

Leonardo Guizilini Plazas Ruiz

Determinação da carga viral em transplantados renais como
parâmetro preditivo para o desenvolvimento da doença infecciosa
por Citomegalovírus

São José do Rio Preto
2015

Leonardo Guizilini Plazas Ruiz

Determinação da carga viral em transplantados renais como
parâmetro preditivo para o desenvolvimento da doença infecciosa
por Citomegalovírus

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Lacerda Nogueira

São José do Rio Preto
2015

Ruiz, Leonardo Guizilini Plazas. Determinação da carga viral em transplantados renais como parâmetro preditivo para o desenvolvimento da doença infecciosa por Citomegalovírus / Leonardo Guizilini Plazas Ruiz. – São José do Rio Preto, 2015

115 f. : il., tabs.

Orientador: Maurício Lacerda Nogueira

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Virologia. 2. Infecções por Citomegalovirus. 3. Rins - Transplante. 4. Reação em cadeia de polimerase. I. Nogueira, Maurício Lacerda. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

III. Título.

CDU – 576.858

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE

UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Leonardo Guizilini Plazas Ruiz

Determinação da carga viral em transplantados renais como
parâmetro preditivo para o desenvolvimento da doença infecciosa
por Citomegalovírus

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Microbiologia, junto ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do
Rio Preto.

Comissão examinadora

Prof. Dr Mauricio Lacerda Nogueira
UNESP-São José do Rio Preto
Orientador

Prof.Dr Celso Francisco Hernandes Granato
UNIFESP-São Paulo

Prof.Dr Mario Abbud Filho
FAMERP-São José do Rio Preto

Prof.Dra Ligia Camera Pierrotti
USP-São Paulo

Prof.Dr Emerson Quintino de Lima
FAMERP-São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
13 de março de 2015

SUMÁRIO

1-Relevância e justificativa.....	01
2-Revisão bibliográfica.....	04
2.1-Características gerais do HCMV	04
2.2-Estrutura do HCMV e funções do tegumento.....	06
2.2.1-Proteínas do tegumento	07
2.3-Complexo das glicoproteínas	09
2.3.1-Glicoproteína B	11
2.4-Infecção por HCMV	13
2.5-Imunomodulação induzida por HCMV	15
2.5.1-Latência e reativação	15
2.5.2-Diferenciação celular	17
2.5.3-Modulação das proteínas do MHC	19
2.5.4-Modulação do tráfego leucocitário	21
2.5.5-Modulação do ciclo celular e da apoptose	22
2.5.6-Ação das proteínas do tegumento	22
2.6-Características clínicas da HCMV infecção e doença infecciosa	24
2.6.1-Infecção por HCMV em indivíduos imunocompetentes	24
2.6.2-Infecção por HCMV e reativação em transplantados	25
2.6.3-Infecção por HCMV nos transplantados renais	29
2.7-Desempenho analítico do PCR em tempo real	32
2.8-Controle imunológico do HCMV	33
2.9-Terapias de imunossupressão	34
2.10-Princípios da terapia antimicrobiana nos receptores de transplantes	36
2.10.1-Emprego clínico	37

2.10.2-Profilaxia universal	38
2.10.3-Terapia preemptiva	39
2.11-Resistências às drogas antivirais	40
3-Objetivos	42
3.1-Objetivo geral	42
3.2-Objetivos específicos	42
4-Materiais e métodos	43
4.1-Pacientes	43
4.2-Imunossupressão	43
4.2.1-Doador vivo (aparentado ou não)	44
4.2.2-Doador falecido	44
4.3-Extração do DNA HCMV	45
4.4-Amplificação do DNA HCMV	47
4.5-Detecção e quantificação do DNA HCMV	49
4.6-Monitoramento DNA HCMV	52
4.7-Definição dos parâmetros virais	52
4.8-Tratamento da doença HCMV	53
4.8.1-Profilaxia antiviral	53
4.8.2-Terapia preemptiva	53
4.9-Coleção dos dados	54
4.10-Análises estatísticas	54
5-Resultados	55
5.1-Viremia e doença infecciosa	55
5.2-Dinâmica de replicação do HCMV	65
5.3-Rejeição celular aguda	66

5.4-Choque séptico	67
6-Discussão	68
7-Conclusão	72
8-Referências bibliográficas	73
9-Apêndice 1: relação de carga viral dos pacientes	92
10-Anexo 1: características da curva ROC.....	115

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Curva de amplificação beta-globina humana (reação negativa)	47
Figura 2- Curva de amplificação HCMV MIEA (pico de carga viral)	48
Figura 3- Curvas de amplificação genes HCMV MIEA e beta-globina humana.....	48
Figura 4- Curvas de amplificação dos controles HCMV MIEA	51
Figura 5- Monitoramento DNA HCMV paciente do grupo 1.....	59
Figura 6- Monitoramento DNA HCMV paciente do grupo 2.....	60
Figura 7- Monitoramento DNA HCMV paciente do grupo 3	61
Figura 8- Média do período de viremia dos pacientes diagnosticados	63
Figura 9- Curva ROC para o diagnóstico da doença HCMV.....	64
Figura 10- Distribuição DNA HCMV nos pacientes doentes e assintomáticos	64
Figura 11- Dinâmica de replicação do DNA HCMV.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- DNA HCMV nos 66 receptores renais	55
Tabela 2- Características clínicas dos receptores com\sem viremia	56
Tabela 3- Correlação carga viral e estado clínico	58
Tabela 4- Características clínicas dos pacientes com HCMV doença	62
Tabela 5- Concentração sérica de creatinina com viremia\sem viremia	66

RESUMO

O Citomegalovírus (HCMV) representa o mais importante patógeno para os pacientes transplantados e pode ser transmitido aos receptores renais via infecção primária, na qual o vírus infecta um organismo sem contato prévio ou determinar a reinfecção endógena, onde indivíduos soropositivos apresentam reativação de latência. Adicionalmente, estes pacientes estão susceptíveis a uma reinfecção exógena quando são infectados por uma cepa diferente. Este estudo apresenta a dinâmica da replicação do HCMV após o transplante renal por meio do monitoramento do DNA HCMV em 1223 amostras de sangue total provenientes de 66 receptores, utilizando-se a metodologia de PCR em tempo real quantitativo. A quantificação da carga viral, abordagens preventivas, período de viremia e tratamento foram monitorados e relacionados às características clínicas envolvidas na evolução destes pacientes. Nossos dados demonstraram um valor preditivo da carga viral de 8.372 cópias/mL para o desenvolvimento da doença infecciosa e a efetividade das abordagens profiláticas e preemptiva. Mediante episódios de rejeição celular aguda e óbito foram determinados a maior média e pico máximo de carga viral, sugerindo uma possível correlação dos efeitos indiretos da viremia com a progressão dos quadros de choque séptico e o aumento da replicação viral mediante condições inflamatórias. Estes achados fornecem parâmetros quantitativos para o desenvolvimento e emprego de abordagens que diminuam os riscos de transmissão, desenvolvimento da doença infecciosa e os efeitos indiretos associados à viremia por HCMV.

PALAVRAS-CHAVES: Citomegalovírus. Transplante renal. Infecção. PCR em tempo real

ABSTRACT

Cytomegalovirus (HCMV) is the most important pathogen in transplant patients and can be transmitted to receivers via renal primary infection in which the virus infects an organism without prior contact or determine the endogenous reinfection, which seropositive individuals have reactivation of latency. Additionally, these patients are susceptible to get infected when exogenous reinfection by a different strain. This paper presents the dynamics of HCMV replication after transplantation by monitoring of HCMV DNA in 1223 from whole blood samples 66 receivers, using the method of quantitative real-time PCR. Quantification of viral load, preventive approaches, treatment and period of virus in blood were monitored and related to the clinical characteristics involved in the evolution of these patients. Our data demonstrated a predictive value of viral load of 8,372 copies / mL for the development of infectious disease, evidence of immune control of HCMV in transplant subjects, the effectiveness of prophylactic and preemptive approaches and suggest a possible correlation of the indirect effects of virus in blood with the progression of frames septic shock. By episodes of acute cellular rejection and death were determined and the highest average peak viral load. These findings may provide quantitative parameters for the development and use of approaches that reduce the risk of transmission, infectious disease development and the associated HCMV in blood indirect effects.

KEYWORDS: Cytomegalovirus. Renal transplantation. Infection. Real-time PCR

1 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O HCMV é um dos mais importantes agentes oportunistas nos pacientes imunocomprometidos, incluindo os receptores de órgãos sólidos e de medula óssea (MENGELLE, 2003). Devido seus efeitos imunomodulatórios, ele pode aumentar a incidência de infecções por outros agentes oportunistas e diminuir a sobrevida dos pacientes (MADI, 2007). A infecção se manifesta por uma ampla variedade de condições, desde uma viremia assintomática a síndrome HCMV e doença tecidual invasiva. O desenvolvimento e utilização de ensaios sensíveis, específicos e disponíveis para o diagnóstico do HCMV são essenciais para a prevenção da doença infecciosa durante o período de pós-transplante imediato (RAZONABLE, 2001). Uma das metodologias frequentemente utilizada para este propósito é o ensaio para o antígeno pp65, uma técnica imunofluorescente baseada na coloração dos leucócitos do sangue periférico para a matriz proteica pp65. Entretanto, esta metodologia apresenta baixa sensibilidade, requer uma interpretação subjetiva, necessita do processamento imediato da amostra, sendo de difícil realização em pacientes neutropênicos. A mais recente metodologia utilizada é a quantificação do DNA HCMV por PCR em tempo real que apresenta rapidez de execução e elevadas sensibilidade e especificidade (KOTTON, 2013).

A doença por HCMV pode ser prevenida pela profilaxia ou pelo tratamento preemptivo, que pode ser dirigido pelo monitoramento da carga viral (FISHMAN, 2007). Na profilaxia todos os receptores recebem o antiviral após o transplante para prevenir o aparecimento da doença. Na terapia preemptiva dirigida pela carga viral, o vírus é detectado em um estágio subclínico e a droga é iniciada para prevenir a infecção sintomática (RUBIN, 2007). De acordo com o consenso internacional para o manejo do Citomegalovírus em receptores de órgãos sólidos (KOTTON, 2013) o teste de carga

viral para HCMV consiste na principal alternativa para o diagnóstico, tomada de decisões para o tratamento preemptivo e o monitoramento da resposta à terapia, sendo a metodologia de PCR em tempo real empregada devido sua melhor precisão, amplo intervalo de linearidade, rapidez de execução e baixo risco de contaminação quando comparada com os testes de PCR convencional. Amostras de plasma e sangue total podem fornecer informações sobre o prognóstico e diagnóstico da doença HCMV. Os estudos publicados envolvem uma ampla variedade metodológica, diferentes tipos de amostras clínicas e diferentes categorias de pacientes (receptores de medula óssea ou órgãos sólidos), determinando a perda de um padrão de referência internacional e a variação das características de desempenho metodológico, dificultando uma correlação interinstitucional dos valores de carga viral para o HCMV e o estabelecimento de pontos de corte amplamente aplicáveis para as decisões clínicas, especificamente para as estratégias preemptivas (RAZONABLE, 2001).

Os centros de transplantes podem estabelecer individualmente os riscos e benefícios de cada estratégia, baseados nas suas frequências de HCMV doença, capacidades de monitoramento dos receptores, custos dos medicamentos antivirais, taxas de falhas da terapia preemptiva e taxas de outras infecções oportunistas (relacionadas aos efeitos indiretos da HCMV doença), perdas de enxertos, rejeições e mortalidades (KOTTON, 2013). Deste modo, visando à otimização do manejo do HCMV nos receptores renais atendidos no Hospital de Base de São José do Rio Preto-SP (HB-SJRP) e o fornecimento de parâmetros quantitativos para o desenvolvimento de estratégias para prevenção da doença infecciosa por HCMV nos transplantados renais, este estudo definiu a dinâmica da replicação do HCMV após transplante renal levando-se em consideração as características clínicas específicas do grupo de pacientes atendidos. Por meio do monitoramento da carga viral no sangue total, utilizando-se a metodologia de

PCR em tempo real, a dinâmica da replicação no período de pós-transplante foi definida entre os receptores, determinando-se o valor de carga viral preditivo da doença infecciosa por HCMV e estabelecendo sua relação com o regime preventivo (profilático ou preemptivo), as manifestações clínicas (assintomáticos, sintomáticos e doença tecidual invasiva do tecido enxertado), os episódios de rejeições celulares agudas e os casos de óbitos verificados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO HCMV

O HCMV é o agente etiológico da “doença de inclusão citomegálica”, cuja denominação deriva-se do efeito citopático caracterizado pelo aumento do volume celular e inclusões intranucleares e citoplasmáticas no tecido infectado (MURRAY, 1997). Nos países desenvolvidos a soroprevalência global é de 30% a 70%, enquanto que nos moradores de países em desenvolvimento, homens homossexuais e grupos socioeconômicos pobres a soroprevalência pode atingir taxa superior a 90% (SOHN, 1991).

Este vírus pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae* (ROIZMAN *et al.*, 1981; MOCARSKI *et al.*, 2002). A estrutura viral é formada por uma dupla hélice de DNA, revestida por uma capa protéica, que por sua vez, está coberta por um envelope. O capsídeo protéico que envolve o DNA, tem simetria icosaédrica, composto por 162 capsômeros dispostos de forma ordenada, que apresentam uma simetria axial 5:3:2. Cada capsômero é um prisma hexagonal alargado com um orifício central. O citomegalovírus é o maior vírus da família herpes humano, com aproximadamente 200 nm de diâmetro. Como qualquer outro herpesvírus, o HCMV fica em estado de latência por toda a vida dos indivíduos infectados e este estado é caracterizado pela presença do DNA viral em células infectadas tais como monócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares e em tecidos, como nas células tubulares renais, mas com ausência de replicação viral (JACOBSON & MILLS, 1988).

O genoma viral é composto de uma dupla fita de DNA linear de aproximadamente 230.000 pares de bases, é formado por duas regiões únicas: a região

única longa (UL, do inglês *unique long*) e uma região única curta (US, do inglês *unique short*). Estas regiões são flanqueadas por sequências terminais repetidas longas e curtas (TRL, do inglês *terminal repeat long* TRS, *terminal repeat short*) e por sequências internas repetidas (IRL, do inglês *internal repeat long* e IRS, *internal repeat short*). Existem relatos que demonstraram que o genoma viral possui 192 ORFs (*open reading frames*) capazes de codificar proteínas (MURPHY *et al.*, 2003).

A perda do controle imune abre o caminho para a reativação do vírus e desenvolvimento da doença. O grande número de funções imunomodulatórias codificadas pelo HCMV aumenta a eficiência da infecção, disseminação, reativação e infecção persistente nos hospedeiros com sistema imunológico intacto e pode contribuir para a virulência nos hospedeiros imunocomprometidos (KIM, 2003). O desequilíbrio imunológico e a reativação do DNA podem ocorrer em decorrência de certos estímulos como, por exemplo, câncer, imunodeficiência e estresse (JARVIS & NELSON, 2002).

2.2 ESTRUTURA DO HCMV E FUNÇÕES DO TEGUMENTO

O capsídeo do HCMV é cercado por um tegumento proteico e um envelope lipídico externo (ARSKI, 2007). Os virions entram na célula hospedeira por meio da interação da membrana celular externa e moléculas glicoproteicas presentes no envelope lipídico do vírus (ARSKI, 2007). Quando a membrana celular e o envelope lipídico fundem-se o DNA contido no capsídeo proteico e as proteínas do tegumento são liberados para dentro da célula hospedeira (SHENK, 2008).

As proteínas do tegumento apresentam várias e importantes funções em todos os estágios do ciclo de vida viral. O tegumento, localizado entre o capsídeo e o envelope lipídico externo, é estruturalmente desorganizado e amorfo, embora algumas estruturas liguem as proteínas do tegumento com as moléculas proteicas do capsídeo (CHEN, 1999). As proteínas do tegumento compreendem mais do que a metade do total de proteínas encontradas dentro dos HCMV virions (KALEJTA, 2008). Uma sequência bioquímica comum às proteínas do tegumento não tem sido identificada e o processo de montagem do tegumento para a saída viral e a desmontagem na entrada do vírus na célula é incompreendido (KALEJTA, 2008). A incorporação das proteínas no tegumento é facilitada pela sua fosforilação no tegumento, sua localização subcelular para o local de montagem e sua interação com o capsídeo ou com as proteínas do envelope (SHENK, 2008). A partir da liberação das proteínas do tegumento para o citoplasma, elas tornam-se funcionalmente ativas para a participação nos estágios do ciclo de vida viral (ARSKI, 2007).

2.2.1 PROTEÍNAS DO TEGUMENTO

As proteínas do tegumento são categorizadas de acordo com sua função na replicação lítica. Algumas proteínas são essenciais para a replicação, enquanto outras são requeridas para melhorar a eficiência da replicação ou são dispensáveis para a replicação lítica. Deste modo, atuam em vários estágios do ciclo de vida do HCMV, incluindo a entrada viral, replicação viral e expressão gênica, evasão imune do hospedeiro, montagem e liberação de novas partículas virais infecciosas (TOMTISHEN, 2013).

Acredita-se que diversas proteínas do tegumento (UL47 e UL48, por exemplo) participam do transporte do DNA viral ao complexo de poros nuclear e sua liberação para o núcleo (LUXTON, 2005). A partir da entrada do genoma viral no núcleo, os genes imediatamente precoces são expressos por sua ativação pela proteína do tegumento pp71 que incia o estágio lítico do ciclo de vida viral e a subsequente replicação da dupla fida do DNA HCMV (CANTRELL, 2006). A expressão dos genes imediatamente precoces pode ser reprimida, resultando em uma infecção latente que é caracterizada pela mínima expressão dos genes virais e a inibição da montagem de novas partículas virais (SINCLAIR, 2006). Embora a pp71 tenha uma importante e reconhecida função na expressão dos genes imediatamente precoces durante o ciclo lítico, os produtos dos genes UL35 e UL69 parecem estar implicados na expressão gênica (KALEJTA, 2008). Após a replicação do DNA inicia-se a expressão dos genes virais tardios. As proteínas tardias são principalmente componentes estruturais que auxiliam na montagem e liberação de novos virions HCMV (ARSKI, 2007). As proteínas primárias do tegumento envolvidas na montagem e liberação são a pp150, pp128 e UL97. A pp150 direciona o movimento do capsídeo no citoplasma para o local

de formação das partículas, enquanto a pp128 direciona as proteínas do tegumento e o DNA contido no capsídeo para dentro de um envelope lipídico (SILVA, 2003; AUCOIN, 2006). A UL97 promove a fosforilação das proteínas do tegumento por meio de sua atividade cinase, facilitando a incorporação de novas proteínas do tegumento aos novos virions infecciosos. Os virions montados são liberados da célula hospedeira por um mecanismo de exocitose que utiliza o sistema de transporte celular para anexar os vacúolos contendo os novos virions sintetizados e sua liberação no espaço extracelular (KROSKY, 2003).

2.3 COMPLEXO DAS GLICOPROTEÍNAS

Os polimorfismos nos genes codificadores das glicoproteínas do envelope viral podem estar associados com a variabilidade no controle imunológico da HCMV infecção, sendo estas glicoproteínas alvos dos anticorpos neutralizantes e envolvidas na entrada e disseminação célula a célula do vírus (PIGNATELLI, 2004).

O HCMV, como outros herpesvírus, utiliza um complexo de multiproteínas para a entrada e o início da infecção nas células hospedeiras. Três glicoproteínas, gB, gH e gL, conhecidas como “*core fusion machinery*”, são conservadas em todos herpesvírus e são requeridas para a infecção celular. A gB é a mais conservada destas glicoproteínas e catalisa a fusão com a membrana durante a entrada viral (CAIRNS, 2007). A gH e gL formam um heterodímero que confere o tipo de especificidade celular aos diferentes herpesvírus, embora sua função precisa não tenha sido demonstrada. Trabalhos com herpes simples vírus-1 (HSV-1) indicam que quando a glicoproteína gD liga-se ao seu receptor celular, ocorre sua associação com gH-gL que liga-se a gB e subsequentemente a fusão é iniciada como um resultado de uma interação direta (COMPTON, 1991). Alternativamente, o complexo gH/gL pode incluir a gp42 que liga-se às proteínas do MHC classe II, promovendo a entrada nas células B por endocitose. Durante a montagem dos virions nas células B a gp42 é sequestrada pela ligação ao MHC classe II, resultando em virions contendo o complexo gH/gL não modificado, potencializando sua capacidade de infecção das células epiteliais (HUTT-FLETCHER, 2007). Complexos de gB:gH-gL foram detectados no HSV e no HCMV (DOLAN, 2004). O HCMV não apresenta gD e requer no mínimo o complexo gB:gH-gL para a entrada nos fibroblastos. Para a entrada nos monócitos, macrófagos, células epiteliais e endoteliais necessita do complexo pentamérico gH-gL-UL128-UL130-UL131 adicionados à gB

(EPSTEIN, 1999). Embora os mecanismos para a formação e regulação destes complexos de multiproteínas estejam caracterizados no HSV, eles são pouco compreendidos no HCMV, permanecendo dúvidas sobre a natureza destes complexos, sua função na infecção e como estes complexos são alvos da neutralização por anticorpos (FOUTS, 2014). Recentemente a estrutura cristalina da gH foi determinada para HSV-2 e Epstein-Barr vírus (EBV) e embora a conservação geral da sequência das proteínas seja baixa, o núcleo estrutural da gH é conservado (CHOWDARY; MATSUURA, 2010). A gH apresenta três domínios distintos: o domínio N-terminal que liga gL (domínio H1), o domínio helical central (domínio H2) e o domínio C-terminal (domínio H3) (EISENBERG, 2012). O domínio H3 é o mais conservado da gH e portanto acredita-se que ele apresente função similar nos outros herpesvírus, como o HCMV (WU, 2005).

O complexo gH/gL do HCMV foi primeiramente descrito baseado no reconhecimento de que o UL115 é um homólogo posicional do gL HSV que complexa-se com gH (SPAETE, 1993). Wang e Shenk realizaram importantes observações conectando os genes HCMV UL128-131 ao complexo gH/gL (WANG, 2005). A UL128 e UL130 estão presentes nos virions e os anticorpos produzidos contra estas respectivas proteínas podem bloquear a entrada do HCMV nas células epiteliais e endoteliais, mas não nos fibroblastos (WANG, 2005). A UL131 está associada com a gH e apresenta funções na infecção das células endoteliais (ADLER, 2006). Uma terceira glicoproteína, designada gO, foi encontrada em associação com o complexo gH/gL nas células infectadas por HCMV (LI, 1997). Para a adequada função de entrada dos vírus as proteínas dos complexos gH/gL/UL128-131 e gH/gL/gO devem ser adequadamente replicadas e organizadas no retículo endoplasmático (HOMMAN-LOUDIYI, 2003).

2.3.1 GLICOPROTEÍNA B

A glicoproteína B é talvez o componente do envelope viral mais altamente conservado. É uma proteína essencial para a replicação do vírus *in vitro* e *in vivo*, importante no processo de adsorção na célula hospedeira e disseminação do vírus célula a célula, além disso, é altamente imunogênica em humanos, sendo importante alvo da resposta imunológica humoral e celular (RASMUSSEN *et al.*, 1999; BRITT & MACH, 1996; LASRY *et al.*, 1996; SHEPP *et al.*, 1996; BONGARTS *et al.*, 1996; ALBEROLA *et al.*, 1998). A virulência de diferentes genótipos do HCMV pode ser um importante fator de ocorrência de doença (COAQUETTE *et al.*, 2004), devido a variações em genes virais envolvidos na entrada viral na célula do hospedeiro, no tropismo tecidual ou na replicação do HCMV (HALARY *et al.*, 2002). Um possível fator que afeta a virulência e patogênese do HCMV é a presença de regiões com grande número de polimorfismo no genoma viral (YU *et al.*, 2006). Uma destas regiões polimórficas é encontrada no gene UL55 que codifica a glicoproteína B (gB) do HCMV (RASMUSSEN *et al.*, 1999). Certas regiões do gene gB são altamente variáveis entre as diferentes linhagens do HCMV, estando uma delas situada próxima ao sítio de clivagem da protease (entre os aminoácidos 460 e 461) que está envolvida no processo de fusão com a célula hospedeira (VOGELBERG *et al.*, 1996).

Estudos revelam a prevalência de determinados genótipos entre os diferentes grupos de pacientes imunocomprometidos estudados. TOROK-STORB *et al.* (1997), descrevem em seu estudo com transplantados de medula óssea, a correlação dos tipos gB3 e gB4 com morte por mielossupressão, e risco reduzido de GVHD (doença do enxerto contra o hospedeiro) agudo de graus II a IV (TOROK-STORB *et al.*, 1997).

Nesse grupo de pacientes, o subtipo gB1 foi encontrado mais comumente em pessoas que sobreviveram à infecção pelo HCMV, com melhor prognóstico (FRIES *et al.*, 1994).

A coinfeção com múltiplos genótipos gB em pacientes imunocomprometidos está associada com maior carga viral, maior prevalência de doença por HCMV, e maior grau de rejeição do órgão, além disso, são freqüentemente concomitantes à infecção com outras herpesvirose (COAQUETTE *et al.*, 2004). As diferenças observadas no tropismo e virulência do HCMV com diferentes genótipos gB podem ser determinadas de acordo com as funções por ela exercidas. Devido ao tropismo viral e patogenicidade serem eventos interligados, os resultados apresentados por MEYER-KÖNIG *et al* em 1998 evidenciam a hipótese de que a variabilidade genética em gB influencia a virulência do HCMV. A gB do HCMV tem sido relacionada com a entrada do vírus na célula, com a transmissão do vírus célula a célula e com a fusão do envelope viral com a célula do hospedeiro (NAVARRO *et al.*, 1993; YU *et al.*, 2006). Baseado nas variações da sequência do gene UL55, são conhecidos cinco genótipos da gB (gB1, gB2, gB3, gB4 e gB5) (CHOU *et al.*, 1991; SHEPP *et al.*, 1998). O genótipo gB2 mostrou associação com tropismo neural em pacientes imunocomprometidos (TARRAGÓ *et al.*, 2003). Os genótipos gB 3 e 4 apresentaram associação com óbito em pacientes transplantados de medula óssea (TOROK-STORB *et al.*, 1997). Pacientes com infecção por múltiplos genótipos da gB do HCMV apresentaram relação com a presença de maior carga viral (PANG *et al.*, 2008) e atraso na eliminação do HCMV do hospedeiro (MANUEL *et al.*, 2009). A infecção por múltiplos genótipos da gB pode ser um fator crucial para o desenvolvimento de sintomas graves de doença causada pelo HCMV em pacientes imunocomprometidos (COAQUETTE *et al.*, 2004).

2.4 INFECÇÃO POR HCMV

O vírus é tipicamente adquirido durante fase precoce da vida e transmitido pelo contato direto e indireto com fluidos corporais infectados (SAGEDAL, 2004). Pode ser adquirido via saliva, contato sexual, transferência placentária, amamentação, transfusão de sangue, transplantes de órgãos sólidos ou células tronco hematopoiéticas (FURNESS, 1997).

