

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS/INI
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS

FERNANDA BAPTISTA CAETANO PIRES DA CRUZ

**Desenvolvimento de protocolo de PCR em Tempo Real
para monitoramento da carga viral de CMV em pacientes
pós-transplante renal**

Rio de Janeiro

2017

DISSERTAÇÃO DP CDI - INI/Fiocruz F. B. C. P. CRUZ 2017

FERNANDA BAPTISTA CAETANO PIRES DA CRUZ

Desenvolvimento de protocolo de PCR em Tempo Real
para Monitoramento da carga viral de CMV
em pacientes pós-transplante renal

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Pesquisa Clínica em Doenças
Infecciosas para obtenção do grau
de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Maria de
Fátima Madeira

Co-orientador: Prof. Dr. Helena
Keiko Toma

Rio de Janeiro

2017

SOUZA, FERNANDA BAPTISTA CAETANO PIRES DA CRUZ.

Desenvolvimento de protocolo de PCR em Tempo Real para monitoramento da carga viral de CMV em pacientes pós-transplante renal / FERNANDA BAPTISTA CAETANO PIRES DA CRUZ SOUZA. - Rio de Janeiro, 2017.

68 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2017.

Orientadora: Maria de Fátima Madeira.

Co-orientadora: Heleno Keiko Toma.

Bibliografia: f. 44-52

1. Citomegalovírus. 2. Carga viral. 3. PCR em Tempo Real. 4. Transplante renal. I. Título.

Dedico este trabalho à minha mãe Isabel e meu pai Fernando (*in memoriam*), por todo amor, apoio e dedicação.

Ao meu noivo Tiago, por todo apoio.

Agradecimentos

A Deus por me dar força, fé, sabedoria e esperança a cada dia. Agradeço a Ti Pai, pela minha vida e salvação. Sem Ti eu nada sou.

À minha mãe Isabel por sempre acreditar em minha capacidade mais do que eu mesma, por sempre me apoiar e estar ao meu lado. Obrigada pelo seu esforço, por ser uma mulher guerreira, pela educação que me deu e por todos esses anos de carinho, cuidado e amor.

Ao meu noivo Tiago por sempre me apoiar e me animar. Obrigada pela paciência, por me ouvir e pelo seu amor.

À professora e co-orientadora Helena Keiko, que me acompanha desde a graduação, pelo incentivo, conversas, paciência e por todo esse carinho que você tem com seus alunos. Obrigada por todos os seus ensinamentos.

À minha orientadora Maria de Fátima por me aceitar como orientanda e por ser sempre tão solícita e disponível.

À amiga Camila por todos os momentos de descontração e por estar sempre presente nos momentos mais importantes.

Aos colegas de classe por sempre incentivarem uns aos outros, dando apoio e estando presentes.

Aos colegas do laboratório de Hematologia e Diagnóstico Molecular (UFRJ).

À Priscila, membro da secretaria acadêmica da Pós-graduação, por ser extremamente solícita, tirar todas as dúvidas, saber de tudo e sempre nos ajudar!

A todos do membro docente que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Aos demais membros do INI pelo trabalho realizado.

À CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro.

Um pouco de ciência no afasta de Deus.
Muito, nos aproxima. Louis Pasteur

Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. Glória, pois
a Ele eternamente. Rm 11:36

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas	v
1. Introdução	1
1.1. Citomegalovírus	1
1.1.1. Biologia Molecular e Ciclo Replicativo do Citomegalovírus.....	2
1.1. 2. Transmissão e epidemiologia.....	3
1.1.3. Patogenia e reativação da infecção pelo CMV.....	7
1.1.4. CMV e transplante renal.....	9
1.1.5. Diagnóstico.....	10
1.1.6. PCR em Tempo Real no diagnóstico da infecção por CMV	15
2. Justificativa	18
3. Objetivos	21
3.1. Objetivos gerais	21
3.2. Objetivos específicos	21
4. Materiais e Métodos	22
4.1. Aspectos éticos	22
4.2. Desenho do estudo	22
4.3. Materiais, procedimentos e técnicas	24
4.3.1. Desenvolvimento de Nested PCR para amplificação da região	24

dos genes iniciais imediatos de CMV.....	
4.3.2. Clonagem de fragmento de CMV.....	25
4.3.3. Padronização da curva de qPCR para CMV.....	26
4.4. Aplicação do protocolo.....	27
4.4.1. Coleta das amostras.....	28
4.4.2. Extração de DNA das amostras.....	28
4.4.3. qPCR das amostras.....	28
4.4.4. Comparação com <i>kit</i> comercial.....	28
5. Resultados.....	29
5.1. Desenvolvimento de <i>Nested</i> PCR.....	29
5.2. Clonagem de fragmento de CMV.....	30
5.3. Sequenciamento do produto de PCR do clone.....	31
5.4. Estabelecimento da curva padrão para Real-Time PCR.....	32
5.5. Análise de especificidade.....	34
5.6. Comparação com <i>kit</i> comercial.....	36
6. Discussão.....	37
7. Conclusão.....	43
Referências Bibliográficas.....	44
Anexos.....	53

CRUZ, F. B. C. P. **Desenvolvimento de protocolo de PCR em tempo real para monitoramento da carga viral de cmv em pacientes pós-transplante renal.** Rio de Janeiro, 2017. 68 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

Resumo

Introdução: O citomegalovírus (CMV) é um vírus que circula de forma assintomática na população, com prevalência de até 90%. Após a infecção primária, permanece no organismo sob a forma latente, podendo ser reativado em situações de imunossupressão, como em pacientes transplantados renais. Nesses, a reativação é importante causa de mortalidade e morbidade, podendo levar à perda do órgão transplantado. Há uma correlação entre carga viral e prognóstico nesses indivíduos, sendo necessário o uso de técnicas que possibilitem o seu monitoramento, aprimorando a sensibilidade e rapidez do diagnóstico. A técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) apresenta benefícios em relação às técnicas diagnósticas usualmente aplicadas. **Justificativa:** O monitoramento da infecção pelo CMV nesses pacientes afeta diretamente a intervenção a ser realizada, pois uma diminuição no uso de imunossupressores administrados pode levar a uma rejeição do enxerto, enquanto que o aumento poderá agravar o quadro infeccioso. Além disso, através da carga viral é possível: a identificação do risco de desenvolvimento de infecção ativa, avaliação da resposta terapêutica e reconhecimento de resistência à drogas. A qPCR é uma técnica que atende à essa necessidade, pois além de monitorar a carga viral, possui uma alta sensibilidade, detectando o vírus em estágios iniciais. **Objetivos:** O objetivo desse trabalho foi desenvolver um protocolo de baixo custo de padronização da técnica de qPCR baseada na metodologia SYBR Green, para diagnóstico da infecção pelo CMV em pacientes transplantados renais. **Métodos:** Inicialmente foi desenvolvida e otimizada uma *Nested* PCR, avaliando-se a melhor temperatura de anelamento, para a amplificação do fragmento de CMV utilizando-se *primers* específicos para a região dos genes iniciais imediatos do vírus. Em seguida, foi realizada a clonagem do fragmento viral, utilizando bactérias competentes e a seleção das bactérias transformadas foi feita através da técnica de “*blue/whitescreening*”. O clone foi utilizado para a obtenção e padronização da curva de qPCR, e em seguida aplicamos o protocolo em 9 amostras de plasma de pacientes, confrontado os resultados com os obtidos usando um *kit* comercial. **Resultados:** Através da otimização da *Nested* PCR, observou-se que a melhor temperatura de anelamento para os *primers* internos é de 57°C. A amplificação de amostras de DNA isoladas do plasma de pacientes sabidamente positivos apresentaram resultado positivo, gerando fragmento de \cong 150 pb. A PCR após a transformação das bactérias gerou um fragmento de \cong 150 pb, conforme o esperado, mostrando sucesso da clonagem. O sequenciamento do clone revelou que 100% (*query cover*) da sequência apresentou 99% de similaridade com Herpes Virus-5 Humano (HHV-5). A reação de qPCR apresentou eficiência de 115,95% e $R^2=0,996$, valores que demonstram que o teste oferece alta sensibilidade e permite a detecção de amostras até diluição de 10^{-5} ng/mL. A análise da curva de *Melting* mostrou que os *primers* escolhidos são específicos para CMV. Além disso, os resultados foram concordantes com os obtidos pelo *kit* comercial. **Conclusão:** O protocolo desenvolvido é um método específico, sensível e de baixo custo. O mesmo se mostrou promissor no contexto do monitoramento dos pacientes no período pós-transplante renal, porém ainda necessita de maior validação.

Palavras-chave: Citomegalovírus, carga viral, PCR em Tempo Real, transplante renal

CRUZ, F. B. C. P. **Development of a real-time PCR protocol for monitoring CMV viral load in post-renal transplant patients.** Rio de Janeiro, 2017. 68 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

Abstract

Introduction: Cytomegalovirus (CMV) is a pathogen that normally circulates asymptomatically among population, reaching a prevalence of up to 90%. After primary infection normally asymptomatic, virus can remain latent, and can be reactivated in immunosuppressive situations such as in renal transplanted patients. In these patients, viral reactivation is an important cause of mortality and morbidity, and may lead to graft loss in some cases. Viral load is an important parameter in prognosis and follow-up of these individuals. Therefore, it is necessary to use techniques that can perform virus monitoring, aiming for an improvement in sensitivity and rapidity in diagnosis. Real Time PCR (qPCR) has been shown to be effective in monitoring the viral load of these patients, presenting several benefits in relation to others techniques. The diagnosis and monitoring of CMV infection on these patients will directly affect the intervention, since a drastic decrease in the usage of immunosuppressants administered may lead to rejection of the transplanted organ, whereas an increase may be harmful for the infectious condition. In addition, quantification of viral load in plasma is extremely important on those patients since it allows: identification of patients who are at increased risk of developing active virus infection, evaluation of therapeutic response and recognition of drug resistance. Thus, real-time PCR is a technique that meets this needs since, it has high sensitivity, allows the detection of virus at the initial stage of infection and can also provide the viral load monitoring. **Aim:** The aim of this study is to develop a protocol of Real Time PCR using Sybr Green® for the diagnosis and monitoring of CMV infection in renal transplant patients. **Methods:** Initially, a Nested PCR was developed and optimized to evaluate the best annealing temperature for amplification of the CMV fragment using primers specific to immediate early genes region. Then, the viral fragment was cloned using competent bacteria and the selection of the transformed bacteria was done by "blue / whitescreening" technique. The clone was used to obtain the qPCR standart curve. **Results:** Nested PCR optimization showed that the best annealing temperature for internal primers was 57°C, and amplification of DNA samples isolated from the plasma of well-known patients showed a positive result, generating a fragment of \cong 150 bp. PCR after transformation of the bacteria generated a fragment of \cong 150 bp, as expected, showing success in the procedure. Sequencing of the clone revealed that 100% (query cover) of the sequence showed 99% similarity with Human Virus-5 Herpesvirus (CMV). qPCR reaction showed efficiency of 115,95% and $R^2=0,996$, values that demonstrate that the test offers high sensitivity and allows the quantification of samples with the precision of up to 10^{-5} ng/ml. Also, the metilng curve analysis showed that our primer set is specific for CMV. **Conclusion:** Our method is a specific, low cost method and effective to diagnose and monitor CMV infection in post- renal transplanted patients.

