do CMV e para avaliação da resposta ao tratamento antiviral^{60, 63, 32, 62, 37}. As desvantagens da AGM são: natureza laboriosa do teste; a falta de normalização, para que não ocorra diminuição da sensibilidade; a necessidade de uma contagem absoluta de neutrófilos superior a 10^6 células / mL; ser um teste manual e não poder ser automatizado; as células têm de ser separadas, contadas, aplicadas em lâminas e fixadas dentro de seis a oito horas a partir da coleta da amostra para evitar a redução na sensibilidade do teste; a leitura do ensaio precisa de pessoas qualificadas^{57, 63, 26, 56}.

No Brasil, a técnica de AGM para diagnóstico de infecções pelo CMV deu-se no início da década de 90, empregando o método originalmente descrito por Van Der Bij et al. (6) em 1988, sendo a única até hoje realizada de forma rotineira^{63, 64, 65, 66, 67, 60}.

5.2. Teste de Ácido Nucléico Quantitativo para o citomegalovírus

Além da AGM, existe o teste QNAT (Teste de Ácido Nucléico Quantitativo), também conhecido como ensaio de carga viral do CMV, que é a principal opção alternativa para o diagnóstico e monitoramento de resposta à terapia⁶³.

Centros de transplante onde muitos pacientes vivem longe cujas amostras de sangue são enviadas para o laboratório preferem usar o teste de ácido nucléico quantitativo⁶³.

Tanto a AGM quanto o QNAT tem utilidade clínica e estão amplamente disponíveis. A decisão sobre que teste vai usar depende de muitos fatores, incluindo recurso disponível, conhecimentos técnicos, população de paciente, tempo de espera para o resultado, volume de amostras testadas e custo⁶³.

5.3.Métodos moleculares

5.3.1.Reação em Cadeia de Polimerase em *Tempo Real*

A maioria dos laboratórios que executam testes de carga viral está se movendo para tecnologia de PCR em *tempo real*, porque ela tem uma melhor precisão, ampla gama linear, tempo de resposta mais rápido, maior rendimento e menos risco de contaminação em comparação com a PCR convencional ⁶³.

5.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase

A técnica de PCR é menos trabalhosa e pode ser facilmente padronizada e automatizada ³⁵.

A PCR, que é um método qualitativo, é uma opção para a vigilância dos *Herpesvírus* ⁶³.

Métodos baseados na PCR podem ser utilizados com sucesso para detectar sequências virais de HHV-8 em várias amostras, por exemplo, em lesões de SK, com elevada especificidade e sensibilidade. As células mononucleares são extraídas do plasma e / ou do sangue periférico ³¹.

5.3.3.Nested-Reação em Cadeia da Polimerase

A N-PCR (Nested-Reação em Cadeia da Polimerase), propiciou aumento da especificidade e sensibilidade da PCR. Nela o produto da primeira PCR, amplificado com um par de iniciadores, é submetido à nova reação de amplificação utilizando-se outro par de iniciadores internos ao primeiro, sendo o produto então detectado por eletroforese em gel de agarose ⁶⁸.

5.4.Método sorológico para o *Herpesvírus Humano 8*

Vários testes têm sido desenvolvidos baseados em imunofluorescência, Western blot e ensaio imunoenzimático (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ³⁹.

Os ensaios ELISA podem detectar anticorpos contra os genes latentes e líticos. Até agora estão disponíveis boas ferramentas para estudos soropidemiológicos, embora a sua utilidade na prática clínica diária seja controverso ³⁹.

Vários testes ELISA foram desenvolvidos, alguns deles o HHV-8 usa antígenos específicos, tais como produtos isolados de Open Reading Frame-26, 65, 73 ou K8.1, enquanto que outros utilizam o conjunto de vírus, obtido a partir dos lisados de vírus ³⁹.

A técnica Western blot também pode ser usada em estudos sorológicos principalmente para fins de investigação ou para confirmar os resultados de ELISA ³⁹.

Na prática clínica diária, o domínio da sorologia para o HHV-8 é limitado devido à falta de critério internacional padrão ³⁹.

OBJETIVOS

1. Geral

- Correlacionar a positividade da AGM e da N-PCR para CMV e da N-PCR do HHV-8 com as manifestações clínicas associadas a estes vírus e com as manifestações bacterianas em pacientes submetidos á transplante de fígado no Hospital de Clínicas da UNICAMP.

2. Específico

- Detectar a prevalência da infecção ativa pelo CMV.
- Detectar a prevalência da infecção ativa pelo HHV-8.
- Identificar as manifestações clínicas associadas ao CMV e ao HHV-8.
- Identificar os casos de co-infecção do CMV e do HHV-8.
- Avaliar se a co-infecção do CMV e do HHV-8 está associada à infecção bacteriana pós-transplante de fígado.

MÉTODOS

1. Casuística

Trata-se de um estudo observacional, prospectivo, analítico, longitudinal, onde foram analisados pacientes submetidos a transplante de fígado no Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) entre os anos de 2008 à 2010. Fizeram parte deste estudo 50 pacientes, sendo 13 (26%) do sexo feminino e 37 (74%) do sexo masculino.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP.

1.1. Critérios de inclusão

- Todo paciente com idade superior a 18 anos submetido à transplante de fígado no HC – UNICAMP.
- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.
- Ter cinco ou mais amostras de sangue colhidas para análise.
- Sorologia IgG (Imunoglobulina G) positiva para CMV no pré-transplante.

1.2. Critérios de exclusão

- Pacientes que tiveram menos de cinco amostras de sangue no pós-transplante.
- Pacientes com idade inferior a 18 anos.
- Pacientes transplantados por hepatite fulminante.

- Pacientes submetidos à retransplante.

1.3. População de estudo

O protocolo foi seguido de acordo com os requerimentos para pesquisas envolvendo seres humanos do Brasil e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Institucional da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP sob o número 430 / 2003 com adendo concedido em 2008 (Anexo I). Todos os pacientes que participaram deste trabalho foram informados sobre os procedimentos a serem adotados e concordaram com a coleta do material necessário para o estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo paciente ou responsável após todas as dúvidas terem sido esclarecidas (Anexo II).

A monitorização dos pacientes foi realizada prospectivamente desde o pré-transplante (imediatamente antes do ato cirúrgico – dia zero) e no pós-transplante: de modo semanal no primeiro e no segundo mês (semanas um a oito), quinzenal no terceiro mês (semanas 10 e 12) e mensal do quarto mês até o sexto mês (semanas 16 20 e 24).

A AGM e a N-PCR foram realizadas na mesma amostra. O material coletado foi encaminhado aos seus respectivos laboratórios (Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia; ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecto Contagiosas por Técnicas de Biologia Molecular, ambos os laboratórios no HC – UNICAMP e ao Laboratório de Hepatologia e Bacteriologia do Gastrocentro – UNICAMP), sendo que no último, as amostras foram estocadas adequadamente até serem utilizadas no presente trabalho. A sorologia IgG do HHV-8 foi realizada no Laboratório de Imunoquímica da FCM – UNICAMP.

1.4. Coleta das amostras

Foram coletados dois tubos contendo EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético) com quatro mL de sangue⁵⁸ e um tubo seco também com quatro mL de sangue do receptor no centro cirúrgico (pré-transplante) e posteriormente, na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), nas enfermarias e / ou no ambulatório da Unidade de Transplante de Fígado (UTH) – UNICAMP (pós-transplante) de acordo com o protocolo descrito anteriormente.

Um tubo contendo EDTA foi encaminhado para o Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia do HC para realização da AGM do CMV.

Outro tubo contendo EDTA foi encaminhado ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecto Contagiosas por Técnicas de Biologia Molecular do HC para extração do DNA e para detecção da PCR e da N-PCR do CMV. O DNA extraído foi armazenado em freezer a -20⁰C no Laboratório de Hepatologia e Bacteriologia do Gastrocentro – UNICAMP para posteriormente ser realizado a PCR e a N-PCR da região ORF-26 (região mais conservada e aberta para leitura; mais utilizada para a triagem molecular) do HHV-8.

O tubo seco foi centrifugado, separado e armazenado a sorologia no freezer a -20⁰C no Laboratório de Hepatologia e Bacteriologia do Gastrocentro – UNICAMP para posteriormente realizar a sorologia IgG do HHV-8.

As análises dessas amostras foram realizadas no período de janeiro de 2008 à março de 2013.

Os dados clínicos dos 50 pacientes foram obtidos das anotações de prontuários próprios da UTH – HC – UNICAMP. Os resultados laboratoriais foram obtidos eletronicamente.

1.5. Protocolo Pós-Transplante

O protocolo de imunossupressão pós-transplante inclui:

- Inibidores de calcineurina: ciclosporina (0,4 mg / kg / dia com nível sanguíneo variando de 150 – 250 ng / mL) ou tacrolimus (0,01 mg / kg / dia com nível sanguíneo variando de 5 – 10 ng / mL);
- Corticosteróides (metilprednisolona 1,0 g no intra-operatório com redução no sétimo dia para 20 mg até o final do primeiro mês, 15 mg no segundo mês, 10 mg no terceiro mês, 5 mg no quarto mês e retirada se o paciente não for portador de doença auto-imune);
- Inibidores de purina (micofenolato de mofetila na dose de 1000 mg / dia ou micofenolato sódico na dose de 750 mg / dia).

A profilaxia antiviral para o *Herpesvírus simples* foi feita com aciclovir (200 mg de 12 / 12 horas) por dois meses.

Os pacientes com doença por CMV receberam ganciclovir, por via intravenosa, na dose de 5 mg / kg duas vezes ao dia por seis semanas.

Na profilaxia da infecção bacteriana utilizou-se a ampicilina / sulbactam (1,5 gr 6 / 6 h EV) por 48 horas, iniciando-se a primeira dose na indução anestésica. A antibioticoterapia pode se prolongar quando a equipe considerou necessário.

2. Cultura de líquidos biológicos

Todo paciente é submetido à coleta de duas amostras de hemocultura e uma amostra de urocultura na admissão para ser submetido a transplante de fígado. Estes exames são repetidos no pós-operatório sempre que há suspeita clínica de infecção bacteriana.

A pesquisa e posterior identificação das bactérias foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Clínica da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas – LPC (Laboratório de Patologia Clínica) – HC – UNICAMP.

A urocultura foi semeada em laminocultivo (*Probac do Brasil*) que contém duas faces, a face verde que é o meio ágar *Cled* e a face vermelha que é o meio *MacConkey*, incubada em estufa de CO₂ (Dióxido de Carbono) a 37°C por 24 horas.

A hemocultura foi semeada em frasco verde de meio de cultura *BacT / ALERT* (*bioMeriéux*, França) que permite a detecção de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos.

O protocolo de diagnóstico de infecção bacteriana se encontra descrito no anexo III.

2.1. Critérios para caracterizar infecção bacteriana

Infecção bacteriana foi definida por cultura positiva (sangue ou urina) com a presença de sinais de infecção (calafrios, febre, hipotensão ou por exame de imagem)^{71, 16}.

3. Extração do DNA de leucócitos de sangue periférico com NaOH e Tris-HCL

O método utilizado para a obtenção do DNA foi de acordo com Schmidt et al. (7)⁶⁹, com modificações (anexo IV).

4.Reação em Cadeia de Polimerase para a detecção do gene humano de β -globina para o citomegalovírus e para o *Herpesvírus Humano 8*

A detecção do gene humano da β -globina pela PCR seguiu o protocolo de Tommasso et al. (5) ⁷³ (anexo V).

5.Citomegalovírus

5.1.Antigenemia – Detecção do antígeno pp65 do citomegalovírus em neutrófilos do sangue periférico

O método utilizado para a AGM do CMV foi a imunofluorescência através do kit CMV BRITE TURBO (*Iq Products*, Holanda), conforme recomendação do fabricante (anexo VI).

5.2.Dupla Reação em Cadeia de Polimerase para detecção do DNA do citomegalovírus em leucócitos de sangue periférico

A detecção do DNA do CMV em leucócitos de sangue periférico através da dupla reação seguiu o protocolo de Nogueira et al. (7) ⁷³ (anexo VI).

5.3.Critérios para diagnóstico de infecção do citomegalovírus

A infecção pelo vírus do CMV foi considerada quando se constatou duas ou mais N-PCR positivas em um intervalo de 30 dias ou antigenemia positiva (> três células positivas) associadas a sintomas clínicos como proposto por vários autores ^{77, 78, 63, 62, 24}. As manifestações clínicas compatíveis com a infecção pelo CMV são:

- Febre: maior ou igual a 38°C, no mínimo por três dias sem foco detectado, acompanhada por leucopenia ($\leq 3.000 / \text{mm}^3$) e plaquetopenia ($\leq 100.000 / \text{mm}^3$) afastadas outras causas;
- Pneumonia intersticial;
- Doença gastrointestinal (esofagite, gastrite e / ou colite);
- Hepatite ou colangite;
- Retinite;
- Nefrite: definida pela detecção da infecção pelo CMV com a identificação histológica em biópsia de rim obtida do paciente com disfunção renal;
- Miocardite: sempre com identificação histológica convencional em biópsia de coração obtida de pacientes com miocardite.

6. Herpesvírus Humano tipo 8

6.1. Amplificação gênica pela PCR e pela N-PCR para detecção da região Open Reading Frame-26 do Herpesvírus Humano 8

A ampliação gênica pela PCR e pela N-PCR para detecção da região ORF-26 do HHV-8 seguiu a metodologia descrita por Chang et al. (7) ⁷⁹ conforme descrito no anexo VII.

6.2. Sorologia por técnica da imunoperoxidase IgG ELISA para Herpesvírus Humano 8

Aplicou-se o teste de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 de fase lítica para a IgG.

Para detecção qualitativa de anticorpos específicos contra os antígenos da fase lítica do HHV-8 foi utilizado o Kit de imunoensaio enzimático por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para pesquisa de anticorpos IgG anti-HHV-8 da empresa ABI (*Advanced Biotechnologies Incorporated*, Maryland, EUA), seguindo as instruções do fabricante ⁸⁰, anexo VIII.

6.3. Critérios para diagnóstico da infecção pelo *Herpesvírus Humano 8*

O diagnóstico do HHV-8 foi realizado através da extração do DNA do sangue periférico, amplificado pela N-PCR ³⁹ e confirmado pela sorologia IgG.

6.4. Critérios para diagnóstico de co-infecção por citomegalovírus e por *Herpesvírus Humano 8*

A co-infecção foi definida quando os dois vírus foram detectados simultaneamente na mesma amostra.