Durante a fase aguda da infecção vários tipos celulares do organismo podem ser infectados, incluindo células endoteliais, epiteliais, nervosas, da musculatura lisa, fibroblastos, hepatócitos, trofoblastos, monócitos/macrófagos e células dendríticas (RAGGAM, 2010). Existem três formas de infecção: infecção primária, na qual o vírus infecta um organismo sem contato prévio; infecção endógena por meio de indivíduos soropositivos que apresentam reativação de latência e reinfecção exógena em indivíduos que são infectados por uma cepa diferente (SAGEDAL, 2004). Após a infecção primária a persistência viral é estabelecida em todos os organismos infectados, sendo cronicamente produtiva ou latente, na qual a expressão dos genes é limitada (HELANTERA, 2003). A infecção produtiva (lítica) resulta em uma sequência coordenada de eventos que levam à síntese das proteínas imediatamente precoces, precoces e tardias. Durante a infecção latente foi verificada a presença do vírus nos progenitores celulares mielóides CD34+ na medula óssea com pequena proporção destas células contendo DNA genômico do citomegalovírus sem detecção da expressão dos genes virais imediatamente precoces. O DNA viral está presente em pequena proporção dos monócitos CD14+, nas células dendríticas e megacariócitos dos portadores saudáveis (GAULT, 2001; TOUPANCE, 2000). A permissividade para replicação do HCMV é célula específica, ou seja, o vírus pode infectar uma célula, mas

devido à repressão transcricional do principal promotor imediatamente precoce não existe a produção de novos vírions. A permissividade das células mielóides para a replicação viral está relacionada ao seu estado de diferenciação. Monócitos são não permissivos, enquanto os macrófagos diferenciados e células dendríticas imaturas são permissíveis para a infecção produtiva (SENECHAL, 2004).

2.5 IMUNOMODULAÇÃO INDUZIDA POR HCMV

O HCMV é o herpesvírus que mais expressa os genes que alteram as respostas imunes inata e adaptativa do hospedeiro. Deste modo, a maioria das proteínas codificadas pode modular a resposta imune (MILLER-KITTRELL, 2009). Sua latência é caracterizada pela persistência do genoma viral sem a produção de partículas virais infectantes, permitindo a coexistência do vírus com o hospedeiro por meio da redução de sua visibilidade e prevenindo seu reconhecimento imunológico. O HCMV infecta diferentes células do sistema imune, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas e granulócitos, determinando-lhe uma vantagem sobre as funções imunes do hospedeiro para escapar do reconhecimento imunológico e prevenir o “*clearance*” viral. Múltiplas estratégias de evasão dos mecanismos imunológicos podem ser determinadas pelo HCMV para o estabelecimento da latência (RUSS 2012).

2.5.1 LATÊNCIA E REATIVAÇÃO

Uma importante propriedade biológica do HCMV é sua habilidade em persistir na forma latente e ser reativado mediante certas condições. As células da linhagem mielóide exercem função fundamental nestes processos. O HCMV pode infectar monócitos, macrófagos, granulócitos, fibroblastos, células endoteliais, epiteliais, neuronais e dos músculos lisos. Os neutrófilos são considerados o principal tipo celular transportadores do vírus durante a infecção aguda, porém não podem suportar a replicação viral (GERNA, 1992). Monócitos/macrófagos são os responsáveis pela disseminação do vírus e constituem o reservatório primário do HCMV latente no sangue periférico dos indivíduos soropositivos (TAYLOR-WIEDEMAN, 1991).

Evidências atuais sugerem que o HCMV não possa replicar eficientemente nos monócitos. Nestas células, a HCMV infecção é não permissiva, pois a expressão e transcrição dos genes virais estão ausentes ou restritas aos produtos dos genes imediatamente precoces (IBANEZ, 1991). A ausência da expressão gênica e dos produtos virais é consistente com a hipótese de que as células pré-monocíticas e monocíticas são reservatórios do vírus latente. Em contraste, macrófagos nos tecidos dos pacientes infectados podem expressar os genes tardios virais e produzirem a infecção viral (GNANN JW, 1988). A diferenciação dos monócitos em macrófagos é um pré-requisito para a infecção HCMV produtiva (SÖDERBERG-NAUCLÉR, 2001). Portanto, o estado de diferenciação celular é o principal fator para a habilidade do vírus em replicar e é também a causa para reativação do HCMV latente (SINDRE, 1996). Como os monócitos apresentam um período médio de vida curto no sangue periférico, a reativação do HCMV nos macrófagos sugere que o HCMV é mantido em uma população precursora da linhagem celular mielóide (MOVASSAGH, 1996). O DNA HCMV acompanha as vias de diferenciação mielóide (KHAIBOULLINA, 2004).

As citocinas inflamatórias IFN-gama e TNF-alfa produzidas pela alo-estimulação das células T são importantes para a reativação do vírus latente e a multiplicação do HCMV nos macrófagos diferenciados (VARANI, 2009). O início da replicação viral a partir do estado de latência também parece estar relacionado à ativação do sistema imune. O vírus pode ser reativado pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), que é liberado durante a inflamação. O TNF-alfa liga-se ao seu receptor nas células latentemente infectadas, gerando sinais que ativam o fator nuclear KB (NF-KB). Consequentemente, o heterodímero p65/p50 NF-KB ativado transloca-se para o núcleo e liga-se à região IE do HCMV que inicia a replicação viral (DOCKE, 1994). Este mecanismo molecular possui uma correlação clínica em que a reativação da infecção

latente tem sido associada com elevados níveis séricos do TNF-alfa nos pacientes com dermatite atópica (DOCKE, 2003) e quadros sépticos (VON MULLER, 2007). Adicionalmente, a reativação comumente acompanha processos de rejeição aguda de órgãos e após doença enxerto versus hospedeiro aguda (GVHD) nos receptores de medula óssea que possuem elevados níveis séricos de TNF-alfa (RICART, 2005). Prostaglandinas pro-inflamatórias e as catecolaminas estimulam o AMPc, também levando à reativação viral (RUBIN, 2007). Por meio destes mecanismos a resposta inflamatória crônica está ligada à reativação do HCMV. Estudos recentes demonstram que as infecções ativas e latente induzem respostas inflamatórias sistêmicas sustentadas que são acompanhadas pela produção de uma citocina do tipo 1 (VAN DE BERG, 2010).

Clinicamente, a ativação imune e a produção concomitante das citocinas pró-inflamatórias parecem ser essenciais para a reativação e replicação do HCMV. Portanto, a ativação imunológica, produção de citocinas inflamatórias e a diferenciação das células mielóides constituem fatores importantes para a reativação e replicação viral nos pacientes infectados (ASADULLAH, 1999).

2.5.2 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Os monócitos circulantes podem originar uma variedade de macrófagos teciduais e células dendríticas especializadas (DCs), de acordo com o estímulo das citocinas (PASS, 2001). Entretanto, as diferentes vias de desenvolvimento a partir dos precursores monocíticos até a diferenciação dos macrófagos e DCs *in vivo* não são completamente compreendidas (GORDON, 2005). As DCs representam potentes estimuladores das células T, constituindo elementos importantes na indução da resposta imune adaptativa

aos agentes infecciosos (BANCHEREAU, 2000). A secreção de citocinas pelas células apresentadoras de antígenos é iniciada pelo reconhecimento dos patógenos microbianos através dos receptores TLR (do inglês *toll-like receptors*). Por meio da liberação de citocinas específicas as DCs influenciam o tipo de resposta das células T e auxiliam no recrutamento e ativação de outras células efetoras, incluindo as células natural Killer (NK), macrófagos e células B (FERNANDEZ, 1999).

A manutenção do estado de latência e a reativação estão diretamente relacionados ao estágio de diferenciação celular. A diferenciação de todas as células infectadas após a entrada do vírus poderia eliminá-lo eficientemente durante o ciclo infeccioso. Porém, após o estímulo com interleucina-4 (IL-4) e fator estimulador de colônia granulocítica/monocítica (GM-CSF), os monócitos infectados não conseguem diferenciar-se, resultando em monócitos imaturos com diminuição da atividade de fosforilação necessária para correta sinalização do GM-CSF mediada pelos fatores solúveis envolvidos na secreção de interleucina-6 (IL-6) pelas células infectadas. Deste modo, os monócitos infectados apresentam a capacidade de fagocitose e de estímulo da proliferação clonal das células T diminuídos, determinando falha na indução da resposta TH1 (VARANI, 2007). Além dos efeitos na diferenciação celular dos monócitos, o HCMV bloqueia reversivelmente a diferenciação em macrófagos induzidas por citocinas, diminuindo os processos de migração celular e fagocitose e possível diminuição da resposta imune durante a fase aguda da infecção por HCMV (VARANI, 2005). A molécula de superfície CD13 (receptora do HCMV) e a glicoproteína B viral parecem estar envolvidos na inibição da diferenciação dos macrófagos (GREDMARK, 2004).

Os efeitos inibitórios do HCMV na diferenciação dos monócitos, diretamente por proteínas virais (glicoproteína B) ou por citocinas produzidas pelos monócitos, estão

fortemente relacionados ao aumento da susceptibilidade para outras infecções nestes pacientes infectados por HCMV (GRIGOLEIT, 2002).

2.5.3. MODULAÇÃO DAS PROTEÍNAS MHC

A diminuição da expressão das moléculas de MHC classe I e II previne o reconhecimento do vírus pelos linfócitos T CD8 e T CD4 respectivamente. Os linfócitos T CD8 são cruciais para o “*clearance*” das infecções virais e a diminuição da expressão das moléculas de MHC classe I nas células infectadas potencialmente facilita o estabelecimento da persistência ou da infecção latente. O bloqueio da rota de apresentação de antígenos das moléculas de MHC classe I pode ser determinado por diversos genes do HCMV, incluindo US2, US3, US6, US10 e US11 (NORIEGA, 2008). Estes genes codificam proteínas que são dispensáveis para a replicação viral, mas que podem impedir a vigilância imunológica dos linfócitos T citotóxicos (CD8) pela redução dos níveis das proteínas MHC-1 na superfície das células infectadas (LOENEN, 2001). Na presença de qualquer uma destas proteínas virais as proteínas do complexo MHC-1 falham na translocação até a superfície da célula infectada. Estudos demonstram que estes genes são ativos durante infecções dos fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e dendríticas (KIM, 2011).

O produto do gene US3 (gpUS3) é uma proteína precoce que previne o transporte das moléculas MHC-1 do retículo endoplasmático ao complexo de Golgi (BECK, 1988). O produto do gene US6 (gpUS6) liga-se ao transportador de antígenos processados no lúmen do retículo endoplasmático (PASS, 2001), bloqueando sua conformação original e prevenindo o transporte dos peptídeos antigênicos. Os produtos dos genes US2 (gpUS2) e US11 (gpUS11) redirecionam as proteínas do MHC-1

nascentes do retículo endoplasmático para o citosol e sua consequente degradação (LIU, 2010).

A diminuição da expressão de antígenos pelas moléculas MHC classe I na superfície celular poderia determinar a susceptibilidade para a lise determinada pelas células natural killer (NK) que respondem a ausência das moléculas do MHC classe I. Entretanto, as células infectadas pelo HCMV são resistentes a este mecanismo. Algumas proteínas do HCMV atuam nos receptores de inibição das NK para prevenir a lise mediada por estas células. A UL18 constitui uma proteína homóloga ao MHC classe I que determina a resistência às células NK. A proteína UL40 suprime a lise por células NK através de sua interação com o complexo receptor de inibição CD94/NKG2A (WILKINSON, 2008).

A interferência com a expressão das moléculas do MHC classe II pode ocorrer de várias maneiras, como a ligação da proteína US3 aos complexo II alfa/beta, impedindo sua associação à cadeia invariante, a inibição das metaloproteinases CD10 e CD13 que participam do processamento do peptídeo antigênico e a interferência com a via sinalizadora CIITA (ativadora de classe II)/JAK-STAT que controla o promotor da região da molécula de MHC classe II (HEGDE, 2002).

A IL-10 codificada pelo vírus (cmvIL-10) também reduz as propriedades antivirais das células apresentadoras de antígenos. Em culturas de monócitos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) a cmvIL-10 diminui a produção de citocinas inflamatórias pela indução da desregulação das proteínas do MHC I e II. A cmvIL-10 utiliza a mesma via de sinalização celular da IL-10 humana para a inibição da funcionalidade dos monócitos, das via Jak/STAT e a atividade PI3K (SINZGER, 2008).

A IL-10 viral pode também dificultar a funcionalidade das células dendríticas, resultando na debilidade para a secreção das citocinas inflamatórias (GERNA, 2005) e

difficuldade na expressão das moléculas de MHC, portanto impedindo a habilidade de estímulo imunológico destas células (HAHN, 2004). A latência viral pode estar associada à cmvIL-10 por meio da baixa expressão das moléculas MHC II na superfície dos progenitores dos granulócitos, macrófagos e monócitos, limitando a resposta imune contra as células latentemente infectadas (JENKINS, 2004). Adicionalmente, esta citocina viral melhora a HCMV infecção pelo aumento da expressão do receptor de entrada viral DC-SIGN. Portanto, a secreção de cmvIL-10 permite ao vírus infectar as células apresentadoras de antígenos e causar a inibição de sua funcionalidade por um longo período (HAHN, 2004).

2.5.4 MODULAÇÃO DO TRÁFEGO LEUCOCITÁRIO

O HCMV codifica proteínas ligadoras de membrana que interagem com proteínas das células hospedeira envolvidas na estimulação dos leucócitos. O produto do gene US28 atua como receptor para as quimiocinas, ligando-as. As quimiocinas e seus receptores estão amplamente distribuídos nos mamíferos e controlam o tráfico leucocitário durante a resposta imune (MOUTAFTSI, 2004).

As proteínas ligadoras induzem a liberação de citocinas que determinam a quimiotaxia dos neutrófilos para as áreas de infecção, aumentando a virulência, pois a amplificação do quadro inflamatório pode exacerbar a disseminação viral. A característica de leucopenia verificada na infecção ativa é causada pela supressão viral das fases G1 e S do ciclo celular em muitas linhagens celulares humanas (MOCARSKI, 2002).

2.5.5 MODULAÇÃO DO CICLO CELULAR E DA APOPTOSE

Células infectadas com HCMV podem torna-se imortalizadas por meio da inibição da apoptose Bcl induzida (MOCARSKI, 2002). A infecção promove impacto direto no ciclo celular, determinando o descontrole na expressão dos produtos dos genes envolvidos na sua regulação (KALEJTA, 2002). Os produtos do gene alfa CMV, IE1491aa, IE2579aa, pUL36/vICA e pUL37x1/vMIA, estão implicados no bloqueio da apoptose (MOCARSKI, 2001). Embora os mecanismos ainda não sejam claros, duas funções virais previnem a apoptose das células humanas infectadas: um inibidor de ativação das caspases (vICA), codificado pelo gene UL36, que inibe a ativação da caspase 8 (SKALETSKAYA, 2001) e um inibidor viral mitocondrial da apoptose (vMIA), codificado pelo gene UL37, que inibe a ativação mitocondrial de maneira similar aos membros da família antiapoptótica Bcl (GOLDMACHER, 1999). Os produtos vMIA protegem as células da exposição a uma ampla variedade de indutores intrínsecos e extrínsecos da apoptose. Esta função, essencial para replicação viral em cultura, é a principal responsável para prevenir a apoptose intrínseca vírus induzida (GOLDMACHER, 1999).

2.5.6 AÇÃO DAS PROTEÍNAS DO TEGUMENTO

A pp65 constitui a mais abundante proteína do tegumento e está implicada na interação com as respostas imune inata e adaptativa durante as infecções por HCMV, sendo o alvo antigênico dominante dos linfócitos T citotóxicos (MCLAUGHLIN-TAYLOR, 1994). Além de constituir uma molécula antigênica, também apresenta função imunomodulatória, prevenindo o reconhecimento das proteínas imediatamente

precoces do reconhecimento imunológico por meio de sua atividade enzimática cinase associada (ODEBERG, 2003). A pp65 migra para o nucléolo nos estágios precoces da infecção, sugerindo uma relação funcional entre sua localização e o estágio lítico do ciclo de vida viral (ARCANGELETTI, 2011). Entretanto, a pp65 inicia a migração para o citoplasma a 48 horas do ciclo lítico através da atividade cinase dependente da ciclina e uma migração mediada pelo Crm1 exportador (SANCHEZ, 2007). É provável que a pp65 não migre independentemente para o nucléolo e permaneça no citoplasma na ausência de outros componentes do HCMV (TOMTISHEN, 2012). Este é um padrão de localização significativo das proteínas do tegumento que correlaciona-se com suas funções (ARNON, 2006). Outra proteína do tegumento pode ligar-se a pp65, induzindo alterações em sua conformação que permitem a inacessibilidade para o sinal de localização nuclear ser reconhecido por moléculas transportadoras nucleares. Deste modo, as características da localização nuclear da pp65 são acionadas e o ciclo lítico é iniciado (TOMTISHEN, 2011).

A pp71 ativa os genes de expressão viral por meio da neutralização dos efeitos da proteína celular Daxx. A proteína Daxx é recrutada aos promotores pelos fatores de transcrição, resultando na repressão da transcrição viral (SALOMONI, 2006). A pp71 liga-se a dois domínios da Daxx e induz sua degradação proteossomal (SAFFERT, 2006). A pp71 retarda o transporte intracelular das moléculas do MHC I, limitando a apresentação dos antígenos HCMV na superfície das células infectadas para os linfócitos T citotóxicos (TRGOVCICH, 2006).

2.6 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA HCMV INFECÇÃO E DOENÇA INFECCIOSA

2.6.1 INFECÇÃO POR HCMV EM INDIVÍDUOS IMUNOCOMPETENTES

Os numerosos mecanismos pelos quais o HCMV previne seu reconhecimento e eliminação pelo sistema imunológico do hospedeiro podem determinar implicações durante a fase aguda infecciosa ou após a reativação do vírus latente (ZANGHELLINI, 1999). Indivíduos imunocompetentes com infecção primária são frequentemente assintomáticos, mas ocasionalmente os efeitos clínicos da doença infecciosa podem manifestar-se como uma síndrome mononucleosa autolimitada. Clinicamente a mononucleose causada por HCMV é similar à mononucleose ocasionada pelo vírus Epstein-Baar (EBV). Mal estar, dor de cabeça, febre elevada, mialgia e adenopatia cervical são característicos da HCMV mononucleose. Nestes pacientes a maioria das infecções primárias por HCMV diagnosticadas são causadas por uma infecção aguda acompanhada por uma imunossupressão transitória que pode permanecer por semanas ou meses, juntamente com a sintomatologia clínica da mononucleose (NANICHE, 2000). A imunossupressão reflete os efeitos diretos do vírus nas células envolvidas na resposta imune normal, uma vez que a HCMV infecção aguda está associada com a diminuição das células apresentadoras de antígenos no sangue periférico (CARNEY, 1981). Esta diminuição correlaciona-se com os elevados níveis de mediadores inflamatórios, principalmente TNF-alfa, que ativa as células apresentadoras de antígenos e células endoteliais, induzindo a maturação, migração, aumento da produção de mediadores vasodilatadores, moléculas de adesão e quimiocinas que alteram a organização do epitélio vascular para a migração transendotelial, resultando no aumento da compartimentalização destas células nos tecidos periféricos durante a HCMV

infecção, assim como em outras infecções (KUNITANI, 2002). Como esta situação é dependente do TNF-alfa, eventos similares podem surgir nas infecções agudas, inflamações crônicas ou doenças autoimunes que determinam o aumento dos níveis do TNF-alfa (sepses, doenças cardiovasculares, artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico, por exemplo). Complicações menos frequentes da infecção primária incluem quadros de faringite, esplenomegalia, artralguas, colite ulcerativa, pneumonias, hepatites, meningite e miocardite. Outras anormalidades clínicas têm sido atribuídas à infecção por HCMV nos hospedeiros normais, como a síndrome de Guillain-Barré (5 a 10 % destes pacientes apresentam evidências sorológicas de infecção primária), anemia hemolítica e trombocitopenia (ANG, 2000).

2.6.2 INFECÇÃO POR HCMV E REATIVAÇÃO EM TRANSPLANTADOS

O HCMV apresenta duas propriedades que determinam suas funções nos transplantados: latência e associação celular. Uma vez infectado, o paciente mantém o vírus por toda vida. A ativação da latência é induzida por muitos dos fatores presentes nos receptores de transplantes, como a terapia com anticorpos anti-linfocitários e drogas citotóxicas, reações alogênicas, infecções e inflamações sistêmicas. Portanto, a inflamação sistêmica acompanhada pela liberação de fator de necrose tumoral alfa e outras citocinas inflamatórias estimulam uma variedade de mensageiros intracelulares que iniciam a reativação da latência, resultando na replicação viral (FIETZE, 1994). A replicação do HCMV está fortemente relacionada à sua associação celular, sendo a resposta citotóxica vírus específica, mediada pelas moléculas de MHC o elemento fundamental para a resposta imune do hospedeiro. Diferentes formas de imunossupressão utilizadas nos receptores de órgãos afetam diferentes aspectos da

infecção viral. Anticorpos anti-linfocitários e drogas citotóxicas melhoram a ativação viral a partir do estado de latência, enquanto a ciclosporina, tacrolimus e corticosteróides promovem a persistência e disseminação do vírus por meio da supressão da resposta imune antiviral do hospedeiro (RUBIN, 1994).

Os efeitos da HCMV infecção nos pacientes transplantados podem ser divididos em duas categorias: efeitos diretos da infecção que causam a síndrome mononucleosa ou a doença tecidual invasiva e os efeitos indiretos (FREEMAN, 2009). Os efeitos diretos nos receptores de transplantes determinam sintomas característicos da síndrome mononucleosa (febre e mialgia), hepatite branda e anormalidades laboratoriais, incluindo leucopenia, trombocitopenia e discreta linfocitose com atipia. A doença órgão invasiva acomete frequentemente o próprio órgão transplantado que parece ser mais susceptível aos efeitos diretos do HCMV do que os órgãos nativos (SAN JUAN, 2008). Suspeita-se de doença tecidual invasiva se elevados níveis de viremia são detectados e o diagnóstico é confirmado pela detecção do vírus no tecido afetado por imunohistoquímica. Neste sentido, muitos estudos têm demonstrado que a elevada carga viral e a consequente exposição cumulativa à replicação são fatores de risco para o desenvolvimento da doença por HCMV (HUMAR, 2006). A identificação de corpúsculos de inclusão ou antígenos virais em material de biópsia ou células de lavado bronco-alveolar por imunohistoquímica/imunocitoquímica pode fornecer um valor preditivo positivo de uma cultura (CHEMALY, 2004). Por outro lado, pouco se sabe sobre a influência dos fatores de virulência do vírus para o desencadeamento da infecção. A glicoproteína B (componente do envelope viral) tem sido relacionada com vários passos essenciais da patogênese na doença por HCMV, como a entrada do vírus, fusão celular, disseminação célula a célula e efeitos imunomodulatórios (HUMAR, 2006).

Os efeitos indiretos da HCMV infecção englobam todos os efeitos que estão acoplados a longos períodos de baixa carga de replicação viral e que são causados em parte pela resposta imune do hospedeiro. Os fatores de risco para os efeitos indiretos do HCMV incluem a soropositividade, baixos níveis da viremia assintomáticos, elevada carga viral e doença HCMV. Viremia assintomática e a reativação da latência são considerados os principais fatores contribuintes para os efeitos indiretos (EMERY, 2007). Dentre estes efeitos destacam-se a rejeição do enxerto e a imunossupressão (PANTALEO, 2006).

O vírus é capaz de replicar-se em uma ampla variedade de tipos celulares, ativando o DNA celular, RNA mensageiro e síntese de proteínas que pode determinar a produção de receptores Fc, moléculas de adesão intracelular, oncogenes, uma glicoproteína homóloga ao MHC de classe I e uma variedade de citocinas pró-inflamatórias (SINZGER, 2008). Como resultado da deficiência imunológica mediada pela HCMV infecção, os pacientes tornam-se mais susceptíveis às infecções oportunistas (HAHN, 2004). O aumento na incidência das infecções concorrentes oportunistas virais, fúngicas e bacterianas nos quadros de HCMV infecção tem sido caracterizado na literatura. As propriedades imunomodulatórias estão envolvidas no aumento da vulnerabilidade dos receptores de órgãos para estas infecções. O prejuízo nas funções das APCs, incluindo o bloqueio da diferenciação, migração e maturação e a reduzida expressão das moléculas de MHC, prevenindo a efetiva apresentação dos antígenos às células T (GREDMARK, 2004), altera a resposta imunológica e proporciona uma transitória, porém substancial imunossupressão que inibe a resposta imune contra o vírus e outros patógenos não relacionados, principalmente nos indivíduos com infecção primária (AVDIC, 2011). A reativação de outras infecções virais tem sido reportada durante a infecção aguda por HCMV (BOECKH, 2003) e sua replicação ativa favorece a imunossupressão pré-

existente nos receptores de órgãos sólidos, propiciando um risco elevado para as infecções bacterianas e fúngicas invasivas (ARTHURS, 2008). Deste modo, em um paciente com infecção incomum (*Pneumocystis carinii*, pneumonia ou aspergilose invasiva, por exemplo), a possibilidade do HCMV constituir um cofator deve ser considerada (WEIMERT, 2007). O HCMV pode empregar estes mecanismos como uma estratégia de evasão da resposta imune, porém pode simultaneamente induzir uma inibição profunda e generalizada da resposta imunológica do hospedeiro (VARANI, 2012). A supressão viral por meio da administração de terapias profiláticas pode proporcionar um declínio nestas infecções oportunistas (BOECKH, 2003).

O HCMV também está implicado nas rejeições aguda e crônica dos órgãos transplantados e sua relação com os mecanismos de rejeição parece ser bidirecional, com o HCMV podendo causar a rejeição e a atividade inflamatória causada pela rejeição celular aumentando a replicação viral (FISHMAN, 2007). Embora não exclusiva, a infecção por HCMV está associada aos processos de rejeições aguda e crônica (HUMMEL, 2001). O tipo de órgão transplantado, a rejeição aguda ao transplante e a intensidade do regime de imunossupressão utilizada após os transplantes são fatores de risco que podem determinar o aumento da replicação viral (RAZONABLE, 2001). A infecção ativa ocorre em 30%-75% dos receptores de transplantes, com uma taxa de mortalidade de 5% (MADI, 2007).

A infecção por HCMV parece estar implicada como fator de risco para novos casos de *diabetes mellitus* nos receptores de transplante renal. Leung et al (LEUNG, 2008) descreveram dois pacientes que desenvolveram quadros de diabetes concomitantes com período de infecção tardia por HCMV. Os pacientes não eram obesos e receberam baixas doses de corticosteróides. Com o tratamento e carga viral indetectável a glicemia destes pacientes foi normalizada. Os autores sugeriram que o desenvolvimento de

diabetes nos quadros de infecção por HCMV está relacionado à toxicidade direta nas células beta ou pela interrupção das vias metabólicas normais no fígado durante a infecção. Adicionalmente, a doença HCMV também parece estar associada com o aumento no risco de desordem linfoproliferativa pós-transplante, relacionado às citocinas, fatores de crescimento e imunossupressão associados ao HCMV (AVDIC, 2011).

Apesar dos avanços nos protocolos de imunossupressão e profilaxia antiviral a infecção por HCMV permanece como principal causa de morbidade e custos após os transplantes de órgãos e relacionada com consequências ao longo prazo (HELANTERA, 2003).

2.6.3 INFECÇÕES POR HCMV NOS TRANSPLANTADOS RENAI

A principal causa de perda tardia do enxerto nos pacientes receptores de transplantes renais é a disfunção crônica do enxerto que pode ser ocasionada por fatores específicos como a rejeição crônica, hipertensão, infecções ou ser de etiologia desconhecida (DICKENMANN, 2001).