Keywords: Cytomegalovirus, viral load, Real Time PCR, renal transplantation

Lista de figuras

Figura 1. Esquema estrutural do Citomegalovírus	3
Figura 2. Esquema do ciclo replicativo de CMV.....	4
Figura 3. Gráfico de amplificação de uma qPCR.....	14
Figura 4. Fluxograma representativo da metodologia.....	23
Figura 5. Análise da melhor temperatura de anelamento.....	29
Figura 6. Gel de agarose 1,5% do produto de PCR de 2 amostras sabidamente positivas	30
Figura 7. Comprovação da transformação das bactérias.....	31
Figura 8. Dados do alinhamento das sequências após sequenciamento.....	32
Figura 9. Gráfico de amplificação da PCR em Tempo Real.....	33
Figura 10. Curva Padrão da qPCR	33
Figura 11. Curva de Melting contendo diluições do plasmídeo e brancos.....	34
Figura 12. . Curva de Melting contendo os brancos.....	35
Figura 13. . Curva de Melting contendo da triplicata da diluição 10^{-5}	35

Lista de tabelas

Tabela 1. Divisão dos Herpesvirus em subfamílias e gêneros com seus respectivos vírus representativos (Brennan, 2001).	1
Tabela 2. Número de transplantes de órgãos sólidos no Brasil entre janeiro e setembro de 2016.	6
Tabela 3. Número de transplantes de rim por estados com maior relevância, entre janeiro e setembro de 2016.	7
Tabela 4. Resultados da qPCR utilizando-se o <i>kit</i> comercial e o protocolo desenvolvido	36

Lista de abreviaturas e siglas

CMV	Citomegalovírus
HHV	Herpes Vírus Humano
qPCR	PCR quantitativa/em Tempo Real
DNA	Ácido desoxirribonucleico
pp65	Fosfoproteína 65
CT	<i>Cycle threshold</i>
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
DRC	Doença Renal Crônica
NKF	<i>National Kidney Foudantion</i>
RFG	Ritmo de Filtração Glomerular
D+	Doador soropositivo
D-	Doador soronegativo
R+	Receptor soropositivo
R-	Receptor soronegativo
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
ATG	Imunoglobulina Antimocítica
ABTO	Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos
RBT	Registro Brasileiro de Transplantes
min	Minutos
s	Segundos
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
qNAT	<i>Quantitative Nucleic Acid Test</i>

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
LAMAP	Laboratório Multidisciplinar de Apoio à Pesquisa
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
UFF	Universidade Federal Fluminense

1. INTRODUÇÃO

1.1. Citomegalovírus

O citomegalovírus (CMV) foi isolado pela primeira vez em 1956, na glândula salivar e nos rins de duas crianças que apresentavam inclusões citomegálicas (SMITH, 1956). O vírus foi denominado inicialmente como vírus da inclusão da glândula salivar e em 1960, Weller e colaboradores sugeriram o termo CMV (WELLER *et al.*, 1957). Em 1965 o vírus foi isolado pela primeira vez em um paciente que havia sido submetido a transplante renal (KLEMOLA *et al.*, 1965).

O CMV pertence à família Herpesviridae, subfamília β -herpesvirinae e ao gênero *Herpesvirus*. São conhecidos oito tipos de herpes vírus humanos (HHV), que são divididos em 3 subfamílias: α -herpesvirinae, β -herpesvirinae e γ -herpesvirinae, que se diferenciam pela estrutura de seus genomas e propriedades biológicas. A subfamília α -herpesvirinae, inclui o vírus da herpes simplex 1 e 2, e o vírus da varicella zoster; a subfamília β -herpesvirinae inclui o CMV, HHV-6 e HHV-7, e a subfamília γ -herpesvirinae, o vírus Epstein-barr e o HHV-8 (Tab. 1) (BRENNAN, 2001).

Tabela 1. Divisão dos Herpesvirus em subfamílias e gêneros com seus respectivos vírus representativos (Modificado de BRENNAN, 2001).

Subfamília	Gênero	Vírus
α -herpesvirinae	<i>Simplexvirus</i>	Herpes simples tipo 1 e 2 (HHV-1 e HHV-2)
	<i>Varicellovirus</i>	Vírus da varicela-zoster (HHV-3)
β -herpesvirinae	<i>Cytomegalovirus</i>	Citomegalovírus (HHV-5)
	<i>Roseolovirus</i>	Vírus do exantema súbito (HHV-6 e 7)
γ -herpesvirinae	<i>Lymphocryptovirus</i>	Vírus Epstein-Barr (HHV-4)
	<i>Rhadinovirus</i>	Vírus do sarcoma de Kaposi (HHV-8)

1.1.1. Biologia Molecular e Ciclo Replicativo do Citomegalovírus

As partículas completas do CMV medem entre 150 - 200 nm de diâmetro e são divididas em três regiões: envelope, tegumento e nucleocapsídeo. O envelope contém glicoproteínas e pelo menos 33 proteínas estruturais, sendo que algumas glicoproteínas determinam a linhagem do vírus e participam do processo de entrada celular (BRENNAN, 2001). O tegumento é uma camada protéica localizada entre a membrana lipídica externa e o nucleocapsídeo e contém diversas proteínas que se tornam ativas após serem liberadas no citoplasma da célula hospedeira. Dentre as proteínas presentes no tegumento, a mais importante é a pp65 (fosfoproteína de 65 kDa), pois além de ser a mais abundante, é também a principal responsável pela evasão do sistema imune (TOMTISHEN, 2012). Devido a sua relevância, a pp65 é utilizada como ferramenta diagnóstica através da técnica de antígenemia, que consiste na detecção direta de antígenos do vírus em neutrófilos circulantes (DE MELLO *et al.*, 2008). O nucleocapsídeo é uma estrutura de simetria icosaédrica composto por 162 capsômeros e envolve o genoma viral, o qual é composto por uma molécula de DNA dupla-fita de 235 Kb (MOCARSKI, SHENK, PASS, 2007) (Fig.1).

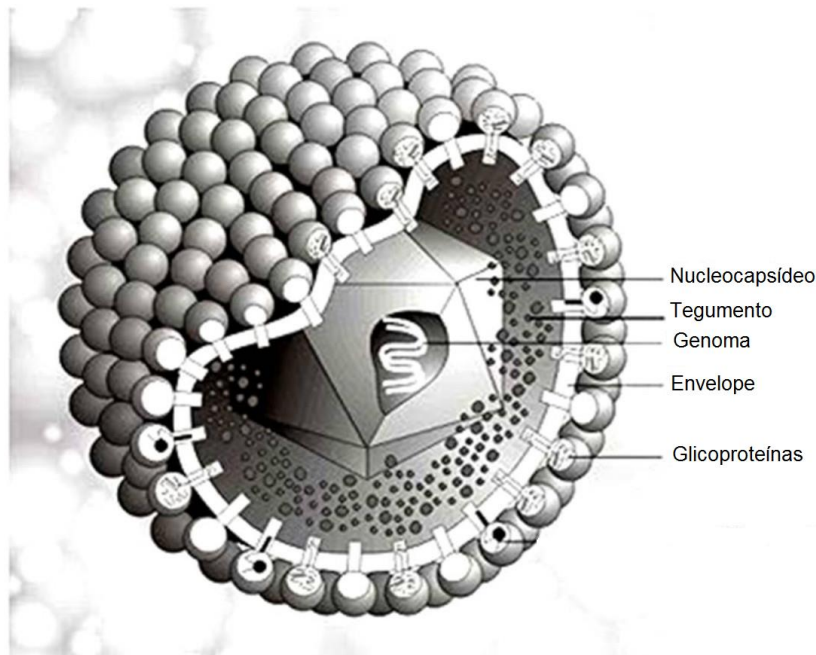


Figura 1. Esquema estrutural do Citomegalovírus (Adaptado de TOMTISHEN, 2012).

O ciclo replicativo do CMV (Fig. 2) se inicia com a entrada do vírus na célula hospedeira através da fusão entre a membrana da célula e o envelope viral, mediada pelas glicoproteínas gB e gH virais. Após esse processo, há liberação das proteínas do tegumento e do capsídeo no interior celular (SHENK, 2008). Uma vez dentro da célula, o nucleocapsídeo segue em direção ao núcleo e libera o DNA viral, dando-se prosseguimento à transcrição do RNA viral e síntese de DNA, que se inicia com a ativação dos genes iniciais imediatos (MOCARSKI, SHENK, PASS, 2006).

Assim como em outros herpesvírus, a expressão dos genes do CMV ocorre em 3 fases: inicial imediata (α), inicial (β) e tardia (γ). Nas fases iniciais (α e β) os genes codificam proteínas não-estruturais, e na fase tardia (γ) as proteínas estruturais do vírus (SISSONS, 1989). Durante a infecção ativa, ocorre a produção de proteínas da fase inicial imediata, as quais modulam o ambiente celular e estimulam a expressão dos genes da fase inicial. As proteínas da fase tardia são componentes estruturais do vírus e auxiliam na montagem e saída das partículas virais recém-formadas (SAFFERT, PENKERT, KALEJTA, 2010). A expressão dos genes iniciais pode ser inibida em certos tipos celulares o que leva a um estado de infecção latente (SINCLAIR, SISSONS, 2006).

A replicação do CMV envolve fases nucleares e citoplasmáticas. A formação do capsídeo viral, a síntese de DNA, o empacotamento do genoma e a formação inicial do tegumento ocorrem no núcleo da célula infectada (BRITT, 2007). O empacotamento do DNA viral leva à formação do nucleocapsídeo (TANDON, MOCARSKI, 2012), o qual adquire o tegumento e o envelope viral no citoplasma da célula. A nova partícula viral deixa a célula hospedeira através do processo de brotamento, quando adquire seu envelope final (LEVINSON, 2010).

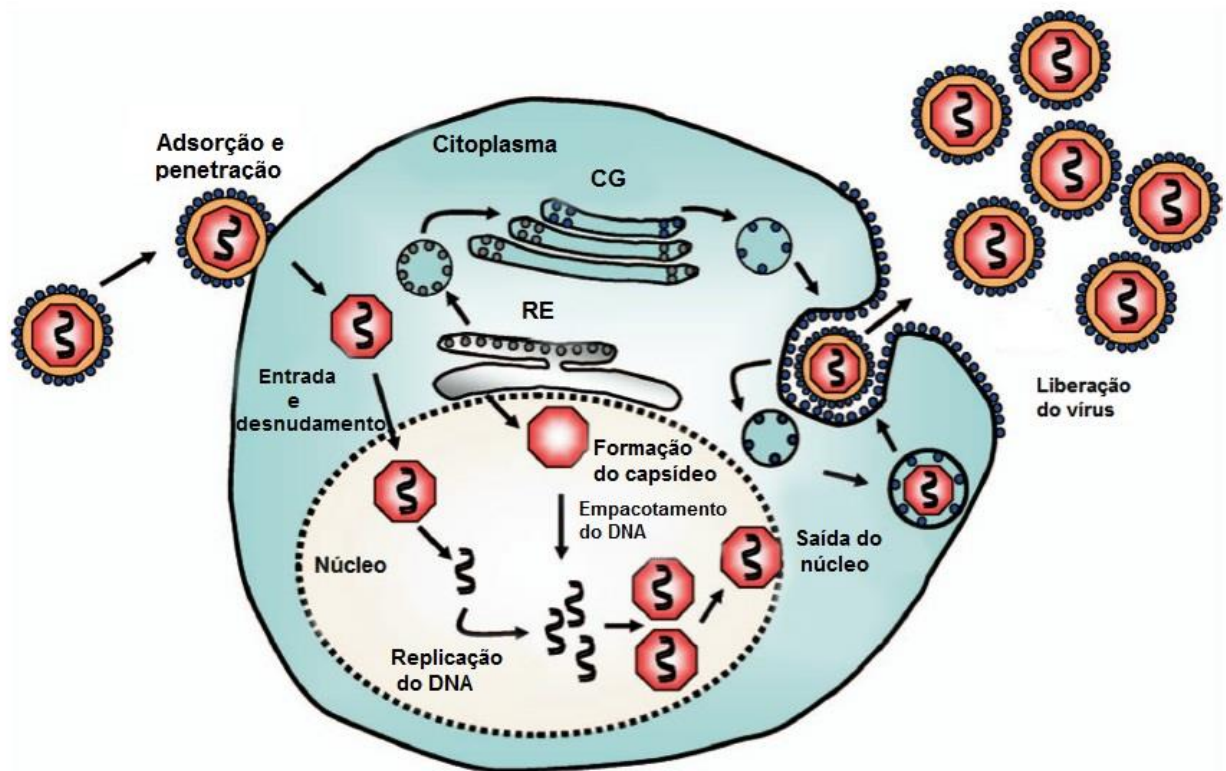


Figura 2. Esquema do ciclo replicativo de CMV. O CMV entra na célula através da fusão entre a membrana da célula hospedeira com o envelope viral e segue em direção ao núcleo celular, onde ocorrem os processos de replicação do DNA viral, empacotamento do DNA recém-formado e inserção do mesmo no nucleocapsídeo. Ao chegar no citoplasma da célula hospedeira, ocorre a formação do tegumento e envelope do vírus. O vírus termina por deixar a célula hospedeira pelo processo de brotamento. CG: Complexo de Golgi, RE: Reticulo endoplasmático (Adaptado de CROUGH, KHANNA, 2009).