7. Normas aplicadas para se evitar contaminação

A fim de se eliminarem problemas de contaminação das reações, o que poderia ocasionar resultados falso-positivos, foi tomado os seguintes cuidados:

- O estabelecimento de normas e procedimentos para limpeza e assepsia das vidrarias, pipetas e do ambiente de trabalho;

- O ambiente utilizado para a extração do DNA foi diferente daquele destinado à amplificação da sequência alvo (PCR e N-PCR);
- As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em bancada com fluxo laminar, o que torna o ambiente estéril;
- Outro ambiente foi utilizado para se fazer a eletroforese;
- Antes da abertura dos “ependorffs” foi efetuada rápida centrifugação para que a reação contida no tubo ficasse concentrada na região inferior evitando sua dispersão por aerosol;
- Foram utilizados ponteiros com filtro e “ependorffs” novos e estéreis no manuseio da amostra;
- Trocas constantes de luvas foram realizadas durante todo o procedimento.

8. Análise estatística

Usou-se de análise descritiva com apresentação em tabelas de frequências para variáveis categóricas verificando-se os episódios de positividade das reações realizadas de acordo com a técnica empregada.

A comparação de variáveis categóricas foi feita usando-se o teste qui-quadrado e o teste exato de Fisher utilizando-se o programa computacional SAS System for Windows 11.0 – 2012 (Cry, NC, USA).

O nível de significância estatística foi $P < 0,05$.

9. Apoios recebidos

Bolsa de Doutorado Pleno – PG do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – processo nº 143186) concedida durante o doutorado.

Auxílio para compra de material de consumo da FAEPEX (Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão – processo nº 1431862009-4) FCM – UNICAMP.

Auxílio do reagente da sorologia do HHV-8 da PROAP (Projeto de Orientação e Atualização Profissional – processo nº 02p 02845 / 12) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia – FCM – UNICAMP.

RESULTADOS

Entre os 50 pacientes adultos submetidos à transplante de fígado incluídos nesse estudo, 37 (74%) foram do sexo masculino e 13 (26%) do sexo feminino com a média de idade de 50 anos (22 – 70).

As etiologias da cirrose hepática mais encontradas nos pacientes submetidos a transplante de fígado foram: Hepatite C e Carcinoma Hepatocelular (10 / 50 = 20%), Hepatite C e Álcool (10 / 50 = 20%), Álcool (5 / 50 = 10%) e Hepatite C isoladamente (5 / 50 = 10%).

Tabela 7: Distribuição das etiologias da cirrose hepática

Etiologias	Número casos	%
Hepatite C e Carcinoma Hepatocelular	10 / 50	20
Hepatite C e Álcool	10 / 50	20
Álcool	5 / 50	10
Hepatite C	5 / 50	10
Hepatite C, Carcinoma Hepatocelular e Álcool	3 / 50	6
Hepatite Auto Imune	3 / 50	6
Doença Policística Hepato-Renal	2 / 50	4
Cirrose Hepática Criptogênica	2 / 50	4
Carcinoma Hepatocelular e Álcool	1 / 50	2
Hepatite B	1 / 50	2
Hepatite B e Hepatite C	1 / 50	2
Atresias de Vias Biliares	1 / 50	2
Cirrose Hepática por Hemocromatose	1 / 50	2
Colangite Esclerosante	1 / 50	2
Hepatite C, Trombose Portal e Anafalopatia Crônica	1 / 50	2
Cirrose Hepática Criptogênica e Carcinoma Hepatocelular	1 / 50	2
Carcinoma Hepatocelular, Hepatite C e Hepatite B	1 / 50	2
Doença de Wilson	1 / 50	2
TOTAL	50	100

Nesse estudo foram realizados 860 exames para detecção do CMV, sendo, para a N-PCR 380 exames, para a AGM 380 exames e para a sorologia IgG e IgM (Imunoglobulina M) 100 exames nos 50 pacientes do estudo (Tabela 8).

RESULTADOS

Tabela 8: Frequência de exames realizados nas amostras dos pacientes monitorizados para o citomegalovírus

Tipos exames	Positivo	Negativo	Total
AGM	27 (7,1%)	353 (92,9%)	380
N-PCR	54 (14,2%)	326 (85,8%)	380
Sorológico IgG	50 (100%)	-	50
Sorológico IgM	2 (4%)	48 (96%)	50
TOTAL	133 (15,5%)	727 (84,5%)	860 (100%)

Legenda: AGM = Antigenemia; N-PCR = Nested-Reação em Cadeia de Polimerase; IgG = Imunoglobulina G; IgM = Imunoglobulina M

A AGM foi positiva em 27 / 380 (7,1%) exames, essa positividade deu-se a partir de uma célula até 20 células.

A N-PCR foi positiva em 54 / 380 (14,2%) exames.

Ambos os exames positivaram a partir do sétimo dia pós-transplante (7 – 174).

A infecção do CMV detectada por AGM e por N-PCR dos pacientes durante o monitoramento pode ser observada na Tabela 9.

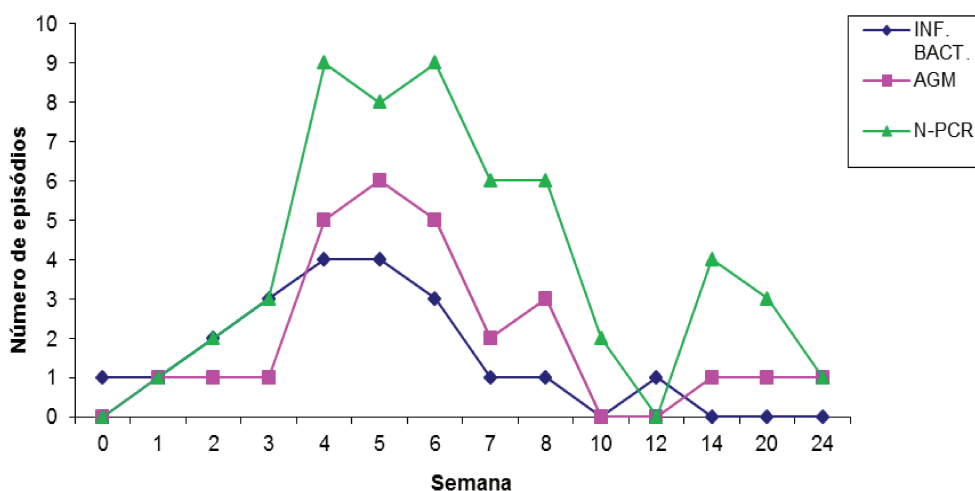
Tabela 9: Frequência da detecção da infecção do citomegalovírus por antigenemia e por Nested-Reação em Cadeia de Polimerase dos pacientes durante o monitoramento

Exames	Nº de pacientes	%
N-PCR	10 / 50	20
AGM	6 / 50	12
TOTAL	16 / 50	32

Legenda: N^o = Número; N-PCR = Nested-Reação em Cadeia de Polimerase; AGM = Antigenemia

Em seis pacientes houve AGM positiva alta (> três células) que coincidiu com o diagnóstico histológico de rejeição celular aguda. Em 10 pacientes, a AGM foi positiva com baixa celularidade (até três células). No gráfico abaixo podem ser observados os episódios da positividade dos exames realizados.

Gráfico 1: Número de episódios de positividade dos exames para citomegalovírus em Nested-Reação em Cadeia de Polimerase, em antigenemia e em infecção bacteriana de acordo com a semana de coleta



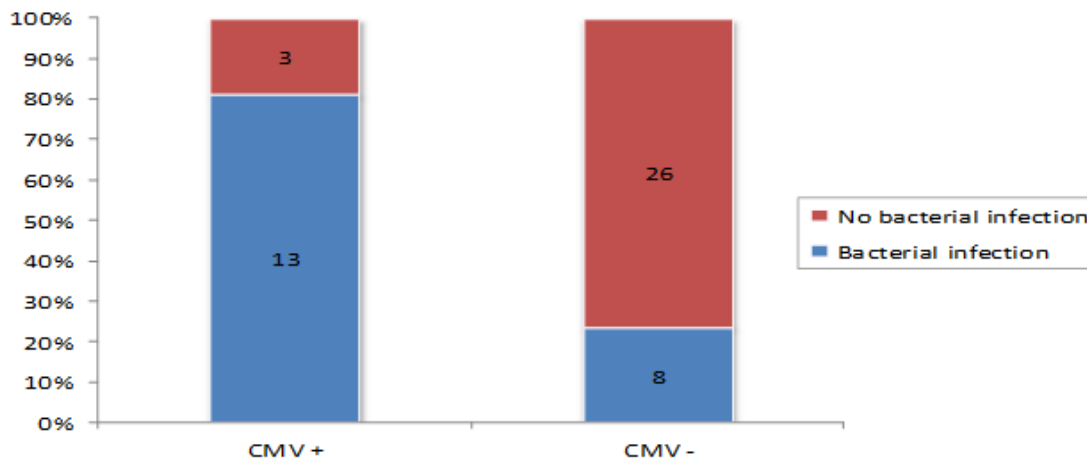
Legenda: INF. BACT. = Infecção Bacteriana; AGM = Antigenemia; N-PCR = Nested-Reação em Cadeia de Polimerase

No nosso estudo observamos que as infecções bacterianas ocorreram após o diagnóstico de infecção pelo CMV.

Nas tabelas de 10 a 17 (Anexos VIII à XV) podem ser observada a análise descritiva do monitoramento dos *Herpesvírus*: CMV, HHV 8 e da infecção bacteriana.

Dezesseis (32%) pacientes apresentaram infecção por CMV e deles, 13 (81%) mostraram infecção bacteriana concomitante. Trinta e quatro pacientes (68%) não tiveram infecção por CMV e deles, 8 (24%) tiveram infecções bacterianas (Gráfico 2).

Gráfico 2: Frequência de infecção por citomegalovírus observada no período de fevereiro de 2008 à janeiro de 2010 associadas ou não à infecção bacteriana ($\chi^2 = 12,61$; $P = 0,0004$)



Legenda: CMV+ = Citomegalovírus Positivo; CMV- = Citomegalovírus Negativo

Os microrganismos responsáveis por infecções bacterianas em nosso estudo foram predominantemente as bactérias gram-negativas (20 / 28 = 71%). Houve apenas um tipo de bactéria gram-positiva (8 / 28 = 29%) (Tabela 18).

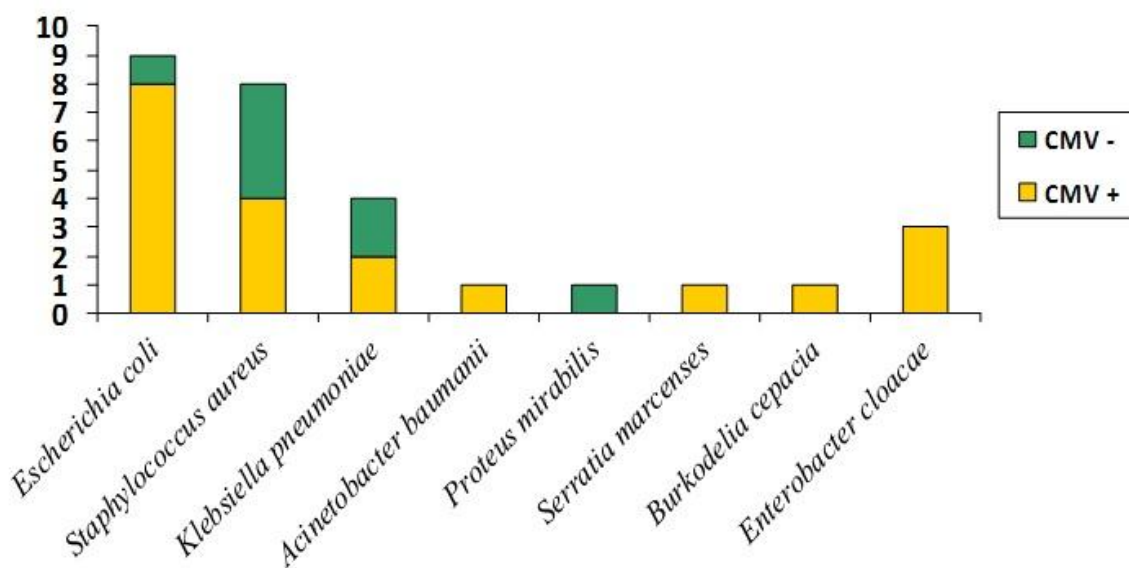
Tabela 18: Frequência dos microrganismos encontrados nos 50 pacientes do estudo

Microrganismos isolados	Número total de cada bactéria	(%)
Gram-negativo		
<i>Escherichia coli</i>	9	32,14
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	4	14,28
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	10,70
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	3,57
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	3,57
<i>Proteus microabis</i>	1	3,57
<i>Serratia marcenses</i>	1	3,57
Gram-positivo		
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	28,6
Total	28	100

Vinte e um (42%) pacientes apresentaram infecções bacterianas confirmadas por 23 hemoculturas e 5 uroculturas. Em três pacientes a infecção bacteriana foi confirmada por hemocultura e urocultura. Seis pacientes apresentaram mais de um microrganismo.

Os agentes etiológicos podem ser observado no Gráfico 3.

Gráfico 3: Frequência de agentes etiológicos encontrados em hemoculturas e uroculturas de acordo com a positividade do citomegalovírus



Legenda: CMV+ = Citomegalovírus Positivo; CMV- = Citomegalovírus Negativo

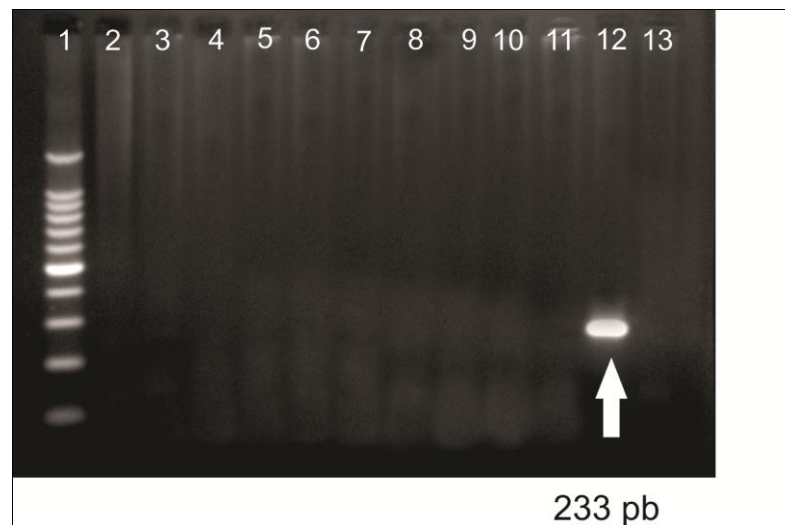
Na tabela 19 (Anexo XVI) podem ser observadas as manifestações clínicas, as alterações laboratoriais, o sítio cirúrgico e a imunossupressão observada nos prontuários dos pacientes em estudo.