Existem fatores de riscos que podem contribuir para infecção por HCMV após o transplante renal. O vírus pode ser introduzido a partir de uma fonte externa para a produção da infecção primária ou da reinfecção. Na infecção endógena (reativação do vírus latente) é produzida a infecção secundária que ocorre mais frequentemente do que a infecção primária. Na infecção primária os fatores de risco são determinados pelo ambiente externo, contato pessoal, transfusão de sangue e doadores renais. Na infecção secundária os fatores de riscos estão relacionados à depressão da resistência do receptor determinada pela falência renal, imunossupressão por drogas e a rejeição do enxerto (MONTANO, 1976).

O HCMV está associado à rejeição aguda e crônica do enxerto renal (REISCHIG, 2010). A infecção lítica pode levar a danos diretos no tecido enxertado (SODERBERG, 2006). Após a viremia e infecção ativa, o HCMV é capaz de persistir nestes enxertos por um longo período, sendo esta persistência relacionada com as alterações crônicas do enxerto renal (HARTMANN, 2006; HOLMA, 2000). Uma relação entre infecção e doença por HCMV e a nefropatia crônica do enxerto é definida por diversos modelos experimentais em animais (VAN DAM, 2000). Em enxertos renais experimentais de ratos, a infecção com HCMV acelera e intensifica a rejeição nos enxertos infectados quando comparados com enxertos não infectados (LAUTENSCHLAGER, 1997). Os mecanismos pelos quais o HCMV contribui para a perda do enxerto não são claros. A citocina fibrogênica transformadora de crescimento fator beta-1 (TGF-beta1) está presente nos espécimes de biópsia dos enxertos renais humanos que sofreram rejeição (CAMPISTOL, 2001). A TGF-beta1 é produzida pelo infiltrado leucocitário durante a rejeição e pode também ser produzida pelas células epiteliais tubulares dos rins (OZDEMIR, 2005), sendo sintetizada em elevados níveis nos enxertos renais infectados comparados aos enxertos não infectados (HELANTERA, 2005). A TGF-beta1 contribui para a fibrose renal em numerosos modelos animais e na doença fibrótica renal de humanos pela indução da transição epitelial-mesenquimal (EMT) das células renais epiteliais tubulares (RASTALDI, 2002). Durante a EMT as células renais tubulares demonstram perda das características epiteliais e adesividade celular, desenvolvendo alterações no citoesqueleto, indução de expressão de moléculas fibrogênicas e adquirem um fenótipo de transição (LIU, 2004). Estas células fibroblastóides são os principais fatores contribuintes para a fibrose renal, assim como a inibição da EMT mediada por TGF-beta1 previne e reverte experimentalmente a fibrose renal nos modelos animais (ZEISBERG, 2003).

A inflamação persistente é importante para os progressivos danos ao órgão transplantado (INKINEN, 2002). Como a infecção por HCMV é dependente da inflamação e é capaz de induzir e manter o processo inflamatório, ela pode ser um fator contribuinte para as disfunções aguda e crônica do enxerto. Adicionalmente, a infecção persistente nos transplantados renais correlaciona-se com o aumento nos níveis séricos de creatinina e reduzida sobrevivência do enxerto (HELANTERA 2003).

Diversos estudos postulam uma associação entre a infecção HCMV e a rejeição celular aguda, principalmente nos pacientes com sintomatologia clínica ou infecção HCMV recorrente, mas os resultados são inconsistentes (SAGEDAL, 2004), uma vez que já foram observadas as mesmas frequências de rejeição aguda nos pacientes com HCMV viremia assintomáticos ou em um único episódio com manifestação clínica (ERDBRUEGGER, 2012). Outro ponto de controvérsia é o período de curso da HCMV infecção e a rejeição celular aguda, pois não é claro se a HCMV infecção precede a rejeição aguda ou se a rejeição aguda precede a infecção (NETT, 2004). A diminuição da terapia de imunossupressão é frequentemente realizada quando o diagnóstico da HCMV infecção é estabelecido, podendo subsequentemente determinar a rejeição aguda (BORCHERS, 1999). A infecção por HCMV também está associada com o aumento da produção de citocinas, moléculas de adesão e aumento da expressão do MHC II marcador de superfície que pode resultar em rejeição aguda. Por outro lado, os episódios de rejeição aguda requerem o aumento da terapia de imunossupressão que pode promover a HCMV infecção (BORCHERS, 1999).

Os vários mecanismos de indução da resposta inflamatória, o controle da diferenciação celular, a indução da migração e proliferação celular podem contribuir para a patogenia da doença no enxerto renal (DICKENMANN, 2001).

2.7 DESEMPENHO ANALÍTICO DO PCR EM TEMPO REAL

As características de desempenho analítico do PCR em tempo real (Rt PCR), metodologia Taqman Q-CMV Rt Nanogen Advanced Diagnostic, foi comparada à performance dos ensaios para antigenemia pp65, sendo demonstrado que o Rt PCR foi mais sensível do que os testes de antigenemia e mantiveram especificidade similar (MARCHETTI, 2011). Um total de 793 amostras foram testadas, sendo 53 (6,7%) positivas para ambos os ensaios, 577 (72,7%) negativas para ambos e as 163 (20,6%) amostras restantes apresentaram resultados discordantes entre os dois métodos. Nestas amostras o PCR em tempo real detectou o DNA HCMV em 162 casos (99,4%) e em cada um destes casos os resultados da antigenemia pp65 foram negativos. Apenas uma amostra testada negativa por Rt PCR apresentou resultado positivo para o ensaio pp65. As amostras positivas para pp65 demonstraram significativamente níveis elevados de DNA HCMV (média de 20.000 cópias/mL).

Amostras consecutivamente testadas por Rt PCR apresentam resultados positivos antes da positividade nos ensaios de pp65, evidenciando que a metodologia de Rt PCR apresenta sensibilidade para o monitoramento dos pacientes com elevado risco para a doença HCMV (SANGHAVI, 2008). A especificidade agregada a um melhor desempenho de sensibilidade analítica permite à metodologia de Rt PCR registrar baixos níveis de carga viral em pacientes assintomáticos, fornecendo a indicação de monitoramento da tendência das cargas virais ao longo do tempo (KOTTON, 2013).

2.8 CONTROLE IMUNOLÓGICO DO HCMV

O controle imunológico do HCMV em hospedeiros imunocomprometidos é complexo, envolvendo os mecanismos imunes inatos ou inespecíficos e os mecanismos adaptativos ou específicos (CROUGH, 2009). Polimorfismos do TLR-2 e TLR-4, bem como deficiências das proteínas do sistema complemento e lecitina ligadora de manose estão associados com o aumento de risco para o desenvolvimento da HCMV doença (KIJPITTAYARITS, 2007; MANUEL, 2007). As células NK apresentam uma função crítica no controle das infecções primária e recorrentes por HCMV, aumentando tipicamente nas respostas à replicação viral (HADAYA, 2008).

A resposta imune adaptativa dos linfócitos B e T são essenciais para o controle da replicação do HCMV, sendo que os métodos empregados para o monitoramento desta resposta poderiam permitir uma identificação precoce dos pacientes com riscos elevados para a replicação viral. As células B são importantes na resposta imune humoral ao HCMV, produzindo anticorpos neutralizantes que atuam primariamente na glicoproteína B e glicoproteína H (CROUGH, 2009). As respostas das células T (CD4 e CD8) são componentes criticamente importantes do sistema imune para o controle do HCMV, inibindo a replicação viral. As células T demonstram reatividade contra uma ampla variedade de antígenos do HCMV, incluindo pp65, pp50, IE-1, gB e outros (SYLWESTER, 2005). Apesar do monitoramento das respostas inata e adaptativa ser importante para os pacientes com elevado risco para o desenvolvimento da HCMV doença no período pós-transplante, sendo empregado como guia para a profilaxia e terapia preemptiva, sua utilização tem sido restrita a estudos experimentais e sua ampla aplicação clínica ainda permanece em investigação (KOTTON, 2013).

2.9 TERAPIAS DE IMUNOSSUPRESSÃO

Atualmente verifica-se uma melhora significativa nos resultados do acompanhamento dos transplantados renais no período de pós-transplante recente. Muitos estudos demonstraram que uma função precoce do enxerto pode ser um aspecto preditivo de sua sobrevivência por períodos prolongados. A sobrevivência do enxerto no período precoce do pós-transplante pode ser obtida por meio de diversos protocolos de imunossupressão (SOLA, 2010).

A terapia de indução pode ser administrada no dia do transplante para a diminuição da incidência da rejeição aguda ou prevenir a função tardia do enxerto e consequentemente melhorar a sobrevivência do órgão transplantado no pós- transplante tardio. Aproximadamente, de 60% a 80% dos transplantados renais que receberam terapia de indução com anti-timoglobulina (ATG), um anticorpo policlonal com ação depletora dos linfócitos, ou com basiliximabe, um anticorpo monoclonal com ação não depletora dos linfócitos, demonstraram uma redução na severidade dos eventos adversos do pós-transplante imediato, disparados pelas células B (PARASURAMAN, 2008).

A ATG é frequentemente administrada por via intravenosa em uma série de doses divididas durante a primeira semana do pós-transplante ou em uma única dose de 9 mg/Kg, promovendo a redução da contagem dos linfócitos. O Basiliximabe é constituído por anticorpos monoclonais com especificidade para os receptores da interleucina-2, geralmente administrado em duas doses (PASCUAL, 2002).

O principal objetivo da terapia de indução é a prevenção da rejeição precoce, bem como melhorar o período de sobrevivência do enxerto, entretanto os pacientes são expostos ao aumento dos riscos das complicações infecciosas e das desordens linfoproliferativas do pós-transplante decorrentes da imunossupressão. Diversos estudos

estabelecem a segurança e tolerância da indução por ATG e basiliximabe (KRYSTUFKOVA, 2012).

A manutenção da imunossupressão pode ser realizada pela administração de imunossupressores convencionais (ciclosporina e prednisolona) e novas drogas imunossupressoras, como o micofenolato mofetil (MMF), tacrolimus e sirolimus (WOOD, 2012). A utilização dos novos agentes imunossupressores reduz consistentemente a incidência da rejeição aguda (15% aproximadamente) no período precoce do pós- transplante (um ano) quando comparada com o uso das drogas convencionais. Entretanto, os efeitos destas novas drogas não parecem ser adicionais, uma vez que o uso do tacrolimus com MMF como adjuvante reduz em 5% os episódios de rejeição aguda, enquanto com a utilização da azatioprina como adjuvante a redução foi de 15% (WOOD, 2012).

2.10 PRINCÍPIOS DA TERAPIA ANTIMICROBIANA NOS RECEPTORES DE TRANSPLANTES

Existem três possibilidades para a utilização da terapia antimicrobiana nos pacientes transplantados. O uso terapêutico que consiste no tratamento da infecção clinicamente estabelecida. A profilaxia baseada na administração do agente antimicrobiano em um grupo inteiro de pacientes para a prevenção da manifestação da doença infecciosa que seja importante o suficiente para justificar a intervenção e o uso preemptivo para a administração da terapia em um subgrupo de pacientes definidos por características clínicas ou epidemiológicas ou pelos resultados de um teste laboratorial que apresente predição para uma elevada taxa da doença clinicamente significativa. Devido à ênfase na prevenção da doença infecciosa por HCMV, atenção específica para as estratégias profilática e preemptiva tem sido empregada (ASBERG, 2007; KHOURY, 2006). Existem variações significativas na prática clínica em cada uma destas estratégias e a utilização de um modelo híbrido com ambas é possível. A utilização destas estratégias preventivas tem resultado em uma significativa redução na doença e mortalidade, assim como dos efeitos indiretos relacionados à infecção por HCMV (KOTTON, 2013). Em todos os pacientes a imunossupressão exógena deve ser reduzida como uma possibilidade para a otimização da prevenção e tratamento da infecção (FISHMAN, 2007).

2.10.1 EMPREGO CLÍNICO

O ganciclovir intravenoso (IV) é considerado o “padrão ouro” para o tratamento da doença HCMV. Previamente, o foscarnet foi comumente utilizado, porém sua toxicidade limita sua utilização nos receptores de órgãos sólidos, especialmente seus efeitos nefrotóxicos (LIMAYE, 2000). O mecanismo primário de ação do ganciclovir/valganciclovir contra o HCMV realiza-se por meio da inibição da replicação do DNA viral pela ganciclovir-5-fosfato que apresenta uma seletiva e potente inibição da DNA polimerase (KHOURY, 2006). O foscarnet interfere com a troca de pirofosfato do desoxinucleotídeo trifosfato durante a replicação viral pela ligação a um sítio da DNA polimerase do HCMV (BALFOUR, 1990). Estudos recentes demonstraram que o valganciclovir oral não é inferior ao ganciclovir IV para o tratamento da doença HCMV nos receptores de órgãos (74% representados por receptores renais) com a doença não apresentando risco de vida aos pacientes (48% com síndrome HCMV e 49% doença tecidual invasiva) (ASBERG, 2007). Nos pacientes apresentando risco de vida pela doença HCMV e crianças o ganciclovir IV ainda é a opção terapêutica preferida, uma vez que os dados sobre os efeitos do valganciclovir são limitados. Ganciclovir IV pode também ser utilizado em pacientes que não toleram tratamento oral ou quando sua absorção é insuficiente (KOTON, 2013).

A administração de doses apropriadas de valganciclovir ou ganciclovir deve ser rigorosa, pois dosagens inadequadas podem resultar na perda da eficácia clínica e promover a resistência. Doses elevadas podem resultar em toxicidade (EMERY, 2000). Podem ser utilizadas duas doses diárias para o tratamento da doença nos pacientes com funções renais normais. A duração adequada do tratamento deve ser obtida pelo monitoramento semanal da carga viral e mantido até uma ou duas amostras consecutivas

negativas da carga viral, mas não descontinuado em um período inferior a duas semanas. Com este algoritmo de tratamento o risco de desenvolvimento da resistência e a recorrência da doença HCMV são minimizados (ASBERG, 2009). Entretanto, os agentes antivirais utilizados para o tratamento das infecções por HCMV apresentam elevada toxicidade hematológica e renal, além de baixa biodisponibilidade (REISCHIG, 2008).

2.10.2 PROFILAXIA UNIVERSAL

A profilaxia universal envolve a administração do agente antiviral em todos os pacientes ou em um grupo de pacientes de risco. Os antivirais são frequentemente iniciados em um período imediato ou muito precoce do pós-transplante e continuados por um período determinado de tempo, geralmente de 3 a 6 meses. Diversos antivirais foram avaliados para a profilaxia, incluindo aciclovir, valaciclovir, ganciclovir intravenoso, ganciclovir oral e valganciclovir. A manifestação tardia da doença HCMV tem sido o mais significativo achado de todos os estudos de avaliação da profilaxia universal, com o surgimento da doença infecciosa após a descontinuidade da profilaxia (PAYA, 2004). Os fatores determinantes para a manifestação da doença infecciosa tardia não estão completamente elucidados, mas parecem estar relacionados à imunossupressão acompanhada pela perda do desenvolvimento de uma imunidade celular significativa específica para o HCMV (RAZONABLE, 2001).

2.10.3 TERAPIA PREEMPTIVA

Na terapia preemptiva o monitoramento laboratorial é realizado em intervalos regulares para a detecção precoce e assintomática da replicação viral. A carga viral deve atingir um determinado valor limiar do ensaio e antes do desenvolvimento dos sintomas a terapia antiviral é iniciada para prevenir a progressão para a doença clínica. As vantagens da terapia preemptiva incluem uma melhor seletividade dos alvos da droga, diminuição dos custos com medicações e toxicidade associada (KOTON, 2013). Teoricamente a estratégia preemptiva pode promover o desenvolvimento e a manutenção de imunidade celular HCMV específica por meio da permissão de baixos níveis da replicação viral. A coordenação da terapia preemptiva é complexa, uma vez que necessita de monitoramento laboratorial semanal e um rápido período da resposta do laboratório. Além disso, os valores limiares otimizados para a carga viral dependem das características de desempenho analítico do exame e não são bem estabelecidos. Uma das principais preocupações da estratégia preemptiva é que ela pode não prevenir os efeitos indiretos da HCMV infecção, incluindo os efeitos no enxerto e na sobrevivência dos pacientes (KLIEM, 2008).

2.11 RESISTÊNCIA ÀS DROGAS ANTIVIRAIS

Os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento da resistência são determinados pela exposição prolongada às drogas antivirais (frequentemente meses, média de 5 a 6 meses) e a contínua replicação viral, como a permitida pelos hospedeiros imunossuprimidos ou imunodeficientes e pela distribuição inadequada da droga no organismo (ganciclovir oral) (ARTHURS, 2008). Não existem grandes estudos comparativos entre os resultados da infecção com cepas de HCMV resistentes e cepas sensíveis. Relatos dos resultados de infecção com cepas resistentes variam de assintomáticos a doença severa ou fatal (MARFORI, 2007). A doença tecidual invasiva é frequentemente diagnosticada nos pacientes infectados com o vírus resistente (EMERY, 2000).

Mediante elevados níveis de viremia ou doença clínica progressiva durante a terapia antiviral prolongada, suspeita-se do desenvolvimento da resistência. O aumento dos níveis das cargas virais, especialmente nas primeiras semanas do tratamento, não são indicadores confiáveis da resistência às drogas (NICHOLS, 2001). Embora os fatores de riscos clínicos para a resistência estejam bem definidos, o diagnóstico exato requer o emprego de testes laboratoriais, como o teste fenotípico de redução em placa que determina a concentração necessária da droga para a inibição do crescimento de um isolado viral em 50% (IC 50). A complexidade e dificuldade de padronização do teste fenotípico impedem seu emprego na rotina de manejo clínico dos pacientes (KOTTON, 2013).

A genotipagem pode rapidamente identificar as mutações das características virais indicativas de resistência às drogas. Tecnologias padronizadas de sequenciamento permitem a detecção de uma sequência viral mutante quando ocorre seu aumento a

aproximadamente 20% da sequência total da população (SCHUURMAN, 1999). A amplificação direta a partir de amostras clínicas permite a determinação da UL97 cinase (códon 460-670) e opcionalmente das sequências UL54 (códon 300-1000). Uma grande base de dados envolvendo as mutações características de resistência do HCMV tem sido acumulada (CHOU, 2008). Dados indicam que mais de 90% dos isolados de HCMV resistentes ao ganciclovir apresentam mutações na UL97 nos códon 460, 520 ou 590 a 607. Mutações M460V/I, C592G, A594V, L595S e C603W são as mais comuns e conferem um aumento de 5 a 10 vezes no IC50 do ganciclovir, excetuando-se a C592G que confere aproximadamente um aumento de 2,5 vezes no IC50, sendo considerado um baixo grau de resistência. Alterações nas sequências menos comuns podem ocorrer nos códon 590 a 607, conferindo vários graus de resistência ao ganciclovir ou nenhuma resistência significativa. No gene da DNA polimerase viral (UL54) as mutações de resistência tendem a ocorrer no domínio funcional conservado e podem conferir resistência a qualquer ou todas as drogas atuais (ganciclovir, foscarnet ou cidofovir) (CHOU, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar a metodologia de PCR em tempo real para descrição da dinâmica de replicação do HCMV nos transplantados renais atendidos pelo HB-SJRP, gerando parâmetros quantitativos de interesse para a profilaxia e o manejo clínico da doença infecciosa.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar um valor de carga viral limiar para HCMV altamente preditivo para o desenvolvimento da doença infecciosa, aplicado às características do desempenho analítico da metodologia utilizada.

Estabelecer a eficácia das estratégias preventivas empregadas.

Relacionar a dinâmica de replicação do HCMV com as características clínicas do grupo de pacientes estudados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

Nós identificamos na base de dados do serviço de transplante todos os pacientes que receberam transplantes renais no Hospital de Base de São José do Rio Preto-SP (HB-SJRP) no período compreendido entre julho de 2010 e dezembro de 2011. A descontinuidade do acompanhamento clínico e laboratorial no HB-SJRP foi estabelecida como critério de exclusão. Desta maneira, 66 pacientes foram incluídos no estudo. A média de idade dos receptores renais foi de 44 anos (idades mínima e máxima de 06 e 68 anos respectivamente), sendo 46 homens e 20 mulheres.

4.2 IMUNOSSUPRESSÃO

A terapia imunossupressora foi realizada de acordo com protocolos do serviço de transplante renal. Indução da imunossupressão realizada com Basiliximabe (20 mg/2 doses) com primeira dose realizada até duas horas após o transplante. Pacientes retransplantados ou sensibilizados (painel de reatividade citotóxica superior a 30%) utilizaram Timoglobulina (1,5 mg/Kg/dose) infundida por seis horas no dia do transplante. Para a manutenção da imunossupressão foram utilizados o Tacrolimo 0,3 mg/kg/dose ou Everolimo 1,5 mg de 12 em 12 horas, Micofenolato sódico 1440 mg/dia e a Prednisona 30 mg/dia (dose única).

4.2.1 DOADOR VIVO (APARENTADO OU NÃO)

Indução realizada em pacientes menores de 18 anos com Basiliximabe 10 mg-2 doses (inferior a 30 Kg) ou 20 mg-2 doses (superior 30 Kg), retransplantados com TIMO 1,5 mg/Kg/dose, sensibilizados (painel de reatividade citotóxica superior a 30%) com TIMO 1,5 mg/Kg/dose e pacientes apresentando HLA distinto com Basiliximabe 20 mg-2 doses. Nos demais casos a indução da imunossupressão não foi realizada.

Início e/ou manutenção da imunossupressão realizados 48 horas antes dos transplantes, utilizando-se Tacrolimo (0,2 mg/Kg/dia) ou Ciclosporina (8 mg/Kg/dia), Micofenolato sódico (1440 mg/dia) e prednisona (30 mg/dia, dose única).

4.2.2 DOADOR FALECIDO

Indução da imunossupressão realizada com Basiliximabe (20 mg/2 doses), excetuando-se os retransplantados (TIMO 1,5 mg/Kg/dose) e pacientes sensibilizados, apresentando painel de reatividade citotóxica superior a 30% (TIMO 1,5 mg/Kg/dose).

Manutenção efetuada com Tacrolimo 0,3 mg/kg/dose ou Everolimo 1,5 mg de 12 em 12 horas, Micofenolato sódico 1440 mg/dia e Prednisona 30 mg/dia (dose única).

4.3 EXTRAÇÃO DNA HCMV

Amostras de sangue total estabilizadas com EDTA foram armazenadas em temperatura ambiente por um período máximo de 3 horas ou 24 horas a 4° C. Mediante necessidade de um maior período de armazenamento (até 7 dias) foram submetidas a temperatura de – 20° C e descongeladas em temperatura ambiente (BIOPUR Mini Spin Plus).

A extração do material genético foi realizada a partir de 200 microlitros de sangue total, utilizando-se o kit comercial BIOPUR Mini Spin Plus com rendimento médio de 6 µg de DNA. O procedimento é baseado na lise inicial das amostras seguida da ligação do DNA genômico à membrana filtrante do filtro spin, lavagem da membrana, eliminação do etanol e eluição do DNA genômico.

As amostras foram lisadas em temperaturas elevadas, na presença do tampão de lise (cloreto de amônio) e proteinase K. A ligação do DNA genômico foi ajustada pelo tampão B6 (2-propanol), sendo então o lisado aplicado ao filtro spin e o DNA genômico adsorvido à membrana. Os contaminantes residuais foram removidos com o uso dos tampões de lavagem I (etanol 50%) e II (etanol 70%). O DNA foi eluído do filtro spin com 200 µL de água milepore pré-aquecida (tampão de eluição).

Foram transferidos 200 µL de sangue total para tubos de reações de 1,5 mL, adicionando-se 200µL de tampão de lise e 20 µL de proteinase K. A mistura foi homogeneizada em vortex por 5 segundos e incubada em termobloco com agitação constante a 56° C por 15 minutos.

Após a incubação adicionou-se ao lisado 400 µL do tampão de ligação. A solução foi homogeneizada em vortex por 10 segundos e transferida para tubos de 2 mL contendo o filtro spin. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 1 minuto e

centrifugados por 2 minutos a 13000 g. O filtrado foi descartado e os filtros colocados em novos tubos de reação de 2 mL.

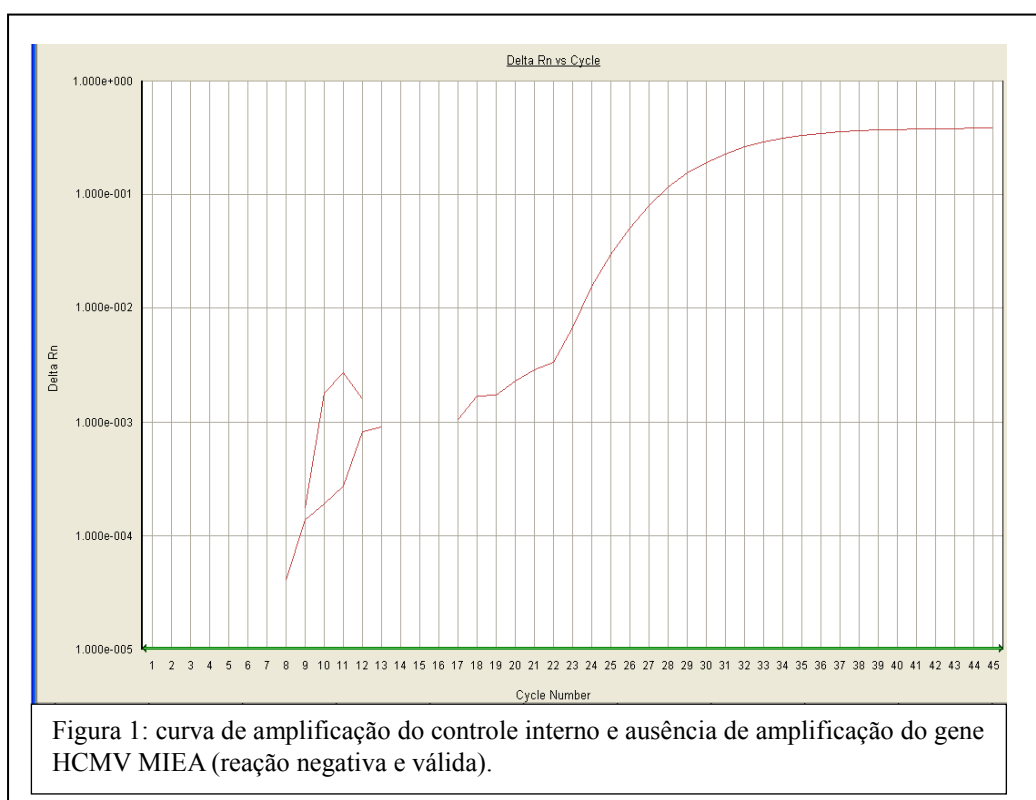
Durante a fase de lavagem foram utilizados 500 µL e 800 µL dos tampões de lavagem I e II respectivamente, centrifugando-os por 1 minuto a 13000 g, descartando o filtrado e retornando o filtro ao tubo de reação a cada procedimento de lavagem. Finalizada a última etapa de lavagem o tubo com o filtro spin foi submetido à centrifugação por 4 minutos a 20328 g para eliminação do etanol residual.