1.1.2. Epidemiologia e Transmissão

A infecção pelo CMV é comum na maioria da população, variando de 50 a 90%, porém, a doença associada é um evento raro em indivíduos saudáveis (VAN DE POL *et al.*, 1999, CUNNINGHAM *et al.*, 2010). A sua prevalência varia em diversas partes do mundo, como mostram alguns estudos: 77% em Portugal (LOPO, *et al.*, 2011), 50,4% nos Estados Unidos da América (SHERI *et al.*, 2010), 64,2% na Itália (MATTIA *et al.*, 1991) e 57% na Austrália (SEALE *et al.*, 2006). Em relação ao Brasil, estudos demonstram uma prevalência de 81% na cidade do Rio de Janeiro (SUASSUNA *et al.*, 1995) e 90% na cidade de São Paulo (ALMEIDA *et al.*, 2001).

Indivíduos imunocomprometidos (como pacientes positivos para vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou submetidos a transplante de órgãos), prematuros, e recém-nascidos com infecção congênita por CMV constituem a população com maior risco de desenvolver doença grave por CMV (CROUGH, KHANNA, 2009). A transmissão do vírus ocorre por diversas vias, dentre elas: saliva, urina, contato sexual, via transplacentária, amamentação, via sanguínea, e por transplantes de órgãos e de células hematopoiéticas (STOWELL *et al.*, 2012).

Dentre essas, a transmissão congênita ocorre em até 1% das gestações, via placentária, podendo ocorrer em todo o período gestacionário, mas o maior risco de transmissão ocorre até a 20ª semana (FOWLER *et al.*, 1999). A maioria dos recém-nascidos é assintomática, porém com o passar do tempo podem surgir alterações, como perda auditiva, déficits cognitivos e outras sequelas neurológicas, sendo o CMV a principal causa infecciosa de alterações do sistema nervoso central. Nessa população, a infecção pelo CMV é mais frequente do que a infecção pelo vírus da rubéola, HIV e *Treponema pallidum* (DOLLARD, GROSSE, ROSS, 2007).

A transmissão do CMV por transplante de órgãos também possui grande relevância e já é descrita em diversos tipos de enxertos, como fígado, coração, pulmão, rim e também células hematopoiéticas. Em todos os casos, a infecção pelo CMV é uma importante causa de morbidade, gerando efeitos diretos e indiretos tanto no período pós-transplante, quanto no prognóstico desses indivíduos. Nesse contexto, a sua prevalência varia de acordo com o tipo de transplante realizado,

sendo em torno de 50-75% em transplantes de coração-pulmão, 22-29% em transplantes de fígado, 30% de células hematopoéticas e 8-32% em transplantes de rim. No período anterior à implementação da rotina profilática, a maioria das infecções causadas pelo CMV tinham início até os 3 primeiros meses após o transplante. Entretanto, atualmente uma das maiores preocupações é reativação tardia (do inglês, *late onset disease*), que ocorre normalmente após o término da profilaxia, em pacientes considerados de alto risco, como é caso da combinação doador soropositivo / receptor negativo (D+/R-) (SIMON, LEVIN, 2001; LJUNGMAN, HAKKI, BOECKH, 2011; AZEVEDON *et al.*, 2015, MARCELIN, BEAM, RAZONABLE, 2014).

No Brasil, o transplante de rim lidera as estatísticas dos transplantes de órgãos sólidos. De acordo com dados do Registro Brasileiro de Transplantes (RBT) da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), entre janeiro e setembro de 2016, houve 4.114 transplantes de rim, seguidos por 1.381 de fígado e 267 de coração (Tabela 2) (ABTO, 2016).

Tabela 2: Número de Transplantes de Órgãos Sólidos no Brasil entre janeiro e setembro de 2016 (Adaptado de ABTO, 2016).

Órgãos	Número de transplantes	Número de equipes
Coração	267	28
Fígado	1.381	58
Multivisceral	1	1
Pâncreas	23	16
Pâncreas/Rim	86	16
Pulmão	71	6
Rim	4.114	125
Total	5.940	

O número de transplantes renais realizados no Brasil ainda é insuficiente frente à quantidade de pacientes ativos na lista de espera, valor que chega a 19.279 indivíduos. Em 2016, 8.621 pacientes ingressaram nesse cadastro, e desses, 771

vieram a óbito antes do procedimento. Dentre os pacientes na lista de espera, 872 residem no estado do Rio de Janeiro, que apesar da sua relevância realizou apenas 256 transplantes renais no mesmo ano (Tabela 3) (ABTO, 2016).

Tabela 3: Número de transplantes de rim por estados com maior relevância, entre janeiro e setembro de 2016 (Adaptado de ABTO, 2016).

Estado	Número de transplantes renais
SP	1.537
RS	421
PR	413
MG	411
RJ	256
PE	202
SC	192
CE	191
DF	89
BA	82
GO	71
Brasil	4.114

1.1.3. Patogenia e reativação da infecção pelo CMV

A infecção primária em indivíduos imunocompetentes geralmente é assintomática e não estabelece doença. Porém, em alguns casos evolui para um quadro semelhante à mononucleose infecciosa, sendo muitas vezes indistinguível da infecção causada pelo vírus Epstein-Barr. Podem surgir alguns sintomas como febre, dor, linfadenopatia e hepatomegalia (CROUGH, KHANNA, 2009).

Assim como outros herpesvírus, após a infecção primária, o CMV permanece no organismo em uma forma latente ou como uma infecção crônica de baixo grau. Ainda não se sabe o local exato em que o vírus permanece nessa forma, porém já

foram descritos achados de material genético de CMV em monócitos e macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células endoteliais (SIA, PATEL, 2000; EMERY, 2012). Na infecção latente ocorre a diminuição da expressão dos genes virais, inibindo assim, a formação de novas partículas virais (SHENK, STINSKI, 2008). Esse tipo de infecção pode ser reativada tornando-se uma infecção lítica, devido a fatores do microambiente celular e em casos de imunodepressão, levando à disseminação do vírus e ao desenvolvimento da doença (KALEJTA, 2008). A infecção ativa é caracterizada pela presença de replicação viral, comprovada pela detecção de DNA viral no plasma sanguíneo e em outras matrizes biológicas. A doença por CMV é caracterizada pela presença de sinais e sintomas somados aos testes diagnósticos positivos (AZEVEDO *et al.*, 2015).

Já se sabe que há uma relação entre a infecção pelo CMV e a rejeição aguda ao enxerto. O processo de rejeição estabelece um ambiente pró-inflamatório que estimula a reativação do vírus latente, e o tratamento imunossupressor diminui a habilidade do sistema imune em controlar a replicação viral. Além disso, o CMV ativa a expressão de antígenos, resultando em um processo reativo ao enxerto e aumentando o risco de rejeição (RAZONABLE *et al.*, 2001).

A imunidade específica ao CMV tem um papel importante no desenvolvimento e na severidade da infecção, sendo o controle da replicação viral mediado pelas respostas CD4+ e CD8+, pelas células *natural killer* e anticorpos que reconhecem as glicoproteínas do envelope viral. Dessa forma, sabe-se que indivíduos que possuem a resposta imune de células T comprometida, apresentam maior risco de desenvolver doença grave pelo CMV (EMERY, 2012; KOTTON, KUMAR, CALIENDO, 2013). O uso de imunossupressores depletors de linfócitos, como por exemplo, a imunoglobulina antimocítica (ATG), micofenolato mofetil e muromonab CD3 (Orthoclone®-OKT3), inibem a reconstituição da resposta imune específica contra o CMV, principalmente se o uso for relacionado ao tratamento de rejeição aguda (RAZONABLE *et al.*, 2001). O desenvolvimento de novas drogas imunossupressoras inibidoras de mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) como o everolimus está associado a um menor risco de infecção e evolução para doença por CMV (BRENNAN *et al.*, 2011).

1.1.4. CMV e transplante renal

Devido ao estado imunossuprimido, indivíduos transplantados tornam-se susceptíveis a diversos agentes infecciosos. Sabe-se que a maior incidência de infecções nesses pacientes ocorre nos primeiros meses após o transplante, e em estudo realizado por Souza e cols. (2010), foram observadas as principais infecções no período pós-transplante: infecções do trato urinário, seguidas por infecções pelo CMV, infecções da incisão cirúrgica, infecções herpéticas, pulmonares e da corrente sanguínea. Concluiu-se também, que a incidência de infecções está relacionada principalmente ao tipo de imunossupressão.

Dentre essas, a infecção por CMV é habitualmente observada entre 40 a 80% dos pacientes transplantados renais e geralmente ocorre nos primeiros seis meses após o transplante, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade (MANFRO, NORONHA, SILVA FILHO, 2004; CORDERO *et al.*, 2012; LISBOA *et al.*, 2012). Dentre os pacientes transplantados renais, três padrões de infecção por CMV são observados, cada um com uma propensão diferente para causar doença clínica: A infecção primária desenvolve-se em pacientes soronegativos que receberam sangue ou órgão de doadores soropositivos para CMV (D+/R-), ou seja, a transmissão ocorre através do órgão transplantado, que carrega o vírus na forma latente. A infecção secundária ou reativação ocorre quando o vírus latente presente no receptor é reativado geralmente após o transplante, ou seja, paciente soropositivo e doador soronegativo (D-/R+). A superinfecção ou reinfecção ocorre quando ambos o receptor e doador são soropositivos (D+/R+), ocorrendo a reativação do vírus latente presente no enxerto ou a reinfecção por uma nova linhagem de CMV. Sabe-se que dentre esses padrões, a combinação D+/R- apresenta maior risco para desenvolvimento de doença grave pelo vírus. A doença sintomática ocorre mais frequentemente em pacientes que apresentam infecção primária, e ocorre em 40 a 60% desses pacientes (SIA, PATEL, 2000; HIRSCH *et al.*, 2013).

Devido à importância do *status* sorológico de doador/receptor, é necessário que no período pré-transplante seja realizada uma triagem sorológica através da identificação de anticorpos IgG, para se avaliar o risco de desenvolvimento da infecção/doença e o prognóstico desse paciente (KASISKE *et al.*, 2010).

A infecção pelo CMV pode resultar tanto em efeitos diretos como o desenvolvimento da doença, quanto indiretos devido à resposta imune estimulatória e ao estímulo antigênico desencadeado pelo vírus, gerando um aumento no risco de rejeição e disfunção do órgão transplantado (REQUIÃO-MOURA, MATOS, PACHECO-SILVA, 2015).

Já foram descritos alguns fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento da infecção pelo CMV, tais como: soronegatividade do receptor, uso de imunossuppressores e tipo de órgão transplantado. Os sinais e sintomas desenvolvidos por pacientes transplantados renais durante a infecção pelo CMV são variados. Em estudo realizado por Bhaduria e cols. (2012), foram analisados 74 pacientes soropositivos que receberam órgãos de doadores soropositivos, sendo relatados os seguintes sintomas: mal-estar, febre, diarreia, mialgia, vômito, disfunção hepática, envolvimento do trato gastrointestinal com esofagite, duodenite e pancreatite, assim como alterações hematológicas, com leucopenia e trombocitopenia. A rejeição ao órgão transplantado também é um fator que influencia no desenvolvimento da infecção, assim como o próprio vírus também pode estimular resposta imune ao órgão conforme citado acima (ABBOTT *et al.*, 2002; SAADI *et al.*, 2013).