Para o HHV-8 foram realizados 78 exames, sendo 52 (66%) para a N-PCR da região ORF-26 e 26 (34%) para a sorologia IgG, referentes a 26 pacientes. Vinte (77%) pacientes foram do sexo masculino e seis (23%) foram do sexo feminino.

Neste estudo foi utilizado a N-PCR para amplificar a região ORF-26 do HHV-8 e não observamos nenhuma amplificação de seqüências de DNA do HHV-8 nas amostras analisadas.

Na Figura 2 abaixo pode ser observada somente o fragmento amplificado do controle positivo do HHV-8 e o marcador de pares de bases.

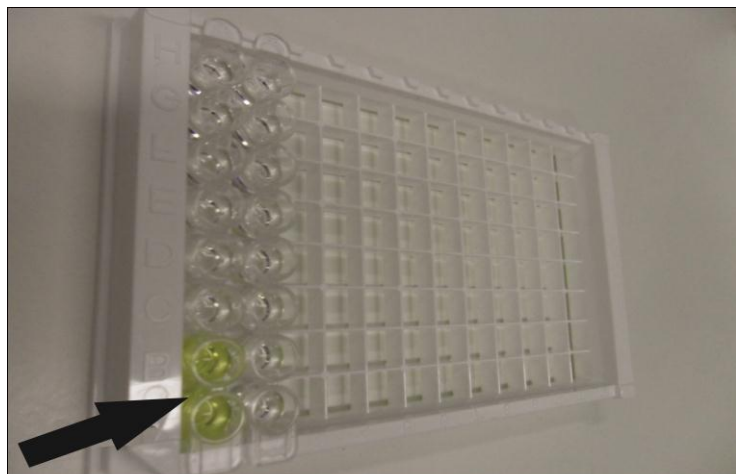
Figura 2: Gel de agarose visto à luz ultravioleta exibindo a Nested-Reação em Cadeia de Polimerase para o *Herpesvírus Humano 8*. Nas colunas: 1 – Padrão de Peso Molecular (Ladder 100 pb); 2 à 11 amostras negativas; 12 – Controle positivo mostrando um fragmento de 233 pb; 13 – Controle negativo da reação



Como controle positivo da reação usou um DNA de biópsia de paciente com diagnóstico de SK e sorologia positiva para o HHV-8.

Não foi verificada nenhuma sorologia positiva no grupo de pacientes estudado. Na Figura 3 abaixo podemos observar uma placa de ELISA onde nos dois poços amarelos foram aplicados o controle positivo, seguido de três controles negativos, três brancos e 8 amostras de pacientes com resultados negativos.

Figura 3: Placa de Enzyme Linked Immunosorbent Assay mostrando duas colunas de teste para a imunoglobulina G do *Herpesvírus Humano 8*



Controle Positivo

DISCUSSÃO

O transplante de fígado tem uma das mais altas taxas de infecção pós-operatória entre todos os procedimentos de transplantes de órgãos ¹³.

Tem sido relatado que a taxa de infecção bacteriana pós-operatória pode ser até mais de 60% ^{14, 11, 81} e representa uma taxa de mortalidade hospitalar de 30% à 50% ¹⁴, contribuindo significativamente para o aumento da morbidade e da mortalidade pós-transplante ^{82, 10}.

Mais da metade dos pacientes desenvolvem algum tipo de infecção durante o primeiro ano pós-transplante e muitas dessas infecções vão exigir muitos cuidados. O risco da infecção é geralmente determinado pela intensidade de exposição a agentes infecciosos (no ambiente hospitalar e na comunidade) e o estado de imunossupressão. Estas infecções ocorrem mais habitualmente durante os primeiros seis meses após o transplante quando os pacientes também são altamente suscetíveis a estas infecções como resultado da intensidade da sua imunossupressão ^{1, 83}.

A incidência de infecções oportunistas frequentemente são durante os primeiros três meses, coincidindo com o mais elevado nível de imunossupressão. No entanto, estratégias eficazes de profilaxia antimicrobiana levam a uma diminuição na incidência de infecções oportunistas ¹⁰.

Em um estudo multicêntrico prospectivo na Espanha, mostrou a incidência de casos de bacteremia em 7,3% entre os transplantados do rim, nos transplantados de fígado a taxa foi de 10,4% e de 20% entre os transplantados de pâncreas ⁸⁴.

Durante os primeiros dois meses pós-transplante, a maioria das infecções são adquiridas no hospital, sendo que o tipo de transplante é que determina a infecção ¹³.

Os agentes etiológicos responsáveis por infecções bacterianas em nosso estudo foram predominantemente as bactérias gram-negativas (20 / 28 – 71%),

principais causas de morbidade e mortalidade ^{84, 16}. A infecção bacteriana por *Escherichia coli* foi o microrganismo mais encontrado em nosso estudo (9 / 28 – 32%). O segundo microrganismo encontrado foi o *Staphylococcus aureus* (8 / 28 – 28%). O *Staphylococcus aureus* é um importante agente patogênico pós-transplante. Infecções por este patógeno tem sido documentada de 20% à 25% nos pacientes que se submetem a transplante de fígado ⁸⁶.

No nosso estudo mostrou as infecções bacterianas detectadas no sangue e na urina, locais mais freqüentes de infecção ⁸². Vinte e um (42%) pacientes tiveram infecção bacteriana. Estudos de Sun et al. (4), em 2012, revelaram índice maior (53%) ⁸⁵. Outros estudos revelaram índice menor (16%) ¹.

A ocorrência de infecções bacterianas no nosso estudo mostrou associação com a infecção pelo CMV. Assim, nosso estudo demonstra que, em pacientes transplantados, deve-se insistir no diagnóstico de infecção pelo CMV e / ou concomitância de infecção bacteriana, mesmo quando já estabelecido uma etiologia para o quadro febril.

A infecção por CMV em pacientes de transplante de órgãos sólidos ocorre de 36% à 100% e em pacientes sintomáticos a taxa é de 11% à 72% durante os 100 primeiros dias pós transplante ^{28, 34}. A incidência varia de acordo com diversos aspectos, tais como o tipo de transplante, a presença de fatores de risco associados e a utilização prolongada de profilaxia ²⁸.

A infecção pelo CMV é uma das infecções virais mais comuns encontradas em transplantados de fígado ⁸⁷.

No nosso estudo 16 (32%) pacientes apresentaram infecção por CMV e deles, 13 (81%) mostraram infecção bacteriana concomitante. Trinta e quatro pacientes (68%) não tiveram infecção pelo CMV e deles, 8 (24%) tiveram infecções bacterianas.

Outro estudo realizado no nosso serviço apresentou 41,5% de infecção pelo CMV ⁸⁸.

A AGM revelou positividade em 27 / 401 (7,1%) dos exames. Um estudo anterior realizado no mesmo serviço apresentou índice de 9,25% ⁶². Dados da literatura revelam índice mais alto (15,78%) ^{89, 54}. Este exame é usado como uma ferramenta para prever quais pacientes irão desenvolver a doença por CMV, mas esse teste requer processamento imediato da amostra e em paciente com neutropenia, pode ser difícil de ser executado ^{54, 56}.

Na N-PCR 54 / 380 (14,2%) exames mostraram positividade. Um estudo anterior no mesmo serviço revelou índice de 20% ⁶².

Os exames de AGM e de N-PCR juntos são importante para o diagnóstico do CMV, pois separadamente não são tão eficazes.

A AGM pode ser interpretada de forma mais eficiente quando comparada com os resultados de N-PCR ⁹⁰. Vários estudos demonstram a importância do CMV no monitoramento pós-transplante baseado na AGM isolada ou associada a testes de N-PCR ^{91, 90}.

A soroprevalência do HHV-8 é desigual e depende do tipo de órgão transplantado, da região geográfica e da população analisada ⁴⁶.

O nosso estudo foi o primeiro trabalho para a triagem molecular do HHV-8 realizado nos pacientes submetidos à transplante de fígado na UNICAMP.

Para o diagnóstico do HHV-8 foi realizado sorologia IgG e a N-PCR em 26 pacientes. Não encontramos nenhum caso de positividade nas amostras analisadas pelos dois exames realizados. Infelizmente não pudemos realizar o teste no grupo todo de receptores, pois não conseguimos reagentes suficientes para todos os exames.

Um estudo de um centro de transplante na França mostrou uma soroprevalência de 2,4% para o HHV-8 nos pacientes de transplantados de fígado, e de 3,3% em doadores de órgãos ⁹².

Na região espanhola, a prevalência global do HHV-8 em receptores de transplante de fígado foi de 3,4%, variando de 1,4% (Murcia, sudeste da Espanha) para 6,6% ou 6,9% (La Coruña e Santander, noroeste e norte da Espanha, respectivamente), uma taxa intermédia, de 2,9% nos doentes de Madrid (Centro da Espanha). Neste estudo, um total de 0,88% de ambos os receptores de transplante de fígado e de rim desenvolveram o SK comprovados por biópsia no período pós-transplante. No entanto, a incidência do SK foi de 2,16% e 0,5%, pós-transplante de fígado e rim ⁹⁴.

Em 2001, estudo realizado em 145 doadores de sangue da cidade de Campinas, avaliou amostras de DNA extraído de sangue periférico, utilizando a N-PCR para amplificar a região ORF-26 e observou que não houve amplificação de seqüências de DNA do HHV-8 nas amostras analisadas ⁹⁵.

Um estudo prospectivo na Itália em 2011, a prevalência de HHV-8 em pacientes adultos no momento do transplante de fígado foi de 10,2%, enquanto que no grupo de doadores de órgãos foi 4,4% ⁴⁸.

No estudo na Itália, a incidência de SK foi de 2,14% entre os 285 transplantados de fígado realizados ⁹⁶. Nenhum paciente do nosso estudo desenvolveu o SK.

CONCLUSÃO

As conclusões deste trabalho foram:

- A infecção bacteriana foi relacionada com infecção ativa pelo CMV, diagnosticada pela positividade da AGM e da N-PCR do CMV.
- As infecções por bactérias gram-negativas foram as mais prevalentes.
- O diagnóstico de infecção bacteriana foi simultâneo com o diagnóstico de infecção aguda pelo CMV.
- Não foi detectado nenhum caso de infecção pelo HHV-8 na população estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wu TJ, Lee CF, Chou HS, Yu MC, Lee WC. Suspect the donor with potential infection in the adult deceased donor liver transplantation. *Transplant Proc.* 2008;40(8):2486-8.
2. Romero FA, Razonable RR. Infections in liver transplant recipients. *World J Hepatol.* 2011;27;3(4):83-92.
3. Karapanagiotou A, Kydona C, Papadopoulos S, Giasnetsova T, Sgourou K, Pasakiotou M et al. Infections after orthotopic liver transplantation in the intensive care unit. *Transplant Proc.* 2012;44(9):2748-50.
4. Burroughs AK, Sabin CA, Rolles K, Delvart V, Karam V, Buckels J et al. 3-month and 12-month mortality after first liver transplant in adults in Europe: predictive models for outcome. *Lancet.* 2006;21;367(9506):225-32.
5. Mattner F, Fischer S, Weissbrodt H, Chaberny IF, Sohr D, Gottlieb J et al. Post-operative nosocomial infections after lung and heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2007;26(3):241-9.
6. van Hoek B, de Rooij BJ, Verspaget HW. Risk factors for infection after liver transplantation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2012;26(1):61-72.
7. Avkan-Oguz V, Ozkardesler S, Unek T, Ozbilgin M, Akan M, Firuzan E, et al. Risk factors for early bacterial infections in liver transplantation. 2013;45(3):993-7.
8. Kim JE, Oh SH, Kim KM, Choi BH, Kim DY, Cho HR et al. Infections after living donor liver transplantation in children. *J Korean Med Sci.* 2010;25(4):527-31.
9. Costa SF, Freire MP, Silva LB, Abdala E, Pierrotti L, Azevedo LS et al. Evaluation of bacterial infections in organ transplantation. *Clinics (Sao Paulo).* 2012;67(3):289-91.
10. Janny S, Bert F, Dondero F, Durand F, Guerrini P, Merckx P et al. Microbiological findings of culture-positive preservation fluid in liver transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2011;13(1):9-14.

11. Vera A, Contreras F, Guevara F. Incidence and risk factors for infections after liver transplant: single-center experience at the University Hospital Fundación Santa Fe de Bogotá, Colombia. *Transpl Infect Dis.* 2011;13(6):608-15.
12. Sganga G, Spanu T, Bianco G, Fiori B, Nure E, Pepe G et al. Bacterial bloodstream infections in liver transplantation: etiologic agents and antimicrobial susceptibility profiles. *Transplant Proc.* 2012;44(7):1973-6.
13. Linares L, García-Goez JF, Cervera C, Almela M, Sanclemente G, Cofán F et al. Early bacteremia after solid organ transplantation. *Transplant Proc.* 2009;41(6):2262-4.
14. Gautam M, Chopra KB, Douglas DD, Stewart RA, Kusne S. Streptococcus salivarius bacteremia and spontaneous bacterial peritonitis in liver transplantation candidates. *Liver Transpl.* 2007;13(11):1582-8.
15. Cervera C, Linares L, Bou G, Moreno A. Multidrug-resistant bacterial infection in solid organ transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30 Suppl 2:40-8.
16. Hsieh CE, Chen YL, Lin PY, Lin KH, Lin HC, Liu CE et al. Liver transplantation in patients infected with gram-negative bacteria: non-Acinetobacter baumannii and Acinetobacter baumannii. *Transplant Proc.* 2013;45(1):225-30.
17. Muñoz P, Fernández NS, Fariñas MC. Epidemiology and risk factors of infections after solid organ transplantation. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30 Suppl 2:10-8.
18. Shi SH, Kong HS, Xu J, Zhang WJ, Jia CK, Wang W, et al. Multidrug resistant gram-negative bacilli as predominant bacteremic pathogens in liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2009;11(5):405-12.
19. Bedini A, Codeluppi M, Cocchi S, Guaraldi G, Di Benedetto F, Venturelli C, et al. Gram-positive bloodstream infections in liver transplant recipients: incidence, risk factors, and impact on survival. *Transplant Proc.* 2007;39(6):1947-9.