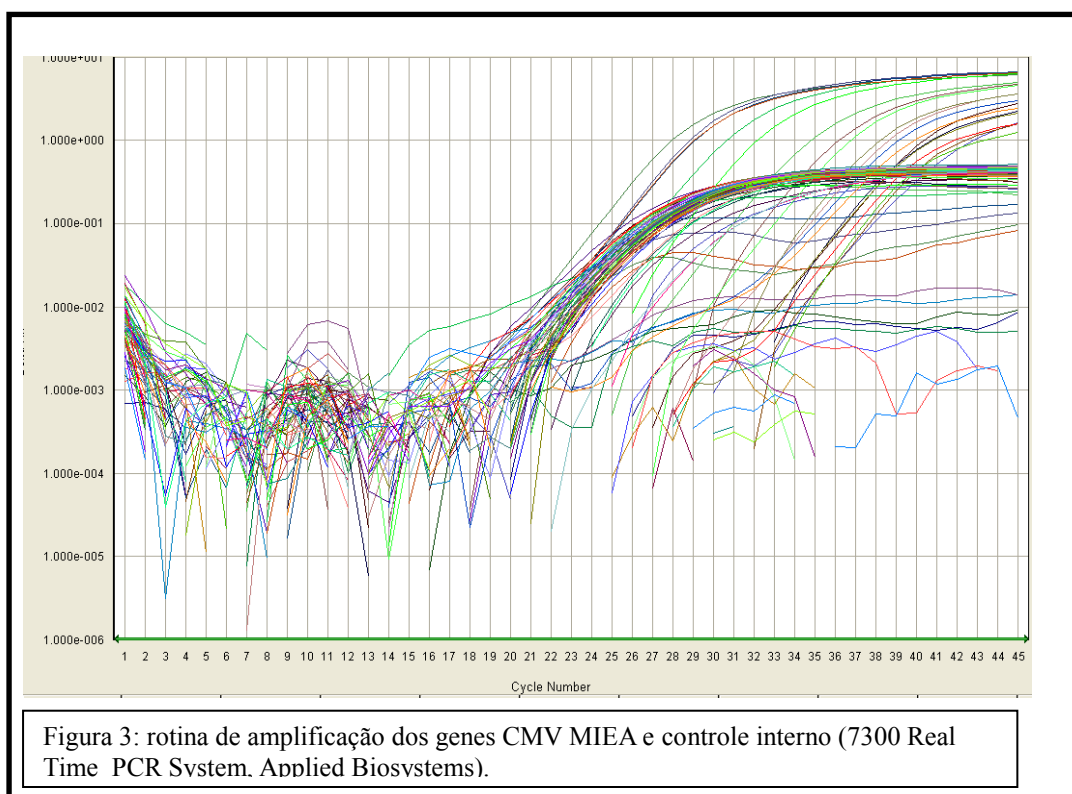
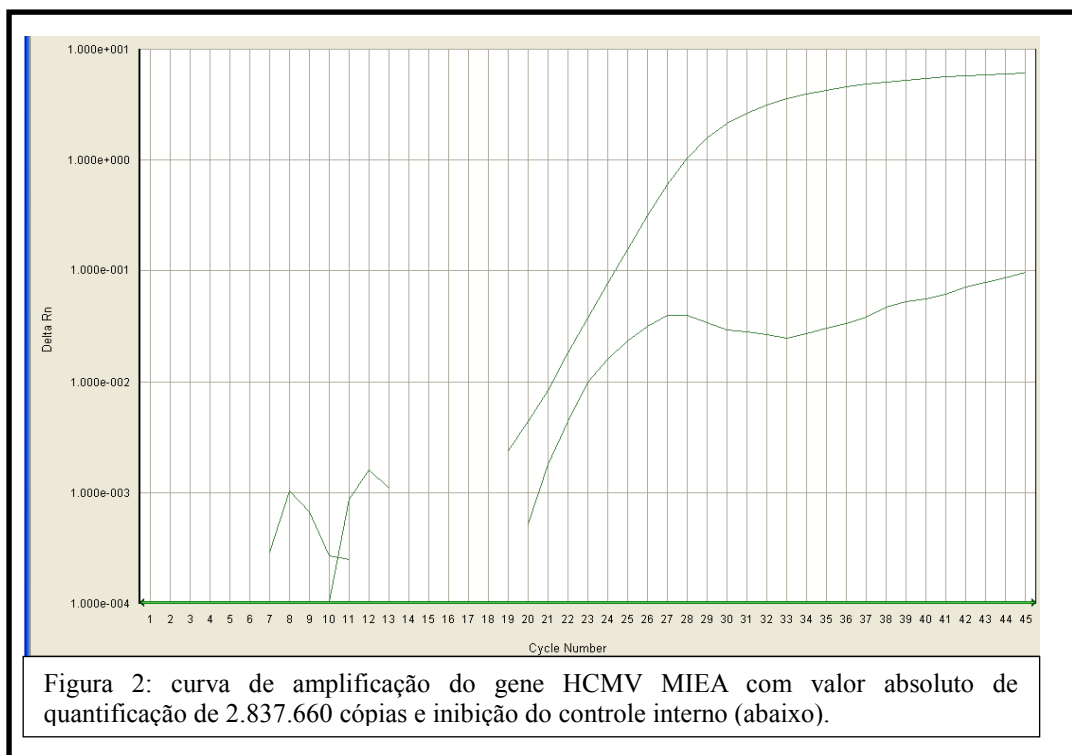
O filtro spin foi transferido para um novo tubo de reação de 1,5 mL. Foram adicionados 200 µL do tampão de eluição pré-aquecido a 56° C e os tubos incubados por 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente seguiram-se a centrifugação por 1 minuto a 8000 g, o descarte do filtro spin e a obtenção do DNA eluído (filtrado).

O DNA eluído foi imediatamente submetido à reação de amplificação ou armazenado por 24h em temperatura de -20°C até o momento de sua testagem (BIOPUR Mini Spin Plus).

4.4 AMPLIFICAÇÃO DNA HCMV

A amplificação do DNA HCMV foi realizada utilizando-se o kit comercial Q-PCR CMV (NANOGEN). Uma reação de amplificação específica para a região do gene antígeno principal imediatamente precoce do CMV (CMV MIEA) e para a região do gene da betaglobina humana (controle interno de inibição) foi realizada em cada amostra de DNA obtida do sangue total. Uma sonda específica para o CMV, marcada com o fluoróforo FAM, foi ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação do CMV. A sonda específica para o controle interno, marcada com o fluoróforo VIC, foi ativada mediante hibridização com o produto específico da reação de amplificação do controle interno (figuras 1, 2 e 3). Os primers utilizados para amplificação do DNA CMV, bem como suas sondas fluorescentes, são específicos para uma determinada região do exon 4 do gene CMV MIEA (HCMV UL123). Os primers utilizados para a amplificação do controle interno, bem como suas sondas fluorescentes, são específicos para o promotor e a região 5 UTR do gene da betaglobina humana.





Em uma mistura padronizada dos reagentes de amplificação em tempo real (tampão, cloreto de magnésio, nucleotídeos trifosfato, fluoróforo de referência passiva ROX, uracil-N-glicosidase e Taq DNA polimerase), apresentando volume de 340 µL, foram adicionados 100 µL da mistura de primers em solução estabilizadora e 100 µL da mistura de sondas marcadas com os fluoróforos. Para a reação de amplificação em tempo real foram utilizados 20 µL da mistura principal obtida e 5 µL de DNA extraído da amostra clínica.

Ciclagem utilizada para as reações de amplificação:

Descontaminação: 50° C, 2 minutos.

Desnaturação: 95° C, 10 minutos.

Amplificação (45 ciclos): 95° C, 15 segundos.

60° C, 45 segundos.

72° C, 15 segundos

4.5 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA HCMV

As reações foram detectadas pelo sistema 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem) e os valores registrados de fluorescência emitidos pela sonda CMV específica (FAM CMV) e pela sonda específica do controle interno (VIC CI) analisados pelo software 7300 System.

Para o cálculo da variação dos valores dos níveis da fluorescência de fundo (“baseline”) foi determinado o intervalo entre o sexto e décimo quinto ciclo. O limiar para o detector do marcador FAM foi ajustado para 0.2 e o limiar para o detector do

marcador VIC ajustado para 0.1 (desempenho analítico preconizado pelo fabricante). Os limiares estabelecidos representam um determinado valor da fase exponencial de amplificação do DNA que corresponde à eficiência máxima da reação. Os valores da fluorescência emitida pelas sondas específicas na reação de amplificação e o valor limiar da fluorescência permitem a determinação do ciclo limiar (Ct, “*cycle threshold*”), ou seja, o ciclo no qual a fluorescência atingiu seu limiar previamente estabelecido e consequentemente a máxima eficiência da reação.

A utilização de quatro soluções plasmidiais apresentando a região do exon 4 do gene HCMV MIEA em título conhecido (10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 cópias/mL) e a detecção da amplificação dos respectivos materiais genéticos permite atestar a eficiência da reação em detectar o DNA HCMV e calcular a curva padrão (figura 4). Deste modo, os valores de Ct da sonda específica para HCMV nas reações de amplificação das quatro soluções com títulos conhecidos define a curva padrão da rotina de amplificação e a validação da amplificação e detecção. De acordo com as orientações do fabricante, um Ct igual ou menor do que 25 foi estabelecido para a solução com maior título para a validação das reações da sessão de amplificação e na reação de amplificação de cada amostra o valor de Ct menor ou igual a 35 da sonda específica para o controle interno foi utilizado para validação das fases de extração, amplificação e detecção. Os títulos das soluções padrões foram determinados pela utilização de materiais de referência calibrados (PeliCheck CMV-DNA-99, VQC Proficiency Panel 2003 CMV DNA e OptiQuant CMV DNA).

Os valores de Ct da sonda CMV específica nas reações de amplificação de cada amostra e a curva padrão da sessão de amplificação foram utilizados para o cálculo da quantidade de DNA alvo presente nas reações de amplificação das amostras. A partir dos resultados da quantidade de cada amostra foram calculados os números equivalentes de cópias/mL do DNA CMV presentes nas amostras utilizadas na extração:

$$NC = \frac{Ve \times \text{quantidade}}{V_c \times V_a \times Ee}$$

$$NC = \text{cópias/mL}$$

Ve = volume total de extração em microlitros

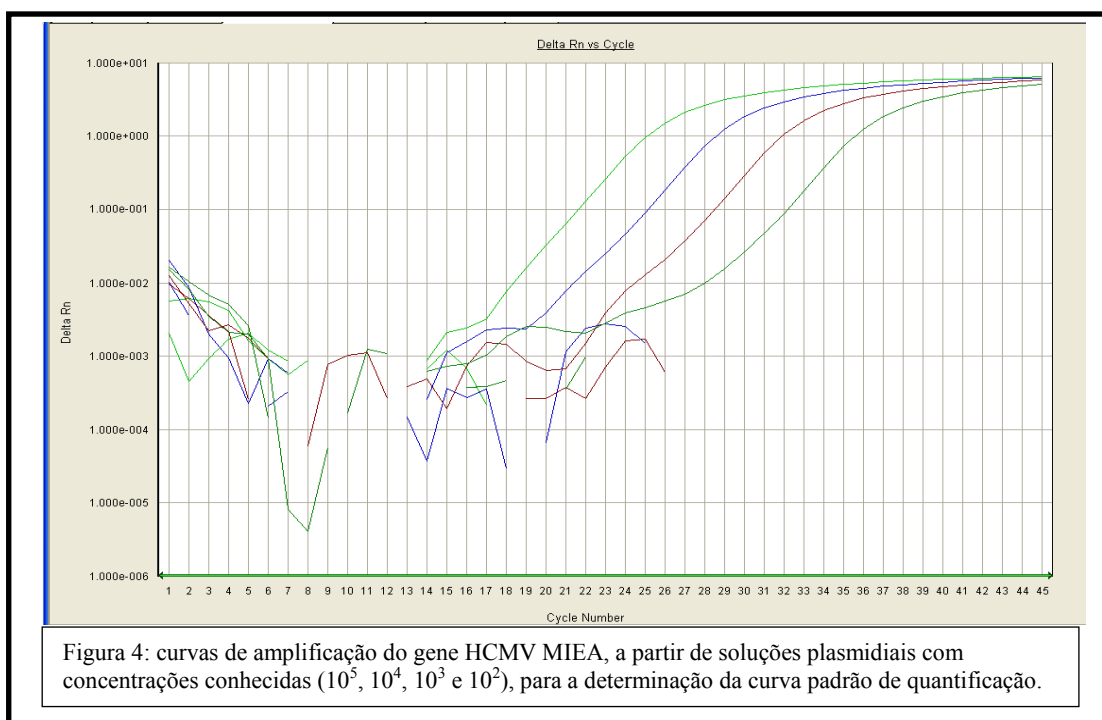
V_c = quantidade de amostra utilizada na extração no valor requerido para unidade de medida

V_a = volume do produto de extração utilizado na reação em microlitros

Ee = eficiência da extração expressa em decimal

$$NC = 200 \times \text{quantidade} \times 0,2 \times 5 \times 1$$

$$NC = 200 \times \text{quantidade}$$



4.6 MONITORAMENTO DNA HCMV

As amostras de sangue total para vigilância do DNA HCMV foram coletadas uma vez por semana durante os três primeiros meses após o transplante. Amostras adicionais foram obtidas em todos os retornos ambulatoriais mensais durante 06 meses. Mediante detecção de carga viral inferior a 5.000 cópias/mL, o monitoramento semanal foi mantido. Com a necessidade do início da terapia preemptiva (carga viral igual ou superior 5.000 cópias/mL) ou do tratamento da doença infecciosa, o esquema de monitoramento foi novamente repetido.

4.7 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS VIRAIS

A viremia foi definida pela detecção do DNA HCMV no sangue total acima do limite mínimo de quantificação do ensaio (20 cópias/mL). A duração da viremia foi definida como o número total de dias nos quais o DNA HCMV foi detectado, incluindo episódios repetidos de viremia no mesmo paciente. Um episódio repetido de viremia foi definido como a presença do DNA HCMV no sangue total, detectado após a resolução de um episódio prévio (duas amostras consecutivas negativas).

A viremia assintomática foi determinada pela detecção do DNA HCMV no sangue total e ausência de sintomatologia relacionada à replicação viral. A doença HCMV foi definida mediante detecção do DNA HCMV no sangue total como evidência de replicação viral e categorizada como síndrome viral na presença de febre, fraqueza, leucopenia e trombocitopenia ou doença tecidual invasiva quando confirmada por biópsia (KOTTON, 2013).

4.8 TRATAMENTO DA DOENÇA HCMV

Para a doença HCMV não severa foram utilizados o valganciclovir oral (900 mg a cada 12 horas) ou ganciclovir IV (5 mg/Kg a cada 12 horas) mantidos até a erradicação viral, porém não descontinuado em período inferior a 2 semanas.

4.8.1 PROFILAXIA ANTIVIRAL

A profilaxia foi realizada nos pacientes de risco (doador IgG positivo para HCMV/receptor IgG negativo para HCMV ou com “*status*” sorológico desconhecido) com valganciclovir 900 mg (intravenoso) durante 3 ou 6 meses com dose única diária, de acordo com o grau de imunossupressão do paciente.

4.8.2 TERAPIA PREEMPTIVA

Os Pacientes foram monitorados semanalmente pela metodologia de PCR em tempo real por um período de 3 meses após o transplante. Mediante carga viral limítrofe de 5.000 cópias/mL a terapia com dose de tratamento clínico com valganciclovir oral ou ganciclovir IV foi iniciada e continuada até a obtenção de dois testes consecutivos de carga viral negativo. Durante todo o tratamento o monitoramento da carga viral foi realizado semanalmente.

4.9 COLEÇÃO DOS DADOS

Os parâmetros clínicos e laboratoriais foram obtidos a partir da base de dados dos serviços de transplante renal e patologia clínica.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram expressos como valores medianos, percentuais e pelos intervalos das variações.

A análise da curva ROC (*“receiver-operating characteristic”*) foi utilizada para a determinação do ponto de corte do DNA HCMV para o desenvolvimento da doença infecciosa, sendo a curva ROC obtida pela utilização do software MedCalc, versão 9.5.2.0.

5 RESULTADOS

5.1 VIREMIA E DOENÇA INFECCIOSA

Um total de 1223 amostras, correspondentes a 66 receptores renais, foram analisadas por PCR em tempo real quantitativo. A detecção quantitativa do DNA HCMV foi positiva em 447-1223 (36,5%) amostras de sangue total, obtidas de 58-66 (87,8%) pacientes, obtendo-se uma média consecutiva de 18 amostras por paciente. A quantificação da carga viral nas 1.223 amostras demonstrou uma variabilidade da viremia de 200 a 2.837.660 cópias/mL.

Os sintomas da doença infecciosa por HCMV foram apresentados por 15 pacientes (22%). Nos pacientes sintomáticos a manifestação órgão específica foi verificada em 4 receptores (6%), sendo duas pulmonares, uma retal e somente uma determinando dano direto no tecido renal enxertado (tabela 1).

Tabela 1: HCMV DNA no sangue total de 66 receptores de transplante renal

<i>Amostras</i>					<i>não</i>	
<i>sangue total</i>	<i>positivo</i>	<i>negativo</i>	<i>pacientes</i>	<i>virêmicos</i>	<i>virêmicos</i>	<i>CMV doença</i>
1.223	447	776	66	58	8	15\66
	36,5%	63,5%		87,80%	12,20%	22%

No contexto de análise das características clínicas dos receptores estudados, os índices comparativos dos pacientes virêmicos e não virêmicos são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 Características clínicas dos receptores com/sem HCMV viremia							
				Viremia (n= 58)		Sem viremia (n= 8)	
Idade do receptor (anos)				46	6*	42	15*
Sexo (M-F)				M (40)	F (18)	M (6)	F (2)
Função tardia do enxerto (%)				35 (60)		05 (62)	
Episódios de rejeição aguda (%)				18 (31)		02 (25)	
Esquema profilático (%)				07 (12)		02 (25)	
Esquema preemptivo (%)				51 (88)		06 (75)	
Indução Timoglobulina (%)				09 (15)		05 (62)	
Indução Basiliximab (%)				32 (55)		02 (25)	
Sem indução (%)				17 (30)		01 (13)	
Sintomático (%)				15 (22)		00 (00)	
Assintomático (%)				43 (78)		08 (100)	
Óbitos (%)				07 (12)		00 (00)	
HCMV : Citomegalovírus humano							
* idade mínima							
M = masculino, F = feminino							

Levando-se em consideração a necessidade do delineamento de valores mínimo, médio e máximo de carga viral relacionada ao desenvolvimento da doença HCMV, as amostras positivas foram arbitrariamente divididas em três grupos baseados na carga viral do HCMV no sangue. Para manutenção da relevância clínica dos dados estatísticos foram consideradas apenas as amostras positivas obtidas a partir da maior carga viral dos pacientes. Desta maneira, no grupo 1 foram incluídas 57 amostras de sangue total com carga viral inferior a 5.000 cópias/mL (média de 1.338, com variação de 207- 4.536 cópias/mL) derivadas de 16 pacientes. No grupo 2, foram relacionadas 17 amostras com carga viral entre 5.000-10.000 cópias/mL (média de 7.044, com variação de 5.174- 9.368 cópias/mL) obtidas de 13 pacientes e no último grupo foram incluídas 71 amostras com carga viral superior a 10.000 cópias/mL (média de 172.998, com variação de 10.228-2.837.660 cópias/mL) de 29 pacientes. O diagnóstico da doença infecciosa foi confirmado em 15 dos 58 pacientes (tabela 1), resultando em uma prevalência de 22,7% nos 66 pacientes transplantados e acima de 25% para os pacientes com HCMV viremia. Nos pacientes diagnosticados, 11 (73%) apresentaram carga viral superior a 10.000 cópias, 3 (20%) com índices variando entre 5.000 até 10.000 cópias e 1 demonstrando carga viral inferior a 5.000 cópias (tabela 3).

Tabela 3: Correlação entre a carga viral e estado clínico nos 66 receptores de transplante renal

<i>carga viral (cópias/mL)</i>	<i>grupo 1 < 5000</i>	<i>grupo 2 5000-10000</i>	<i>grupo 3 > 10000</i>	<i>total</i>	
<i>média (variação)</i>	1338 (207-4536)	7044 (5174-9368)	172998 (10228-2837660)		
<i>amostras (n)</i>	57	17	71	145\1223	11,8%
<i>pacientes (n)</i>	16	13	29	58\66	87,80%
<i>CMV doença (n)</i>	1	3	11	15\66	22,7%

O paciente do grupo 1 com manifestação sintomática órgão específica (retal) da doença infecciosa demonstrou carga viral no momento do diagnóstico de 4.536 cópias/mL, também equivalente a sua carga máxima, apresentou episódio de rejeição celular aguda e negatização da carga viral após tratamento com ganciclovir (figura 5).

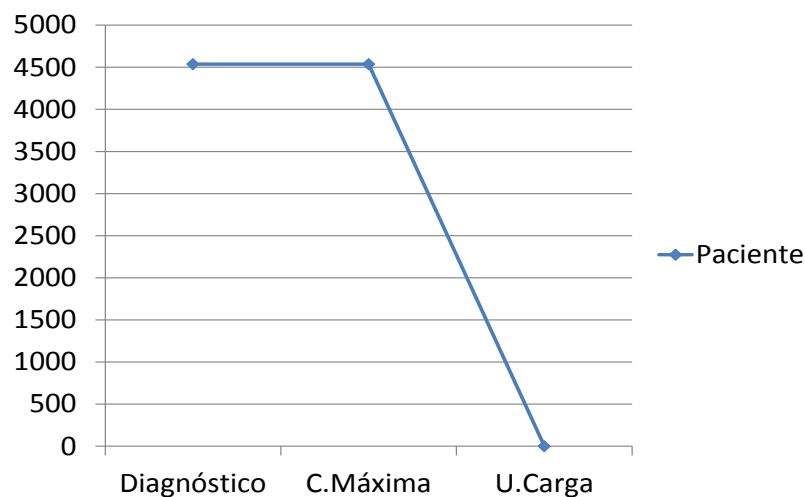


Figura 5: monitoramento do DNA HCMV no paciente com doença infecciosa do grupo 1 (diagnóstico, carga máxima e última carga).

Um paciente do grupo 2 com manifestações clínicas da doença infecciosa apresentou carga viral no momento do diagnóstico de 5.971 cópias/mL, viremia máxima de 7.390 cópias/mL, infecções bacterianas pulmonar e abdominal, evoluindo para choque séptico e óbito com a manutenção da carga máxima mesmo após terapia antiviral. Os demais pacientes sintomáticos deste grupo apresentaram negatização da carga viral após tratamento (figura 6).

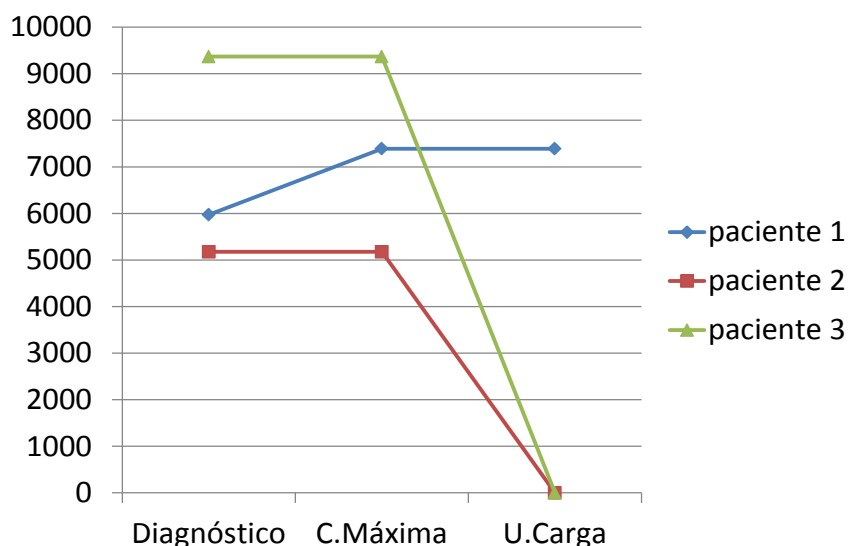


Figura 6: monitoramento do DNA HCMV nos 3 pacientes do grupo 2 com doença infecciosa (diagnóstico, carga máxima e última carga).

A maioria dos pacientes do grupo 3 demonstraram carga viral para o DNA HCMV situada entre 10.000 cópias/mL e 100.000 cópias/mL com controle efetivo da viremia após tratamento antiviral. Os pacientes de números 2, 7 e 10 apresentaram viremia superior a 1.000.000 cópias/mL, onde o número 2 apresentou cargas diagnóstica e máxima de 1.650.100 cópias/mL e controle de carga após uso de ganciclovir; o de número 7 após monitoramento semanal de três cargas consecutivas negativas demonstrou carga diagnóstica e máxima, nos 37 dias subsequentes da última carga negativa, de 2.837.660 cópias/mL, com episódio de rejeição aguda e controle de carga viral após tratamento, evoluindo para óbito por choque séptico; o paciente de número 10 também apresentou controle da carga viral após tratamento (figura 7).

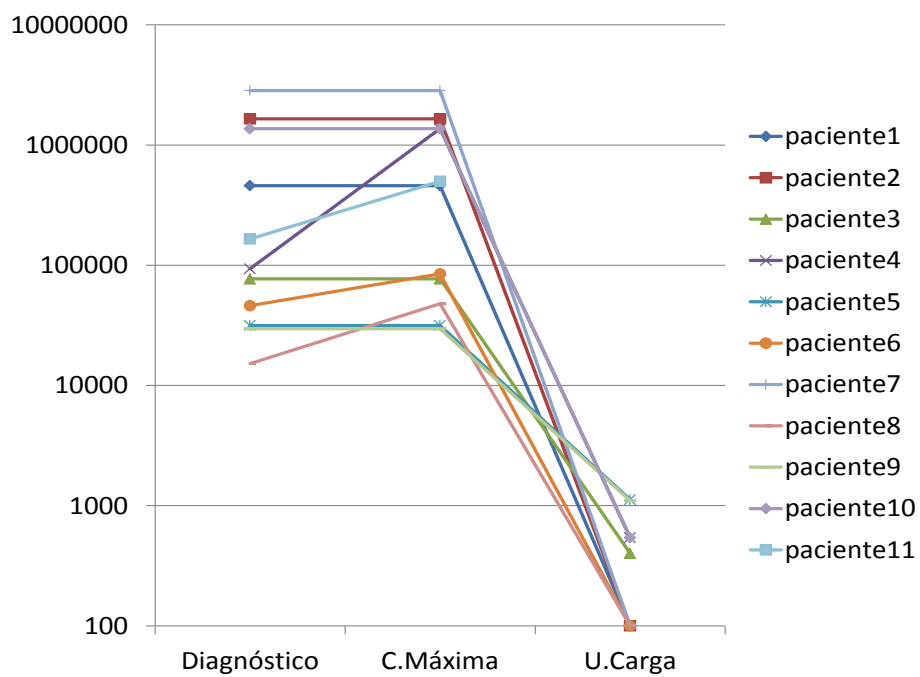


Figura 7: monitoramento do DNA HCMV nos 11 pacientes do grupo 3 diagnosticados com a doença infecciosa (diagnóstico, carga máxima e última carga) .

As características clínicas dos grupos de pacientes que desenvolveram a doença infecciosa estão definidas na tabela 4.

Tabela 4: Características clínicas dos pacientes com HCMV doença						
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo3	Total	%
Rejeição aguda		1	1	4	6	40
Órgão específica		1	0	3	4	26,66
DGF		1	1	4	6	40
Choque séptico		0	1	3	4	26,66
Óbito		0	1	3	4	26,66
ATG		0	1	3	4	26,66
BSXM		1	1	5	7	46,66
Sem indução		0	1	3	4	26,66
Preemptivo		1	3	8	12	80
Profilaxia		0	0	3	3	20
DGF: função tardia do enxerto						
ATG: timoglobulina						
BSXM: basiliximabe						

O período médio necessário para o controle da carga viral nos três grupos de pacientes diagnosticados foi de 73 dias (figura 8).