1.1.5. Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por CMV pode ser realizado por diversos métodos, sendo os principais: histopatologia, cultura celular, sorologia, antigenemia e métodos moleculares. A histopatologia é uma técnica que busca a identificação das inclusões celulares características na infecção pelo CMV, porém possui baixa sensibilidade e requer um procedimento invasivo (biópsia tecidual). A cultura celular é um método

que visa o isolamento viral, porém é trabalhosa e não permite resultados positivos nos estágios iniciais da infecção, possuindo baixa sensibilidade. A sorologia para detecção de IgG deve ser realizada no período pré-transplante em ambos doador e receptor, com objetivo de se avaliar o *status* sorológico, já que o mesmo está relacionado com o prognóstico e risco de infecção pelo vírus. Já no período após a realização do transplante, a sorologia não é utilizada no monitoramento e acompanhamento desses pacientes, pois devido ao estado de imunossupressão, os mesmos não produzem anticorpos de maneira eficaz, fazendo com que os títulos de IgM não sejam detectados precocemente, afetando a sensibilidade do teste e gerando resultados falso-negativos (STORCH, 2000; SEED *et al.*, 2009, KOTTON, 2013).

Um ponto importante no diagnóstico da infecção pelo CMV nesses pacientes é a quantificação da carga viral no plasma e em outros fluidos corporais. Já se sabe que através da carga viral é possível a identificação dos indivíduos que possuem maior risco de desenvolver doença pelo vírus, a avaliação da resposta terapêutica, o reconhecimento de resistência a drogas, também estando relacionada com a severidade da doença e o aparecimento de sintomas (BRENNAN, 2001; TOYODA *et al.*, 1997; ROBERTS *et al.*, 1998).

Com o objetivo de se evitar a infecção pelo CMV, dois tipos de terapias antivirais podem ser administradas: profilática e preemptiva. A terapia profilática baseia-se na administração dos antivirais como, por exemplo, ganciclovir intravenoso e valganciclovir oral, antes que o paciente se submeta ao transplante. A profilaxia vem sendo substituída pela estratégia preemptiva, principalmente devido a casos de resistência já relatados, exposição desnecessária aos medicamentos de alguns indivíduos, maior geração de custos e a reativação tardia do vírus, que normalmente ocorre após o término da terapia. Já a terapia preemptiva baseia-se no monitoramento da replicação viral, através de técnicas diagnósticas que permitam a quantificação da carga viral, sendo utilizado o ganciclovir intravenoso como padrão ouro. Dessa forma, quando a carga viral detectada atinge certo limiar considerado de alto risco para o desenvolvimento de doença por CMV, o tratamento antiviral é iniciado apenas nos pacientes que atingiram esse limiar, evitando que pacientes de baixo risco sejam medicados de forma desnecessária (SOLANO *et al.* 2013; MUNOZ-COBO *et al.*,2013). Nesses pacientes, a terapia preemptiva e o

acompanhamento da reativação e/ou infecção pelo CMV são o padrão ouro para monitoramento desses pacientes. Dessa forma, novas técnicas que possibilitassem essa quantificação começaram a ser adotadas. A antigenemia e a PCR quantitativa (em Tempo Real) (qPCR) são as técnicas mais utilizadas para esse fim.

A antigenemia é um método que consiste na detecção da fosfoproteína viral pp65 em leucócitos infectados pelo CMV através do uso de anticorpos monoclonais para a pp65. A técnica permite a quantificação da carga viral, expressando resultados em número de células positivas/número de leucócitos. Além disso, é um método rápido, permitindo que resultados sejam liberados em curto prazo (menos de 24h) e útil para se diagnosticar quadros clínicos associados à infecção viral, possibilitando assim, o início da terapia preemptiva e o monitoramento da resposta à terapia (BALDANTI, LILLERI, GERNA, 2008). Entretanto, a técnica possui algumas desvantagens, como o processamento da amostra em curto prazo (até 6h), necessitando de logística adequada, falta de padronização do método e necessidade de profissionais com treinamento adequado (GANDHI, KHANNA, 2004).

Por sua vez, a qPCR é uma técnica molecular que vem sendo utilizada como método padrão no diagnóstico, monitoramento da carga viral e acompanhamento desses pacientes no período pós-transplante. A técnica baseia-se na quantificação em tempo real do produto amplificado, através da emissão de fluorescência emitida pelos reagentes ligados a cada fragmento amplificado de DNA.

Atualmente, a técnica pode ser baseada em 2 metodologias principais: detecção da fluorescência emitida pelo corante SYBR Green ou pelo uso de sondas, como por exemplo a sonda TaqMan®. O SYBR Green é uma cianina assimétrica, que emite um sinal de fluorescência ao ligar-se de forma inespecífica às moléculas de DNA dupla-fita geradas a cada ciclo de reação (NYGREN, SVANVIK, KUBISTA, 1998). Por outro lado, as sondas consistem em moléculas de DNA marcadas com fluoróforos que se hibridizam de forma específica à regiões do DNA alvo. As sondas possuem em sua estrutura, um fluoróforo ligado no terminal 5' (repórter) e na extremidade 3', uma molécula chamada *quencher*, que absorve a energia luminosa emitida pelo repórter quando estão mantidos próximos pela estrutura do oligonucleotídeo. Conforme o processo de amplificação ocorre, a enzima *Taq Polimerase*, através da sua atividade exonuclease, cliva a extremidade 5' da sonda,

deslocando-a para longe do *quencher* e dessa forma, a emissão de fluorescência passa a ser detectada pelo equipamento (HEID *et al.*, 1996, HOLLAND *et al.*, 1991). No que se refere à quantificação da carga viral, ambos possibilitam essa análise, porém alguns estudos demonstram maior especificidade pelo uso das sondas. Entretanto, esta é uma metodologia de alto custo, fator relevante no cenário dos serviços públicos de saúde, principalmente de países emergentes, fazendo com que os mesmos restrinjam o diagnóstico pelo uso da antigenemia. A metodologia que utiliza o corante SYBR Green possui a vantagem de ser uma técnica com alto custo-benefício. O corante tem a característica de ser um intercalante inespecífico de DNA dupla fita, podendo se intercalar tanto em dímeros de *primers* como em produto amplificado. Dessa forma, o seu uso requer um desenho cauteloso do ensaio e de todos os detalhes que o envolvem, como o desenho de *primers* e análise da curva de *melting*, para que se possa garantir uma maior especificidade da técnica (HEID *et al.*, 1996, WITTER *et al.*, 1997).

Durante os ciclos iniciais da qPCR, o sinal emitido é fraco, e não pode ser distinguido do *background*. Conforme o produto começa a se acumular, o sinal começa a ser detectado e aumenta exponencialmente. Após essa fase o nível do sinal tende a se estabilizar, dando origem a fase platô. Dessa forma, a intensidade do sinal gerado reflete a quantidade do produto formado. A quantificação do DNA presente na amostra ocorre através da análise do CT (*Cycle Threshold*). Este valor demonstra a quantidade de ciclos necessários para que o sinal emitido pela amostra ultrapasse o limiar de detecção (*threshold*), abaixo do qual as fluorescências emitidas não são consideradas (Figura 3) (KUBISTA *et al.*, 2006).

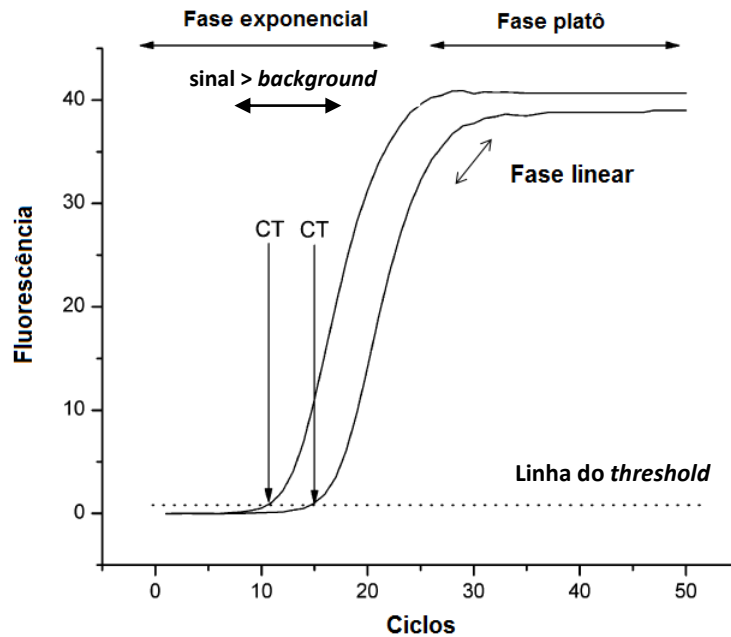


Figura 3. Curva de amplificação de uma reação de PCR em Tempo Real. No início da reação, o sinal emitido é fraco e apenas após alguns ciclos, o produto começa a se acumular de forma exponencial, chegando por último à fase platô. Linha do threshold: limiar abaixo do qual a fluorescência emitida não é considerada. CT: cycle threshold. (Adaptado de KUBISTA *et al.*, 2006).

A análise dos dados consiste principalmente no gráfico de amplificação, onde é possível observar os CTs de cada amostra (para determinação de amostras positivas ou negativas) e a curva de dissociação ou curva de *Melting* (quando o SYBR Green é utilizado). Através da curva de dissociação, são obtidos os valores da temperatura de *melting* (T_m), que refletem a temperatura onde 50% dos fragmentos amplificados estão dissociados, e dessa forma, gerando uma queda na fluorescência detectada. Dessa forma, é possível detectar amplificações inespecíficas e formações de dímeros de *primers*.

Para realizar uma quantificação absoluta, como por exemplo a carga viral, controles positivos com concentrações conhecidas devem ser adicionados a cada reação para que a partir desses, uma curva-padrão seja construída. A análise dos CTs referentes a cada concentração dos controles positivos nos pontos da curva e sua comparação com os obtidos em cada amostra permite definir, por exemplo, o número de cópias virais em determinada amostra clínica. Outro dado fornecido pela curva-padrão é o coeficiente angular da reta (*slope*), valor que será utilizado no cálculo da eficiência da reação, e deve permanecer em torno de -3,3, referente a

uma eficiência de 100%, valor compatível com uma reação em que o número de moléculas dobrou a cada ciclo, conforme o esperado (TOO, 2003; KUBISTA *et al.*, 2006).

Diversos métodos estão disponíveis para o diagnóstico do CMV. Porém, até 2009 ainda não havia um padrão universal para ser utilizado nos ensaios, principalmente em relação às técnicas moleculares, levando muitos laboratórios a desenvolverem metodologias *in house*, gerando certa instabilidade e disparidade entre resultados de mesmas amostras quando realizados em diferentes unidades. Assim, cada instituição desenvolvia seus próprios valores de *cut-off* para iniciar a terapia e realizar o acompanhamento dos pacientes (TREMBLAY *et al.*, 2015). Por isso, em 2010 a Organização Mundial de Saúde (OMS) em parceria com o *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) e apoiado pelo *WHO Expert Committee on Biological Standardization*, desenvolveu um padrão internacional para calibração de testes comerciais e desenvolvidos *in house*. Esse padrão consiste em uma amostra clínica da cepa Merlin, liofilizada com títulos de 5×10^6 IU/mL e tem sido utilizado em diversos estudos, mostrando grande utilidade na harmonização dos resultados (FRYER *et al.*, 2010). A sua utilização torna mais possível a padronização dos resultados, porém já foi demonstrado um nível de variação ainda persistente, principalmente entre resultados positivos, podendo variar de $1.5 \log_{10}$ IU/mL, até $2.82 \log_{10}$ IU/mL. Essas variações já são suficientes para impactar o manejo desses pacientes, principalmente se resultados de diferentes ensaios e de instituições forem utilizados (PREIKSAITIS *et al.*, 2016). Dessa forma, apesar dos avanços alcançados, a harmonização e padronização dos testes moleculares para CMV ainda são uma questões a serem definidas.

1.1.6. qPCR no diagnóstico da infecção por CMV

Como citado acima, na infecção pelo CMV, a carga viral está diretamente relacionada com os sinais e sintomas desenvolvidos, e conseqüentemente, com a evolução clínica do paciente (ROBERTS *et al.*, 1998). Porém, apesar de existirem

diversos métodos diagnósticos para a infecção, a maioria destes possui algumas desvantagens em relação à qPCR.