20. Shields RK, Clancy CJ, Gillis LM, Kwak EJ, Silveira FP, Massih RC et al. Epidemiology, Clinical Characteristics and Outcomes of Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Infections among Solid Organ Transplant Recipients. *PLoS One*. 2012;7(12):e52349.
21. Baskin E, Ozçay F, Sakalli H, Agras PI, Karakayali H, Canan O, et al. Frequency of urinary tract infection in pediatric liver transplantation candidates. *Pediatr Transplant*. 2007;11(4):402-7.
22. Bert F, Larroque B, Paugam-Burtz C, Janny S, Durand F, Dondero F, et al. Microbial epidemiology and outcome of bloodstream infections in liver transplant recipients: an analysis of 259 episodes. *Liver Transpl*. 2010;16(3):393-401.
23. Patel G, Huprikar S. Infectious complications after orthotopic liver transplantation. *Semin Respir Crit Care Med*. 2012;33(1):111-24.
24. Kotton CN. CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 3:24-40.
25. Cunha-Bang C, Sorensen SS, Iversen M, Sengelov H, Hillingso JG, Rasmussen A et al. Factors associated with the development of cytomegalovirus infection following solid organ transplantation. *Scand J Infect Dis*. 2011;43(5):360-5.
26. Raymund RR, Beam E. Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation: Epidemiology, Prevention, and Treatment. *Curr Infect Dis Rep*. 2012;14(6):633-41.
27. Raymund, RR. Cytomegalovirus infection after liver transplantation: Current concepts and challenges. *World J Gastroenterol*. 2008;21;14(31):4849-60.
28. Linares L, Sanclemente G, Cervera C, Hoyo I, Cofán F, Ricart MJ et al. Influence of cytomegalovirus disease in outcome of solid organ transplant patients. 2011;43(6):2145-8.

29. Aguado JM, Reyne AG, Lumbreras C. . Infecciones en los pacientes trasplantados de hígado. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25(6):401-10.
30. Katsolis JG, Bosch W, Heckman MG, Diehl NN, Shalev JA, Pungpapong S, et al. Evaluation of risk factors for cytomegalovirus infection and disease occurring within 1 year of liver transplantation in high-risk patients. *Transpl Infect Dis*. 2013;15(2):171-80.
31. Lebbé C, Legendre C, Francès C. Kaposi sarcoma in transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*. 2008;22(4):252-61.
32. Fishman JA, Issa NC. Infection in organ transplantation: risk factors and evolving patterns of infection. *Infect Dis Clin North Am*. 2010;24(2):273-83.
33. www.biografix.de/hcmv/html/metaframe/htm
34. Miller CS, Avdiushko SA, Kryscio RJ, Danaher RJ, Jacob RJ. Effect of prophylactic valacyclovir on the presence of Human Herpesvirus DNA in saliva of healthy individuals after dental treatment. *Journal of Clinical Microbiology*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(5):2173-80.
35. Bodro M, Sabé N, Lladó L, Baliellas C, Niubó J, Castellote J, et al. Prophylaxis versus preemptive therapy for cytomegalovirus disease in high-risk liver transplant recipients. *Liver Transpl*. 2012;18(9):1093-9.
36. Lautenschlager I. CMV infection, diagnosis and antiviral strategies after liver transplantation. *Transpl Int*. 2009;22(11):1031-40.
37. Sampaio AM, Guardia AC, Milan A, Sasaki NA, Andrade PD, Bonon SHA, et al. Co-infection and Clinical Impact of Human Herpesvirus 5 and 6 in Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2012;44(8):2455-8.
38. Griffiths PD, Clark DA, Emery VC. Betaherpesviruses in transplant recipients. *J Antimicrob Chemother*. 2000;45:29-34.

39. Kim JE, Oh SH, Kim KM, Choi BH, Kim DY, Cho HR et al. Infections after living donor liver transplantation in children. *J Korean Med Sci.* 2010 Apr;25(4):527-31.
40. Jalilvand S, Shoja Z, Mokhtari-Azad T, Nategh R, Gharehbaghian A. Seroprevalence of Human herpesvirus 8 (HHV-8) and incidence of Kaposi's sarcoma in Iran. *Infect Agent Cancer.* 2011;28;6:5.
41. Carratalà J, Montejo M, Pérez-Romero P. Infections caused by herpes viruses other than cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30 Suppl 2:63-9.
42. Souza SLM, Nascimento MC, Oliveira J, Mascheretti M, Quiroga M, Freire WS et al. Human Herpesvirus-8 Infection and Oral Shedding in Amerindian and Non-Amerindian Populations in the Brazilian Amazon Region. *J Infect Dis.* 2007;15;196(6):844-52.
43. Pfeiffer RM, Wheeler WA, Mbisa G, Whitby D, Goedert JJ, de Thé G. Geographic heterogeneity of prevalence of the human herpesvirus 8 in sub-Saharan Africa: Clues about etiology. *Ann Epidemiol . Ann Epidemiol.* 2010;20(12):958-63.
44. Cattani P, Cerimele F, Porta D, Graffeo R, Ranno S, Marchetti S et al. Age-specific seroprevalence of Human Herpesvirus 8 in Mediterranean regions. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(4):274-9.
45. Wang H, Liu J, Dilimulati, Li L, Ren Z, Wen H et al. Seroprevalence and risk factors of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection among the general Uygur population from south and north region of Xinjiang, China. *Virology J.* 2011;14;8:539.
46. Caterino de Araújo A, Santos-Fortuna E, Magri MC, Schuelter T F, Silva MV. Latent Human Herpesvirus – 8 (HHV-8) Infection in Female Commercial Sex Workers From Imbituba, Santa Catarina, Brasil. *Braz J Infect Dis.* 2007;11(1):9-11.

47. Cunha AM, Caterino-de-Araujo A, Costa SC, Santos-Fortuna E, Boa-Sorte NC, Gonçalves MS et al. Increasing seroprevalence of Human herpesvirus 8 (HHV-8) with age confirms HHV-8 endemicity in Amazon Amerindians from Brazil. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 9):2433-7.
48. Pietrosi G, Vizzini G, Pipitone L, Di Martino G, Minervini MI, Lo Iacono G, et al., Primary and reactivated HHV8 infection and disease after liver transplantation: a prospective study. *Am J Transplant.* 2011;11(12):2715-23.
49. Ferrés M, Nervi B, Ramírez P. Prophylaxis against cytomegalovirus infection in pediatric and adult patients undergoing solid organ and hematopoietic stem cells transplantation. *Rev Chilena Infectol.* 2012;29(1):23-8.
50. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Snyderman DR et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. Transplantation Society International CMV Consensus Group. *Transplantation.* 2010;15;89(7):779-95.
51. Kute VB, Vanikar AV, Shah PR, Gumber MR, Patel HV, Godara SM et al. Post-renal transplant cytomegalovirus infection: study of risk factors. *Transplant Proc.* 2012;44(3):706-9.
52. Restrepo CS, Martinez S, Lemos JA, Carrillo JA, Lemos DF, Ojeda P et al. Imaging manifestations of Kaposi sarcoma. *Radiographics* 2006;26:1169-85.
53. Wen KW, Damania B. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis. *Cancer Lett.* 2010;28;289(2):140-50.
54. Barozzi P, Luppi M, Facchetti F, Mecucci C, Alu M, Sarid R et al. Post-transplant Kaposi sarcoma originates from the seeding of donor-derived progenitors. *Nat Med.* 2003;9:554-61.
55. Du M-Q, Bacon CM, Isaacson PG. Kaposi sarcoma associated herpesvirus / human herpesvirus 8 and lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol.* 2007;60(12):1350-7.

56. Boaretti M, Sorrentino A, Zantedeschi C, Forni A, Boschiero L, Fontana R. Quantification of cytomegalovirus DNA by a fully automated real-time PCR for early diagnosis and monitoring of active viral infection in solid organ transplant recipients. *J Clin Virol.* 2013;56(2):124-8
57. Hernando S, Folgueira L, Lumbreras C, San Juan R, Maldonado S, Prieto C, et al. Comparison of cytomegalovirus viral load measure by real-time PCR with pp65 antigenemia for the diagnosis of cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients *Transplant Proc.* 2005;37(9):4094-6.
58. Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med.* 2000;342:1027-38.
59. Casper C. Defining a role for antiviral drugs in the treatment of persons with HHV-8 infection. *Herpes.* 2006;13(2):42-7.
60. Bonon SHA, Menoni SMF, Rossi CL, Souza CA, Costa SCB. Surveillance of cytoemaglovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. *J Infection.* 2005;50(2):130-7.
61. Bordils A, Plumed JS, Ramos D, Beneyto I, Mascarós V, Molina JM et al. Comparison of quantitative PCR and antigenemia in cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2005;37(9):3756-9.
62. Milan A, Sampaio AM, Guardia AC, Pavan CR, Andrade PD, Bonon SH et al. Monitoring and detection of cytomegalovirus in liver transplant recipients. *Transplant Proc.* 2011;43(4):1360-1.
63. van der Bij W, Schirm J, Torensma R, van Son WJ, Tegzess AM, The TH. Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J Clin Microbiol.* 1988;26(12):2531-5.
64. van der Bij W, Speich R. Management of citomegalovirus infection and disease after solid-organ transplantation. *Clin Infect Dis.* 2001; 1;33 Suppl 1:S32-7.

65. Deboni L. Estudo da incidência da infecção por citomegalovírus em uma coorte de pacientes transplantados renais através da técnica de antígenemia. [Tese - Mestrado]. Porto Alegre (RGS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.
66. Schroeder RB. Antigenemia para citomegalovírus no pós-transplante renal: Escolha de um ponto de corte para o diagnóstico de doença citomegálica. [Tese - Mestrado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.
67. Schroeder R, Michelon T, Fagundes I, Bortolotto A, Lammerhirt E, Oliveira J et al. Cytomegalovirus Disease Latent and Active Infection Rates During the First Trimester After Kidney Transplantation. *Transplant Proc.* 2004;36(4):896-8.
68. Brytting M, Sundqvist VA, Stålhandske P, Linde A, Wahren B. Cytomegalovirus detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. *J Virol Methods.* 1991;32(2-3):127-38.
69. Schmidt CA, Oettle H, Wilborn F, Jessen J, Timm H, Schwerdtfeger R et al. Demonstration of cytomegalovirus after bone marrow transplantation by polymerase chain reaction, virus culture and antigen detection in buffy coat leukocytes. *Bone Marrow Transplant.* 1994;13(1):71-5.
70. Zhong L, Men TY, Li H, Peng ZH, Gu Y, Ding X, et al. Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections after liver transplantation - spectrum and risk factors. *J Infect.* 2012;64(3):299-310.
71. Aquino VH, Figueiredo LTM. Cytomegalovirus Infection in renal Transplant Recipients diagnosed by nested-PCR. *Brazilian Journal of Medical.* 2001;34(2):93-101.
72. De Tommaso AM, Andrade PD, Costa SC, Escanhoela CA, Hessel G. High frequency of human cytomegalovirus DNA in the liver of infants with extrahepatic neonatal cholestasis. *BMC Infect Dis.* 2005;5:108.

73. Nogueira E, Arruda VR, Bizzacchi JM, Costa FF, Ozelo MC, Rossi CL et al. Possible association between cytomegalovirus infection and gastrointestinal bleeding in hemophiliac patients. *Acta Haematol.* 2000;103(2):73-7.
74. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of Cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect. Dis.* 1988;158(6):1177-84.
75. Tokimatsu I, Tashiro T, Nasu M. Early Diagnosis and Monitoring of human Cytomegalovirus pneumonia in Patients with Adult T-cell Leukemia by DNA Amplification in Serum. *Chest* .1995;107:1024-7.
76. Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM, Arnheim N. Detection of Cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infect with Human Immunodeficiency Virus. *J Infect Dis.* 1988; 58(6):1185-92.
77. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definition of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002;15;34(8):1094-7.
78. Paya CV, Wilson JA, Espy MJ, Sia IG, DeBernardi MJ, Smith TF et al. Preemptive use of oral ganciclovir to prevent cytomegalovirus infection in liver transplant patients: a randomized, placebo-controlled trial. *J Infect Dis.* 2002;1;185(7):854-60.
79. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science.* 1994;16;266(5192):1865-9.
80. <http://www.abionline.com>
81. Li C, Wen TF, Mi K, Wang C, Yan LN, Li B. . Analysis of infections in the first 3-month after living donor liver transplantation. 2012;28;18(16):1975-80.
82. Oltean M, Herlenius G, Gäbel M, Friman V, Olausson M. Infectious complications after multivisceral transplantation in adults. 2006;38(8):2683-5.

83. Razonable RR, Findlay JY, O'Riordan A, Burroughs SG, Ghobrial RM, Agarwal B et al. Critical care issues in patients after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2011;17(5):511-27.
84. Moreno A, Cervera C, Gavaldá J, Rovira M, Cámara R, Jarque I, et al. Bloodstream infections among transplant recipients: results of a nationwide surveillance in Spain. *Am J Transplant.* 2007;7(11):2579-86.
85. Sun HY, Cacciarelli TV, Wagener MM, Singh N. Impact of the Duration of Posttransplant Renal Replacement Therapy on Bacterial Infections in Liver Transplant Recipients. *Liver Transpl.* 2011;17(10):1212-7.
86. Florescu DF, McCartney AM, Qiu F, Langnas AN, Botha J, Mercer DF et al. Staphylococcus aureus infections after liver transplantation. 2012;40(3):263-9.
87. Scott GM, Naing Z, Pavlovic J, Iwasenko JM, Angus P, Jones R, et al. Viral factors influencing the outcome of human cytomegalovirus infection in liver transplant recipients. *J Clin Virol.* 2011;51(4):229-33.
88. Guardia AC, Stucchi RS, Sampaio AM, Milan A, Costa SC, Pavan CR et al. Human herpesvirus 6 in donor biopsies associated with the incidence of clinical cytomegalovirus disease and hepatitis C virus recurrence. *Int J Infect Dis.* 2012;16(2):124-9.
89. Hoppe L, Bressane R, Lago LS, Schiavo FL, Marroni CA, Keiserman DR et al. Risk factors associated with cytomegalovirus-positive antigenemia in orthotopic liver transplant patients. *Transplant Proc.* 2004;36(4):961-3.
90. Sampaio AM, Thomasini RL, Guardia AC, Stucchi RS, Rossi CL, Costa SC, et al. Cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and human herpesvirus-7 in adult liver transplant recipients: diagnosis based on antigenemia. *Transplant Proc.* 2011; 43(4):1357-9.
91. Razonable RR, Paya CV. The impact of human herpesvirus-6 and -7 infection on the outcome of liver transplantation. *Liver Transpl.* 2002; 8:651.

92. Marcelin AG, Roque-Afonso AM, Hurtova M, Dupin N, Tulliez M, Sebah M et al. Fatal disseminated Kaposi's sarcoma following human herpesvirus 8 primary infections in liver-transplant recipients. *Liver Transpl.* 2004;10: 295–00.
93. García-Astudillo LA, Leyva-Cobián F. Human herpesvirus-8 infection and Kaposi's sarcoma after liver and kidney transplantation in different geographical areas of Spain. *Transpl Immunol.* 2006;17(1):65-9.
94. Cunha AMG. Detecção do Herpesvírus Humano 8 (HHV-8) em pacientes com sarcoma de Kaposi, mieloma múltiplo e em doadores de sangue. [Tese - Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2001.
95. Di Benedetto F, Di Sandro S, De Ruvo N, Berretta M, Masetti M, Montalti R et al. Kaposi's sarcoma after liver transplantation. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134(6):653-8.