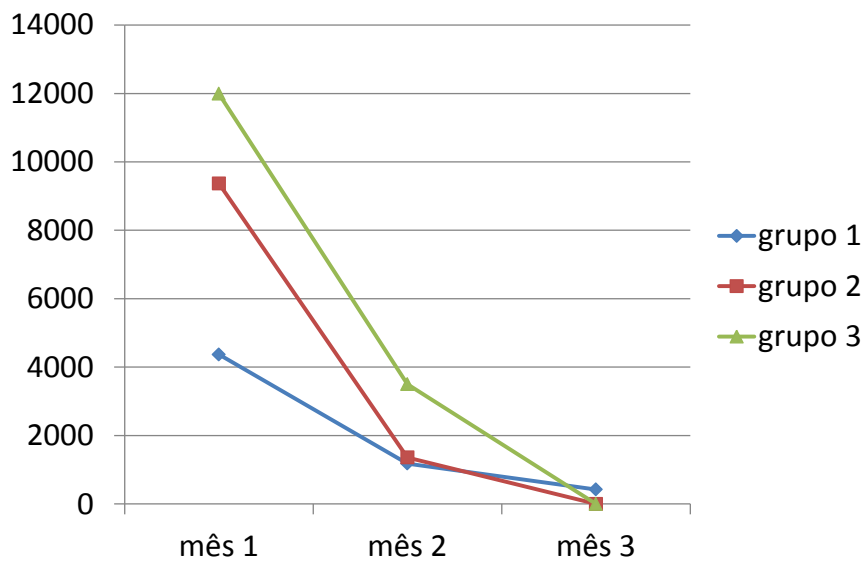


Figura 8: média do período de viremia ("clearance") nos pacientes dos grupos 1, 2 e 3.

Considerando-se as amostras com relevância clínica para o diagnóstico, a área abaixo da curva ROC foi de 0,996 (95% CI: 0,967-1,00) e utilizando um valor limite de 8.372 cópias foi demonstrada sensibilidade de 94,81% (95% CI: 87,2%-98,6%) e especificidade de 100% (95% CI: 94,7%-100%) para a triagem da doença infecciosa por citomegalovírus nos receptores renais (figuras 9 e 10).

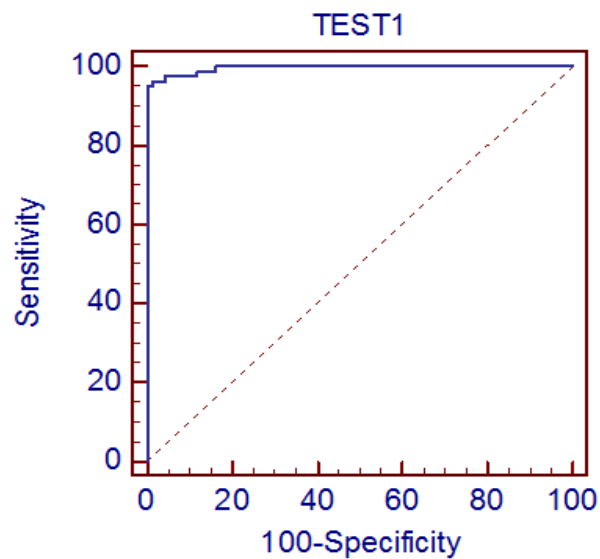


Figura 9: curva ROC para o diagnóstico da HCMV doença e níveis de HCMV no sangue. Um “cut-off” de 8.372 cópias foi utilizado.

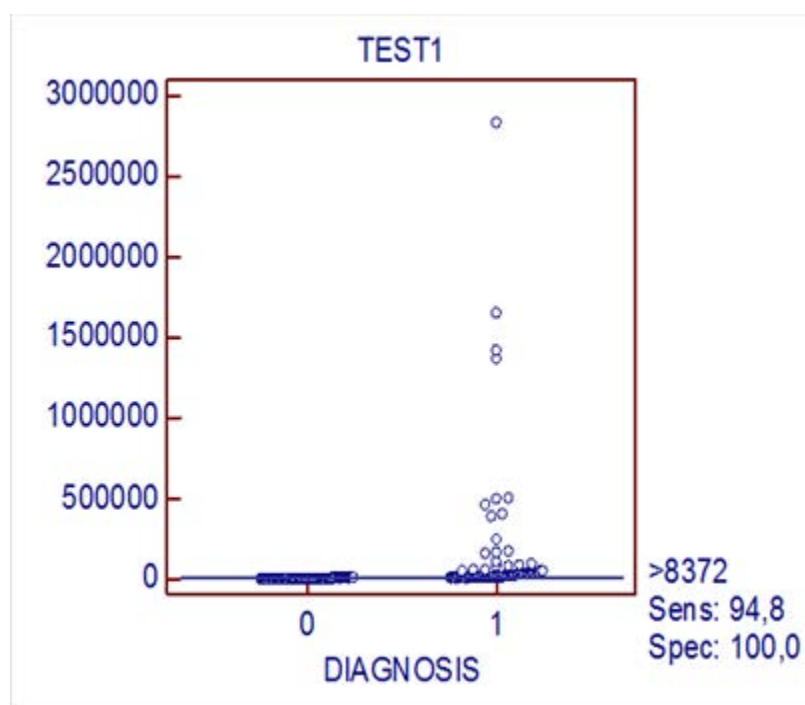


Figura 10: distribuição da carga viral HCMV DNA em associação com a doença infecciosa (1) e pacientes assintomáticos (0).

5.2 DINÂMICA DE REPLICAÇÃO DO HCMV

Os pacientes monitorados pelo esquema preemptivo apresentaram a maior média de carga viral (34.572 cópias/mL, equivalente logarítmico de 4,5 log) enquanto os pacientes em profilaxia antiviral demonstraram carga viral média de 7.970 cópias/mL (3,9 log). A figura 11 apresenta a dinâmica de replicação do HCMV no total de receptores e mediante diferentes características clínicas.

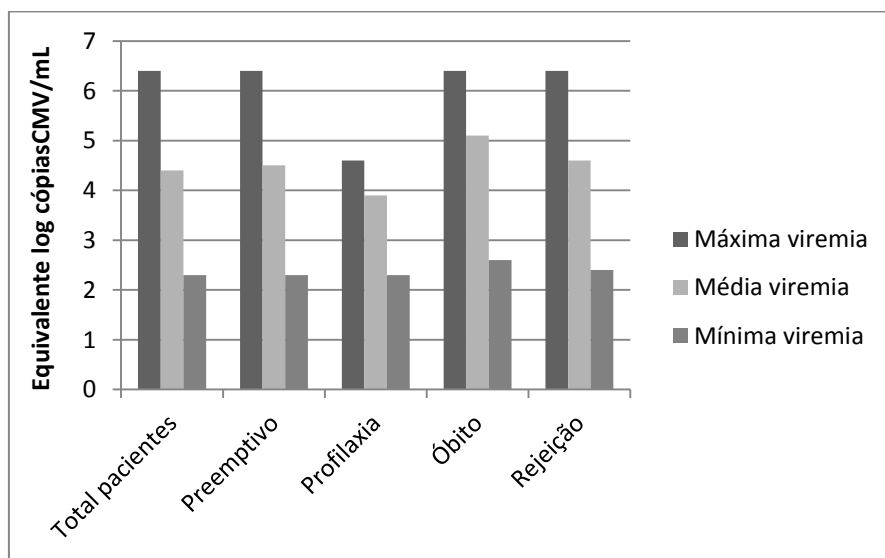


Figura 11: Dinâmica de replicação do HCMV no total de pacientes e em diferentes situações clínicas.

5.3 REJEIÇÃO CELULAR AGUDA

Do total de 58 pacientes com carga viral detectável no período pós-transplante, 18 sofreram rejeição celular aguda (RAC) e dos 08 pacientes com DNA HCMV indetectável, apenas 2 desenvolveram RAC. Deste modo, entre os 20 pacientes que apresentaram RAC, 18 demonstraram DNA HCMV, determinando uma taxa de positividade de 90% e somente 2 receptores sem carga viral foram acometidos por RAC (25%). Os 18 pacientes virêmicos com RAC apresentaram níveis de cópias variando entre 2.259 e 2.837.660. No grupo de pacientes com carga inferior 5.000 cópias foram observados 6 episódios de RAC. Para os grupos de 5.000-10.000 e acima de 10.000 as taxas observadas para RAC foram de 5 e 7 pacientes respectivamente. A relação entre o desenvolvimento da doença infecciosa e os episódios de RAC foi determinada para 6 receptores renais (6\15).

A concentração sérica média de creatinina dos receptores renais em diferentes períodos do pós-transplante foi comparada aos episódios de viremia (tabela 5).

Tabela 5: Concentração de creatinina * (mg/dL) com viremia/sem HCMV viremia						
			viremia (n=58)		sem viremia (n=08)	
Primeiro mês			2,6		1,2	
Após 12 meses			2,2		1,4	
*concentração plasmática						

5.4 CHOQUE SÉPTICO

Entre os receptores renais incluídos no estudo 7 desenvolveram quadro de choque séptico (10%), todos decorrentes de infecções bacterianas (uma de tecidos moles, uma do trato urinário, uma gastroenterite e quatro pneumonias). Dos 7 pacientes com quadro de choque séptico 6 apresentaram viremia para HCMV (85%), sendo 4 receptores sintomáticos para HCMV doença (57%). Um receptor apresentando carga viral entre 5.000-10.000 cópias/mL e 3 com viremia superior a 10.000 cópias/mL foram acometidos pelo quadro séptico. Todos os pacientes virêmicos que apresentaram o quadro de choque séptico receberam tratamento antiviral.

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos demonstraram que a quantificação da carga viral por PCR quantitativo é útil para o diagnóstico e predição da doença por HCMV (EMERY, 2000). A utilização de amostras de sangue total determina fácil manuseio, sem a necessidade de centrifugação ou separação celular. A quantificação do DNA HCMV a partir destas amostras apresenta elevada sensibilidade para o monitoramento da infecção por HCMV nos pacientes imunocomprometidos (DEBACK, 2007). Por outro lado, o impacto clínico dos baixos níveis de DNA HCMV no sangue total ainda não é determinado. Esta detecção precoce apresenta a vantagem de alertar os clínicos para a manutenção do controle da evolução da infecção por meio do monitoramento criterioso da dinâmica da carga viral (HALWACHS, 2001). Valores de pontos de corte baseados em testes para o DNA HCMV diferem entre grupos populacionais e diferentes metodologias, não estando definidos valores que poderiam determinar a distinção entre as formas das infecções latente e ativa (CHOI, 2009). A determinação de um intervalo de valores da carga viral para o emprego clínico é importante não somente para a predição da doença infecciosa e consequente tratamento anterior ao quadro sintomático, mas também para evitar a utilização desnecessária do agente antiviral mediante determinação de valores abaixo do limite mínimo de quantificação que podem corresponder ao vírus no seu estado de latência no sangue total. Porém, esporadicamente alguns pacientes podem desenvolver a doença tecidual invasiva por HCMV com níveis de carga viral baixo ou até mesmo indetectáveis (ASBERG, 2007). O monitoramento contínuo do DNA HCMV nos receptores renais pode determinar a dinâmica característica de replicação do vírus e sua provável tendência para o desenvolvimento da doença infecciosa (EMERY, 2000).

Os prováveis picos de carga viral no sangue correlacionam-se com a doença HCMV, porém na maioria das vezes ocorrem muito tardiamente para fornecerem uma informação prognóstica para o desenvolvimento da doença infecciosa. Desta maneira, marcadores precoces para a predição dos pacientes em risco por doença HCMV são necessários, onde a determinação de uma carga viral HCMV precoce e a caracterização da dinâmica de replicação do vírus podem apresentar informações prognósticas importantes para manejo clínico dos pacientes (EMERY, 2010). A terapia preemptiva apresenta eficácia na triagem de receptores renais utilizando-se um ponto de corte inicial para intervenção clínica superior a 2.000 cópias/mL no sangue total (STORCH, 1993; KHOURY, 2006; REISCHIG, 2008). Pacientes que apresentam carga viral acima de 5.000 cópias/mL apresentam elevado risco de desenvolverem a doença por HCMV (HADAYA, 2003). De acordo com as características de desempenho analítico da metodologia empregada, este estudo demonstrou um valor absoluto de carga viral de 8.372 cópias/mL no sangue total como sendo altamente preditivo para o desenvolvimento da doença infecciosa por HCMV. Portanto, o estabelecimento de um ponto de corte situado no intervalo de valores da carga viral mínimo e máximo de 2.000 cópias/mL e inferior a 8.372 cópias/mL respectivamente, poderia ser empregado para estratégia preemptiva do grupo de pacientes estudados. De fato, a orientação para a terapia preemptiva empregada nos receptores deste estudo foi realizada com um valor de carga viral de 5.000 cópias/mL, portanto adequado para sua utilização como guia de orientação para o início do tratamento preemptivo.

A morbidade da infecção por HCMV e a consequente manifestação sintomática pode variar entre 44% a 83% após o transplante renal (Ho, 1991). A maioria dos pacientes apresentou episódios virêmicos (87%), porém tanto o tratamento profilático quanto o preemptivo empregados no manejo do HCMV nos receptores demonstraram-se efetivos

na prevenção da síndrome HCMV e surgimento da doença órgão terminal, uma vez que apenas 22% dos pacientes foram sintomáticos e somente um demonstrou comprometimento direto do tecido renal enxertado devido à replicação viral.

A ocorrência da doença infecciosa foi mais evidente nos pacientes monitorados pelo esquema preemptivo (31%), enquanto que nos receptores em tratamento profilático os episódios sintomáticos foram de 11%. Entretanto, 38% do grupo dos pacientes em monitoramento preemptivo que poderiam ser submetidos ao uso estendido de Ganciclovir, se tratados profilaticamente, evitaram a doença infecciosa sem a necessidade de receber qualquer terapia antiviral. Este dados estão de acordo com estudo de Atabani et al (2102) em que 30% dos receptores de órgãos sólidos monitorados preemptivamente evitaram a doença HCMV sem o uso de droga antiviral.

A intervenção antiviral precoce definida pelos esquemas profilático e preemptivo pode prevenir a progressão da carga viral para níveis elevados e consequente doença infecciosa, porém os pacientes envolvidos nos casos de rejeição celular aguda e óbitos continuaram a ter episódios de rápida replicação e picos de carga viral. Dentre os receptores monitorados preemptivamente que apresentaram episódio de rejeição celular aguda e óbito foram verificados a maior média e pico máximo de carga viral (figura 11). A concentração sérica média de creatinina (primeiro mês e um ano após transplante) apresentou níveis superiores nestes pacientes virêmicos (tabela 5). O início da replicação viral a partir do estado de latência não é causado somente pela imunossupressão, mas também parece estar relacionado à ativação do sistema imune. O vírus pode ser reativado pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) que é liberado durante a inflamação (DOCKE, 1994). Deste modo, a reativação viral parece acompanhar os processos de rejeições agudas que podem determinar um prejuízo da função renal e aumento dos níveis da creatinina plasmática.

A viremia assintomática e a reativação da latência são consideradas os principais fatores contribuintes para os efeitos indiretos do HCMV (EMERY, 2007). O aumento na incidência das infecções concorrentes oportunistas, devido às propriedades imunomodulatórias, é caracterizado como um destes efeitos (BOECKH, 2003). A imunomodulação pode ser mediada por proteínas virais (CMV interleucina-10, por exemplo) que determinam a imunossupressão local, prejudicando a ação antibacteriana e antifúngica do sistema imune (HELLANTERA et al, 2010). As proteínas CMV IL-10, apesar de sua baixa homologia às IL-10 produzidas pelas células endógenas, podem inibir a proliferação das células mononucleares do sangue periférico, determinar a supressão da produção das citocinas e diminuir a atividade de processamento e apresentação de antígenos dos monócitos. Deste modo, a CMV IL-10 pode contribuir para imunossupressão CMV induzida e ser um importante fator da patogênese viral (SPENCER, 2002). Os pacientes que desenvolveram choque séptico e consequente óbito apresentaram a maior média de carga viral e pico de 2.837.660 cópias/mL e portanto, uma possível relação entre os efeitos indiretos da viremia HCMV e um prognóstico negativo deve ser levada em consideração.

7 CONCLUSÃO

O valor preditivo da carga viral de 8.372 cópias/mL no sangue total foi estabelecido para o desenvolvimento da doença infecciosa por HCMV no grupo de receptores renais estudado.

As abordagens profiláticas e preemptivas foram efetivas na prevenção da doença infecciosa por HCMV, entretanto a viremia assintomática e os níveis elevados de carga viral em condições clínicas específicas, como nos episódios de rejeições agudas, demonstram o aumento de replicação do HCMV nestes receptores, expondo-os aos riscos indiretos da viremia.

Os dados obtidos fornecem parâmetros quantitativos para o desenvolvimento de esquemas alternativos para o manejo do HCMV nos receptores renais, visando à diminuição da transmissão, replicação e consequentemente dos riscos indiretos associados à viremia.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-ABBATE, N.; FINNSTROM, N.; ZANIRATTI, S.; SOLMONE, M.C.; SELVAGGINI, S.; BENNICI, E.; NERI, S.; BREGA, C.; PATERNO, M.; CAPOBIANCHI, M.R. 2008. **Evaluation of an automated extraction system in combination with AYgene® CMV Trender for CMV DNA quantitative determination: comparison with nested PCR and pp65 antigen test.** J Virol. Methods 151:61–65.

- 2-ADLER, B. L.; SCRIVANO, Z.; RUZCICS, B.; RUPP, C.; SINZGER, and KOSZINOWSKI, U. 2006. **Role of human cytomegalovirus UL131A in cell type-specific virus entry and release.** J. Gen. Virol. 87:2451–2460.

- 3-ALFORD, C.A.; BRITT, W.J. - **Cytomegalovirus.** In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. Virology, 2^a ed., New York, Raven Press Ltda, 1990, p. 1981-2010.

- 4-ANG, C.W.; JACOBS, B.C.; BRANDENBURG, A.H.; et al. **Crossreactive antibodies against GM2 and CMV-infected fibroblasts in Guillain-Barre syndrome.** Neurology. 2000; 54: 1453–58.

- 5-ARCANGELETTI, M.C.; RODIGHIERO, I.; MIRANDOLA, P.; DE CONTO, F.; COVAN, S.; GERMINI, D.; RAZIN, S.; DETTORI, G.; CHEZZI, C. **Cell-cycle-dependent localization of human cytomegalovirus UL83 phosphoprotein in the nucleolus and modulation of viral gene expression in human embryo fibroblasts in vitro.** J. of Cell. Biochem., 112; 2011; p307-317.

- 6-ARNON TI; MARKEL, G; MANDELBOIM, O. **Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors.** Semin. Cancer Biol. 16; 2006; p348-358.

- 7-ARSKI, E. S.; T. SHENK.; R. F. PASS. **Cytomegaloviruses.** In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), Fields virology, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA; 2007. p2701-2772.

- 8-ARTHURS S.K; EIDAJ, PEDERSEN R.A.; et al. **Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation.** Clin Infect Dis 2008; 46 (6): 840^846.

- 9-ASADULLAH, K.; PRÖSCH, S.; AUDRING, H.; BÜTTNEROVA, I.; VOLK, H.D.; STERRY, W.; et al. **A high prevalence of cytomegalovirus antigenaemia in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: an association with systemic tumour necrosis factor alpha overexpression.** Br J Dermatol 1999; 141:94-102.

- 10-ASBERG, A. ; HUMAR, A. ; ROLLAG, H.; et al. **Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients.** Am J Transplant 2007; 7: 2106.

- 11-ASBERG, A. ; HUMAR, A. ; JARDINE, A.G.; et al. **Long-term outcomes of CMV disease treatment with valganciclovir versus IV ganciclovir in solid organ transplant recipients.** Am J Transplant 2009; 9: 1205.
- 12-ASHLEY, E.; Fouts, LAËTITIA, C.A.; KATHARINA, F.; Stengel, D.E.; ALLYN, J.; Schoeffler, S.W.; DAN, L.; BECKET, F.2014. **Mechanism for neutralizing activity by the anti-CMV gH/gL monoclonal antibody MSL-109**
[.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1404653111](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1404653111)
- 13-ATABANI, S. F.; SMITH, C.; ATKINSON, C.; ALDRIDGE, R. W.; RODRIGUEZ-PER'ALVAREZ, M.; ROLANDO, N.; HARBER, M. ; JONES, G.; O'RIORDAN, A. ; BURROUGHS, A. K.; THORBURN, D.; O'BEIRNED, J.; MILNEA, S. B.; EMERY, V. C. A .;. GRIFfITHS, P. D. **Cytomegalovirus Replication Kinetics in Solid Organ Transplant Recipients Managed by Preemptive Therapy.** American Journal of Transplantation, 2012.
- 14-AUCOIN, D. P.; SMITH, G. B.; MEIERING, C. D.; MOCARSKI, E. S. **Betaherpesvirus conserved cytomegalovirus tegument protein ppUL32 (pp150) controls cytoplasmic events during virion maturation.** J. Virol. 80; 2006; p8199-8210.
- 15-AVDIC S, C.A.O.; CHEUNG, A.K.; ABENDROTH, A. ; SLOBEDMAN, B. **Viral interleukin-10 expressed by human cytomegalovirus during the latent phase of infection modulates latently infected myeloid cell differentiation.** J Virol 2011; 85:7465-71.
- 16-BALFOUR, H.H. **Management of Cytomegalovirus disease with antiviral drugs.** Rev Infect Dis. 12:S849-S860.
- 17-BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; et al. **Immunobiology of dendritic cells.** Annu Rev Immunol 2000; 18:767–811.
- 18-BECK, S.; BARRELL, B.G. **Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens.**Nature 1988.
- 19-BINDER, T.; SIEGERT, W.; KRUSE, A.; OETTLE, H.; WILBORN, F.; PENG, R.; TIMM, H.; NEUHAUS, P.; SCHMIDT, C.A. – **Identification of Human and DNA Sequencing of the Envelope Glycoprotein B Gene Region-Distribution Frequency in Liver Transplant Recipients.** Journal of Virological Methods, 78(1-2): 153-162, 1999.
- 20-BOECKH M, N. **Immunosuppressive effects of betaherpesviruses.** Herpes 2003; 10 (1): 12^16.
- 21-BONGARTS, A.; VON LAER, D.; VOGELBERG, C.; EBERT, K.; VAN LUNZEN, J.; GARWEG, J.; VAITH, P.; HUFERT, F.; HALLER, O.; MEYER-KÖNIG, U. – **Glycoprotein B Genotype of Human Cytomegalovirus: Distribution in HIV-Infected Patients.** Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 28: 447-449, 1996.

- 22-BORCHERS, A.T.; PEREZ, R.; KAYSEN, G.; et al. **Role of cytomegalovirus infection in allograft rejection: a review of possible mechanisms.** *Transpl Immunol* 1999; 7: 75–82.
- BRESNAHAN, W.A.; SHENK, T. - A Subset of Viral Transcripts Packaged Within Human Cytomegalovirus Particles. *Science*, 288: 2373-2376, 2000.
- 23-BRITT, W. J.; MACH, M. **Human Cytomegalovirus Glycoproteins.** *Intervirology*, 39: 401-412, 1996.
- 24-BROWN, H.L.; ABERNATHY, M.P. **Cytomegalovirus Infection.** *Seminars in Perinatology*, 22(4): 260-266, 1998.
- 25-BRUGGEMAN, C.A.; MARJORIE, H.J.; NELISSEN-VRANCKEN, G. **Cytomegalovirus and Atherogenesis.** *Antiviral Research*, 43: 135-144, 1999.
- 26-BRUGGEMAN, C.A. **Cytomegalovirus and Latency: an overview.** *Virchows Archiv B: Cell Pathology*, 325-333, 1993.
- 27-CAIRNS, T. M.; FRIEDMAN, L. S.; LOU, H.; WHITBECK, J. C.; SHANER, M. S.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J. 2007. **N-terminal mutants of herpes simplex virus type 2 gH are transported without gL but require gL for function.** *J. Virol.* 81:5102–5111.
- 28-CAMPISTOL, J.M.; INIGO, P.; LARIOS, S.; BESCOS, M.; OPPENHEIMER, F. 2001. **Role of transforming growth factor-beta1 in the progression of chronic allograft nephropathy.** *Nephrology Dialysis Transplantation* 1: 114–116.
- 29-CANTRELL, S. R.; BRESNAHAN, W. A. **Human cytomegalovirus (HCMV) UL82 gene product (pp71) relieves hDaxx-mediated repression of HCMV replication.** *J Virol* 80; 2006; p6188-6191.
- 30-CARNEY, W.P.; HIRSCH, M.S. **Mechanisms of immunosuppression in cytomegalovirus mononucleosis. II. Virus-monocyte interactions.** *J Infect Dis* 1981; 144: 47-54.
- 31-CHEMALY, R.F.; YEN-LIEBERMAN, B.; CASTILLA, E.A.; et al. **Correlation between viral loads of cytomegalovirus in blood and bronchoalveolar lavage specimens from lung transplant recipients determined by histology and immunohistochemistry.** *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2168.
- 32-CHEN, D. H.; JIANG, H.; LEE, M.; LIU, F.; ZHOU, Z. H. **Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus.** *Virology* 260; 1999; p10-16.
- 33-CHOI SM, L.D.G.; LIM, J.; PARK, S.H.; CHOI JH, Y.J.H.; et al. **Comparison of quantitative real-time PCR in hematopoietic stem cell transplant recipients.** *J Korean Med Sci* 2009;24:571-8.
- 34-CHOWDARY, T.K.;et al. (2010) **Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL.** *Nat Struct Mol Biol* 17(7):882–888.

35-CHOU, S. **Differentiation of Cytomegalovirus Strains by Restriction Analysis of DNA Sequences Amplified from Clinical Specimens.** Journal of Infectious Diseases, 162: 738-742, 1990.

36-CHOU, S. **Cytomegalovirus Infection.** Current Opinion in Infectious Diseases, 5: 427-432, 1992.

37-CHOU, S.; DENNISON, K.M. **Analysis of Interstrain Variation in Cytomegalovirus Glycoprotein B Sequences Encoding Neutralization-Related Epitopes.** Journal of Infectious Diseases, 163: 1229-1234, 1991.

38-CHOU, S.; MERIGAN, T.C. **Rapid Detection and Quantitation of Human Cytomegalovirus in Urine through DNA Hybridization.** New England Journal of Medicine, 308: 921-925, 1983.

39-CHOU, S.; MAROUSEK, G.; PARENTI, D.M.; GORDON, S.M.; LAVOY, A. G.; ROSS, J.G.; MINER, R.C.; DREW, L. **Mutation in Tegment III of the DNA Polymerase Gene Conferring Foscarnet Resistance in Cytomegalovirus Isolates from 3 Subjects Receiving Prolonged Antiviral Therapy.** Journal of Infectious Diseases, 178: 526-530, 1998.

40-CHOU, S. **Antiviral Drug Resistance in Human Cytomegalovirus.** Transplant Infectious Disease, 1(2): 105-114, 1999.

41-CHOU, S.; MAROUSEK, G.I.; VAN WECHSEL, L.C.; et al. **Growth and drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase gene III mutations observed in clinical specimens.** Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 4160.

42-CHOU, S. **Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir.** Rev Med Virol 2008; 18: 233.

43-COAQUETTE, A.; BOURGEOIS, A.; DIRAND, C.; VARIN, A.; CHEN, W; HERBEIN, G. **Mixed Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotypes in Immunocompromised Patients.** Clinical Infectious Diseases, 39: 155-161, 2004.

44-COMPTON, T.; NEPOMUCENO, R. R.; NOWLIN, D. M. 1992. **Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface.** Virology 191:387–395.

45-CROUGH, T. K .R. **Immunobiology of human cytomegalovirus: From bench to bedside.** Clin Microbiol Rev 2009; 22: 76.