A antigenemia, apesar de ser mais sensível e rápida que outras técnicas, como por exemplo a cultura convencional, possui alguns pontos negativos em relação à qPCR. Dentre eles, pode-se citar a baixa sensibilidade para detectar infecção no estágio inicial, necessidade de processamento imediato da amostra, demanda de tempo e não se trata de uma técnica automatizada, necessitando de pessoal técnico qualificado (CALIENDO *et al.*, 2000). Leruez-Ville e cols., (2003) e Beckmann e cols., (2011) relataram que a qPCR permite detectar a presença do vírus mesmo em estágios iniciais, o que permite uma intervenção terapêutica precoce, detecção do vírus em maior período de tempo durante o monitoramento pós-tratamento, assim como uma menor sensibilidade para a antigenemia. Além disso, a qPCR é uma técnica fácil de ser realizada, sendo uma tecnologia confiável e de alto custo-benefício. A técnica também utiliza pequena quantidade de plasma, sendo possível o seu armazenamento. Já a antigenemia requer maior quantidade de amostra e seu processamento imediato (LERUEZ-VILLE *et al.*, 2003, PANG *et al.*, 2009; KRAFT *et al.*, 2012).

Os testes moleculares e quantitativos (do inglês, *quantitative nucleic acid test*, qNAT) são mais recomendados para diagnóstico e monitoramento da infecção e doença pelo CMV, pois são mais passíveis de padronização, principalmente com a disponibilidade do padrão internacional desenvolvido pela OMS. No que se refere a antigenemia, ainda não há um padrão semelhante disponível, tornando-a a opção de escolha em determinados centros por questões práticas como o seu custo reduzido, volume de amostras testadas em cada centro e habilidade da equipe técnica (KOTTON *et al.*, 2013).

Ademais, o uso da metodologia SYBR Green, torna a qPCR uma técnica simples quando comparada ao uso das sondas, já que as mesmas acrescentam complexidade ao ensaio, tanto no desenho dos *primers*, quanto nos parâmetros inerentes ao método. Estudos já demonstraram que o SYBR Green é uma alternativa segura, de baixo custo e específica, quando analisada a curva de *melting* dos produtos amplificados (SHAHZAMANI *et al.*, 2011). Além disso, artefatos podem ser identificados nas reações de qPCR, principalmente em ciclos de amplificação acima do CT 30. Ainda, mutações podem ocorrer nas regiões-alvo a serem

amplificadas e não serão detectadas pelas sondas específicas. O uso do SYBR Green e a análise da curva de *melting* permitem que esses artefatos e produtos com mutações sejam facilmente identificados (KARLSEN *et al.*, 1995; ALDEA *et al.*, 2002; GIBELLINI *et al.*, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

A doença renal crônica (DRC) vem crescendo em todo o mundo e nela ocorre uma perda lenta, progressiva e irreversível das funções renais (HAMER, EL NAHAS, 2006). De acordo com a *National Kidney Foundation* (NKF) a DRC é caracterizada, por dano renal por mais de 3 meses, confirmado por alterações patológicas através de biópsia ou por marcadores de dano renal, como proteinúria com ou sem alterações no ritmo de filtração glomerular (RFG), ou por RFG abaixo de 60 mL/min/1,73 m² por mais de 3 meses com ou sem danos renais (K/DOQI, 2002).

A doença progride de forma que o indivíduo pode evoluir para insuficiência renal leve, moderada ou grave. O último estágio caracteriza a fase terminal da DRC, e culmina evoluindo para falência renal. O RFG é baixo (<15 mL/min/1,73m²) e o paciente encontra-se intensamente sintomático, necessitando de alguma terapia renal substitutiva como a diálise ou o transplante (K/DOQI, 2002). De acordo com estudo realizado entre 1999 e 2004 pelo *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), 13% da população adulta dos Estados Unidos da América desenvolveram DRC entre os estágios iniciais da doença (SAYDAH *et al.* 2007). Já no Brasil, o Relatório do Censo Brasileiro de Diálise Crônica revelou que em 2012 haviam 97.586 pacientes em diálise no país (SESSO *et al.*, 2014) e, de acordo com o Registro Brasileiro de Transplantes da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO), em setembro de 2016, havia 19.279 pacientes ativos na fila do transplante renal (ABTO, 2016).

Para os pacientes candidatos ao transplante renal, o procedimento representa um tratamento durável com benefícios relativos à sobrevida, qualidade de vida, custos e efetividade, em relação à diálise (CUNHA *et al.*, 2007). O Brasil atualmente possui o maior sistema público de transplantes do mundo, arcando com cerca de 95% do tratamento (MEDINA-PESTANA, 2004). Porém, o aumento da incidência de DRC e do conhecimento dos benefícios do transplante, aliadas à escassez de

órgãos doados, ocasiona aumento na fila de espera por um órgão e maior tempo de espera.

Em relação ao transplante renal, sabe-se que a maior causa de perda do órgão transplantado está relacionada à rejeição aguda e às infecções desenvolvidas após o procedimento. Devido à terapia imunossupressora administrada para evitar-se o processo de rejeição, esses pacientes tornam-se susceptíveis a diversas infecções oportunistas, principalmente as virais. Nesse contexto, sabe-se que a infecção sintomática pelo CMV acomete entre 20-60% de todos os pacientes submetidos ao transplante renal, seja por infecção primária ou por reativação do vírus latente no organismo ou no enxerto, se tornando uma importante causa de mortalidade e morbidade, podendo levar a perda do órgão transplantado (HIRSCH *et al.*, 2013; CORDERO *et al.*, 2012).

Nesses pacientes, uma importante ferramenta no acompanhamento da infecção pelo CMV é o monitoramento da carga viral. Através dela é possível diferenciar infecção por CMV de doença ativa, além de ter intensa correlação com os sinais e sintomas desenvolvidos por esses pacientes. A carga viral também é de extrema importância para o monitoramento do processo de rejeição e na manutenção da terapia imunossupressora. Dessa forma, se faz necessário o desenvolvimento de técnicas diagnósticas que possibilitem a quantificação da carga viral. Uma técnica que vem sendo bastante utilizada é a qPCR. A técnica, além de possibilitar quantificação do DNA amplificado a cada ciclo de amplificação, oferece outras vantagens sobre as técnicas diagnósticas, podendo-se citar: alta sensibilidade e especificidade, melhor custo-benefício, necessitar de pequena quantidade de amostra, com possibilidade de armazenamento, não sendo necessário o processamento imediato (LERUEZ-VILLE *et al.*, 2003, KRAFT *et al.*, 2012). Além disso, a possibilidade de se utilizar o reagente SYBR Green como metodologia de escolha, gera uma redução nos custos do teste sem que haja perda de sensibilidade e especificidade. Esse fato é de extrema importância principalmente no cenário atual do setor público de saúde brasileiro.

Desta forma, é fundamental o desenvolvimento de técnicas diagnósticas que sejam sensíveis, específicas, rápidas e de baixo custo e que possibilitem a detecção da infecção, assim como o monitoramento da carga viral ao longo do período pós-transplante, de forma a se garantir uma melhor qualidade de vida a esses pacientes,

além de permitir uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho é a padronização da técnica de qPCR baseada na metodologia SYBR Green, para diagnóstico e acompanhamento da infecção pelo CMV em pacientes transplantados renais e que futuramente possa ser utilizado como protocolo padrão no Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP).

3.2. Objetivos Específicos

- A partir de amostras sabidamente positivas, otimizar a PCR convencional para obtenção do fragmento de DNA viral
- Desenvolver a técnica de qPCR baseada na metodologia SYBR Green, para diagnóstico da infecção pelo CMV em pacientes transplantados renais
- Avaliar os parâmetros de sensibilidade e especificidade da técnica desenvolvida
- Comparar os resultados obtidos pelo protocolo desenvolvido, com os obtidos através de um *kit* comercial

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com seres humanos da Universidade Federal Fluminense (UFF), sob CAAE nº 18768213.1.0000.5243, e possui código de cadastramento na Coordenação de Pesquisa do INI de número 1131. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (em anexo) foi aplicado pela equipe do Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas/Hospital Universitário Antônio Pedro - UFF (LAMAP/HUAP -UFF) para coleta das amostras de plasma que foram cedidas para realização deste projeto.

4.2. Desenho do estudo

Inicialmente, foi realizada a otimização da PCR convencional utilizando-se *primers* descritos na literatura, específicos para regiões conservadas do CMV. Em seguida, foi realizado o processo de clonagem, seguido da extração, quantificação e purificação do produto obtido. Foi realizado sequenciamento do plasmídeo, e em seguida, a obtenção da curva padrão para a qPCR através da diluição dos plasmídeos. Foram analisados os seguintes parâmetros: sensibilidade, especificidade, limite de detecção e linearidade da curva. Por fim, foi realizada comparação dos resultados obtidos em 9 amostras de plasma de pacientes com os obtidos pelo *kit* comercial Kit Master CMV (XGEN) (Fig. 4).

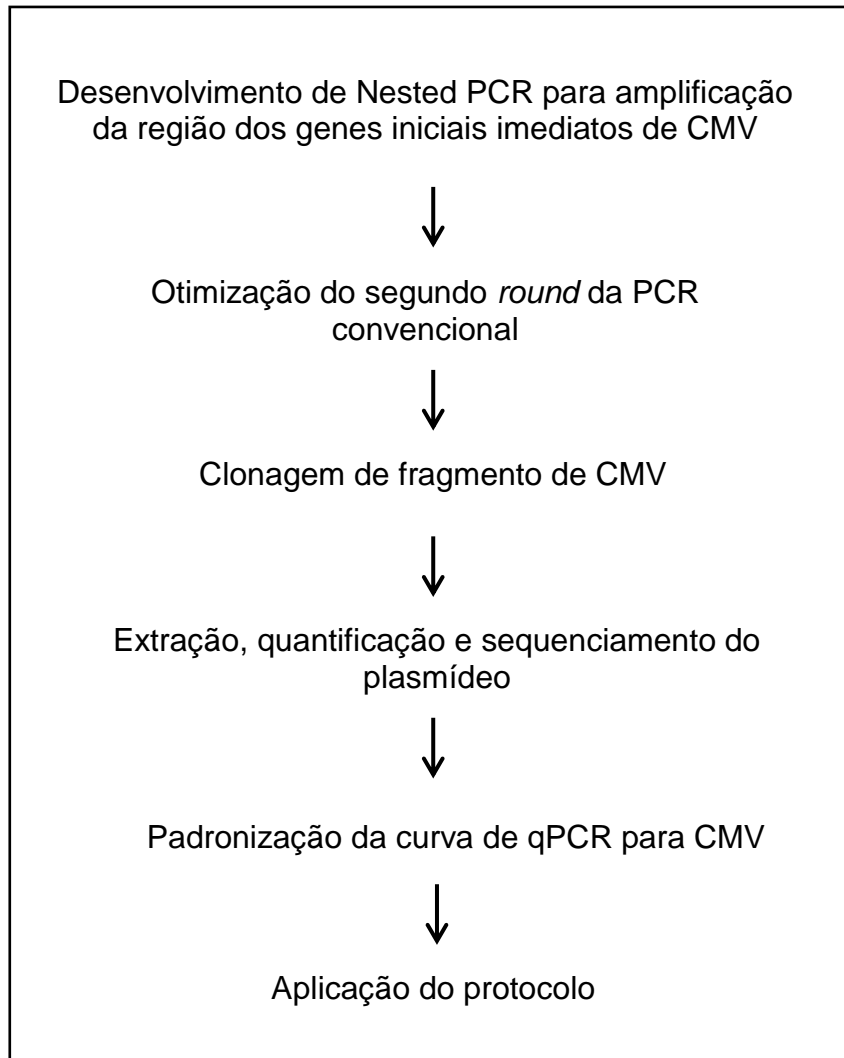


Figura 4: Fluxograma representativo da metodologia.