ANEXOS

ANEXO I

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa / FCM



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 22/07/08.
(PARECER CEP: Nº 403/2003)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "DETECÇÃO E MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA POR CÍTOMEGALOVÍRUS, HHV-6 E HHV-7 PELA TÉCNICA DE ANTIGENEMIA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS HEPÁTICOS".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ana Maria Sampaio

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a inclusão do projeto "DIAGNÓSTICO CLÍNICO-LABORATORIAL PARA HERPESVÍRUS HUMANO HCMV, HHV-7 E HHV-8 POR TÉCNICAS IMUNOCITOQUÍMICAS E MOLECULARES EM TRANSPLANTADOS DE FÍGADO" com a finalidade de doutorado, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de julho de 2008.

Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

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

Página 1 de 1

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a colaborar com o projeto de pesquisa **“Herpesvírus Humano: HCMV, HHV-6, HHV-7 e HHV-8 no Transplante Hepático: Detecção e Monitorização pela AGM e pela N-PCR”** que será realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. O objetivo desse estudo é avaliar e comparar alguns métodos para detecção da infecção ativa pelos *Herpesvírus*. Serão utilizadas técnicas diferentes para a realização deste diagnóstico e que para isso serão colhidos 12 mL de sangue no pré-transplante e no pós-transplante sendo realizadas coletas semanais regulares até completarem seis meses. Não há riscos previsíveis para esse procedimento. O material biológico obtido será processado e devidamente armazenado no laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular até o final do estudo. Caso haja necessidade de atualização do material em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, fica o seu critério escolher uma das opções abaixo:

sim, concordo que o material biológico obtido nesse estudo seja armazenado e utilizado em pesquisa futuras.

não, não desejo que o material biológico obtido nesse estudo seja utilizado em pesquisas futuras.

Espera-se que, a partir de resultados obtidos, seja possível o estabelecimento do método mais eficaz que possa auxiliar no diagnóstico precoce da infecção ativa pelos *Herpesvírus*: HCMV, HHV-6, HHV-7 e HHV-8 e no tratamento de pacientes transplantados de fígado, portanto, esse estudo não lhe trará benefícios diretos e imediatos. A sua participação na pesquisa não traz complicações legais e a qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento sem que essa decisão lhe traga prejuízos. As informações obtidas serão confidenciais e quaisquer dados serão divulgados de

forma que não possibilite sua identificação, assegurando total privacidade. Não haverá nenhuma forma de reembolso de dinheiro, já que sua participação não lhe trará nenhum gasto. O pesquisador responsável pela pesquisa (identificação abaixo) lhe apresentará o termo e estando de acordo com o presente documento, você assinará duas vias de igual conteúdo e forma, ficando uma em sua posse. Você tem a garantia de tomar conhecimento e obter informações, a qualquer tempo, dos procedimentos e métodos utilizados neste estudo, bem como dos resultados parciais e finais da pesquisa. Para tanto, você poderá consultar o pesquisador responsável. Outras informações consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp com endereço na Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 Cx Postal 6111, telefone (19) 3751-8936, e e-mail cep@fcm.unicamp.br.

Pesquisadora Responsável

Ana Maria Sampaio

Telefone: (19) 3521-8557

E-mail: dra_ana@fcm.unicamp.br

Paciente

Nome:

R.G.:

ANEXO III

Protocolo de cultura de líquidos biológicos

Os microrganismos multiplicam-se no meio de cultura gerando CO₂. O aumento de CO₂ origina a alteração de cor do sensor no fundo do frasco de hemocultura do sistema *Bact / ALERT 3 D* (*bioMérieux*, França).

Pela medição de luz refletida, o *BacT / ALERT 3D* monitoriza e detecta as alterações de cor no sensor. A análise dos dados é efetuada por algoritmos que determinam a sua positividade, sendo o laboratório notificado imediatamente através de alarmes visuais e sonoros. As alterações no sensor são permanentes e visíveis a olho nu, ao contrário de qualquer outro método.

Após o resultado positivo da hemocultura e da urocultura realiza-se a triagem através da bacterioscopia obtendo o resultado da coloração de gram + (positivo) ou gram - (negativo).

A identificação do microrganismo foi realizada através dos testes bioquímicos convencionais (semeada usando uma alça calibrada para inoculação na placa em meio sólido, sendo, em meio ágar *McConkey*, os gram-positivos; em meio ágar *sangue*, os gram-negativos e em meio *chocolate* os cocos e os bacilos. O método preferencialmente utilizado é o de esteira. A placa é incubada de 18 a 24 horas e o número de colônias é contado) e ou através da automação pelo Sistema VITEK® (*bioMérieux*, França) utilizando cartão específico.

O sistema VITEK® automatiza todas as etapas necessárias para a realização dos testes de identificação, usando os cartões (GN para os gram - e AST 612 ou AST 101 para os gram +). Apresenta-se num acondicionamento unitário, o que garante uma verdadeira conservação dos testes até utilização. Do tamanho de um cartão de crédito, é fácil de guardar ou de eliminar. Após inoculação, é selada e por isso pode ser manipulada sem risco de contaminação. Cada carta de identificação inclui 30 poços que contêm substratos bioquímicos desidratados. Não é necessário reagente adicional, o que elimina qualquer risco

de omissão ou de erro. A identificação VITEK® cobre mais de 300 espécies encontradas em clínica e na área industrial.

O sistema acima é composto por um suporte de enchimento / selador, um incubador / leitor, um computador e uma impressora. O suporte de enchimento / selador permite a inoculação dos cartões em alguns minutos. O incubador / selador simultaneamente incuba e lê os cartões e tem uma capacidade que varia entre 32 e 480 cartões, conforme o modelo do aparelho. O computador com o programa VITEK® gere continuamente as operações em curso, memoriza os valores, trata e interpreta os resultados.

ANEXO IV

Protocolo da extração do DNA de leucócitos de sangue periférico com NaOH (Hidróxido de Sódio) e Tris-HCL (Hidroximetil-Ácido Clorídrico)

O método utilizado para a obtenção do DNA seguiu o protocolo de Schmidt et al. (8) ⁶⁹.

A cada quatro mL de sangue contendo EDTA como anticoagulante, um mL de dextran 6% foi acrescentado. A mistura foi incubada à 37°C por 30 minutos para permitir agregação e sedimentação dos eritrócitos. O sobrenadante rico em leucócitos foi transferido para outro tubo e centrifugado a 1500 rpm por cinco minutos. Ao pellet de células foi adicionada solução de lise, composta de NH₄HCO₃ (Bicarbonato de Sódio) a 0,01M (Molar) e NH₄CL (Cloreto de Amônio) a 0,144 M, proporção 1:10, para ruptura dos eritrócitos remanescentes. Sucessivas lavagens foram realizadas até eliminação completa dos eritrócitos. A cada ciclo, foi realizada centrifugação à 1500 rpm (Rotações por Minuto) por cinco minutos.

Aos leucócitos contidos em tubos plásticos de 1,5 mL, acrescentou-se solução de NaOH a 50 mM. Após incubação em banho-seco à 100°C, por 30 minutos, acrescentou-se à mistura de Tris-HCL a 1M (pH = 7,5). Após centrifugação à 4°C por cinco minutos, à 12.000 rpm, o sobrenadante foi transferido para outro tubo plástico e mantido sob à -20°C até o momento da amplificação.

ANEXO V

Protocolo da Reação em Cadeia da Polimerase para a detecção do gene humano da β -globina para o citomegalovírus e para o *Herpesvírus Humano 8*

Todas as amostras de DNA obtidas da extração de leucócitos do sangue periférico a serem analisadas foram inicialmente testadas para a presença do gene humano da β -globina, dessa maneira, pudemos verificar qualquer falha durante a execução da técnica de extração, confirmando a presença de DNA e, também, eliminando a possibilidade da presença de interferentes que poderiam inibir a reação de amplificação para a detecção do CMV e do HHV-8 gerando resultados falso-negativos ⁷¹.

Em todas as amostras com DNA presente foram observados fragmentos de 110 pb correspondentes ao gene da β -globina. A amplificação do fragmento do gene da β -globina humana evidencia a viabilidade do DNA da amostra e funciona como controle da reação de PCR. A não amplificação desse gene demonstra que o DNA presente na amostra avaliada não é viável e, portanto, deve ser excluído da reação ⁷¹.

A reação da PCR para o diagnóstico do gene humano da β -globina foi realizada seguindo as condições descritas por De Tommaso et al. (5) ⁷³, com modificações, e constitui-se de: 2 μ L de Buffer 10X (composição: KCL (Cloreto de Potássio) a 500 mM, Tris-HCL a 200 mM (Milimolar), pH = 8,4); MgCL₂ (Cloreto de Magnésio) a 1,5 mM; 2 μ M (Micromolar) de cada oligonucleotídeo, denominados PCO3 e PCO4 (Iniciador de Primer – sequência descrita na Tabela 1); 2 μ L de DNTP (Desoxirribonucleotídeo Fosfatados) (dATP – Desoxirribonucleotídeo Adenina Trifosfato, dCTP – Desoxirribonucleotídeo Citosina Trifosfato, dGTP – Desoxirribonucleotídeo Guanina Trifosfato e dTTP – Desoxirribonucleotídeo Timidina Trifosfato) 1,5 mM; 0,8 μ L do DNA a ser analisado, obtido da lise de leucócitos, segundo o protocolo de extração – anexo IV; 0,5 U da enzima “Taq (Thermuss Aquaticus) DNA Polymerase, Recombinant”

(Life Technologies) e água esterilizada suficiente para se completar o volume final de reação de 20 µL. Uma gota de óleo mineral foi adicionada a cada tubo a fim de se evitar a evaporação dos reagentes.

A amplificação ocorreu em termociclador "Robocycler™ 40 - Stratagene" (USA, Waltham – MASS), totalizando 30 ciclos, sendo estes precedidos de desnaturação inicial à 94°C por cinco minutos e finalizados de extensão final à 72°C durante sete minutos. Os 30 ciclos compreenderam: desnaturação: 94°C – 45 segundos; anelamento: 55°C – 45 segundos e extensão: 72°C – um minuto.

Tabela 1: Sequência nucleotídica dos iniciadores (“primers”) utilizados para a detecção do gene humano da β-globina para o citomegalovírus e para o *Herpesvírus Humano 8*

“Primers”	Seqüência nucleotídica 5’ – 3’
PCO3	CTTCTGACACA ACTGTGTTCACTAGC
PCO4	TCACCACCAACTTCATCCACGTTCCACC

Seqüência descrita por De Tommaso et al. (5) ⁷⁹. **Produto amplificado de 110 pb**

Para a eletroforese cinco µL do produto da PCR foram submetidos em gel de agarose (Gibco-BRL Life Technology, Carlsbad, CA, USA) 2% corado com brometo de etídeo (0,1 µg / mL de gel), juntamente com dois µL de solução corante de azul de bromofenol. Observou-se um fragmento de 110 pb correspondente à região do gene flanqueada pelos primers utilizados, em todas as amostras. Foi visualizado com luz ultravioleta e fotografado em sistema Polaroyd.

ANEXO VI

Protocolo de diagnóstico do citomegalovírus

1. Detecção do antígeno pp65 do citomegalovírus em neutrófilos do sangue periférico – antigenemia

O método utilizado para a AGM do CMV foi a imunofluorescência através do kit CMV BRITE TURBO (*Iq Products*, Holanda), descrito segundo o fabricante.

As amostras de sangue (quatro mL) foram coletadas em tubos contendo como anticoagulante EDTA e processadas no prazo de até seis horas após coleta.

Os leucócitos foram sedimentados com a lise dos eritrócitos. Incubados a 10 minutos a 4^oC, seguido de centrifugação e desprezado sobrenadante. Para remoção das hemácias persistentes, foi usada uma suspensão outra vez da lise dos eritrócitos, seguido de centrifugação. O sobrenadante foi então desprezado novamente e o sedimento celular lavado com PBS (Tampão Fosfato Salino), centrifugado e então foi ressuspensionado em 500 µL de PBS.

Após a extração, os leucócitos foram contados em câmara de Neubauer e preparada uma suspensão com 2 x 10⁶ células / mL. Cem µL desta suspensão foram colocadas em citofunil e centrifugadas em citocentrífuga (Revan-mod. Citociclo) a 600 rpm por quatro minutos em lâminas de vidro na citocentrífuga.

A seguir, as lâminas (feitas em duplicata) foram secas, fixadas com reagente B em temperatura ambiente por cinco minutos em câmara escura. Lavadas três vezes com PBS e em seguida, imersas na solução de permeabilização (reagente C) em temperatura ambiente e depois lavadas três vezes com PBS.

As lâminas foram mantidas em câmara úmida durante a coloração, depois aplicamos o anticorpo monoclonal primário C10 / C11 que reconhecem o antígeno pp65 do CMV. Mergulhamos as lâminas em solução de lavagem, aplicamos o conjugado (reagente E), lavamos por duas vezes com PBS fresco.

Montamos com glicerina tamponada diluída e cobrimos com lamínula.

A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência em toda lâmina e células positivas mostraram coloração verde-amarelada no núcleo polilobulado da célula. Este teste forneceu um resultado quantitativo, indicando o número de células positivas, ou seja, com replicação viral ativa.

2. Dupla Reação em Cadeia da Polimerase para a detecção do DNA do citomegalovírus em leucócitos do sangue periférico

Para detecção do DNA do CMV em leucócitos do sangue periférico através da Reação em Cadeia da Polimerase, seguimos a metodologia descrita por Nogueira et al. (7)⁷³, com algumas modificações.

2.1. Condições da primeira reação da Reação em Cadeia de Polimerase do citomegalovírus

As condições da primeira reação da PCR para o diagnóstico do CMV pouco diferiram da reação para a amplificação gênica da β -globina anteriormente descrita no anexo V. Mantendo-se a mesma concentração dos reagentes e volume final da reação, porém utilizando os oligonucleotídeos externos, denominados de MIE4 e MIE5 (sequência descrita na Tabela 2), que flanqueiam uma região conservada do vírus, correspondente ao gene que codifica a proteína major immediate-early.

A amplificação foi finalizada com 30 ciclos, com os mesmos tempos e temperaturas de desnaturação inicial e extensão final, mas com as seguintes modificações: desnaturação: 94°C – um minuto; anelamento: 55°C – um minuto e extensão: 72°C – um minuto e 30 segundos.