46-DICKENMANN, M.J.; CATHOM, A.S.G.; STEIGER, J.; et al: **Cytomegalovirus infection and graft rejection in renal transplantation.** Transplantation 71:764–767, 2001

- 47-DOLAN, A.C.; CUNNINGHAM, R. D.; HECTOR, A. F. H.W.; LEE, L.; ADDISON, C. D. J.; DARGAN, D. J.; MCGEOCH, D.G.; EMERY, V.C.; GRIFFITHS, P. D.; C. SINZGER, B. P.; MCSHARRY, G. W. G.; DAVISON, A. J. 2004. **Genetic content of wild-type human cytomegalovirus**. J. Gen. Virol. 85:1301–1312.
- 48-EMERY, V.C.; GRIFFITHS, P.D. **Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy**. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 8039.
- 49-EMERY, V. C.; GRIFFITHS, P. D. 2000. **Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation**. Lancet 355:2032–2036.
- 50-DEBACK, C.; FILLET, A.M.; DHEDIN, N.; BARROU, B.; VARNOUS, S.; NAJIOULLAH, F.; BRCAIRE, F.; AGUT, H. 2007. **Monitoring of human cytomegalovirus infection in immunosuppressed patients using real-time PCR on whole blood**. J Clin Virol 40:173–179.
- 51-DOCKE, W.D.; PROSCH, S.; FIETZE, E.; KIMEL, V.; ZUCKERMANN, H.; KLUG, C.; SYRBE, U.; KRUGER, D.H.; VON BAEHR, R.; VOLK, H.D. **Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor**. Lancet 1994, 343: 268-269.
- 52-DREW, W.L. **Diagnosis of Cytomegalovirus Infection**. Reviews of Infectious Diseases, 10 (suppl3): 468-476, 1988(a).
- 53-DREW, W.L. **Herpesviridae: Cytomegalovirus**. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases (Principles and Practice), vol II, 247-260, 1988(b).
- 54-ERDBRUEGGER, U.; SCHEFFNER, I.; MENGEL, M.; SCHWARZ, A. ; VERHAGEN, W.; HALLER, H.; GWINNER, W. **Impact of CMV infection on acute rejection and long-term renal allograft function: a systematic analysis in patients with protocol biopsies and indicated biopsies**. [Nephrol Dial Transplant](#). 2012 Jan;27(1):435-43.
- 55-EHRNST, A. - **The Clinical Relevance of Different Laboratory Tests in CMV Diagnosis**. - Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplement 100: 64-71, 1996.
- 56-EISENBERG, R.J.; et al. 2012. **Herpes virus fusion and entry: A story with many characters**. Viruses 4(5):800–832.
- 57-EMERY, V. C.; SABIN, C. A. ; COPE, A.V.; GOR, D.; HASSAN-WALKER, A. F.; GRIFFITHS, P. D. 2000. **Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation**. Lancet 355:2032–2036.
- 58-EMERY, V.C.; GRIFFITHS, P.D. **Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy**. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 8039.

- 59-EMERY, V.C. **Facing the facts: the indirect effects of cytomegalovirus.** Transplantation 2007; 84: S7[^]S10.
- 60-EPSTEIN, S. E.; ZHOU, Y.F.; ZHU, J. 1999. **Potential role of cytomegalovirus in the pathogenesis of restenosis and atherosclerosis.** Am. Heart J. 138:S476–S478.
- 61-FERNANDEZ, N.C.; LOZIER, A .; FLAMENT, C.; et al. **Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo.** Nat Med 1999; 5: 405–411.
- 62-FIETZE, E.; PROSCH, S.; REINKE, P.;et al. **Cytomegalovirus infection in transplant recipients: the role of tumor necrosis factor.** Transplantation 1994;58: 675-80.
- 63-FISHMAN, J.A.; EMERY, V.C.; FREEMAN, R.; PASCUAL, M.; ROSTAING, L.; SCHLITT, H.J.; et al. **Cytomegalovirus in transplantation - challenging the status quo.** Clin Transplant 2007; 21:149-58
- 64-FISHMAN, J.A. **Infection in renal transplant recipients.** Semin Nephrol 2007; 27:445–61.
- 65-FREEMAN, R.B. Jr. **The ‘indirect’ effects of cytomegalovirus infection.** Am J Transplant 2009; 9:2453–8.
- 66-FRIES, B.C.; CHOU, S.; BOECKH, M.; TOROK-STORB, B. **Frequency Distribution of Cytomegalovirus Envelope Glycoprotein Genotypes in Bone Marrow Transplant Recipients.** Journal of Infectious Diseases, 169: 769-774, 1994.
- 67-FURNESS, P.N.; KIRKPATRICK, U.; TAUB, N.; DAVIES, D.R.; SOLEZ, K. **A UK-wide trial of the 68-Banff classification of renal transplant pathology in routine diagnostic practice.** Nephrol Dialy Transplant 1997; 12: 995-1000.
- 69-GAULT, E.; MICHEL, Y.; DEHEE, A .; BELABANI, C.; NICOLAS, J.C.; GARBARG-CHENON, A. **Quantification of human cytomegalovirus DNA by real-time PCR.** J Clin Microbiol 2001; 39: 772-775.
- 70-GERNA, G.; ZIPETO, D.; PERCIVALLE, E.; PAREA, M.; REVELLO, M.G.; MACCARIO, R.; et al. **Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients.** J Infect Dis 1992; 166:1236-44.
- 71-GERNA, G.; PERCIVALLE, E.; LILLERI, D.; LOZZA, L.; FORNARA, C.; HAHN, G.; et al. **Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8⁺ T cells.** J Gen Virol 2005; 86:275-84.
- 72-GILBERT, C.; BOIVIN, G. Minireview: **Human Cytomegalovirus Resistance to Antiviral Drugs.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(3): 873-883, 2005.

- 73-GNANN JW, Jr.; AHLMÉN, J.; SVALANDER, C.; OLDING, L.; OLDSTONE, M.B.; NELSON, J.A. **Inflammatory cells in transplanted kidneys are infected by human cytomegalovirus.** *Am J Pathol* 1988; 132:239-48.
- 74-GOLDMACHER, V.S.; et al. (1999) **A cytomegalovirus encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12536–12541.
- 75-GORDON, S.; TAYLOR, P.R. **Monocyte and macrophage heterogeneity.** *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 953–964.
- 76-GREDMARK, S.; TILBURGS, T.; SODERBERG-NAUCLER, C. **Human cytomegalovirus inhibits cytokine-induced macrophage differentiation.** *J Virol* 2004; 78: 10378–10389.
- 77-GREDMARK, S.; BRITT W.B.; XIE, X.; LINDBOM, L.; SÖDERBERG-NAUCLÉR, C. **Human cytomegalovirus induces inhibition of macrophage differentiation by binding to human aminopeptidase N/CD13.** *J Immunol* 2004; 173: 4897-907.
- 78-GRIGOLEIT, U.; RIEGLER, S.; EINSELE, H.; et al. **Human cytomegalovirus induces a direct inhibitory effect on antigen presentation by monocyte-derived immature dendritic cells.** *Br J Haematol* 2002; 119: 189–198.
- 79-HADAYA, K.; DE RHAM, C.; BANDELIER, C.; et al. **Natural killer cell receptor repertoire and their ligands, and the risk of CMV infection after kidney transplantation.** *Am J Transplant* 2008; 8: 2674.
- 80-HAHN, G.; REVELLO, M.G.; PATRONE, M.; PERCIVALLE, E.; CAMPANINI, G.; SARASINI, A. ; et al. **Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes.** *J Virol* 2004; 78:10023-33.
- 81-HALWACHS-BAUMANN, G.; WILDERS-TRUSCHNIG, M.; ENZINGER, G.; et al. 2001. **Cytomegalovirus diagnosis in renal and bone marrow transplant recipients: the impact of molecular assays.** *J Clin Virol* 20:49.
- 82-HARTMANN, A. ; SAGEDAL, S.; HJELMESAETH, J. **The natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients.** *Transplantation* 2006; 82:S15–7.
- 83-HASSAN-WALKER, A.F.; KIDD, I.M.; SABIN, C.; SWENTY, P.; GRIFFITHS, P.D.; EMERY, V.C. **Quantity of human cytomegalovirus (CMV) DNAemia as a risk factor for CMV disease in renal allograft recipients: relationship with donor-recipient CMV serostatus, recipient augmented methylprednisolone and anti-thymocyte globulin (ATG).** *F Med Virol*, 1999; 58: 182-87.

84-HEGDE, N.R.; TOMAZIN, R.A.; WISNER, T.W.; DUNN, C.; BONAME, J.M.; LEWINSOHN, D.M.; et al. **Inhibition of HLA-DR assembly, transport, and loading by human cytomegalovirus for evading major histocompatibility complex class II glycoprotein US3: a novel mechanism antigen presentation.** J Virol 2002; 76:10929-41.

85-HELANTERA, I.; KOSKINEN, P.; TORNROTH, T.; LOGINOV, R.; GRONHAGEN-RISKA, C.; LAUTENSCHLAGER, I. **The impact of cytomegalovirus infections and acute rejection episodes on the development of vascular changes in 6-month protocol biopsy specimens of cadaveric kidney allograft recipients.** Transplantation 2003; 75: 1858.

86-HELANTERA, I.; LOGINOV, R.; KOSKINEN, P.; TORNROTH, T.; GRONHAGEN-RISKA, C.; et al. 2005. **Persistent cytomegalovirus infection is associated with increased expression of TGF- β 1, PDGF-AA and ICAM-1 and arterial intimal thickening in kidney allografts.** Nephrology Dialysis Transplantation 20: 790–796.

87-HOLMA, K.; TORNROTH, T.; GRONHAGEN-RISKA, C.; LAUTENSCHLAGER, I. **Expression of the cytomegalovirus genome in kidney allografts during active and latent infection.** Transpl Int 2000; 13: S363.

88-HOMMAN-LOUDIYI, M.K.; HULTENB, Y.; BRITT, W.; SODERBERG-NAUCLER, C. 2003. **Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-Golgi network 46, and mannosidase II.** J. Virol. 77:3191–3203.

89-HUMAR, A. ; MICHAELS, M. **American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation.** Am J Transplant 2006; 6: 262.

90-HUMMEL, M.; ZHANG, Z.; YAN, S.; DEPLAEN, I.; GOLIA, P.; et al. 2001 **Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes in vivo: a model for reactivation from latency.** Journal of Virology 75: 4814–4822

91-HUTT-FLETCHER, L. M. 2007. **Epstein-Barr virus entry.** J. Virol. 81:7825–7832.

92-IBANEZ, C.E.; SCHRIER, R.; GHAZAL, P.; WILEY, C.; NELSON, J.A. **Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages.** J Virol 1991; 65:6581-8.

93-INKINEN, K.; SOOTS, A. ; KROGERUS, L.; BRUGGEMAN, C.; AHONEN, J.; LAUTENSCHLAGER, I. **Cytomegalovirus increases collagen synthesis in chronic rejection in the rat.** Nephrol Dial Transplant 2002; 17: 772–779.

- 94-JACOBSON, M.A.; MILLS, J.; **Cytomegalovirus infection.** Clin Chest Med, 9: 443-448, 1988.
- 95-JARVIS, M.A.; NELSON, J.A.; **Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages.** Curr Opin Microbiol 5: 403-7, 2002.
- 96-JENKINS, C.; ABENDROTH, A.; SLOBEDMAN, B. **A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection.** J Virol 2004; 78: 1440–1447.
- 97-KALEJTA, R.F.; SHENK, T. 2002. **Manipulation of the cell cycle by human cytomegalovirus.** Front. Biosci. 7, d295–306.
- 98-KALEJTA, R. F. **Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression.** Curr. Top. Microbiol. Immunol. 325; 2008; p101-116.
- 99-KALEJTA, R.F. **Tegument proteins of human cytomegalovirus.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72; 2008; p249-265.
- 100-KHAIBOULLINA, S.F.; MACIEJEWSKI, J.P.; CRAPNELL, K.; SPALLONE, P.A.; DEAN STOCK, A.; PARI, G.S.; et al. **Human cytomegalovirus persists in myeloid progenitors and is passed to the myeloid progeny in a latent form.** Br J Haematol 2004; 126:410-7.
- 101-KHAN, G.; KANGRO, G.K.; COATES, P.J.; Heath, R.B. **Inhibitory Effects of Urine on the Polymerase Chain Reaction for Cytomegalovirus DNA.** Journal of Clinical Pathology, 44: 360-365, 1991.
- 102-KHOURY, J.A.; STORCH, G.A.; BOHL, D.L.; et al. **Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients.** Am J Transplant 2006; 6: 2134.
- 103-KIJPITTAYARIT, S.; EIDA, J.; BROWN, R.A.; et al. **Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation.** Clin Infect Dis 2007; 44: 1315.
- 104-KIM, C.K.; SONG, J.H.; KIM, S.M.; et al: **Clinical usefulness of human cytomegalovirus antigenemia assay after kidney transplantation.** Transplantation 75:2151, 2003.
- 105-KIM, S.; LEE, S.; SHIN, J.; KIM, Y.; EVNOUCHIDOU, I.; KIM, D.; et al. **Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8(+) T cell responses by targeting the aminopeptidase ERAP1.** Nat Immunol 2011.
- 106-KLIEM, V.; FRICKE, L.; WOLLBRINK, T.; et al. **Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: Results of a randomized clinical trial.** Am J Transplant 2008; 8: 975.

- 107-KOTTON, C.N.; KUMAR, D.; CALIENDO, A.M.; et al. **International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation.** Transplantation 2013;89:779–95.
- 108-KRECH, U. **Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world.** Bull World Health Organ 49:103, 1973.
- 109-KROSKY, P. M.; BAEK, M. C.; JAHNG, W. J.; BARRERA, I.; HARVEY, R. J.; BIRON, K. K.; COEN, D. M.; SENTHA, P. B.. **The human cytomegalovirus UL44 protein is a substrate for the UL97 protein kinase.** J. Virol. 77; 2003; p7720-7727.
- 110-KUNITANI, H.; SHIMIZU, Y.; MURATA, H.; HIGUCHI, K.; WATANABE, A. **Phenotypic analysis of circulating and intrahepatic dendritic cell subsets in patients with chronic liver diseases.** J Hepatol 2002; 36:734-41.
- 111-KRYSTUFKOVA, E.; SEKERKOVA, A. ; STRIZ, I.; et al. **Regulatory T cells in kidney transplant recipients: the effect of induction immunosuppression therapy.** Nephrol Dial Transplant 2012; 27: 2576–2582.
- 112-LAUTENSCHLAGER, I.; SOOTS, A. ; KROGERUS, L.; KAUPPINEN, H.; SAARINEN, O. ; et al. 1997. **CMV increases inflammation and accelerates chronic rejection in rat kidney allografts.** Transplantation Proceedings 29: 802–803.
- 113-LEHNER, R.; STAMMINGER, T.; MACH, M. **Comparative Sequence Analysis of Human Cytomegalovirus Strains.** Journal of Clinical Microbiology, 29: 2494-2502, 1991.
- 114-LEUNG, K.; VENETZ, J.P.; MEYLAN, P.; LAMOTH, F.; RUIZ, J.; PASCUAL, M. **Cytomegalovirus infection and new-onset post-transplant diabetes mellitus.** ClinTransplant 2008; 22(2):245^249.
- 115-LI, L.; NELSON, J.A. ; BRITT, W. J.1997. **Glycoprotein H-related complexes of human cytomegalovirus: identification of a third protein in the gCIII complex.** J. Virol. 71:3090–3097.
- 116-LIMAYE, A.P.; COREY, L.; KOELLE, D.M.; et al. **Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants.** Lancet 2000; 356: 645.
- 117-LIPSON, S.M.; MATCH, M.E.; TORO, A.I.; KAPLAN, M.H.; SHEPP, D.H. **Application of a Standardized Cytomegalovirus Antigenemia Assay in the Management of Patients with AIDS.** Diagnostic Microbiologic in Infectious Diseases, 32: 75-79, 1998.
- 118-LIU, Y. 2004. **Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention.** Journal of the American Society of Nephrology 15: 1–12.
- 119-LOENEN, W.A. ; BRUGGEMAN, C.A.; WIERTZ, E.J. **Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology.** Semin Immunol

2001; 13:41-9. Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. Immunol Ver 2010.

120-LUXTON, G. W. G.; HAVERLOCK, S.; COLLER, K. E.; ANTINONE, S. E.; PINCETIC, A.; SMITH, G. A. **Targeting of herpesvirus capsid transport in axons is coupled to association with specific sets of tegument proteins.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102; 2005; p5832-5837.

121-MADI, N.; AL-NAKIB, W.; MUSTAFA, A.S.; SAEED, T.; PACSA, A.; NAMPOORY, M.R.N. 2007. **Detection and monitoring of Cytomegalovirus infection in renal transplants patients by quantitative real-time PCR.** Med. Princ. Pract. 16, 268-273.

122-MANUEL, O.; PASCUAL, M.; TRENDELENBURG, M.; et al. **Association between mannose-binding lectin deficiency and cytomegalovirus infection after kidney transplantation.** Transplantation 2007; 83: 359.

123-MARFORI, J.E.; EXNER, M.M.; MAROUSEK, G.I.; et al. **Development of new cytomegalovirus UL97 and DNA polymerase mutations conferring drug resistance after valganciclovir therapy in allogeneic stem cell recipients.** J Clin Virol 2007; 38: 120.

124- MARCHETTI, S.; SANTANGELO, R.; MANZARA, S.; D'ONGHIA, S.; FADDA, G.; CATTANI, P. **Comparison of real time PCR and pp65 antigen assays for monitoring the development of Cytomegalovirus disease in recipients of solid organ and bone marrow transplants.** New Microbiologica, 34, 157-164, 2011.

125-MATSUURA, H.; KIRSCHNER, A.N.; LONGNECKER, R.; JARDETZKY, T.S. 2010. **Crystal structure of the Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein H/glycoprotein L (gH/gL) complex.** Proc Natl Acad Sci USA 107(52):22641–22646.

126-MCLAUGHLIN-TAYLOR, E.; PANDE, H.; FORMAN, S. J.; TANAMACHI, B.; LI, C. R.; ZAIA, J. A.; GREENBERG, P. D.; RIDDELL, S. R. **Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8 virus-specific cytotoxic T lymphocytes.** J. Med. Virol. 43; 1994; p103-110.

127-MENGELLE, C.; PASQUIER, C.; ROSTAING, L.; et al. **Quantitation of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplant by real-time PCR and pp65 antigenemia.** J Med Virol 2003;69:225–31.

128-MEYER-KÖNIG, U.; VOGELBERG, C.; BONGARTS, A.; KAMPA, D.; DELBRÜCK, R.; WOLFF-VORBECK, G.; KIRSTE, G.; HABERLAND, M.; HUFERT, F.T.; VON LAER, D. – **Glycoprotein B Genotype Correlates with Cell Tropism *In Vivo* of Human Cytomegalovirus Infection.** *Journal of Medical Virology*, 55: 75-81, 1998.

129-MEYER-KÖNIG, U.; HABERLAND, M.; VON LAER, D.; HALLER, O.; HUFERT, F.T. – **Intragenic Variability of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B in Clinical Strains.** *Journal of Infectious Diseases*, 177: 1162-1169, 1998(2).

130-MILLER-KITTRELL, M.; SPARER, T.E. **Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation.** Virol J 2009, 6: 4.

131-MOCARSKI, E.S.Jr.; ABENES, G.B.; MANNING, W.C.; SAMBUCETTI, L.C.; CHERRINGTON, J.M.- **Molecular Genetic Analysis of Cytomegalovirus Gene Regulation in Growth, Persistence and Latency.** Current Topics in Microbiology and Immunology, 154: 47-73, 1990.

132-MOCARSKI, E.S.; COURCELLE, C.T. 2001. **Cytomegaloviruses and their replication.** In Fields Virology (Knipe, D.M. And Howley, P.M., eds), pp. 2629–2673, Lippincott Williams & Wilkins.

133-MOCARSKI, E.S.Jr. **Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion.** Trends Microbiol 2002; 10 (7): 332, 339.

134-MONTO, H.O. ; JOHN, N.D.; JOHN, A.A.; SAKDIDEJ, S.S.; BRIAN, W.; LEONA, A.Y.; ARNOLD, S. **Factors contributing to the risk of Cytomegalovirus infection in pacientes receiving renal transplants.** The Yale Journal of Biology and Medicine 49, 17-26 .1976.

135-MOUTAFTSI, M.; BRENNAN, P.; SPECTOR, S.A.; TABI, Z. **Impaired lymphoid chemokine-mediated migration due to a block on the chemokine receptor switch in human cytomegalovirus-infected dendritic cells.** J Virol. 2004;78(6):3046–54.

136-MOVASSAGH, M.; GOZLAN, J.; SENECHAL, B.; BAILLOU, C.; PETIT, J.C.; LEMOINE, F.M. **Direct infection of CD34+ progenitor cells by human cytomegalovirus: evidence for inhibition of hematopoiesis and viral replication.** Blood 1996; 88:1277-83.

137-MURPHY, E.; YU, D.; GRIMWOOD, J.; SCHMUTZ, J.; DICKSON, M.; JARVIS, M.A.; HAHN, G.; NELSON, J.A.; MYERS, R.M.; SHENK, T.E. 2003. **Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus.** ProcNatlAcadSci USA 100:14976-81.

138-MURRAY, B.M. **Management of Cytomegalovirus Infection in Solid-Organ Transplant Recipients.** Immunological Investigations, 26: 243-255, 1997.

139-NANICHE, D.; OLDSTONE, M.B. **Generalized immunosuppression: how viruses undermine the immune response.** Cell Mol Life Sci 2000; 57:1399-407.

140-NAVARRO, D.; LENNETTE, E.; TUGIZOV, S.; PEREIRA, L. **Humoral Immune Response to Functional Regions of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B.** Journal of Medical Virology, 52: 451-459, 1997.

141-NETT, P.C; HEISE, Y.D.M.; FERNANDEZ, L.A. ; et al. **Association of cytomegalovirus disease and acute rejection with graft loss in kidney transplantation.** Transplantation 2004; 78: 1036–1041.

142-NICHOLS, W.G.; COREY, L.; GOOLEY, T.; et al. **Rising pp65 antigenemia during preemptive anticytomegalovirus therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Risk factors, correlation with DNA load, and outcomes.** Blood 2001; 97: 867.

143-NORIEGA, V.; REDMANN, V.; GARDNER, T.; TORTORELLA, D. **Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus.** Immunol Res 2012.

144-ODEBERG, J.; PLACHTER, B.; BRANDEN, L.; SODERBERG-NAUCLER, C. **Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR alpha-chain.** Blood 101; 2003; p4870-4877.

145-OZDEMIR, B.H.; OZDEMIR, F.N.; DEMIRHAN, B.; HABERAL, M. 2005. **TGF-beta1 expression in renal allograft rejection and cyclosporine A toxicity.** Transplantation 80: 1681–1685.

146-PARASURAMAN, R.; NIZAAR, A.; KARTHIKEYAN, V.; et al. **Significant increase in identification associated renal allograft failure over the past decade past.** In American Transplant Congress. Toronto, Ontario, Canada, 2008.

147-PASCUAL, M.; THERUVATH, T.; KAWAI, T.; et al. **Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation.** N England J Med. 2002; 346:580.

148-PAYA, C.; HUMAR, A.; DOMINGUEZ, E.; et al. **Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients.** Am J Transplant 2004; 4: 611.

149-PIGNATELLI, S.; DAL MONTE, P.; ROSSINI, G.; LANDINI, M.P. 2004. **Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (CMV) wild-type strains.** Rev Med Virol 14:383–410.

150-RASMUSSEN, L. **Immune Response to Human Cytomegalovirus Infections.** Current Topics in Microbiology and Immunology, 154: 221-254, 1990.

151-RASMUSSEN, L.; MORRIS, S.; ZIPETO, D.; FESSEL, J.; WOLITZ, R.; DOWLING, A.; MERIGAN, T.C. **Quantitation of Human Cytomegalovirus DNA from Peripheral Blood Cells of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients Could Predict Cytomegalovirus Retinitis.** Journal of Infectious Diseases, 171: 177-182, 1995.

152-RASMUSSEN, L.; HONG, C.; ZIPETO, D.; MORRIS, S.; SHERMAN, D.; CHOU, S.; MINER, R.; DREW, W.L.; WOLITZ, R.; DOWLING, A.; WARFORD, A.; MERIGAN, T.C. **Cytomegalovirus gB Genotype Distribution Differs in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients and Immunocompromised Allograft Recipients.** Journal of Infectious Diseases, 175: 179-184, 1997.

- 153-RASTALDI, M.P.; FERRARIO, F.; GIARDINO, L.; DELL'ANTONIO, G.; GRILLO, C.; et al. 2002. **Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies.** *Kidney International* 62: 137–146.
- 154-RAZONABLE, R.R.; RIVERO, A.; RODRIGUEZ, A.; et al. **Allograft rejection pre dicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir.** *J Infect Dis* 2001; 184: 1461– 1464.
- 155-REINHARD, B.; RAGGA, M.; MICHAEL, B.; HELMUT J. F.; SALZE, R.; SANDRA, H.; CORDULA, H.; KATHARIN, A.; RUZICK, A.; HARALD, H.; KESSLE, R.; 2010. **Rapid quantitation of cytomegalovirus DNA in whole blood by a new molecular assay based on automated sample preparation and real-time PCR.** *Med Microbiol Immunol* (2010) 199:311–316.
- 156-REISCHIG, T.; JINDRA, P.; HES, O.; et al. **Valacyclovir prophylaxis versus pre emptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation.** *Am J Transplant* 2008; 8: 69.
- 157-REISCHIG, T.; NEMCOVA, J.; VANECEK, T.; et al. **Intragraft cytomegalovirus infection: A randomized trial of valacyclovir prophylaxis versus pre- emptive therapy in renal transplant recipients.** *Antivir Ther* 2010; 15: 23–30.
- 158-RETIÈRE, C.; IMBERT, B.M.; DAVID, G.; COURCOUX, P.; HALLET, M.M. **A Polymorphism in the Major Immediate-Early Gene Delineates Groups Among Cytomegalovirus Clinical Isolates.** *Virus Research*, 57: 43-51, 1998.
- 159-ROIZMAN, B.; CARMICHAEL, L.E.; DEINHARDT, F.; DE-THE, G.; NAHMIAS, A.J.; PLOWRIGHT, W.; RAPP, F.; SHELDRIK, P.; TAKAHASHI, M.; WOLF, K. ***Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy.*** The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 16:201-17, 1981.
- 160-RUBIN, R.H. **Infection in the organ transplant recipient.** In: Rubin RH, Young LS, eds. *Clinical approach to infection in the compromised host.* 3rd ed. New York: Plenum Publishing, 1994:629-705.
- 161-RUBIN, R.H. **The pathogenesis and clinical management of cytomegalovirus infection in the organ transplant recipient: The end of the 'silo hypothesis'.** *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20:399–407.
- 162-RÜGER, R.; BORNKAMM, G.W.; FLECKENSTEIN, B. **Human Cytomegalovirus DNA Sequences with Homologies to the Cellular Genome.** *Journal of General Virology*, 65: 1351-1364, 1984.
- 163-RUSS, S.G.; NAUCLÉR, C.S. **Dendritic cell biology in human cytomegalovirus infection and the clinical consequences for host immunity and pathology.** *Landes Bioscience* 2012. *Virulence* 3:7, 1–14.