4.3. Material, procedimentos e técnicas

4.3.1. Desenvolvimento de *Nested* PCR para amplificação da região dos genes iniciais imediatos de CMV

Inicialmente, foi realizada uma *Nested* PCR utilizando *primers* externos (5'-CTG CCC CGA TAA TCG GC - 3'; 5' AGT ACT GAC GGC CGT CTC - 3') no primeiro *round*, e *primers* internos (5'- GAT CCG ACC CAT TGT CTA AG-3'; 5'- GGC AGC TAT CGT GAC TGG GA-3') já descritos na literatura (MENDEZ *et al.*, 1998). Ambos os *primers* são específicos para a região dos genes iniciais imediatos de CMV e foram utilizadas 2 amostras de pacientes transplantados renais sabidamente positivas para CMV. Para o primeiro *round*, foi utilizada *Taq* DNA Polimerase (Thermo Scientific), dNTP's (0,2 mM), MgCl₂ (1,5 mM), solução tampão da enzima (1x), 50 ng de DNA, 10 pmol de cada *primer* externo e água suficiente para um volume final de 20 µL de reação. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 35 ciclos (94°C por 30 segundos, para desnaturação do DNA genômico, 58°C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 72°C por 45 segundos para a extensão) e 72°C por 10 minutos, para a extensão final, em termociclador Axygen MaxyGene.

Para o segundo *round* foi realizado um gradiente de temperatura entre 57°C e 63°C. A reação foi realizada nas mesmas concentrações e condições do primeiro *round* utilizando 2 µL da primeira reação, em termociclador Axygen MaxyGene. Em seguida foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. O produto amplificado foi visualizado após coloração com brometo de etídeo, sob luz ultravioleta.

4.3.2. Clonagem de fragmento de CMV

a. Inserção do fragmento em plasmídeo

O produto amplificado pela *Nested* PCR foi purificado com o objetivo de retirar oligonucleotídeos e *primers* não ligados. Para isso utilizou-se o *kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Foi dado seguimento realizando a ligação do produto ao plasmídeo, e para isso comparamos a eficiência de dois kits comerciais: pGEM®-T *Vector* (Promega) e TOPO® TA *Cloning® Kit for Sequencing* (Invitrogen). As ligações foram realizadas segundo orientações dos fabricantes gerando os plasmídeos recombinantes.

b. Transformação de bactérias

Para a seleção dos insertos, os plasmídeos recombinantes foram inseridos nas linhagens BL-21 e DH-5 α de bactérias *Escherichia coli*. Para isso, 2 μ L do produto de ligação foram adicionados em tubo contendo 100 μ L de bactérias competentes, e em seguida mantidas no gelo por 20 min. Após esse período foi realizado choque térmico por imersão em banho-maria à 42°C por 50 s.

Após esse procedimento as bactérias foram mantidas em gelo por 2 minutos. Em seguida adicionou-se 500 μ L de meio SOC (triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glicose 20 mM), e a cultura de bactérias foi mantida sob leve agitação por 1 h a 37°C. As bactérias foram, em seguida, semeadas em duplicata em placas de ágar LB (Luria Bertani) contendo ampicilina (50 μ g/mL), isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) (100 mM) e substrato X-Gal (40 mg/mL). A semeadura ocorreu da seguinte forma: foram semeados 100 μ L da cultura de bactérias com auxílio de alça de Drigalsky em uma placa e em seguida, foi realizada centrifugação do restante da cultura a 1431 g por 1 minuto, sendo o *pellet* ressuspendido no meio remanescente e então semeado em outra placa. As placas foram mantidas em estufa a 37°C overnight.

c. Seleção das bactérias transformadas

As bactérias foram selecionadas através da técnica de *blue/White screening*, onde através da coloração produzida pelas bactérias é possível identificar as que possuem o plasmídeo com o inserto. Nesse caso, foram selecionadas as colônias de cor branca, as quais foram semeadas em 2 mL de caldo LB com ampicilina (50µg/mL), e mantidas sob agitação à 37°C, overnight. Após, realizou-se uma PCR convencional para comprovação da presença do inserto. O volume de 5 µl das colônias crescidas em meio LB foram adicionadas a 5 µl de água e fervidas a 95°C e 1 µL de bactéria lisada foi submetido ao segundo *round* de amplificação nas mesmas condições descritas acima (item 4.3.1).

d. Extração, quantificação e sequenciamento do plasmídeo

Foram selecionadas 2 culturas que apresentaram a presença do inserto (confirmado pela PCR positiva) para a extração do plasmídeo das bactérias. Foi utilizado *kit Pure Yield Plasmid Miniprep System* (Promega), segundo orientações do fabricante e em seguida o plasmídeo foi quantificado por espectrofotometria em aparelho Denovix (UNISCIENCE). O sequenciamento do fragmento inserido foi realizado utilizando-se o *kit Big Dye Terminator v1.1. Cycle Sequencing* (Thermo Fischer) seguindo orientações do fabricante. A corrida foi realizada no equipamento ABI 3130 (Abbott) e as sequências obtidas foram comparadas ao *GenBank do National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando a ferramenta *Blast*.

4.3.3. Padronização da curva de qPCR para CMV

A partir da quantificação do plasmídeo, realizou-se a diluição do mesmo para a concentração de 1 ng/µL e, a partir desta, foi realizada uma diluição seriada (1:10), para obter valores e concentrações finais: 1 ng/µL, 10⁻¹ ng/µL, 10⁻² ng/µL, 10⁻³ ng/µL, 10⁻⁴ ng/µL e 10⁻⁵ ng/µL.

A PCR em tempo real foi realizada em triplicata, utilizando-se 5µL de DNA proveniente de cada diluição, ao qual acrescentou-se 10 µL de SYBR Mix (Applied Biosystems|Thermo Fisher), 1 µL de cada *primer* interno (10 pmol) completando-se com água para um volume final de 20 µL. Como controle negativo, foi utilizado Mix da reação, adicionando-se o volume de 5µL de água. A reação foi conduzida em aparelho termociclador (7500 Real-Time PCR System/Applied), nas seguintes condições: 1 ciclo (50°C por 2 min, 95°C por 10 min), seguido de 40 ciclos (95°C por 15 s e 60°C por 1 min).

O cálculo do número de cópias foi feito utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Número de cópias} = \frac{X \text{ ng} \times 6,022 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{N \times 650 \text{ g/mol} \times 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

Onde:

X ng: quantidade de DNA em nanogramas (ng)

6,022 x 10²³ moléculas/mol: número de Avogadro

N: tamanho do amplicon em pares de base

650 g/mol: peso molecular de 1 par de base de DNA dupla fita em Daltons

1x10⁹: fator de conversão para nanogramas

Fonte: <http://www.idtdna.com/>

4.4. Aplicação do protocolo

O protocolo foi testado em 9 amostras de plasma de pacientes submetidos ao transplante renal no HUAP e o resultados comparados com os obtidos usando as mesmas amostras utilizando-se um kit comercial.

4.4.1. Coleta das amostras

Dos 32 transplantes realizados em 2014 no HUAP, foram coletadas amostras de plasma de cada indivíduo em diferentes períodos após o transplante pela equipe do LAMAP/HUAP. As amostras foram cedidas pela equipe do do LAMAP/HUAP. O sangue total foi coletado em tubo contendo EDTA e em seguida centrifugado a 2500 rpm. O plasma foi aliquoteado e armazenado a -80°C até o momento do desenvolvimento do protocolo. Após realização da antigenemia pela equipe do LAMAP/UFF, 9 amostras com antigenemia positiva, independente do sexo e idade, foram selecionadas para aplicação do protocolo e comparação com *kit* comercial.

4.4.2. Extração de DNA das amostras

O DNA das amostras de 9 pacientes foi extraído utilizando-se o *kit* QIAamp® *DNA Mini Kit* (QIAGEN), seguindo-se as orientações do fabricante e armazenado a -20°C.

4.4.3. PCR em Tempo Real das amostras

Em seguida, realizou-se a qPCR das amostras de DNA dos pacientes, utilizando-se as mesmas condições padronizadas na obtenção da curva padrão (item 4.4.4.)

4.4.4. Comparação com kit comercial

As amostras de DNA dos pacientes foram submetidas à reação de amplificação utilizando o kit comercial *Kit Master CMV* (XGEN), baseado na metodologia TaqMan® e sendo seguidas as orientações do fabricante.

5. RESULTADOS

5.1. Desenvolvimento de *Nested* PCR: otimização do segundo *round* da PCR convencional

Após algumas tentativas não foi possível reproduzir o protocolo de MENDEZ e cols. (1998) mesmo alterando-se a concentração de cloreto de magnésio e a temperatura de anelamento. Assim, *primers* externos à região almejada foram sintetizados para o desenvolvimento de uma *Nested* PCR. Inicialmente foi realizado o primeiro *round* da PCR utilizando-se os *primers* externos, e em seguida fez-se a otimização do segundo *round* utilizando-se os *primers* internos. A partir da PCR realizada com gradiente de temperatura, pode-se concluir que a melhor temperatura de anelamento para os *primers* internos foi de 57°C (Fig. 5). Dessa forma as amostras de DNA isoladas do plasma de 2 pacientes sabidamente positivos apresentaram resultado positivo, gerando um fragmento de 150 pb (Fig. 6).

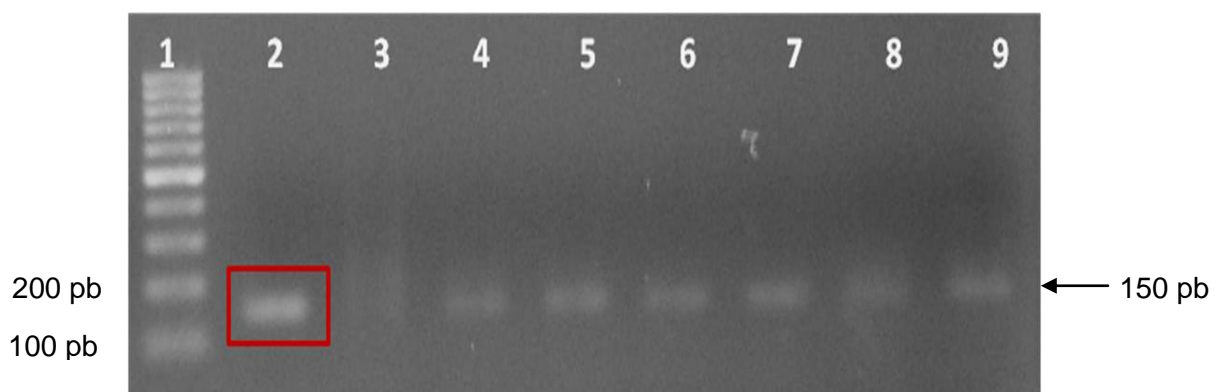


Fig. 5. Análise da melhor temperatura de anelamento. Gel de agarose 1,5% do produto de PCR Gradiente para CMV. 1: padrão de peso molecular 100pb; 2-9 : Gradiente de temperatura: 57°C - 63°C. Pode-se observar a formação de um fragmento 150 pares de base e de maior intensidade na temperatura de 57°C.

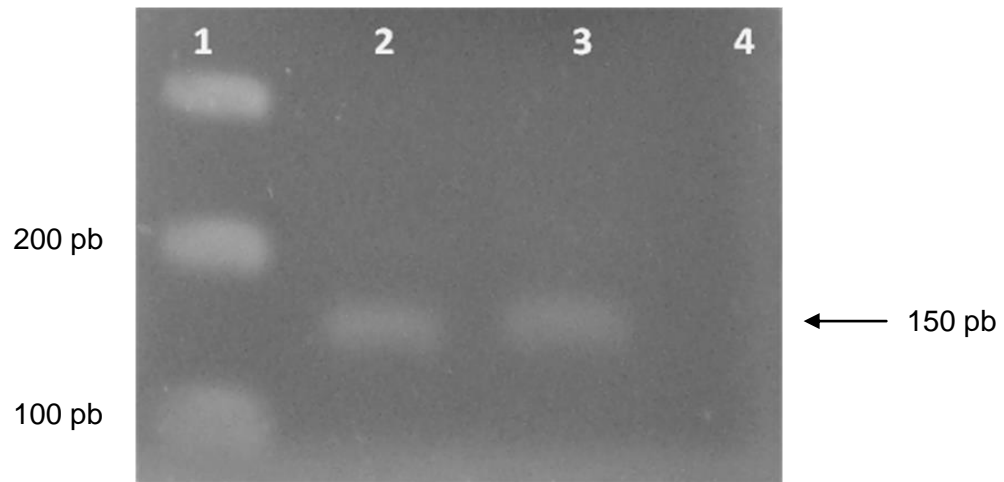


Fig. 6: Gel de agarose 1,5% do produto de PCR de 2 amostras sabidamente positivas. 1: padrão de peso molecular 100pb, 2: paciente 1, 3: paciente 2, 4: branco. Pode-se observar a formação de bandas de 150 pb após amplificação das 2 amostras de pacientes.