Tabela 2: Sequência nucleotídica dos iniciadores (“primers”) utilizados para a detecção do citomegalovírus na primeira reação da Reação em Cadeia de Polimerase

“Primers”	Seqüência nucleotídica 5’ – 3’
MIE4	CCAAGCGGCTCTGATAACCAAGCC
MIE5	CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG

Seqüência descrita por Demmler et al. (4) ⁷⁴, Tokimatsu et al. (3) ⁷⁵, Nogueira et al. (7) ⁷³
Produto amplificado de 435 pb

2.2. Condições da segunda reação da Nested-Reação em Cadeia de Polimerase do citomegalovírus

Para a N-PCR, 0,6 µL do produto da primeira reação de PCR foi utilizada como substrato para a realização da segunda reação de amplificação, utilizando-se um par de iniciadores internos ao produto da primeira reação, denominados IE1 e IE2 (Iniciador de Primer – sequência descrita na Tabela 3).

A dupla reação de amplificação foi preparada observando-se as mesmas condições da primeira reação da PCR (item 2.1.) quanto à concentração dos reagentes, volume final de reação e número total de ciclos, sendo as únicas alterações: desnaturação: 94°C – 40 segundos; anelamento: 57°C – 40 segundos e extensão: 72°C – um minuto e 30 segundos.

Tabela 3: Sequência nucleotídica dos iniciadores (“primers”) utilizados para a detecção do citomegalovírus na segunda reação da Nested-Reação em Cadeia de Polimerase

“Primers”	Seqüência nucleotídica 5’ – 3’
IE1	CCACCCGTGGTGCCAGCTCC
IE2	CCCGCTCCTCCTGAGCACCC

Seqüência descrita por Shibata et al. (6) ⁷⁶, Tokimatsu et al. (3) ⁷⁵, Nogueira et al. (7) ⁷³
Produto amplificado de 159 pb

Seguindo o mesmo procedimento descrito no anexo V, nas amostras positivas, observou-se um fragmento de 159 pb, enquanto, nas amostras negativas, nenhum fragmento foi observado. Controle positivo, negativo e branco da reação foi utilizado, sendo, respectivamente, a cepa AD 169, uma amostra negativa e água esterilizada. Foi visualizado com luz ultravioleta e fotografado em sistema Polaroyd.

2.3.Sorologia para as imunoglobulinas G e M do citomegalovírus

A sorologia IgG e IgM para o CMV foi realizada através do Sistema Vidas (*biomeriéux*, França).

ANEXO VII

Protocolo de diagnóstico do *Hespesvírus Humano 8*

1. Ampliação gênica pela Reação em Cadeia de Polimerase e pela Nested-Reação em Cadeia de Polimerase para detecção da região Open Reading Frame-26 do *Hespesvírus Humano 8*

A ampliação gênica pela PCR e pela N-PCR para detecção da região ORF-26 do HHV-8 seguiu a metodologia descrita por Chang et al. (7) ⁷⁹.

1.1. Condições da primeira Reação em Cadeia de Polimerase da região Open Reading Frame-26 do *Hespesvírus Humano 8*

Para cada reação de amplificação foi utilizado um µL (200 ng) do DNA a ser analisado para 30 µL de reação. Foram adicionados 1,5 mM de Buffer, dois pmol de cada “primer” KS4 e KS5 (Iniciador de Primer - sequência descrita na Tabela 4), que flanqueiam uma região de 571 pb, 200 mM de cada desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 1U de Taq DNA Polimerase (KapaBiosystems KK 1023).

Tabela 4: Sequência nucleotídica dos iniciadores (“primers”) utilizados para a detecção da região Open Reading Frame-26 do *Hespesvírus Humano 8* na primeira reação da Reação em Cadeia de Polimerase

“Primers”	Seqüência nucleotídica 5’ – 3’
KS4	GCACTCGCAGGGCAGTACG
KS5	GACTCTTCGCTGATGAACTGG

Seqüência descrita por Chang et al. (7) ⁸⁰. Produto amplificado de 571 pb

4.2. Condições da segunda reação da Nested-Reação em Cadeia de Polimerase da região Open Reading Frame-26 do *Hespesvírus Humano 8*

Para a técnica de N-PCR, as condições de reação foram as mesmas utilizadas na primeira reação da PCR, sendo que para a segunda reação uma alíquota do produto da primeira reação (dois μL) foi reamplificada com os “primers” KS1 e KS2 (Iniciador de Primer - sequência descrita na Tabela 5), que flanqueiam uma região de 233 pb, um fragmento interno ao amplificado na primeira reação; o volume final da reação foi de 50 μL .

Tabela 5: Sequência nucleotídica dos iniciadores (“primers”) utilizados para a detecção da região Open Reading Frame-26 do *Hespesvírus Humano 8* na Nested-Reação em Cadeia de Polimerase

“Primers”	Seqüência nucleotídica 5’ – 3’
KS1	AGCCGAAAGGATTCCACCAT
KS2	TCCGTGTTGTCTACGTCCAG

Seqüência descrita por Chang et al. (7) ⁹. Produto amplificado de 233 pb

Para visualização, cerca de cinco μL do produto amplificado, acrescidos de um μL do corante azul de bromofenol, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Nas amostras positivas, deveria ser observado um fragmento de 233 pb, ao passo que nas amostras negativas não constatou fragmento amplificado. Como controle positivo da reação usou uma alíquota de DNA extraído de biópsia de paciente com diagnóstico de SK e sorologia positiva para o HHV-8 (DNA e genoma completo do vírus). O controle branco da reação foi composto dos reagentes utilizados no preparo do “Master”, acrescido de água pura.

2. Sorologia por técnica da imunoperoxidase IgG ELISA para *Hespesvírus Humano 8*

Para detecção qualitativa de anticorpos específicos contra os antígenos da fase lítica do HHV-8 foi utilizado o Kit de imunensaio enzimático por ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-HHV-8 da empresa ABI (*Advanced Biotechnologies Incorporated*, Maryland, USA), seguindo as instruções do fabricante⁸⁰.

Primeiramente, as amostras de soro que permaneciam estocadas a freezer -20°C foram aliqotada 50 uL em tubos de eppendorf e centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos a 4°C, para que se pudesse garantir uma amostra não lipêmica.

Anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica da infecção HHV-8 presentes no soro dos pacientes sob suspeita desta infecção foram detectados em placa de poliestireno de 96 cavidades, recobertas com antígeno bruto do HHV-8 obtido de cultura de células infectadas KS-1 (lisado viral).

As amostras a serem analisadas juntamente ao soro controle positivo (duplicata), soro controle negativo (triplicata), branco (triplicata), foram diluídos em tubos contendo 495 µL de diluente da amostra e adicionando-se cinco µL de soro (diluição 1:100). Cem µL das amostras foram depositados nas cavidades da placa e incubados por 30 minutos a 37°C. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (Tampão Fosfato Tween). Posteriormente, foram adicionados 100 µL de conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase, em cada cavidade da placa, e após nova incubação por 30 minutos a 37°C e três lavagens com tampão de lavagem e a reação foi prosseguida pela adição de 100 µL de solução substrato TMB (Tetrametilbenzidina). Nesta etapa da reação, as placas foram mantidas por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. A reação enzimática foi bloqueada pela adição de 100 µL de solução de parada (Ácido Sulfúrico um N) e a leitura foi feita em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan MS, Finlândia) com filtro de comprimento de onda de 450 nm (Nanômetro).

Quando a leitura da reação foi menor ou igual a 0,75, o soro foi considerado não reagente; quando maior ou igual a um, como soro reagente e entre 0,76 e 0,99 como inconclusivos (soro “borderline”).

Na tabela abaixo pode ser observada a composição do kit de sorologia IgG da ABI.

Tabela 6: Conjunto de Reagentes do Kit de sorologia para imunoglobulina G *Advanced Biotechnologies Incorporated*

Reagentes	Composição
Linhagem celular (antígeno)	KS-1 – Lisado viral
Diluição da amostra	1:101 em diluente da amostra – 4x diluir em água deionizada
Tampão de lavagem	Tampão fosfato-tween – 20x diluir em água deionizada
Conjugado	Anti-IgG humana marcada com peroxidase – pronto para o uso
Substrato	Tetrametilbenzidina – pronto para o uso
Solução de parada	Ácido sulfúrico 1N – pronto para o uso

ANEXO VIII

Tabela 10: Análise descritiva do monitoramento dos *Herpesvírus*: citomegalovírus, *Herpesvírus Humano 8* e infecção bacteriana

SEMANA 0							
PACIENTES	CMV IgG 0	CMV IgM 0	HHV-8 IgG 0	HHV-8 PCR 0	CMV PCR 0	CMV AGM 0	INF. BACT.
1	S	N	N	N	N	N	N
2	S	N	N	N	N	N	N
3	S	N			N	N	N
4	S	N					N
5	S	N					N
6	S	N					N
7	S	N					N
8	S	N					N
9	S	N			N	N	N
10	S	N	N	N			N
11	S	N			N	N	N
12	S	N			N	N	N
13	S	N	N	N			N
14	S	N	N	N			N
15	S	N					N
16	S	N	N	N			N
17	S	N	N	N			N
18	S	N	N	N	N	N	N
19	S	N			N	N	N
20	S	N	N	N	N	N	N
21	S	N	N	N	N	N	N
22	S	N			N	N	N
23	S	N	N	N			N
24	S	N					N
25	S	N			N	N	N
26	S	N	N	N	N	N	N
27	S	N			N	N	N
28	S	N			N	N	N
29	S	N	N	N	N	N	N
30	S	N	N	N			N
31	S	N	N	N			N
32	S	N	N	N	N	N	S
33	S	N					N
34	S	N	N	N			N
35	S	N			N	N	N
36	S	N	N	N	N	N	N
37	S	N					N
38	S	N					N
39	S	N			N	N	N
40	S	N	N	N	N	N	N
41	S	N					N
42	S	N					N
43	S	N	N	N	N	N	N
44	S	N	N	N	N	N	N
45	S	N	N	N	N	N	N
46	S	N	N	N	N	N	N
47	S	N	N	N	N	N	N
48	S	N			N	N	N
49	S	N	N	N	N	N	N
50	S	N	N	N	N	N	N

ANEXO IX

Tabela 11: Análise descritiva do monitoramento dos *Herpesvírus*: citomegalovírus, *Herpesvírus Humano 8* e infecção bacteriana

PACIENTES	SEMANA 1 (7 dias)			SEMANA 2 (14 dias)		
	CMV PCR 1	CMV AGM 1	INF. BAC.	CMV PCR 2	CMV AGM 2	INF. BAC.
1	N	N	N			N
2	N	N	N	N	N	N
3	N	N	N			N
4	N	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	N	S
7	N	N	N	S	N	N
8	N	N	N			N
9	N	N	N	N	N	N
10	N	N	N	N	N	N
11	S	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N	N
13	N	N	N	N	N	N
14			N	N	N	S
15			N			N
16			N	N	N	N
17	N	N	N	N	N	N
18	N	N	N	N	N	N
19	N	N	N	N	N	N
20	N	N	N			N
21	N	N	N	N	N	N
22	N	S	N	N	S	N
23			N			N
24	N	N	N	N	N	N
25	N	N	N			N
26	N	N	S			N
27	N	N	N	S	N	N
28	N	N	N			N
29	N	N	N			N
30	N	N	N	N	N	N
31	N	N	N	N	N	N
32	N	N	N	N	N	N
33	N	N	N	N	N	N
34	N	N	N	N	N	N
35	N	N	N			N
36	N	N	N			N
37	N	N	N			N
38	N	N	N			N
39			N			N
40			N	N	N	N
41	N	N	N			N
42	N	N	N	N	N	N
43	N	N	N	N	N	N
44	N	N	N	N	N	N
45	N	N	N			N
46			N			N
47			N			N
48	N	N	N			N
49			N	N	N	N
50	N	N	N	N	N	N

ANEXO X

Tabela 12: Análise descritiva do monitoramento dos *Herpesvírus*: citomegalovírus, *Herpesvírus Humano 8* e infecção bacteriana

PACIENTES	SEMANA 3 (21 dias)			SEMANA 4 (28 dias)			
	CMV PCR 3	CMV AGM 3	INF. BAC.	HHV-8 PCR 4	CMV PCR 4	CMV AGM 4	INF. BAC.
1	N	N	N	N			N
2	N	N	N	N			N
3			N		N	S	S
4	N	N	N		N	S	N
5			N				N
6			N				N
7			N		N	N	N
8			N				N
9	N	N	S		S	S	N
10	N	N	N	N	N	N	N
11			N		S	S	S
12	N	N	N		S	N	N
13	N	N	N	N	N	N	S
14			N	N			N
15			N				N
16			N	N	S	N	N
17	N	N	S	N	S	N	N
18	N	N	N	N	N	N	N
19			N				N
20			N	N	N	N	S
21			N	N			N
22	S	N	N		S	N	N
23	S	S	S	N			N
24			N		S	N	N
25	N	N	N				N
26	N	N	N	N	N	N	N
27	N	N	N		N	N	N
28	N	N	N		N	N	N
29	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N			N
31			N	N			N
32			N	N	N	N	N
33	N	N	N		N	S	N
34			N	N	S	N	N
35	N	N	N				N
36	N	N	N	N			N
37			N				N
38	N	N	N		N	N	N
39			N		S	N	N
40			N	N			N
41			N		N	N	N
42	N	N	N				N
43	N	N	N	N			N
44	S	N	N	N			N
45			N	N	N	N	N
46			N	N			N
47	N	N	N	N			N
48	N	N	N		N	N	N
49	N	N	N	N			N
50	N	N	N	N	N	N	N

ANEXO XI

Tabela 13: Análise descritiva do monitoramento dos *Herpesvírus*: citomegalovírus, *Herpesvírus Humano 8* e infecção bacteriana

PACIENTES	SEMANA 5 (35 dias)			SEMANA 6 (42 dias)		
	CMV PCR 5	CMV AGM 5	INF. BAC.	CMV PCR 6	CMV AGM 6	INF. BAC.
1	S	S	S			N
2			N			N
3			N	S	N	N
4	N	N	N	S	S	S
5	S	N	N	S	N	S
6	N	N	N			N
7	S	N	N	S	S	N
8			N	S	S	S
9	S	N	N	S	S	N
10	N	N	N	N	N	N
11	S	N	N			N
12	S	S	N			N
13	N	S	N			N
14			N			N
15	N	N	N	N	N	N
16	S	N	S			N
17	N	S	N	N	N	N
18	N	N	N	S	N	N
19			N			N
20	N	N	N			N
21			S	S	N	N
22	N	N	S			N
23			N			N
24	N	S	N			N
25			N	N	N	N
26	N	N	N			N
27	N	N	N	N	N	N
28	N	N	N			N
29	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N
31			N			N
32	N	N	N			N
33	N	N	N			N
34			N			N
35	N	N	N			N
36	N	N	N			N
37			N			N
38	N	N	N	N	N	N
39	N	N	N			N
40	N	S	N	S	S	N
41			N			N
42			N	N	N	N
43			N	N	N	N
44			N			N
45	S	N	N			N
46	N	N	N	N	N	N
47	N	N	N			N
48	N	N	N			N
49	N	N	N	N	N	N
50			N			N