- 164-SAGEDAL, S.; HARTMANN, A.; NORDAL, K.P.; et al. **Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival.** *Kidney Int* 2004; 66: 329.
- 165-SAFFERT, R.T.; KALEJTA, R.F. **Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp 71 protein stimulates viral immediate early gene expression.** *J Virol.* 80; 2006; p3863-3871.
- 166-SALOMONI, P.; KHELIFI, A.F. **Daxx: death or survival protein?** *Trends Cell Biol.* 16; 2006; p97-104.
- 167-SANCHEZ, V.; MAHR, J.A.; ORAZIO, N.I.; SPECTOR, D.H. **Nuclear export of the human cytomegalovirus tegument protein pp65 requires cyclin-dependent kinase activity and the Crm1 exporter.** *J. Virol.* 81; 2007; p11730-11736.
- 168-SAN JUAN, R.; AGUADO, J.M.; LUMBRERAS, C.; et al. **Impact of current transplantation management on the development of cytomegalovirus disease after renal transplantation.** *Clin Infect Dis* 2008; 47: 875-878.
- 169-SCHUURMAN, R.; DEMETER, L.; REICHELDERFER, P.; et al. **Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase.** *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2291.
- 170-SENECHAL, B.; BORUCHOV, A.M.; REAGAN, J.L.; HART, D.N.; YOUNG, J.W. **Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83.** *Blood* 2004; 103: 4207-15.
- 171-SHEN, C.; CHANG, B.; CHANG, S.; YANG, S.; TSENG, S.; CHEN, C.; WU, C. **Molecular Epidemiology of Cytomegalovirus Infection in Kindergarten Children.** *Journal of Medical Virology*, 48: 33-37, 1996.
- 172-SHENK, T.; MARK, F.S. **Human Cytomegalovirus.** 1st ed. Vol. 325. Berlin: Springer, 2008. Current Topics in Microbiology and Immunology.
- 173-SHEPP, D.H.; MATCH, M.E.; ASHRAF, A.B.; LIPSON, S.M.; MILLAN, C.; PERGOLIZZI, R.G. **Cytomegalovirus Glycoprotein B Groups Associated with Retinitis in AIDS.** *Journal of Infectious Diseases*, 174: 184-187, 1996.
- 174-SHEPP, D.H.; MATCH, M.E.; LIPSON, S.M.; PERGOLIZZI, R.G. **A Fifth Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotype.** *Research in Virology*, 149: 109-114, 1998.
- 175-SILVA, M. C.; YU, Q. C.; ENQUIST, L.; SHENK, T. **Human cytomegalovirus UL99-encoded pp28 is required for the cytoplasmic envelopment of tegument-associated capsids.** *J. Virol.* 77; 2003; p10594-10605.

- 176-SINCLAIR, J.; SISSONS, P. **Latency and reactivation of human cytomegalovirus.** J Gen Virol. 87; 2006; p1763-1779.
- 177-SINDRE, H.; TJØONNFJORD, G.E.; ROLLAG, H.; RANNEBERG-NILSEN, T.; VEIBY, O.P.; BECK, S.; et al. **Human cytomegalovirus suppression of and latency in early hematopoietic progenitor cells.** Blood 1996; 88:4526-33.
- 178-SINZGER, C.; HAHN, G.; DIGEL, M.; KATONA, R.; SAMPAIO, K.L.; MESSERLE, M.; et al. **Cloning and sequencing of a highly productive, endotheliotropic virus strain derived from human cytomegalovirus TB40/E.** J Gen Virol 2008; 89:359-68.
- 179-SINZGER, C.; DIGEL, M.; JAHN, G. **Cytomegalovirus cell tropism.** Curr Top Microbiol Immunol 2008; 325:63-83.
- 180-SKALETSKAYA, A. et al. 2001. **A cytomegalovirus encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 7829–7834.
- 181-SODERBERG-NAUCLÉR, C. **Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer?** J Intern Med 2006; 259:219–46.
- 182-SÖDERBERG-NAUCLÉR, C.; STREBLOW, D.N.; FISH, K.N.; ALLAN-YORKE, J.; SMITH, P.P.; NELSON, J.A. **Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14(+) monocytes is differentiation dependent.** J Virol 2001; 75:7543-54.
- 183-SOHN, Y.M.; OH, M.K.; BALCAREK, K.B.; CLOUD, G.A.; PASS, R.F. **Cytomegalovirus infection in sexually active adolescents.** J Infect Dis 1991; 163: 460–63.
- 184-SOLA, E.; GONZALEZ-MOLINA, M.; CABELLO, M.; BURGOS, D.; RAMOS, J.; GUTIERREZ, C.; et al. **Long-term improvement of deceased donor renal allograft survival since 1996: a single transplant center study.** Transplantation 2010;89:714-20.
- 185-SAGEDAL, S.; HARTMANN, A.; NORDAL, K. P.; OSNES, K.E.; LEIVESTAD, T.; FOSS, A.; DEGRÉ, M.; FAUCHALD, P.; ROLLAG, H. 2004. **Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival** Kidney International, Vol. 66 (2004), pp. 329–337.
- 186-STORCH, G.A.; ETTINGER, N.A.; OCKNER, D.; et al. **Quantitative cultures of the cell fraction and supernatant of bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of cytomegalovirus pneumonitis in lung transplant recipients.** J Infect Dis 1993; 168: 1502.
- 187-SYLWESTER, A.W.; MITCHELL, B.L.; EDGAR, J.B.; et al. **Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T cells dominate the memory compartments of exposed subjects.** J Exp Med 2005; 202: 673.

188-TAYLOR-WIEDEMAN, J.; SISSONS, J.G.; BORYSIEWICZ, L.K.; SINCLAIR, J.H. **Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells.** J Gen Virol 1991; 72:2059-6.

189-TOMTISHEN, J. P. III, **Tegument Protein Subcellular Localization of Human Cytomegalovirus.** Honor's thesis. Bucknell University; 2011.

190-TRGOVCICH, J.; CEBULLA, C.; ZIMMERMAN, P.; SEDMAK, D.D. **Human cytomegalovirus protein pp 71 disrupts major histocompatibility complex class I cell surface expression.** J Virol. 80; 2006; p951-63.

191-TOROK-STORB, B.; BOECKH, M.; HOY, C.; LEISENRING, W.; MYERSON, D.; GOOLEY, T. **Association of Specific Cytomegalovirus Genotypes with Death from Myelosuppression after Marrow Transplantation.** Blood, 90(5): 2097-2102, 1997.

192-VAN DAM, J.G.; LI, F.; YIN, M.; YOU, X.M.; GRAULS, G.; et al. 2000. **Effects of cytomegalovirus infection and prolonged cold ischemia on chronic rejection of rat renal allografts.** Transplant International 13: 54–63.

193-VAN DE BERG, P.J.; HEUTINCK, K.M.; RAABE, R.; MINNEE, R.C.; YOUNG, S.L.; VAN DONSELAAR-VAN DER PANT, K.A. ; BEMELMAN, F.J.; VAN LIER, R.A. ; TEN BERGE, I.J. **Human cytomegalovirus induces systemic immune activation characterized by a type 1 cytokine signature.** J Infect Dis 2010, 202: 690-699.

194-VARANI S, FRASCAROLI G, GIBELLINI D, et al. **Impaired dendritic cell immunophenotype and function in heart transplant patients undergoing active cytomegalovirus infection.** Transplantation 2005; 79:219–227.

195-VARANI, S.; CEDERARV, M.; FELD, S.; et al. **Human cytomegalovirus differentially controls B cell and T cell responses through effects on plasmacytoid dendritic cells.** J Immunol 2007; 179: 7767–7776.

196-VARANI, S.; MASTROIANNI, A. ; FRASCAROLI, G.; TAMMIK, C.; RAHBAR, A. ; CHRISTENSSON, M.; ROSSINI, G.; LANDINI, M.P.; SODERBERG-NAUCLER, C. **Generalized Wegener's granulomatosis in an immunocompetent adult after cytomegalovirus mononucleosis and bacterial urinary tract infection.** Arthritis Rheum 2009, 60: 1558-1562.

197-VARNUM, S. M.; STREBLOW, D. N.; MONROE, M. E.; SMITH, P.; AUBERRY, K. J.; PASA-TOLIC, L.; WANG, D.; CAMP, D. G.; RODLAND, K.; WILEY, S.; BRITT, W.; SHENK, T.; SMITH, R. D.; NELSON, J. **Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome.** J. Virol. 78; 2004; p10960-10966.

198-VOGELBERG, C.; MEYER-KÖNIG, U.; HUFERT, F.T.; KIRSTE, G.; VON LAER, D. **Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotypes in Renal Transplant Recipients**. Journal of Medical Virology, 50: 31-34, 1996.

199-VON MULLER, L.; KLEMM, A.; DURMUS, N.; WEISS, M.; SUGER-WIEDECK, H.; SCHNEIDER, M.; HAMPL, W.; MERTENS, T. **Cellular immunity and active human cytomegalovirus infection in patients with septic shock**. J Infect Dis 2007, 196: 1288-1295.

200-WANG, D.; SHENK, T. 2005. **Human cytomegalovirus virion protein complex required for epithelial and endothelial cell tropism**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:18153–18158.

201-WEIMERT, N.A.; ALLOWAY, R.R. **Renal transplantation in high-risk patients**. Drugs 2007; 67 (11): 1603–1627.

202-WILDEMAN, B.; HASS, J.; LYNEN, N.; STINGELE, K.; STORCH-HAGENLOCHER, B. **Diagnosis of Cytomegalovirus Encephalitis in Patients with AIDS by Quantitation of Cytomegalovirus Genomes in Cells of Cerebrospinal Fluid**. Neurology, 50: 693-697, 1998.

203-WILKINSON, G.W.; TOMASEC, P.; STANTON, R.J.; ARMSTRONG, M.; PROD'HOMME, V.; AICHELER, R.; et al. **Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus**. J Clin Virol 2008.

204-WINGART, B.Z.; BRYTTING, M.; LINDE, A.; WAHREN, B.; GRILLNER, L. **Sequence Variation within Three Important Cytomegalovirus Gene Regions in Isolates from Four Different Patient Populations**. Journal of Clinical Microbiology, 36(12): 3662-3669, 1998.

205-WOOD, K.J.; BUSHELL, A.; HESTER, J. **Regulatory immune cells in transplantation**. Nat Rev Immunol 2012; 12: 417–430

206-WU, L.; BORZA, C.M.; HUTT-FLETCHER, L.M. 2005. **Mutations of Epstein-Barr virus gH that are differentially able to support fusion with B cells or epithelial cells**. J Virol 79(17): 10923–10930.

207-XU, W.; SUNDQVIST, V.A.; BRYTTING, M.; LINDE, A. **Diagnosis of Cytomegalovirus Infections Using Polymerase Chain Reaction, Virus Isolation and Serology**. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 25: 311-316, 1993.

208-YOSHIDA, A.; HITOMI, S.; FUKUI, T.; ENDO, H.; MORISAWA, Y.; KAZUYAMA, Y.; OSUMI, K.; OKA, S.; KIMURA, S. **Diagnosis and Monitoring of Human Cytomegalovirus Diseases in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection by Use of a Real-Time PCR Assay**. Clinical Infectious Diseases, 33: 1756-1761, 2001.

- 209-YUN, Z.; LEWENSOHN-FUCHS, I.; LJUNGMAN, P.; RINGHOLM, L.; JONSSON, J.; ALBERT, J. **A Real-time Taq Man PCR for Routine Quantitation of Cytomegalovirus DNA in Crude Leukocyte Lysates from Stem Cell Transplant Patients.** Journal of Virological Methods, 110: 73-79, 2003.
- 210-ZANGHELLINI, F.; BOPPANA, S.B.; EMERY, V.C.; GRIFFITHS, P.D.; PASS, R.F. **Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features.** J Infect Dis 1999; 180:702-7.
- 211-ZEISBERG, M.; HANAI, J.; SUGIMOTO, H.; MAMMOTO, T.; CHARYTAN, D.; et al. 2003. **BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury.** Nature Medicine 9: 964–968.
- 212-ZHENG, S.S.; ZHOU, L.; QIAN, J.; CAI, T.; FAN, J.; MA, W.H. **Cytomegalovirus glycoprotein B sequence variation in Chinese liver transplant recipients.** Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2002 Feb;1(1):26-9.
- 213-ZHOU, L.; HARDER, T.C.; ULLMANN, U.; RAUTENBERG, P. **Rapid Detection by Reverse Hybridization of Mutants in the UL97 Gene of Human Cytomegalovirus Conferring Resistance to Ganciclovir.** Journal of Clinical Virology, 13(1-2): 53-59, 1999.

APÊNDICE 1: PACIENTES/CARGA VIRAL

	data/carga viral (cópias/mL)	
Paciente 1	13/07/2010	1155
	20/07/10	704
	03/08/10	5971
	18/08/10	7390
Paciente 2	13/07/10	NEGATIVO
	27/07/2010	NEGATIVO
	03/08/2010	NEGATIVO
	23/09/2010	NEGATIVO
	28/10/2010	NEGATIVO
	17/11/2010	NEGATIVO
	01/12/2010	NEGATIVO
	03/02/2011	NEGATIVO
Paciente 3	15/07/2010	NEGATIVO
	22/07/2010	NEGATIVO
	05/08/2010	NEGATIVO
	26/08/2010	NEGATIVO
	15/10/2010	730
	22/10/2010	2.387
	11/11/2010	384
	19/01/2011	NEGATIVO
Paciente 4	25/03/2011	NEGATIVO
	23/05/2011	NEGATIVO
	22/07/2010	NEGATIVO
	29/07/2010	NEGATIVO
	17/09/2010	4329
	08/10/2010	NEGATIVO
	22/10/2010	NEGATIVO
	18/11/2010	NEGATIVO
Paciente 5	10/12/2010	NEGATIVO
	25/08/2010	NEGATIVO
	31/08/2010	NEGATIVO
	17/09/2010	NEGATIVO
	24/09/2010	NEGATIVO
	01/10/2010	NEGATIVO
	08/10/2010	NEGATIVO
	05/11/2010	NEGATIVO
Paciente 6	25/11/2010	2259
	23/12/2010	NEGATIVO
	03/02/2011	NEGATIVO
	25/08/2010	NEGATIVO
	10/09/2010	778
	15/10/2010	459594
	22/10/2010	45.628
	29/10/2010	3.999
	05/11/2010	NEGATIVO
	11/11/2010	1368
	18/11/2010	NEGATIVO
	25/11/2010	NEGATIVO
	10/12/2010	3479
	16/12/2010	14242
	29/12/2010	NEGATIVO

Paciente 6

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

NEGATIVO04/01/2011
 NEGATIVO11/01/2011
 NEGATIVO24/01/2011
 668 LBA 27/01/2011
 NEGATIVO03/02/2011
 NEGATIVO10/02/2011
 NEGATIVO14/02/2011
 NEGATIVO22/02/2011
 NEGATIVO01/03/2011
 NEGATIVO09/03/2011
 241 19/04/2011

Paciente 7

NEGATIVO11/05/2011
 NEGATIVO06/07/2011
 NEGATIVO25/08/2010
 NEGATIVO31/08/2010
 NEGATIVO17/09/2010
 NEGATIVO24/09/2010
 NEGATIVO08/10/2010
 NEGATIVO15/10/2010
 NEGATIVO22/10/2010
 NEGATIVO29/10/2010
 NEGATIVO05/11/2010
 NEGATIVO11/11/2010
 NEGATIVO18/11/2010
 NEGATIVO02/12/2010
 NEGATIVO07/01/2011
 395 26/01/2011
 NEGATIVO17/02/2011
 5174 23/02/2011
 NEGATIVO27/02/2011
 NEGATIVO02/03/2011
 NEGATIVO08/03/2011
 NEGATIVO14/03/2011
 NEGATIVO21/03/2011
 NEGATIVO28/03/2011
 NEGATIVO05/04/2011
 2114 13/04/2011
 NEGATIVO13/07/2011
 NEGATIVO22/07/2011
 NEGATIVO05/09/2011
 5712 24/09/2010
 1650100 08/10/2010
 388344 15/10/2010
 504.658 22/10/2010
 32.174 29/10/2010
 1070 11/11/2010
 1563 18/11/2010
 NEGATIVO25/11/2010
 324 02/12/2010
 10311 10/12/2010
 171500 23/12/2010
 2215 31/12/2011

Paciente 8

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

Paciente 8

2044 03/01/2011
 1996 13/01/2011
 NEGATIVO17/01/2011
 1.118 10/09/2010
 2026 02/02/2011
 1949 09/02/2011
 4011 14/02/2011
 3933 01/03/2011
 NEGATIVO08/03/2011
 NEGATIVO17/03/2011
 5456 29/03/2011
 NEGATIVO08/04/2011
 NEGATIVO11/04/2011
 NEGATIVO19/04/2011
 NEGATIVO12/06/2011
 1795 27/06/2011
 316 13/07/2011
 NEGATIVO29/07/2011
 3.181 09/08/2011
 2.803 22/08/2011
 1949 09/02/2011

Paciente 9

NEGATIVO05/09/2011
 NEGATIVO12/09/2011
 NEGATIVO19/09/2011
 NEGATIVO16/02/2012
 NEGATIVO28/03/2012
 NEGATIVO17/09/2010
 NEGATIVO24/09/2010
 477 08/10/2010
 6.359 22/10/2010
 506 05/11/2010
 4797 11/11/2010
 2120 18/11/2010
 NEGATIVO25/11/2010
 NEGATIVO10/12/2010
 NEGATIVO23/12/2010
 581 30/12/2010
 2023 05/01/2011
 20214 11/01/2011
 1204 17/01/2011
 NEGATIVO24/01/2011
 NEGATIVO01/02/2011
 NEGATIVO08/02/2011
 NEGATIVO14/02/2011
 NEGATIVO21/02/2011
 NEGATIVO21/03/2011
 1591 25/04/2011
 5760 02/05/2011
 2409 07/05/2011
 NEGATIVO09/05/2011
 202 15/05/2011
 NEGATIVO24/05/2011

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

Paciente 9

2606 30/05/2011

Paciente 10

NEGATIVO07/06/2011
 NEGATIVO14/06/2011
 2139 21/06/2011
 834 05/07/2011
 NEGATIVO11/07/2011
 NEGATIVO19/07/2011
 1.387 25/07/2011
 NEGATIVO02/08/2011
 NEGATIVO09/08/2011
 NEGATIVO15/08/2011
 NEGATIVO22/08/2011
 NEGATIVO25/08/2011
 NEGATIVO06/09/2011
 NEGATIVO03/10/2011
 NEGATIVO08/11/2011
 NEGATIVO10/09/2010
 NEGATIVO24/09/2010
 712 08/10/2010
 9368 29/10/2010
 7107 05/11/2010
 2252 08/11/2010
 8758 11/11/2010
 1843 18/11/2010
 1358 25/11/2010
 NEGATIVO02/12/2010
 NEGATIVO10/12/2010
 NEGATIVO23/12/2010
 NEGATIVO30/12/2010
 NEGATIVO13/01/2011
 732 24/01/2011
 NEGATIVO09/02/2011
 723 21/02/2011
 468 28/02/2011
 275 14/03/2011
 NEGATIVO23/03/2011
 NEGATIVO08/04/2011
 NEGATIVO13/05/2011
 NEGATIVO08/07/2011
 NEGATIVO29/02/2012
 NEGATIVO01/10/2010
 NEGATIVO19/10/2010
 NEGATIVO22/10/2010
 NEGATIVO29/10/2010
 2674 26/11/2010
 NEGATIVO29/11/2010
 NEGATIVO10/12/2010
 NEGATIVO16/12/2010
 NEGATIVO23/12/2010
 NEGATIVO26/10/2010
 NEGATIVO28/10/2010
 NEGATIVO25/11/2010

Paciente 11

Paciente 12

Paciente 12

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

320 10/12/2010
 NEGATIVO17/12/2010

Paciente 13

3263 23/12/2010
 3721 29/12/2010
 7049 05/01/2011
 NEGATIVO11/01/2011
 NEGATIVO31/01/2011
 NEGATIVO08/02/2011
 1252 14/02/2011
 NEGATIVO17/02/2011
 238 22/02/2011
 NEGATIVO28/02/2011
 NEGATIVO15/03/2011
 NEGATIVO25/01/2011
 NEGATIVO28/03/2011
 NEGATIVO09/05/2011
 NEGATIVO13/06/2011
 NEGATIVO04/07/2011
 NEGATIVO30/08/2011
 NEGATIVO18/11/2010
 NEGATIVO02/12/2010
 NEGATIVO02/12/2010
 NEGATIVO16/12/2010
 NEGATIVO30/12/2010
 NEGATIVO18/01/2011
 461 15/02/2011
 1583 23/02/2011
 4370 28/02/2011
 207 09/03/2011
 NEGATIVO14/03/2011
 1778 21/03/2011
 NEGATIVO29/03/2011
 423 26/04/2011
 NEGATIVO09/05/2011
 NEGATIVO27/06/2011
 2.871 17/08/2011
 NEGATIVO22/08/2011
 NEGATIVO16/11/2011
 NEGATIVO21/11/2011
 NEGATIVO29/10/2010
 NEGATIVO18/11/2010
 NEGATIVO25/11/2010
 NEGATIVO02/12/2010
 NEGATIVO16/12/2010
 NEGATIVO30/12/2010
 NEGATIVO03/01/2011
 2755 10/01/2011
 1372 19/01/2011
 16255 25/01/2011
 NEGATIVO02/02/2011
 NEGATIVO02/02/2011
 NEGATIVO08/02/2011

Paciente 14

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

Paciente 14

NEGATIVO15/02/2011
 NEGATIVO22/02/2011
 NEGATIVO09/03/2011

Paciente 15

NEGATIVO22/03/2011
 NEGATIVO24/04/2011
 NEGATIVO15/05/2011
 NEGATIVO24/05/2011
 922 06/06/2011
 2669 12/06/2011
 NEGATIVO20/06/2011
 NEGATIVO27/06/2011
 NEGATIVO08/07/2011
 NEGATIVO10/07/2011
 NEGATIVO18/07/2011
 322 01/08/2011
 NEGATIVO03/10/2011
 747 07/02/2012
 1.194 16/02/2012
 405 24/02/2012
 332 01/03/2012
 NEGATIVO06/03/2012
 NEGATIVO18/11/2010
 1013 10/12/2010
 NEGATIVO16/12/2010
 2629 30/12/2010
 NEGATIVO06/01/2011
 884 26/01/2011
 835 07/02/2011
 6614 01/02/2011
 NEGATIVO09/02/2011
 NEGATIVO18/02/2011
 NEGATIVO22/02/2011
 NEGATIVO01/03/2011
 NEGATIVO17/03/2011
 NEGATIVO28/03/2011
 687 28/04/2011
 NEGATIVO30/05/2011
 1131 15/06/2011
 NEGATIVO27/06/2011
 NEGATIVO23/08/2011
 NEGATIVO27/09/2011
 NEGATIVO03/10/2011
 NEGATIVO10/02/2012
 NEGATIVO15/03/2012
 160.750 10/12/2010
 37682 16/12/2010
 NEGATIVO29/12/2010
 NEGATIVO04/01/2011
 NEGATIVO10/01/2011
 NEGATIVO17/01/2011
 7699 25/01/2011
 1773 01/02/2011

Paciente 16

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

Paciente 16

NEGATIVO08/02/2011
 NEGATIVO15/02/2011
 NEGATIVO22/02/2011
 NEGATIVO01/03/2011

Paciente 17

Paciente 17

NEGATIVO07/03/2011
 3414 02/05/2011
 3561 16/05/2011
 2837 30/05/2011
 1790 06/06/2011
 5399 14/06/2011
 1088 17/06/2011
 NEGATIVO20/06/2011
 NEGATIVO27/06/2011
 NEGATIVO04/07/2011
 640 11/07/2011
 1.565 18/07/2011
 7.939 25/07/2011
 9.852 30/07/2011
 458 01/08/2011
 NEGATIVO09/08/2011
 NEGATIVO15/08/2011
 NEGATIVO22/08/2011
 NEGATIVO29/08/2011
 NEGATIVO30/08/2011
 NEGATIVO05/09/2011
 1.246 19/09/2011
 209 03/10/2011
 333 10/10/2011
 1.568 24/10/2011
 NEGATIVO07/11/2011
 870 21/11/2011
 NEGATIVO28/11/2011
 NEGATIVO05/01/2012
 NEGATIVO17/02/2012
 NEGATIVO06/03/2012
 NEGATIVO02/12/2010
 NEGATIVO10/12/2010
 1199 16/12/2010
 165532 30/12/2010
 401502 11/01/2011
 499712 16/01/2011
 9114 25/01/2011
 3867 01/02/2011
 NEGATIVO08/02/2011
 NEGATIVO15/02/2011
 793 21/02/2011
 293 28/02/2011
 NEGATIVO15/03/2011
 758 29/03/2011
 11993 05/04/2011
 8215 08/04/2011
 NEGATIVO11/04/2011
APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO
 NEGATIVO18/04/2011
 206 25/04/2011
 NEGATIVO04/05/2011
 222 10/05/2011
 1870 16/05/2011

Paciente 18

4804 24/05/2011
 5841 28/05/2011
 NEGATIVO31/05/2011
 1532 06/06/2011
 NEGATIVO15/06/2011
 NEGATIVO20/06/2011
 NEGATIVO05/07/2011
 2291 28/06/2011
 NEGATIVO12/07/2011
 708 19/07/2011
 NEGATIVO02/08/2011
 1.104 15/08/2011
 NEGATIVO23/08/2011
 NEGATIVO06/09/2011
 NEGATIVO20/09/2011
 NEGATIVO10/10/2011
 NEGATIVO31/10/2011
 NEGATIVO21/11/2011
 NEGATIVO20/12/2011
 NEGATIVO03/04/2012
 NEGATIVO10/12/2010
 1105 16/12/2010
 821 30/12/2010
 715 11/01/2011
 1811 09/02/2011
 2688 14/02/2011
 11054 21/02/2011
 NEGATIVO08/03/2011
 NEGATIVO15/03/2011
 NEGATIVO28/03/2011
 NEGATIVO28/04/2011
 NEGATIVO30/06/2011
 NEGATIVO04/08/2011
 NEGATIVO01/09/2011
 5.213 07/10/2011
 764 13/10/2011
 NEGATIVO18/10/2011
 NEGATIVO04/11/2011
 1.085 18/11/2011
 10.819 29/11/2011
 NEGATIVO06/12/2011
 NEGATIVO12/12/2011
 NEGATIVO19/12/2011
 NEGATIVO26/12/2011
 NEGATIVO09/01/2012
 NEGATIVO23/01/2012
 591 06/02/2012

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

Paciente 18

NEGATIVO06/03/2012
 NEGATIVO23/03/2012
 NEGATIVO09/04/2012
 NEGATIVO25/11/2010
 NEGATIVO02/12/2010
 NEGATIVO10/12/2010

Paciente 19

Paciente 20

880 16/12/2010
 4228 30/12/2010
 NEGATIVO04/01/2011
 254 05/01/2011
 NEGATIVO10/01/2011
 NEGATIVO18/01/2011
 1462 31/01/2011
 1266 14/02/2011
 411 21/02/2011
 462 09/03/2011
 NEGATIVO22/03/2011
 NEGATIVO02/05/2011
 NEGATIVO17/06/2011
 NEGATIVO16/12/2010
 NEGATIVO23/12/2010
 NEGATIVO17/01/2011
 NEGATIVO24/01/2011
 540 08/02/2011
 NEGATIVO15/02/2011
 6738 01/03/2011
 441 08/03/2011