5.2. Clonagem de fragmento de CMV

Na comparação entre os kits de clonagem e linhagens de *E.coli*, o kit pGEM[®]-T Vector (Promega) e a linhagem BL-21 obtiveram um maior número de colônias, sendo então o *kit* e a linhagem utilizados a partir desse momento.

Após a transformação, foi feito PCR convencional das colônias para comprovação da inserção do fragmento no plasmídeo. Pode-se observar que houve amplificação de um fragmento de 150 pb aproximadamente, o que mostra que o processo de clonagem foi eficiente (Fig. 7).

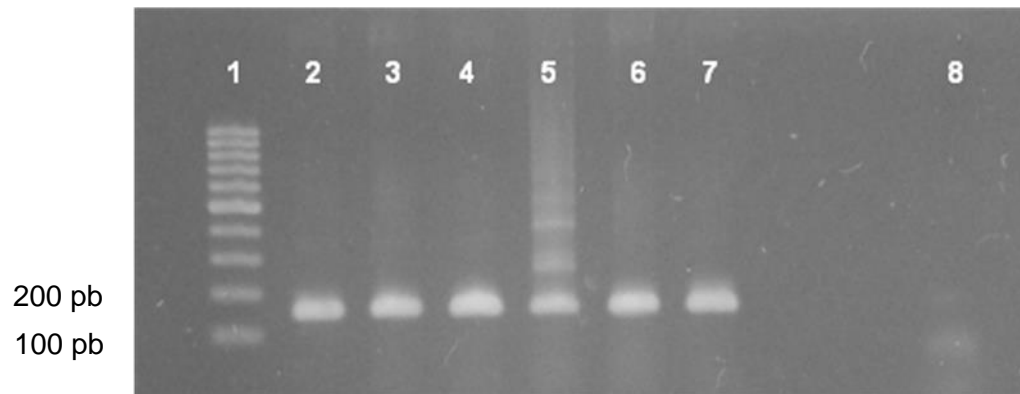


Figura 7. Comprovação da transformação das bactérias. Gel de agarose 1,5 % do produto de amplificação. 1:padrão de peso molecular. 2,3,4,5,6 e 7: Produto de PCR das colônias transformadas. 8: Branco.

5.3. Sequenciamento do produto de PCR do clone

O produto da PCR realizada a partir do plasmídeo recombinante foi purificado e sequenciado, sendo posteriormente analisado no banco de dados GenBank. Após a análise, 100% (*query cover*) da sequência mostrou 99% de similaridade com Herpes Virus-5 Humano (CMV).

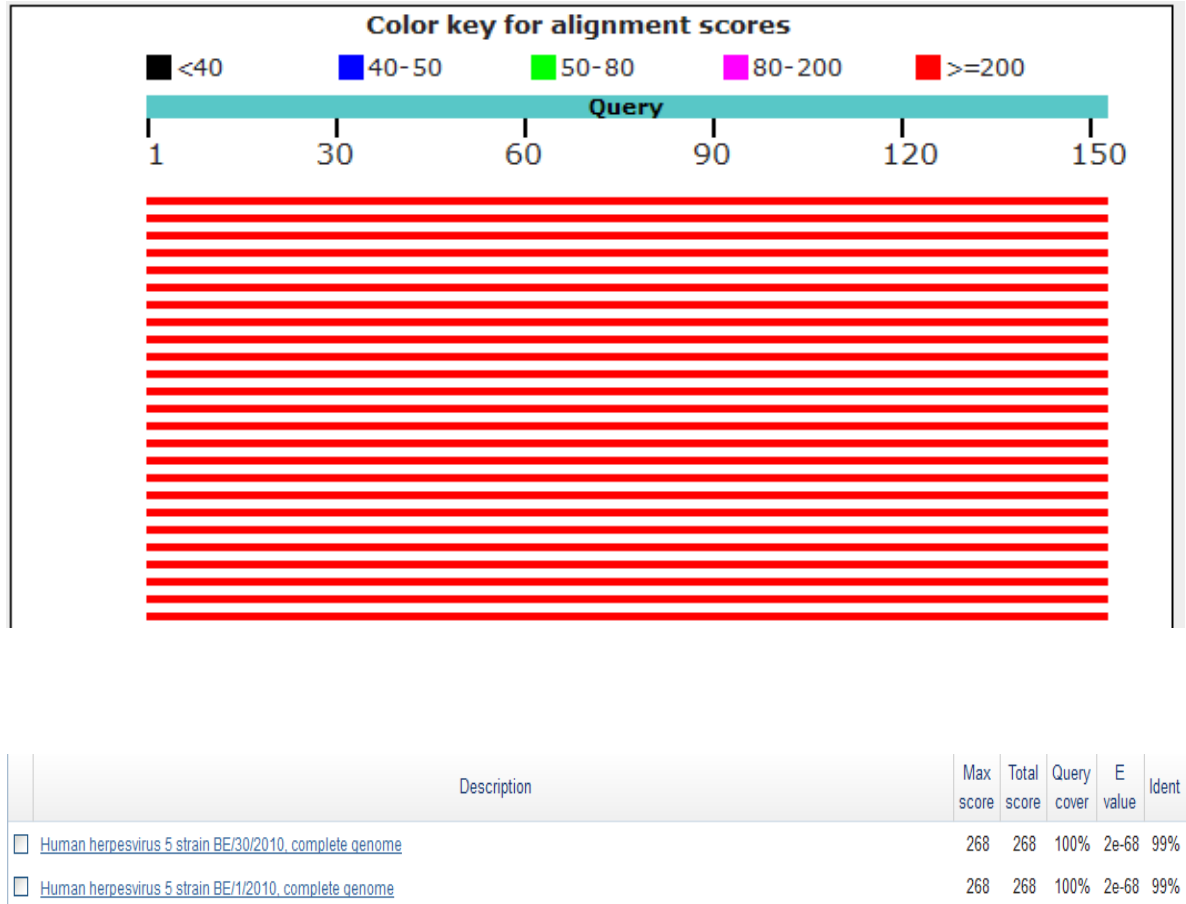


Figura 8. Dados do alinhamento das sequências obtidas após o sequenciamento. O sequenciamento mostrou 99% de identidade com herpesvírus humano 5 (HHV-5), mostrando especificidade dos primers.

5.4. Estabelecimento da curva padrão para qPCR

A linearidade obtida nas diferentes diluições da curva de quantificação absoluta demonstra a estabilidade da reação que se mantém até a diluição de 10^{-5} ng/mL. As diluições do plasmídeo abrangem valores de cargas virais de 293.555.620 (1ng/ μ L) – 2935,5 cópias/mL (10^{-5} ng/ μ L). A curva apresentou um slope de -2,99, eficiência da reação de 115,95% e $R^2=0,996$. Esses valores demonstram que o teste oferece alta sensibilidade, permitindo a identificação de amostras com cargas virais correspondentes até a diluição de 10^{-5} ng/ μ L (Fig. 8 e 9).

Gráfico de amplificação

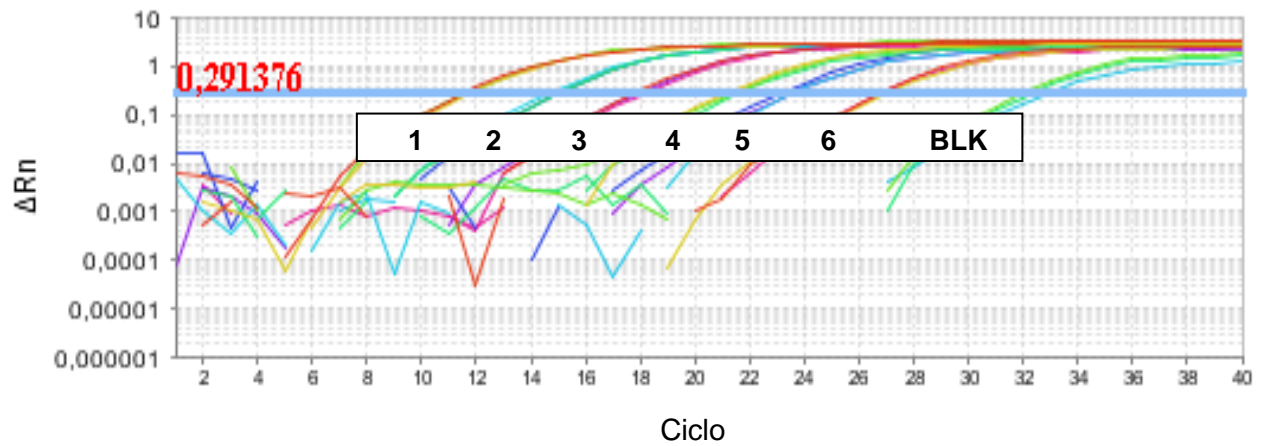


Figura 9. Gráfico de amplificação da PCR em Tempo Real. Diluições do plasmídeo: 1:1 ng/ μ L, 2: 10^{-1} ng/ μ L, 3: 10^{-2} ng/ μ L, 4: 10^{-3} ng/ μ L, 5: 10^{-4} ng/ μ L e 6: 10^{-5} ng/ μ L. BLK: branco

Curva padrão

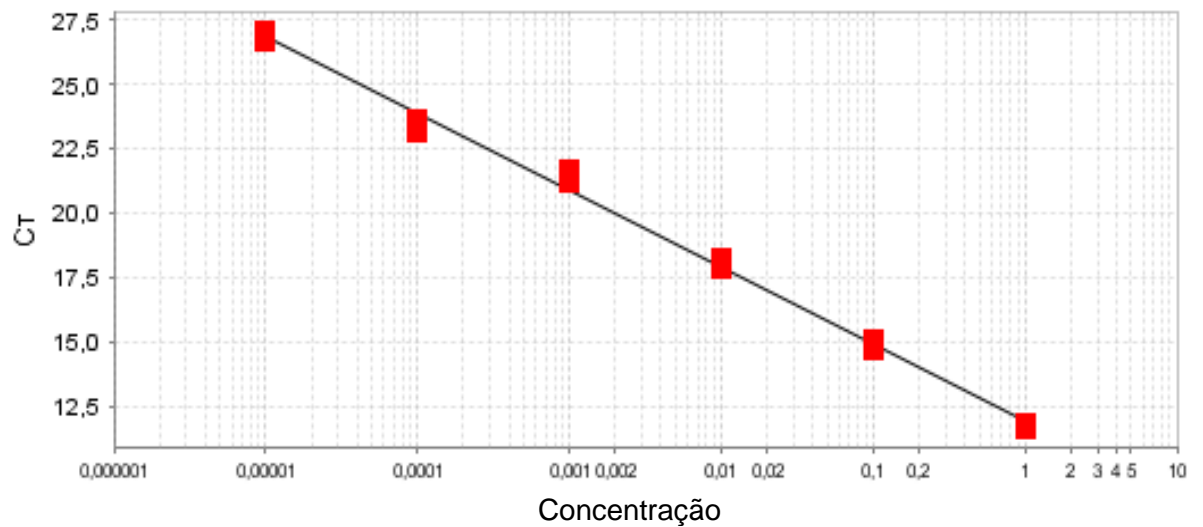


Figura 10. Curva padrão da qPCR. Diluições de 1 ng/ μ L - 10^{-5} ng/ μ L, em triplicata.

5.5. Análise de especificidade

As curvas de *Melting* das soluções com diferentes diluições do plasmídeo apresentaram picos em temperaturas variando de 86 a 87°C, mostrando que os *primers* utilizados são específicos para a região de interesse (genes iniciais imediatos), e que a reação é específica para amplificação de CMV. Apenas em uma triplicata da diluição de 10^{-5} ng/ μ L, houve a formação de um pico anterior à T_m de 86°C. Em diluições maiores, tende-se a haver uma diminuição da especificidade. Os brancos apresentaram T_m entre (74 e 75°C). Esse dado é explicado devido à formação de dímeros pelos *primers*. Essas estruturas, devido ao seu menor tamanho, se dissociam em temperaturas menores do que o fragmento de interesse, gerando um pico em temperaturas menores (Figura 10).