ANEXO XII

Tabela 14: Análise descritiva do monitoramento dos *Herpesvírus*: citomegalovírus, *Herpesvírus Humano 8* e infecção bacteriana

PACIENTES	SEMANA 7 (49 dias)			SEMANA 8 (56 dias)		
	CMV PCR 7	CMV AGM 7	INF. BACT.	CMV PCR 8	CMV AGM 8	INF. BACT.
1	S	N	N			N
2			N			N
3	N	N	N			N
4			N			N
5			N	S	S	N
6	N	N	N			N
7	S	S	S	N	N	N
8			N	S	N	N
9	S	S	N	S	S	N
10	N	N	N	N	N	N
11	N	N	N	S	N	N
12	S	N	N			N
13	N	N	N	N	N	N
14			N	N	N	N
15			N			N
16			N	N	N	N
17	N	N	N	S	N	N
18	S	N	N	N	N	S
19	N	N	N	N	N	N
20	N	N	N			N
21	S	N	N			N
22	N	N	N	N	N	N
23			N	N	N	N
24			N	N	N	N
25	N	N	N	S	S	N
26			N			N
27	N	N	N	N	N	N
28			N	N	N	N
29			N	N	N	N
30			N	N	N	N
31			N			N
32			N			N
33			N	N	N	N
34	N	N	N			N
35			N			N
36			N			N
37			N			N
38	N	N	N	N	N	N
39			N	N	N	N
40			N	N	N	N
41			N	N	N	N
42			N			N
43			N			N
44			N	N	N	N
45	N	N	N			N
46			N	N	N	N
47	N	N	N			N
48			N			N
49	N	N	N			N
50	N	N	N	N	N	N

ANEXO XIII

Tabela 15: Análise descritiva do monitoramento dos *Herpesvírus*: citomegalovírus, *Herpesvírus Humano 8* e infecção bacteriana

PACIENTES	SEMANA 10 (70 dias)			SEMANA 12 (84 dias)		
	CMV PCR 10	CMV AGM 10	INF. BACT.	CMV PCR 12	CMV AGM 12	INF. BACT.
1			N			N
2			N			N
3	N	N	N			N
4	N	N	N	N	N	N
5			N			N
6	N	N	N			N
7	N	N	N			N
8	N	N	N	N	N	N
9	N	N	N	N	N	N
10	S	N	N	N	N	N
11			N	N	N	N
12	N	N	N			N
13			N			N
14			N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	S
16			N			N
17	N	N	N			N
18	N	N	N	N	N	N
19	N	N	N	N	N	N
20			N			N
21			N			N
22	N	N	N			N
23	N	N	N	N	N	N
24			N			N
25	N	N	N	N	N	N
26			N			N
27	N	N	N	N	N	N
28			N			N
29			N			N
30	N	N	N			N
31	N	N	N			N
32			N			N
33	N	N	N	N	N	N
34	N	N	N			N
35			N			N
36			N			N
37	S	N	N	N	N	N
38			N			N
39			N			N
40	N	N	N	N	N	N
41	N	N	N	N	N	N
42			N			N
43			N			N
44	N	N	N			N
45			N			N
46			N			N
47			N			N
48			N			N
49			N			N
50	N	N	N			N

ANEXO XIV

Tabela 16: Análise descritiva do monitoramento dos *Herpesvírus*: citomegalovírus, *Herpesvírus Humano 8* e infecção bacteriana

PACIENTES	SEMANA 14 (114 dias)			SEMANA 20 (144 dias)		
	CMV PCR 14	CMV AGM 14	INF. BACT.	CMV PCR 20	CMV AGM 20	INF. BACT.
1			N	N	N	N
2			N	S	N	N
3	N	N	N			N
4	N	N	N	S	S	N
5	S	N	N			N
6			N			N
7			N			N
8			N			N
9			N	N	N	N
10	S	N	N			N
11	N	N	N	N	N	N
12			N			N
13			N	N	N	N
14			N	N	N	N
15			N			N
16	N	N	N			N
17			N			N
18	N	N	N	N	N	N
19			N	N	N	N
20			N			N
21	N	S	N	N	N	N
22	N	N	N	N	N	N
23	N	N	N			N
24	N	N	N			N
25			N	N	N	N
26	S	N	N			N
27	N	N	N	N	N	N
28			N	N	N	N
29			N			N
30	N	N	N			N
31			N	N	N	N
32			N	N	N	N
33	N	N	N	N	N	N
34			N	N	N	N
35			N	N	N	N
36			N	N	N	N
37	N	N	N	N	N	N
38			N	N	N	N
39	S	N	N	N	N	N
40	N	N	N			N
41	N	N	N	N	N	N
42	N	N	N			N
43			N	N	N	N
44			N	N	N	N
45			N			N
46	N	N	N			N
47			N	N	N	N
48	N	N	N	S	N	N
49			N			N
50	N	N	N			N

ANEXO XV

Tabela 17: Análise descritiva do monitoramento dos *Herpesvírus*: citomegalovírus, *Herpesvírus Humano 8* e infecção bacteriana

PACIENTES	SEMANA 24 (174 dias)		
	CMV PCR 24	CMV AGM 24	INF. BACT.
1			N
2	N	N	N
3	N	N	N
4	N	N	N
5			N
6	S	S	N
7	N	N	N
8	N	N	N
9			N
10			N
11			N
12	N	N	N
13	N	N	N
14	N	N	N
15	N	N	N
16	N	N	N
17	N	N	N
18	N	N	N
19	N	N	N
20			N
21	N	N	N
22			N
23	N	N	N
24	N	N	N
25			N
26			N
27	N	N	N
28			N
29	N	N	N
30	N	N	N
31	N	N	N
32	N	N	N
33	N	N	N
34			N
35	N	N	N
36	N	N	N
37	N	N	N
38			N
39			N
40			N
41			N
42	N	N	N
43			N
44			N
45			N
46			N
47			N
48			N
49			N
50			N

Legenda: N=Negativo; S= Positivo

ANEXO XVI

Tabela 19: Manifestações clínicas, alterações laboratoriais, sítio cirúrgico e imunossupressão observada nos prontuários dos pacientes em estudo

Pc	Manifestações clínicas	Alterações laboratoriais	Rejeição grau	Infecção pós-TX	AGM+	PCR +	Imunossupressão	NSI
1	D+19 Dor abdominal D+34 Rebaixamento nível consciência, confuso	D+20 Aumento FA e GGT D+34 Aumento FA e GGT D+49 Aumento GGT e Plaquetopenia D+110 Aumento GGT e Plaquetopenia D+225 Aumento FA, GGT, Plaquetopenia	D+ 125 Rejeição celular aguda	D+41 Hemocultura+ <i>Acinebacter baumannii</i> + <i>Enterobacter cloacae</i>	+35 (2)	+35, +49	FK 3 mg dia / 3 mg noite	NCP
2	D+22 Diarréia, Febre	D+10 Enzimas elevadas até final seguimento	D+22 Rejeição celular crônica	-	-	-	-	-
3	D+22 Ictérico, Diarréia, Dor abdominal	Discreta elevação das enzimas hepáticas durante o seguimento	Rejeição celular crônica	D+ 33 Hemocultura+ <i>Escherichia coli</i>	+31 (20)	+42	NCP	-
4	D+40 Diarréia, Febre, Icterícia	D+34 Leucopenia, Plaquetopenia, Aumento enzimas hepáticas	-	D+45 Hemocultura+ <i>Burkiloderia cepacia</i>	+30 (2), +42 (5),+1 44 (3)	+42 +144	FK 0 / 0	14,8
5	D+39 Diarréia, Náusea, Vômitos, Icterícia D+50 Febre, Pneumonia	D+43 Aumento TGO, FA, Plaquetopenia	-	D+45 Hemocultura + <i>Staphylococcus aureus</i>	+56 (1)	+35, +42, +56, 58, +144	FK 3 mg dia / 3 mg noite	3,6

Continua...

Continuação anexo XVI

Pc	Manifestações clínicas	Alterações laboratoriais	Rejeição grau	Infecção pós-TX	AGM+	PCR +	Imunossupressão	NSI
6	D+15 Calafrios, Febre	D+12 Aumento TGO, TGP, Plaquetopenia	-	D+16 Hemocultura+ Escherichia coli	+174 (2)	+174	NCP	-
7	D+13 Sepse – foco pulmonar, Diarréia, Vômito, Febre, Tosse	D+8 Plaquetopenia D+15 Aumento TGP, TGO, GGT, FA	-	D+52 Hemocultura + <i>Staphylococcus aureus</i>	+42 (2), +49 (1)	+14, +35, +42, +45, +49, +63	NCP	-
8	D+40 Mal estar, Diarréia	D+32 Aumento FA, GGT, Linfocitose, TGO, TGP	Rejeição celular aguda	D+45 Hemocultura+ <i>Klebsiella pneumoniae</i>	+42 (5)	+42, +56	FK 1 mg dia / 1 mg noite	2,3
9	D+4 Ictérico D+8 Síndrome hepato-pulmonar, Ictérico D+13 Febre D+28 Diarréia D+35 Febre e Diarréia D+49 Febre D+72 Diarréia, Tosse D+164 Icterícia	D+19 Aumento FA, TGP, GGT, Leucopenia D+39 Aumento TGP, TGO D+45 Aumento GGT	D+163 Rejeição celular moderada	D+20 Urocultura+ <i>Klebsiella pneumoniae</i> D+58 Hemocultura + <i>Serratia marcescens</i>	+28 (1), +42 (3), +49 (3), +56 (7), +63 (1)	+28, +35, +42, +49, +56, +63	FK 2 mg dia / 2 mg noite	8,0
10	Assintomático	-	-	-	-	+70, +114	-	-

Continua...

Pc	Manifestações clínicas	Alterações laboratoriais	Rejeição grau	Infecção pós-TX	AGM+	PCR +	Imunossupressão	NSI
11	D+18 Tosse, Calafrios D+27 Sepse - foco abdominal	D+15 Plaquetopenia D+27 Aumento FA, TGO, TGP D+37 Linfocitose	-	D+30 Hemocultura+ <i>Escherichia coli</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	+28 (3)	+7, +28, +35, +56	SIR 1 mg dia	1,5
12	D+34 Mal estar, Dor abdominal	D+29 Linfocitose, Aumento enzimas hepáticas, Plaquetopenia	-	-	+35 (1)	+28, +35,+49	AH	-
13	D+31 Calafrios, Febre	D+13 Plaquetopenia, Leucopenia, Aumento FA, TGO, GGT	-	D+31 Hemocultura+ <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	FK 1 mg dia / 1 mg noite	7,9
14	D+16 Febre, Vômito, Ictérico	Enzimas alteradas durante todo o seguimento D+17 Plaquetopenia	-	D+16 Hemocultura+ <i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	NCP	6,0
15	D+11 Dor abdominal, Tosse	D+20 Aumento FA, GGT, TGP, Plaquetopenia e Leucopenia	-	D+2 Hemocultura + <i>Enterobacter cloacae</i> D+87 Urocultura+ <i>Escherichia coli</i> D+88 Hemo+ <i>Enterobacter cloacae</i>		+70, +84	FK 2 mg dia / 3 mg noite	5,7

Continua...

Continuação anexo XVI

Pc	Manifestações clínicas	Alterações laboratoriais	Rejeição grau	Infecção pós-TX	AGM+	PCR +	Imunossupressão	NSI
16	D+17 Febre D+26 Diarréia, Febre D+29 Ictérico, Desconforto abdominal D+36 Vômito, Febre D+53 Febre D+58 Febre	D+27 Aumento GGT, TGP, FA, Leucopenia D+55 Plaquetopenia	-	D+38 Hemocultura + <i>Escherichia coli</i>	-	+28, +35	FK 2 mg dia / 1 mg noite	5,2
17	D+17 Icterícia D+74 Diarréia	Discreta elevação das enzimas hepáticas durante o seguimento	-	D+16 Urocultura+ <i>Staphylococcus aureus</i> D+22 Hemocultura + <i>Klebsiella pneumoniae</i>	+35 (3)	+28	FK 2 mg dia / 2 mg noite	4,8

Continua...

Continuação anexo XVI

Pc	Manifestações clínicas	Alterações laboratoriais	Rejeição grau	Infecção pós-TX	AGM	PCR +	Imunossupressão	NSI
18	D+12 Ictérico D+42 Dor abdominal, Diarréia D+53 Febre D+63 Sepse - foco abdominal D+67 Ictérico, Encefalopatia hepática, Insuficiência renal aguda	D+67 Aumento TGP, TGO, GGT, BI FA, Plaquetopenia	D+60 Rejeição celular aguda	D+54 Hemocultura+ <i>Klebsiela pneumoniae</i>	-	+42, +49	FK 2 mg dia / 3 mg noite	8,4
19	D+11 Diarréia D+17 Pneumonia D+31 Náusea D+99 Febre	D+34 Leucopenia, Plaquetopenia	-	-	-	-	-	-
20	D+22 Sepse - Infecção ferida cirúrgica	D+20 Aumento Leucócitos, GGT, TGO, TGP, FA, Plaquetopenia durante o seguimento	-	D+22 Hemocultura+ <i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Escherichia coli</i>	-	+35	FK 4 mg dia / 4 mg noite	10,5

Continua...

Continuação Anexo XVI

Pc	Manifestações clínicas	Alterações laboratoriais	Rejeição grau	Infecção pós-TX	AGM+	PCR +	Imunossupressão	NSI
21	D+8 Mal estar D+10 Dor epigástrica D+18 Mal estar, Dor abdominal D+32 Distensão, Dor abdominal, Piora função renal	D+31 Linfocitose, Aumento FA, GGT	-	D+32 Hemocultura+ <i>Escherichia coli</i>	-	+42, +49	FK 2 mg dia / 2 mg noite	4,1
22	D+7 Mal estar	D+25 Leucopenia, Plaquetopenia, Aumento enzimas hepáticas	-	D+32 Urocultura + <i>Escherichia coli</i>	+7 (1), +14 (1)	+21, +28	FK 3 mg dia / 3 mg noite	7,2
23	D+15 Diarréia, Febre D+19 Diarréia	D+67 Aumento TGO, GGT, TGP, Plaquetopenia	-	D+20 Hemocultura+ <i>Proteus mirabilis</i>	+18 (1)	-	FK 3 mg dia / 3 mg noite	5,8
24	D+33 Diarréia, Dor abdominal	D+35 Aumento TGP, TGO, FA, GGT, Plaquetopenia D+131 Aumento GGT, TGP, FA, Plaquetopenia	-	-	+35 (8)	+28	AH	-

Continua...