Paciente 21

NEGATIVO15/03/2011
 NEGATIVO22/03/2011
 NEGATIVO29/12/2010
 NEGATIVO04/04/2011
 NEGATIVO16/12/2010
 NEGATIVO23/12/2010
 NEGATIVO30/12/2010
 NEGATIVO05/01/2011
 NEGATIVO12/01/2011
 1296 28/01/2011
 6706 07/02/2011
 3343 16/02/2011
 758 21/02/2011
 1218 03/03/2011
 NEGATIVO09/03/2011
 NEGATIVO14/03/2011
 NEGATIVO22/03/2011
 NEGATIVO09/05/2011
 NEGATIVO27/06/2011
 NEGATIVO21/07/2011
 482 26/08/2011

Paciente 22

NEGATIVO29/12/2011
 NEGATIVO23/12/2010
 NEGATIVO30/12/2010
 NEGATIVO03/01/2011

Paciente 22

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

NEGATIVO11/01/2011
 226 18/01/2011
 365 24/01/2011
 NEGATIVO31/01/2011
 NEGATIVO07/02/2011
 NEGATIVO21/02/2011
 NEGATIVO22/03/2011

Paciente 23

1717 10/05/2011
 806 02/06/2011
 1884 13/06/2011
 NEGATIVO20/06/2011
 NEGATIVO27/06/2011
 NEGATIVO11/07/2011
 NEGATIVO25/07/2011
 NEGATIVO07/02/2012
 NEGATIVO30/12/2010
 NEGATIVO03/01/2011
 NEGATIVO11/01/2011

716 17/01/2011
 4069 24/01/2011
 76992 28/01/2011
 9538 01/02/2011
 52032 08/02/2011
 20755 14/02/2011
 1917 01/03/2011
 484 08/03/2011

Paciente 24

NEGATIVO15/03/2011
 409 22/03/2011
 NEGATIVO11/01/2011
 NEGATIVO02/02/2011
 NEGATIVO07/02/2011
 NEGATIVO14/02/2011

11993 28/02/2011
 30267 10/03/2011
 3502 15/03/2011
 12475 22/03/2011
 NEGATIVO29/03/2011
 NEGATIVO05/04/2011
 379 13/04/2011
 2270 18/04/2011
 1900 25/04/2011
 20234 02/05/2011
 50010 07/05/2011
 3863 09/05/2011
 850 15/05/2011
 NEGATIVO25/05/2011
 NEGATIVO31/05/2011
 849 07/06/2011
 1163 13/06/2011
 3862 16/06/2011
 NEGATIVO20/06/2011
 3062 27/06/2011

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

Paciente 24

1277 05/07/2011
 NEGATIVO11/07/2011
 225 18/07/2011
 NEGATIVO25/07/2011
 NEGATIVO01/08/2011
 1.055 08/08/2011
 NEGATIVO15/08/2011
 NEGATIVO22/08/2011

Paciente 25

NEGATIVO12/09/2011
 371 26/09/2011
 NEGATIVO31/01/2011
 NEGATIVO08/02/2011
 NEGATIVO21/02/2011
 NEGATIVO16/03/2011
 29872 30/03/2011
 4759 05/04/2011
 5883 11/04/2011
 NEGATIVO18/04/2011
 NEGATIVO24/04/2011
 NEGATIVO27/04/2011
 NEGATIVO09/05/2011
 827 19/05/2011
 2372 22/05/2011
 1147 26/05/2011
 625 01/06/2011
 NEGATIVO06/06/2011
 NEGATIVO12/06/2011
 NEGATIVO20/06/2011
 NEGATIVO27/06/2011
 306 04/07/2011
 548 11/07/2011
 NEGATIVO01/08/2011
 10.228 10/09/2011
 2.815 13/09/2011
 10.874 19/09/2011
 NEGATIVO26/09/2011
 NEGATIVO03/10/2011
 NEGATIVO10/10/2011
 NEGATIVO17/10/2011
 NEGATIVO24/10/2011
 NEGATIVO31/10/2011
 NEGATIVO07/11/2011
 NEGATIVO16/11/2011
 NEGATIVO28/11/2011
 355 09/01/2012
 NEGATIVO06/02/2012
 NEGATIVO14/02/2012
 1.638 05/03/2012
 309 02/04/2012
 NEGATIVO31/01/2011
 NEGATIVO08/02/2011
 NEGATIVO14/02/2011
APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO
 NEGATIVO23/02/2011
 NEGATIVO09/03/2011
 NEGATIVO23/03/2011
 NEGATIVO04/05/2011
 3045 17/05/2011
 2240 20/05/2011
 1523 23/05/2011
 4610 01/06/2011
 6694 03/06/2011

Paciente 26

Paciente 26

	NEGATIVO08/06/2011
	NEGATIVO12/06/2011
	NEGATIVO22/06/2011
	2020 28/06/2011
	NEGATIVO13/07/2011
	NEGATIVO29/07/2011
	NEGATIVO03/08/2011
	NEGATIVO24/08/2011
	NEGATIVO01/09/2011
	NEGATIVO22/12/2011
Paciente 27	NEGATIVO10/03/2011
	NEGATIVO21/03/2011
	NEGATIVO28/03/2011
	NEGATIVO08/04/2011
	NEGATIVO06/05/2011
	1438 10/06/2011
	2230 20/06/2011
	953 27/06/2011
	488 04/07/2011
	227 29/08/2011
	NEGATIVO29/09/2011
	NEGATIVO14/10/2011
Paciente 28	NEGATIVO14/03/2012
	NEGATIVO08/02/2011
	NEGATIVO15/02/2011
	NEGATIVO22/02/2011
	NEGATIVO28/02/2011
	NEGATIVO14/03/2011
	NEGATIVO04/04/2011
	7209 02/05/2011
	5300 09/05/2011
	NEGATIVO22/05/2011
	NEGATIVO24/05/2011
	NEGATIVO31/05/2011
	NEGATIVO07/06/2011
	NEGATIVO14/06/2011
	NEGATIVO21/06/2011
	NEGATIVO28/06/2011
	NEGATIVO25/07/2011
	NEGATIVO22/08/2011
	NEGATIVO26/09/2011
	1.964 21/11/2011
	NEGATIVO28/11/2011
Paciente 28	APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO
	NEGATIVO05/12/2011
	NEGATIVO12/12/2011
	NEGATIVO19/12/2011
	NEGATIVO23/01/2012
	NEGATIVO26/03/2012
Paciente 29	NEGATIVO22/02/2011
	NEGATIVO08/03/2011
	NEGATIVO14/03/2011
	NEGATIVO30/03/2011
	NEGATIVO06/04/2011

	NEGATIVO02/05/2011
	NEGATIVO20/05/2011
	NEGATIVO27/06/2011
	1.964 21/11/2011
Paciente 30	NEGATIVO19/02/2011
	NEGATIVO02/03/2011
	NEGATIVO21/03/2011
	NEGATIVO28/03/2011
Paciente 31	NEGATIVO08/03/2011
	NEGATIVO15/03/2011
	NEGATIVO22/03/2011
	NEGATIVO05/09/2011
	NEGATIVO10/10/2011
Paciente 32	NEGATIVO07/04/2011
	NEGATIVO11/04/2011
	NEGATIVO18/04/2011
	NEGATIVO25/04/2011
	NEGATIVO02/05/2011
	NEGATIVO09/05/2011
	NEGATIVO23/05/2011
	NEGATIVO02/06/2011
	NEGATIVO13/06/2011
	NEGATIVO11/07/2011
	369 15/08/2011
	NEGATIVO26/09/2011
	NEGATIVO10/10/2011
Paciente 33	NEGATIVO18/04/2011
	NEGATIVO24/04/2011
	NEGATIVO16/05/2011
	NEGATIVO23/05/2011
	NEGATIVO31/05/2011
	93599 01/07/2011
	1367826 08/07/2011
	10411 12/07/2011
	1508 18/07/2011
	1.036 25/07/2011
	NEGATIVO01/08/2011
	NEGATIVO09/08/2011
	4.900 15/08/2011
	1.865 22/08/2011
	9.542 30/08/2011
	NEGATIVO06/09/2011
	APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO
Paciente 33	NEGATIVO12/09/2011
	572 19/09/2011
	NEGATIVO26/09/2011
	5052 03/10/2011
	29.854 10/10/2011
	235 17/10/2011
	1.770 24/10/2011
	NEGATIVO31/10/2011
	NEGATIVO07/11/2011
	3.578 21/11/2011
	13.571 28/11/2011

Paciente 34

NEGATIVO05/12/2011
 NEGATIVO12/12/2011
 NEGATIVO19/12/2011
 378 26/12/2011
 4410 02/01/2012
 32909/01/2012
 61016/01/2012
 767 23/01/2012
 NEGATIVO30/01/2012
 598 06/02/2012
 NEGATIVO13/02/2012
 NEGATIVO27/02/2012
 NEGATIVO05/03/2012
 541 04/04/2012
 NEGATIVO18/04/2011
 NEGATIVO24/04/2011
 NEGATIVO03/05/2011
 NEGATIVO09/05/2011
 NEGATIVO16/05/2011
 1006 30/05/2011
 13891 06/06/2011
 2789 12/06/2011
 4990 20/06/2011
 NEGATIVO27/06/2011
 NEGATIVO05/07/2011
 NEGATIVO11/07/2011
 55018/07/2011
 2.475 25/07/2011
 23.215 29/07/2011
 724 01/08/2011
 1.847 09/08/2011
 NEGATIVO15/08/2011
 NEGATIVO22/08/2011
 357 29/08/2011
 81125 04/10/2011
 1.845 10/10/2011
 NEGATIVO17/10/2011
 NEGATIVO28/10/2011
 NEGATIVO31/10/2011
 NEGATIVO07/11/2011
 NEGATIVO14/11/2011

Paciente 34

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

Paciente 35

NEGATIVO13/12/2011
 NEGATIVO16/01/2012
 NEGATIVO13/02/2012
 NEGATIVO12/03/2012
 NEGATIVO24/04/2011
 NEGATIVO04/05/2011
 803 23/05/2011
 7926 06/06/2011
 14597 15/06/2011
 1026 20/06/2011
 NEGATIVO27/06/2011
 NEGATIVO05/07/2011

	NEGATIVO12/07/2011
	NEGATIVO25/07/2011
	8.645 08/08/2011
	542 16/08/2011
	NEGATIVO22/08/2011
	NEGATIVO29/08/2011
	2.844 06/09/2011
	NEGATIVO13/09/2011
	382 04/10/2011
	NEGATIVO18/10/2011
	NEGATIVO28/11/2011
	458 12/12/2011
Paciente 36	NEGATIVO23/01/2012
	NEGATIVO24/04/2011
	NEGATIVO02/05/2011
	2385 16/05/2011
	4536 22/05/2011
	575 31/05/2011
	NEGATIVO08/06/2011
	NEGATIVO13/06/2011
	NEGATIVO22/06/2011
	NEGATIVO27/06/2011
	NEGATIVO04/07/2011
	1.076 29/07/2011
	3.424 01/08/2011
Paciente 37	NEGATIVO09/08/2011
	NEGATIVO15/05/2011
	NEGATIVO31/05/2011
	NEGATIVO14/06/2011
	4376 13/07/2011
	46.011 25/07/2011
	84.707 01/08/2011
	835 09/08/2011
Paciente 38	NEGATIVO15/08/2011
	NEGATIVO16/05/2011
	NEGATIVO22/05/2011
	NEGATIVO31/05/2011
	2837660 07/07/2011
	1420702 12/07/2011
	3.030 20/07/2011
Paciente 38	APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO
	NEGATIVO25/07/2011
	448 01/08/2011
	NEGATIVO08/08/2011
	NEGATIVO15/08/2011
	NEGATIVO20/08/2011
Paciente 39	NEGATIVO22/05/2011
	NEGATIVO31/05/2011
	NEGATIVO06/06/2011
	10508 14/06/2011
	14338 15/06/2011
	627 20/06/2011
	2344 27/06/2011
	NEGATIVO05/07/2011

Paciente 40

NEGATIVO12/07/2011
 NEGATIVO18/07/2011
 NEGATIVO25/07/2011
 NEGATIVO28/07/2011
 484 01/08/2011
 1.308 15/08/2011
 14.148 29/08/2011
 NEGATIVO06/09/2011
 NEGATIVO14/09/2011
 NEGATIVO19/09/2011
 NEGATIVO26/09/2011
 NEGATIVO10/10/2011
 NEGATIVO07/11/2011
 7.455 05/12/2011
 458 19/12/2011
 406 26/12/2011
 NEGATIVO02/01/2012
 NEGATIVO13/01/2012
 NEGATIVO22/05/2011
 775 06/06/2011
 1437 13/06/2011
 24381 22/06/2011
 5546 27/06/2011
 39259 05/07/2011
 788 12/07/2011
 NEGATIVO18/07/2011
 NEGATIVO25/07/2011
 NEGATIVO03/08/2011
 NEGATIVO08/08/2011
 NEGATIVO15/08/2011
 1.418 05/09/2011
 678 13/09/2011
 1.128 19/09/2011
 589 22/09/2011
 NEGATIVO27/09/2011
 NEGATIVO31/10/2011
 NEGATIVO28/11/2011
 NEGATIVO25/05/2011
 NEGATIVO31/05/2011

Paciente 41

Paciente 41

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

NEGATIVO13/06/2011
 NEGATIVO27/06/2011
 NEGATIVO11/07/2011
 552 20/07/2011
 2951 01/08/2011
 608 15/08/2011
 415 22/08/2011
 1.403 29/08/2011
 NEGATIVO05/09/2011
 377 12/09/2011
 NEGATIVO19/09/2011
 NEGATIVO26/09/2011
 620 03/10/2011
 3.734 10/10/2011

Paciente 42

NEGATIVO27/10/2011
 NEGATIVO31/10/2011
 NEGATIVO28/11/2011
 NEGATIVO26/03/2012
 NEGATIVO13/06/2011
 NEGATIVO21/06/2011
 NEGATIVO28/06/2011
 1.726 01/08/2011
 3.583 08/08/2011
 558 15/08/2011
 245.126 22/08/2011
 NEGATIVO29/08/2011
 NEGATIVO06/09/2011
 NEGATIVO12/09/2011
 NEGATIVO20/09/2011
 NEGATIVO21/09/2011
 NEGATIVO26/09/2011
 NEGATIVO04/10/2011
 NEGATIVO25/10/2011
 NEGATIVO13/12/2011
 968 06/03/2012
 528 12/03/2012
 NEGATIVO20/03/2012

Paciente 43

NEGATIVO13/06/2011
 NEGATIVO29/06/2011
 NEGATIVO13/07/2011
 1.698 26/07/2011
 1.115 01/08/2011
 15.217 12/08/2011
 47.822 22/08/2011
 755 29/08/2011
 NEGATIVO06/09/2011
 NEGATIVO12/09/2011
 861 26/09/2011
 4131 03/10/2011
 17.274 10/10/2011
 8.437 17/10/2011
 19.300 24/10/2011

Paciente 43

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

727 31/10/2011
 NEGATIVO07/11/2011
 NEGATIVO14/11/2011
 507 24/11/2011
 1480 30/11/2011
 421 05/12/2011
 2.790 12/12/2011
 1.210 19/12/2011
 2.270 27/12/2011
 1536 09/01/2012
 2.787 17/01/2012
 2.425 23/01/2012
 12.166 31/01/2012
 11.806 03/02/2012
 3.459 07/02/2012

Paciente 44

1.397 14/02/2012
 NEGATIVO15/02/2012
 NEGATIVO20/02/2012
 NEGATIVO28/02/2012
 574 06/03/2012
 NEGATIVO12/03/2012
 NEGATIVO21/03/2012
 NEGATIVO10/04/2012
 NEGATIVO27/06/2011
 NEGATIVO04/07/2011
 NEGATIVO11/07/2011
 NEGATIVO18/07/2011
 NEGATIVO26/07/2011
 NEGATIVO03/08/2011
 NEGATIVO08/08/2011
 NEGATIVO29/08/2011
 3.678 13/09/2011
 2.388 21/09/2011
 8.372 17/10/2011
 NEGATIVO31/10/2011
 NEGATIVO07/11/2011
 NEGATIVO14/11/2011
 NEGATIVO22/11/2011
 NEGATIVO29/11/2011
 NEGATIVO06/12/2011
 NEGATIVO13/12/2011
 NEGATIVO04/04/2012
 866 08/04/2012
 NEGATIVO09/04/2012
 367 16/04/2012
 NEGATIVO04/07/2011
 NEGATIVO11/07/2011
 NEGATIVO18/07/2011
 814 25/07/2011
 1.458 01/08/2011
 10.963 08/08/2011
 553 15/08/2011

Paciente 45

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

Paciente 45

313 17/08/2011
 1.899 22/08/2011
 NEGATIVO
 29/08/2011
 NEGATIVO06/09/2011
 297 13/09/2011
 NEGATIVO19/09/2011
 NEGATIVO26/09/2011
 NEGATIVO11/10/2011
 2.486 24/10/2011
 1.169 31/10/2011
 1.058 07/11/2011
 3.917 21/11/2011
 391 28/11/2011
 NEGATIVO05/12/2011
 NEGATIVO12/12/2011
 NEGATIVO19/12/2011

Paciente 46

NEGATIVO26/12/2011
 NEGATIVO27/01/2012
 610 20/02/2012
 NEGATIVO27/02/2012
 NEGATIVO06/03/2012
 414 12/03/2012
 NEGATIVO24/07/2011
 NEGATIVO01/08/2011
 NEGATIVO08/08/2011
 NEGATIVO15/08/2011
 NEGATIVO22/08/2011
 NEGATIVO05/09/2011
 NEGATIVO26/09/2011
 NEGATIVO24/10/2011
 NEGATIVO28/11/2011

Paciente 47

NEGATIVO09/01/2012
 NEGATIVO18/07/2011
 NEGATIVO25/07/2011
 NEGATIVO01/08/2011
 NEGATIVO15/08/2011
 770 22/08/2011
 472 05/09/2011
 1.692 19/09/2011
 10.434 27/09/2011
 NEGATIVO03/10/2011
 NEGATIVO09/10/2011
 NEGATIVO24/10/2011
 446 10/11/2011
 NEGATIVO14/12/2011
 NEGATIVO05/01/2012
 NEGATIVO03/02/2012
 NEGATIVO08/03/2012
 NEGATIVO05/04/2012
 NEGATIVO18/07/2011
 NEGATIVO26/07/2011
 NEGATIVO01/08/2011

Paciente 48

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

Paciente 48

NEGATIVO08/08/2011
 NEGATIVO15/08/2011
 2.608 29/08/2011
 27.933 06/09/2011
 596 14/09/2011
 745 12/09/2011
 NEGATIVO19/09/2011
 NEGATIVO26/09/2011
 NEGATIVO03/10/2011
 NEGATIVO11/10/2011
 1.120 17/10/2011
 3.531 25/10/2011
 1.413 31/10/2011
 NEGATIVO08/11/2011
 766 13/12/2011
 NEGATIVO03/01/2012
 NEGATIVO09/01/2012

Paciente 49

NEGATIVO06/02/2012
 NEGATIVO29/03/2012
 NEGATIVO01/08/2011
 1.536 29/08/2011
 687 08/09/2011
 13.674 19/09/2011
 NEGATIVO26/09/2011
 NEGATIVO09/10/2011
 NEGATIVO17/10/2011
 NEGATIVO24/10/2011
 913 14/11/2011
 NEGATIVO22/11/2011
 NEGATIVO29/11/2011
 NEGATIVO13/12/2011
 NEGATIVO10/01/2012
 NEGATIVO20/03/2012

Paciente 50

NEGATIVO01/08/2011
 NEGATIVO09/08/2011
 NEGATIVO22/08/2011
 NEGATIVO29/08/2011
 NEGATIVO05/09/2011
 NEGATIVO19/09/2011
 NEGATIVO26/09/2011
 NEGATIVO09/01/2012
 2.062 13/02/2012
 411 10/04/2012

Paciente 51

NEGATIVO09/08/2011
 NEGATIVO15/08/2011
 NEGATIVO22/08/2011
 NEGATIVO06/09/2011
 NEGATIVO16/09/2011
 1069 03/10/2011
 10.804 10/10/2011
 NEGATIVO17/10/2011
 NEGATIVO28/10/2011

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

Paciente 52

708 31/10/2011
 NEGATIVO07/11/2011
 3.233 12/11/2011
 5.517 22/11/2011
 NEGATIVO28/11/2011
 NEGATIVO05/12/2011
 280 19/12/2011
 4237 04/01/2012
 4676 10/01/2012
 2.480 17/01/2012
 4.752 23/01/2012
 1.343 02/02/2012
 948 08/02/2012
 1.076 14/02/2012
 NEGATIVO27/02/2012
 NEGATIVO09/03/2012
 NEGATIVO12/04/2012

Paciente 53

NEGATIVO09/08/2011

Paciente 54

NEGATIVO22/08/2011
 NEGATIVO29/08/2011
 NEGATIVO05/09/2011
 771 19/09/2011
 NEGATIVO27/09/2011
 1.059 07/11/2011
 NEGATIVO23/11/2011
 NEGATIVO05/12/2011
 676 24/01/2012
 763 08/02/2012
 NEGATIVO20/02/2012
 6.952 28/02/2012
 NEGATIVO06/03/2012
 NEGATIVO13/03/2012
 NEGATIVO22/08/2011
 NEGATIVO29/08/2011
 NEGATIVO06/09/2011
 NEGATIVO21/09/2011
 NEGATIVO28/09/2011
 1.527 18/10/2011
 NEGATIVO24/10/2011
 NEGATIVO31/10/2011
 NEGATIVO07/11/2011
 374 16/11/2011
 528 28/11/2011
 NEGATIVO12/12/2011
 NEGATIVO16/01/2012
 NEGATIVO17/02/2012
 NEGATIVO14/03/2012
 NEGATIVO05/09/2011
 NEGATIVO13/09/2011
 NEGATIVO19/09/2011
 NEGATIVO27/09/2011
 NEGATIVO11/10/2011

Paciente 55

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

Paciente 55

NEGATIVO24/10/2011
 NEGATIVO07/11/2011
 NEGATIVO28/11/2011
 NEGATIVO27/12/2011
 NEGATIVO23/01/2012
 NEGATIVO20/02/2012
 NEGATIVO20/03/2012
 NEGATIVO12/09/2011
 NEGATIVO19/09/2011
 NEGATIVO26/09/2011
 10.057 09/10/2011
 639 17/10/2011
 534 24/10/2011
 NEGATIVO30/10/2011
 NEGATIVO06/11/2011
 NEGATIVO16/11/2011
 NEGATIVO23/11/2011
 NEGATIVO02/12/2011
 339 16/12/2011

Paciente 56

Paciente 57

2.819 27/12/2011
 392 02/01/2012
 NEGATIVO10/01/2012
 NEGATIVO25/01/2012
 NEGATIVO28/02/2012
 NEGATIVO05/03/2012
 NEGATIVO12/03/2012
 NEGATIVO16/04/2012
 NEGATIVO14/11/2011
 NEGATIVO21/11/2011
 NEGATIVO06/12/2011
 NEGATIVO22/12/2011

Paciente 58

647 17/02/2012
 NEGATIVO16/03/2012
 NEGATIVO23/03/2012
 NEGATIVO25/04/2012
 NEGATIVO05/12/2011
 661 12/12/2011
 3.216 19/12/2011
 8.424 27/12/2011
 NEGATIVO02/01/2012
 28423 10/01/2012
 NEGATIVO16/01/2012
 NEGATIVO23/01/2012
 NEGATIVO30/01/2012
 NEGATIVO06/02/2012
 NEGATIVO13/02/2012
 9.559 19/02/2012
 107.622 05/03/2012
 NEGATIVO17/03/2012
 NEGATIVO26/03/2012
 NEGATIVO02/04/2012
 NEGATIVO23/04/2012

Paciente 59

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

377 29/12/2011
 8218 03/01/2012
 20.519 12/01/2012
 28.426 16/01/2012
 1.379 23/01/2012
 11.656 30/01/2012
 3.161 06/02/2012
 NEGATIVO14/02/2012
 NEGATIVO20/02/2012
 NEGATIVO25/02/2012
 668 27/02/2012

Paciente 60

272 05/03/2012
 NEGATIVO09/12/2011
 NEGATIVO19/12/2011
 NEGATIVO26/12/2011
 630 02/01/2012
 NEGATIVO06/01/2012
 676 12/01/2012
 7.039 25/01/2012
 421 06/02/2012

Paciente 61	NEGATIVO10/02/2012
	NEGATIVO14/02/2012
	NEGATIVO22/02/2012
	NEGATIVO29/02/2012
	NEGATIVO05/03/2012
	NEGATIVO12/03/2012
	NEGATIVO26/03/2012
	NEGATIVO13/04/2012
	NEGATIVO19/12/2011
	NEGATIVO26/12/2011
	NEGATIVO02/01/2012
	NEGATIVO13/01/2012
	NEGATIVO30/01/2012
	7.318 16/03/2012
	791 24/03/2012
Paciente 62	561 26/03/2012
	NEGATIVO02/04/2012
	NEGATIVO16/04/2012
	NEGATIVO23/04/2012
	NEGATIVO21/12/2011
	NEGATIVO26/12/2011
	NEGATIVO02/01/2012
	NEGATIVO12/01/2012
	450 23/01/2012
	1.413 06/02/2012
	1.364 13/03/2012
	385 26/03/2012
	536 29/03/2012
	398 10/04/2012
	NEGATIVO11/04/2012
	498 13/04/2012

APÊNDICE 1: CONTINUAÇÃO

Paciente 63	31.520 18/11/2011
Paciente 64	1.166 02/12/2011
Paciente 65	NEGATIVO25/11/2010
Paciente 66	NEGATIVO05/03/2012
	NEGATIVO07/11/2011
	NEGATIVO23/11/2011
	NEGATIVO02/01/2012
	NEGATIVO09/01/2012
	NEGATIVO16/01/2012
	NEGATIVO23/01/2012
	951 30/01/2012
	29.625 14/02/2012
	755 20/02/2012
	NEGATIVO27/02/2012
	516 05/03/2012
	NEGATIVO26/03/2012
	NEGATIVO02/04/2012
	NEGATIVO09/04/2012
	NEGATIVO16/04/2012
	1.768 23/04/2012
	NEGATIVO16/05/2011

Anexo 1- Características da curva ROC

ROC curve

Variable	TEST1
Classification variable	DIAGNOSIS

Sample size	145
Positive group :	DIAGNOSIS = 1 77
Negative group :	DIAGNOSIS = 0 68

Disease prevalence (%)	unknown
------------------------	---------

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,996
Standard Error ^a	0,00296
95% Confidence interval ^b	0,967 to 1,000
z statistic	167,311
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,9481
Associated criterion	>8372

Criterion values and coordinates of the ROC curve [\[Hide\]](#)

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥207	100,00	95,3 - 100,0	0,00	0,0 - 5,3	1,00	
>4536	100,00	95,3 - 100,0	83,82	72,9 - 91,6	6,18	0,00
>5174	98,70	93,0 - 100,0	83,82	72,9 - 91,6	6,10	0,015
>6614	98,70	93,0 - 100,0	88,24	78,1 - 94,8	8,39	0,015
>6694	97,40	90,9 - 99,7	88,24	78,1 - 94,8	8,28	0,029
>7049	97,40	90,9 - 99,7	95,59	87,6 - 99,1	22,08	0,027
>7107	96,10	89,0 - 99,2	95,59	87,6 - 99,1	21,78	0,041
>7318	96,10	89,0 - 99,2	98,53	92,1 - 100,0	65,35	0,040
>7390	94,81	87,2 - 98,6	98,53	92,1 - 100,0	64,47	0,053
>8372	94,81	87,2 - 98,6	100,00	94,7 - 100,0		0,052
>2837660	0,00	0,0 - 4,7	100,00	94,7 - 100,0		1,00