Continuação Anexo XVI

Pc	Manifestações clínicas	Alterações laboratoriais	Rejeição grau	Infecção pós-TX	AGM+	PCR +	Imunossupressão	NSI
25	D+35 Diarréia D+58 Dor abdominal	Enzimas permanecem elevadas durante todo o seguimento	-	-	+56 (7)	+56	FK 1 mg dia	4,3
26	Assintomático	D+161 Aumento TGP, GGT, Plaquetopenia	-	D+2 Urocultura+ <i>Escherichia coli</i>	-	-	FK 1 mg dia / 1 mg noite	2,0
27	D+19 Sepsis D+30 Nível consciência deprimida D+34 Dor abdominal D+51 Encefalopatia metabólica	D+129 Aumento TGP, TGO, GGT, LD	Rejeição celular leve	-	+35 (3)	+14	-	-
28	D+8 Insuficiência pancreática	-	-	-	-	-	-	-
29	Assintomático	-	-	-	-	-	-	-
30	Assintomático	-	-	-	-	-	-	-
31	Assintomático	D+83 Aumento TGO, TGP permanecendo elevado até o final do seguimento, Plaquetopenia	-	-	-	-	-	-

Continua...

Continuação Anexo XVI

Pc	Manifestações clínicas	Alterações laboratoriais	Rejeição grau	Infecção pós-TX	AGM+	PCR +	Imunossupressão	NSI
32	Assintomático	D+13 Plaquetopenia	-	D+0 Hemocultura + <i>Stapylococcus aureus</i>	-	-	-	-
33	Assintomático	-	-	Não	-	-	-	-
34	D+5 Ictérico	D+10 Aumento TGP, TGO, FA, GGT, Plaquetopenia	-	-	-	+28	-	-
35	D+175 Icterícia, Mal estar	Discreta elevação das enzimas hepáticas durante o seguimento	D+180 Rejeição celular aguda	-	-	-	-	-
36	D+15 Diarréia, Vômito	-	-	-	-	-	-	-
37	Assintomático	Enzimas hepáticas elevadas durante todo o seguimento, Plaquetopenia	-	-	-	+70	-	-
38	Assintomático	-	-	-	-	-	-	-
39	Assintomático	-	-	-	-	+28 +121	-	-
40	D+34 Dor abdominal, Mal estar	-	-	-	+35 (1), +42 (2)	+42	-	-
41	D+17 Dor abdominal	Pequena elavação das enzimas hepáticas durante o seguimento	D+18 Rejeição celular leve	-	-	-	-	-

Continua...

Pc	Manifestações clínicas	Alterações laboratoriais	Rejeição grau	Infecção pós-TX	AGM+	PCR +	Imunossupressão	NSI
42	Assintomático	-	Não	-	-	-	-	-
43	D+26 Vômito D+40 Diarréia	D+40 Aumento TGO, FA, TGP, FA D+43 Plaquetopenia Aumento FA, GGT	-	-	-	-	-	-
44	D+20 Icterícia	D+10 Aumento FA, GGT, TGP, TGO	D+9 Rejeição	-	+21(1)	-	-	-
45	D+44 Icterícia D+70 Diarréia, Tosse com secreção, Febre	D+73 Enzimas hepáticas elevadas	D+46 Rejeição celular aguda grave	-	-	-	-	-
46	Assintomático	-	-	-	-	-	-	-
47	Assintomático	-	-	-	-	-	-	-
48	Assintomático	-	-	-	-	-	-	-
49	D+14 Febre	Discreta elevação das enzimas hepáticas durante o seguimento	Rejeição	-	-	-	-	-
50	D+7 Febre D+13 Febre D+23 Febre D+24 Febre D+120 Febre	D+20 Plaquetopenia Aumento FA, TGO, TGP, GGT	-	-	-	-	-	-

Concluído

Legenda: Pc = Paciente; D+ = Dia Pós Transplante; FA = Fosfatase Alcalina; GGT = Gama-Glutamiltransferase; TGO = Aspartato Aminotransferase; TGP = Alanina Aminotransferase; FK = Tacrolimus; SIR = Sirolimus; NSI = Nível Sérico Imunossupressor; AH = Alta Hospitalar; NCP = Não Consta no Prontuário

ANEXO XVII: Identification of Bacterial Infections and Clinical Manifestation Associated With Cytomegalovirus in Liver Transplantation Patients



Identification of Bacterial Infections and Clinical Manifestation Associated With Cytomegalovirus in Liver Transplantation Patients

A. Milan, A.M. Sampaio, A.C. Guardia, C.R. Pavan, P.D. Andrade, S.H.A. Bonon, S.C.B. Costa, E.C. Ataíde, I.F.S.F. Boin, and R.S.B. Stucchi

ABSTRACT

Introduction. Liver transplantation has become the most effective therapy for the treatment of patients with end-stage liver disease. With new immunosuppressive agents the incidence of acute rejection has been significantly reduced, but infection has become a serious problem.

Objective. Our objective was to correlate cytomegalovirus (CMV) positivity of antigenemia and polymerase chain reaction (PCR) with clinical manifestations and bacterial infections among patients undergoing liver transplantation.

Methods. This prospective study included patients monitored for 6 months for early detection of CMV infection. Sample collections were performed at the time of surgery and weekly until the second month followed by fortnightly in the third month, and monthly in the fourth to sixth month. CMV infection was defined by positive antigenemia (>3 cells) or 2 positive PCR tests associated or not with clinical symptoms. The methodology for the diagnosis of bacterial infection was through biochemical tests and the automated VITEK/bioMérieux (identification and antibiogram) using samples of urine and blood cultures. Chi-square test was used for dicotomic variables with significant differences when $P < .05$.

Results. Sixteen patients (32%) had CMV infections, including 13 (81%) with concomitant infections. Thirty-four patients (68%) did not have CMV infections and 8 of these (24%) had bacterial infection. There was a high correlation with bacterial infections among CMV-positive patients.

Conclusion. Bacterial infections after liver transplantation were associated with CMV infection.

LIVER transplantation has become the most effective therapy for the treatment of patient with end-stage liver disease. With new immunosuppressive agents, the incidence of acute rejection episodes is significantly reduced, but infections have become a serious problem.¹ Despite recent advances in prevention and treatment, cytomegalovirus (CMV) remains a major complication contributing to morbidity and mortality among transplant recipients.^{2,3} Most infections occur early (1–3 months) after surgery, appearing to be associated with recipient or pre-operative factors.

Bacterial infections mainly caused by gram-negative organisms produce complications more frequently among liver transplant recipients.⁴ The aim of this study was to correlate antigenemia and polymerase chain reaction (PCR) positivity for CMV with clinical manifestations and bacterial infections among liver transplant recipients.

METHODS

This prospective study included cases from February 2008 to January 2010 who need the criteria older than 18 years, follow-up greater than or equal to 30 days, serum immunoglobulin G (IgG) positive for CMV pretransplantation, and signing of an informed consent. Exclusion criteria were as follows: children, fulminant hepatitis, retransplantation, and patients with serum (IgG) nega-

From the Faculty of Medical Science, State University of Campinas, Campinas, Brazil.

Supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil.

Address reprint requests to Raquel Silveira Bello Stucchi, Av. Princesa d' Oeste, 1252, AP. 71, Jd. Paraíso, CEP. 13100-040. E-mail: stucchi.raquel@gmail.com

0041-1345/13/\$—see front matter
<http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.02.016>

© 2013 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

1130

Transplantation Proceedings, 45, 1130–1132 (2013)

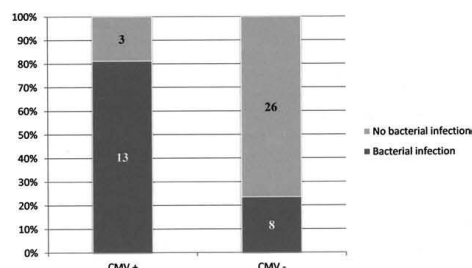


Fig 1. Frequency of CMV infection observed in the period from February 2008 to January 2010 associated or not with bacterial infection ($\chi^2 = 12.61$; $P = .0004$).

tive for CMV pretransplantation. This study was approved by our Institutional Ethics Committee (CEP no. 430/2003).

To detect CMV, antigenemia was examined by immunofluorescence in peripheral blood, using the methodology described by the manufacturer (Kit CMV Brite Turbo, IQ Products, Netherlands). DNA was obtained according to the method of Schmidt et al⁵ with modifications. The PCR reaction to diagnoses the human gene β -globin was performed following the conditions described by De Tommaso et al⁶ with modifications. PCR used peripheral blood leukocytes to detect CMV DNA, following the method described by Nogueira et al⁷ with some modifications.

Patients were monitored for early detection of CMV infection for 6 months. The sample collections were performed at the time of surgery, weekly until the second month, fortnightly in the third month, and monthly from the fourth to the sixth month.

CMV infection was defined as positive antigenemia (>3 cells) or 2 consecutive positive PCR results within an interval less than or equal to 30 days associated with clinical symptoms. Clinical data were obtained through analysis of medical records and follow-up visits. We considered clinical symptoms associated with CMV infection to be the following: fever, diarrhea, chest pain, flu-like signs, and jaundice. Laboratory results associated with CMV infection were as follows: elevated liver profile (alkaline phosphatase, gamma glutamyl transferase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and total bilirubin), leukopenia, and thrombocytopenia. To prevent infection by herpes virus in patients undergoing liver transplantation, acyclovir was prescribed for 6 weeks, concurrently with the standard immunosuppressive therapy that we have previously described.³

The cellular rejection episodes were treated with methylprednisolone and CMV+ subjects received gancyclovir for 21 days with good clinical and laboratory responses.

The methodology for the diagnosis of bacterial infection was biochemical tests and the automated VITEKbioMérieux (identification and antibiogram) using samples of urine and blood cultures.

RESULTS

During this period, 102 patients underwent liver transplantation; 50 patients (49%) met the inclusion criteria. Thirty-seven patients (74%) were males and 13 (26%) females, with ages ranging from 22 to 70 years.

Only 4 patients were followed for less than 6 months due to death 2 at 2 months, 1 at 4 months, and the other 1 at 5 months. Forty-six (92%) patients were for followed 6

months. During the study period, 40 patients showed good follow up.

Sixteen (32%) patients experienced CMV infections, with 13 (81%) showing concomitant bacterial infection. Thirty-four patients (68%) did not have CMV infection with 8 (24%) displaying bacterial infections (Fig 1).

In 6 patients, there was high positive antigenemia (>5 cells), which coincided with the histological diagnosis of acute cellular rejection. In 10 patients, the antigenemia was positive with low cellularity (up to 5 cells). None of these patients has clinical symptoms related to active CMV infection, although 4 of them developed acute cellular rejection episodes with symptoms of fever, sickness, myalgia, and jaundice.

Twenty-one patients had bacterial infections confirmed by 23 positive hemocultures and 5 unocultures. In 3 patients the bacterial infection was confirmed by hemoculture and urocultures. Six displayed more than 1 microorganism. The etiologic agents can be observed in Figure 2.

DISCUSSION

CMV infection is a major cause of morbidity and mortality among liver transplant recipients. In this study, CMV infection occurred among 16 (32%) transplant recipients, consistent with the literature.⁹ A previous study in our liver transplantation unit showed a 28% positivity for CMV antigenemia.^{8,10}

Infections developed during the first 3 months, with peak incidence between the the third and fourth month.¹¹ In our study we observed 21 patients with 28 bacterial infections, consistent with the literature.⁹

The common gram-negative bacilli after liver transplantation cause major challenges for clinical treatment.⁴ Bacterial infections are the leading cause of death within the first year after liver transplantation. There were 2 recorded cases of death in our study, namely at the second and sixth month after transplantation, respectively.

Approximately 80% of organ transplant recipients suffer 1 or more infections episode during the first year after transplantation.¹² Our data corroborated the literature, observing 73% of infections.

An early diagnosis of CMV infection allows for immediate treatment, prevents progression of clinical disease, and

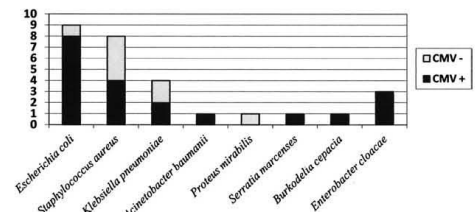


Fig 2. Frequency of etiologic agents found in hemocultures and urocultures according to CMV positivity.

reduces the risk of graft injury. Bacterial infections after liver transplantation were associated with CMV infection.

REFERENCES

1. Li H, Yu DL, Ren L, et al. Analysis of gram-positive bacterial infection in patients following liver transplantation. *Chin Med J*. 2012;125:2417.
2. Linares L, Sanclemente G, Cervera C, et al. Influence of cytomegalovirus disease in outcome of solid organ transplant patients. *Transplant Proc*. 2011;43:2145.
3. Kim JM, Kim SJ, Joh JW, et al. The risk factors for cytomegalovirus syndrome and tissue-invasive cytomegalovirus disease in liver transplant recipients who have cytomegalovirus antigenemia. *Transplant Proc*. 2010;42:890.
4. Shi SH, Kong HS, Xu J, et al. Multidrug resistant gram-negative bacilli as predominant bacteremic pathogens in liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2009;11:405.
5. Semhmidt CA, Odette H, Peng R, et al. Comparison of polymerase chain reaction from plasma and buffy coat with antigen detection and occurrence of immunoglobulin M for the demonstration of cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Transplantation*. 1995;59:1133.
6. De Tommaso AM, Andrade PD, Costa SC, et al. High frequency of human cytomegalovirus DNA in the liver of infants with extrahepatic neonatal cholestasis. *BMC Infect Dis*. 2005;5:108.
7. Nogueira E, Arruda VR, Bizzacchi JM, et al. Possible association between cytomegalovirus infection and gastrointestinal bleeding in hemophiliac patients. *Acta Haematol*. 2000;103:77.
8. Sampaio AM, Thomasini RL, Gaurdia, AC, et al. Cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and human herpesvirus-7 in adult liver transplant recipients: diagnosis based on antigenemia. *Transplant Proc*. 2011;43(3):1357.
9. Van HB, Rooij BJ, Verspaget HW. Risk factors for infection after liver transplantation. *Clin Gastroenterol*. 2012;26(1):61.
10. Milan A, Sampaio AM, Gaurdia AC, et al. Monitoring and detection of cytomegalovirus in liver transplant recipients. *Transplant Proc*. 2011;43(3):1360.
11. Hoppe L, Bressane R, Lago LS, et al. Risk factors associated with cytomegalovirus-positive antigenemia in orthotopic liver transplant patients. *Transplant Proc*. 2004;36:961.
12. Costa FA, Soki MN, Andrade PD, et al. Simultaneous monitoring of CMV and human herpesvirus 6 infections and diseases in liver transplant patients: one-year follow-up. *Clinics*. 2011;66:949.