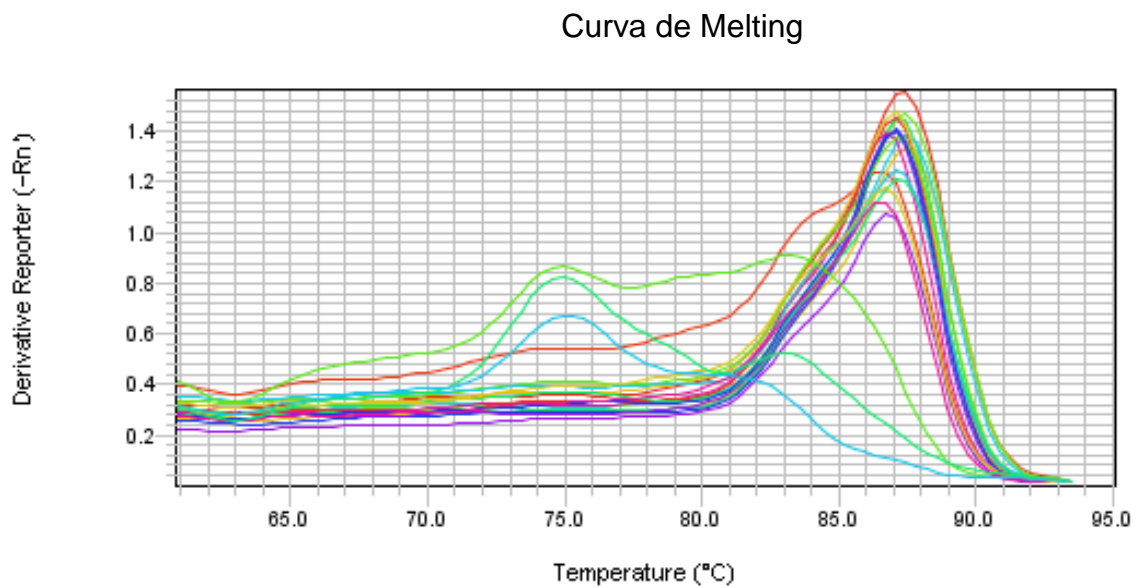


Figura 11. Curva de Melting contendo as diluições do plasmídeo e brancos.

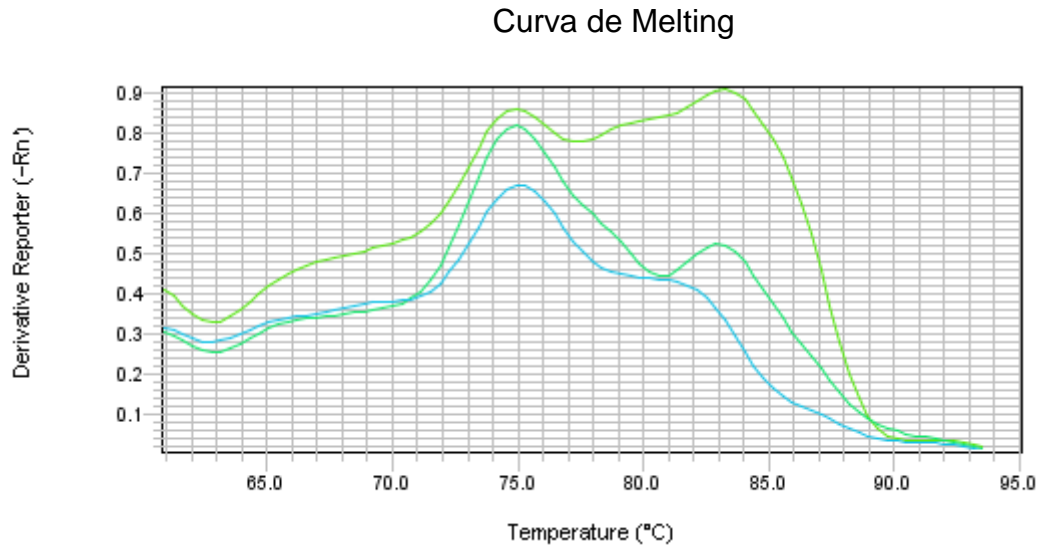


Figura 12. Curva de Melting dos brancos.

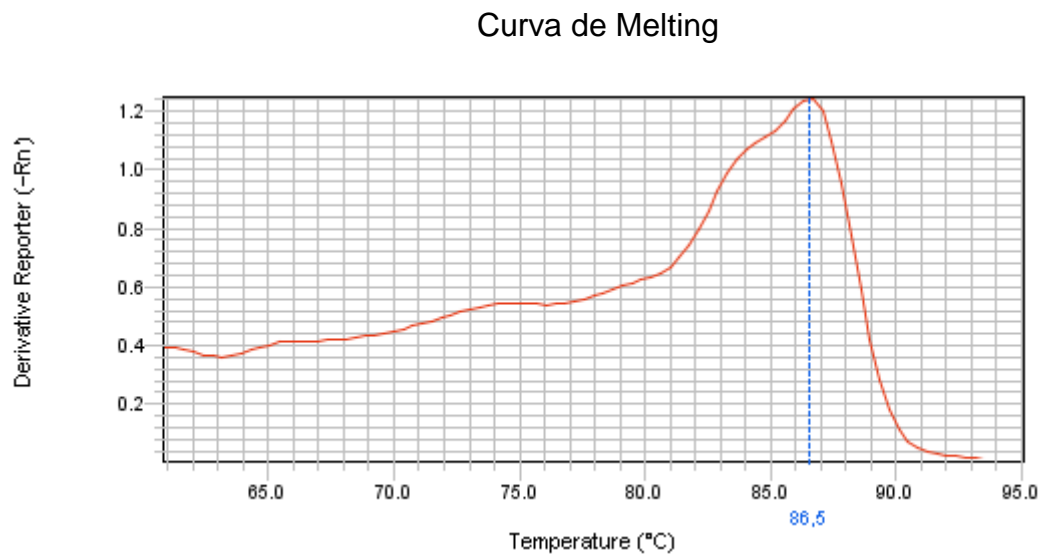


Figura 13. Curva de Melting de uma triplicata da diluição 10^{-5} do plasmídeo.

5.6. Comparação com *kit* comercial

A análise dos CTs e dos valores de carga viral obtidos pelo *kit* comercial permite a conclusão de que todas as 9 amostras são positivas para CMV, com valores de CT variando entre 26,51 e 33,7, correspondendo respectivamente às cargas virais de 1.000.500 e 5.790 cópias/mL. Já os CTs obtidos pelo protocolo desenvolvido variaram de 22,8 a 26,3, também traduzindo o resultado de amostras positivas para o CMV (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de CT médio da quantificação de CMV feita em duplicata, utilizando-se *kit* comercial e o protocolo desenvolvido *in house*.

Amostra	CT Xgen	Cópias/mL	CT <i>in house</i>
1	33,7027	6.115	22,8196
2	32,7868	11.545	26,2166
3	26,85	715.000	22,8272
4	28,3095	259.000	24,95
5	26,5125	1.000.500	24,2761
6	32,4365	14.780	25,9194
7	33,781	5.790	25,9137
8	33,222	8.530	26,3476
09	27,5198	449.000	25,47265

6. DISCUSSÃO

A infecção pelo CMV é uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes transplantados renais. Apesar dos avanços obtidos em todo o complexo procedimento que envolve os transplantes, a infecção pelo vírus continua sendo uma das maiores complicações no período após o procedimento. Devido à importância da quantificação da carga viral nesses pacientes, diversos métodos diagnósticos têm sido propostos. Dentre eles, a qPCR é uma técnica que vem sendo utilizada, apresentando vantagens em relação à outras metodologias, dentre elas a antigenemia. Por ser uma técnica molecular, apresenta alta sensibilidade, especificidade, possui melhor custo benefício, utiliza pequena quantidade de amostra e é uma técnica de fácil execução. Dessa forma, a qPCR possibilita a otimização do tratamento antiviral, podendo-se monitorar os pacientes quanto a resposta ao tratamento e também a detecção de resistência (SOLANO *et al.*, 2013, EMERY *et al.*, 2013).

A carga viral é um importante parâmetro no monitoramento desses pacientes. Através dela é possível analisar o risco de desenvolvimento de doença, o diagnóstico de infecção ativa, monitoramento da resposta terapêutica, detecção de resistência e o tempo adequado para se interromper o tratamento. A interpretação dos resultados de um teste diagnóstico nesses pacientes é algo complexo, sendo necessário o entendimento das características específicas do teste e de todos os fatores intrínsecos aos indivíduos.

Apesar da importância da quantificação da carga viral nesses pacientes já ser conhecida, os valores adequados para se iniciar o tratamento antiviral (*cut-offs*), caracterizar infecção ativa, prever o risco de reativação e estimar a duração do tratamento ainda não foram estabelecidos. Isso ocorre principalmente devido a variações existentes em cada ensaio, como o tipo de matriz biológica e métodos de extração e quantificação utilizados (CALIENDO *et al.*, 2009). Somente em 2012 o teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV Test (Roche Molecular

Systems) recebeu a aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) para quantificação da carga viral de CMV. Entretanto, a maioria dos testes utilizados atualmente ainda são considerados desenvolvidos *in-house*, sendo desenvolvidos, otimizados e validados por cada laboratório responsável. Dessa forma, cada instituição estabelece seus próprios valores de *cut-off*, considerados significativos de acordo com a população local (WOLFF *et al.*, 2009; KRAFT, ARMSTRONG, CALIENDO, 2012).

Dessa forma, o sucesso da terapia preemptiva, através da análise dos valores de carga viral requer uma atenção especial principalmente em relação às baixas cargas. Para que haja uma conclusão diagnóstica mais precisa, deve-se levar em consideração o tipo de matriz biológica utilizada no ensaio, o tipo de transplante, nível de imunossupressão, *status* sorológico de doador/receptor, assim como o limite de detecção e precisão do teste utilizado e variações inerentes a cada ensaio (COSTA *et al.* 2016; KRAFT, ARMSTRONG, CALIENDO, 2012).

Alguns fatores constituem importantes fontes de interferência no resultado dos métodos moleculares, podendo-se citar: matriz biológica utilizada, região-alvo amplificada e metodologia de quantificação.

Há uma grande discussão em torno de qual matriz biológica deva ser utilizada, sendo plasma e sangue total as principais escolhas. O CMV é um vírus que aparece mais frequentemente associado a células, e por isso amostras de sangue total parecem ser as mais adequadas para o diagnóstico, pois refletem ao mesmo tempo tanto o vírus associado a células, quanto as partículas virais livres. Porém, a quantificação no sangue total necessita de uma padronização mais complexa, estando sujeito a inibições derivadas de produtos de degradação da hemoglobina e também não permite a diferenciação entre infecção latente/ativa (BOECKH, 2004; VON MÜLLER *et al.*, 2007; LISBOA *et al.*, 2011). Costa e cols. (2016) realizaram um estudo onde foram comparados 2 testes moleculares para detecção de CMV utilizando-se amostras de plasma e sangue total. De acordo com o estudo, houve uma diferença significativa nos valores de carga viral obtidos através das duas matrizes biológicas, onde baixas cargas virais, principalmente de pacientes sob tratamento antiviral, foram detectadas mais facilmente em amostras de sangue total do que de plasma. O estudo reforçou influência da matriz biológica

no valor final da carga viral e ressaltou a importância de ser utilizada uma mesma matriz ao longo do período de monitoramento e *follow-up* desses pacientes.

No presente estudo, utilizamos amostras de plasma para obtenção do plasmídeo e o teste visa o monitoramento desses pacientes através desse mesmo compartimento biológico no período pós-transplante. O plasma consiste em uma matriz biológica mais simples de ser utilizada, passível de padronização com mais facilidade e gerando resultados com maior rapidez. Estudos já comprovam que a quantificação no plasma apresenta maior sensibilidade em casos de leucopenia, e maior especificidade quando comparadas a amostras de sangue total. Além disso, como a replicação do CMV inicia-se no interior das células e termina com a liberação de partículas virais no plasma, o uso dessa matriz constitui um indicador de infecção ativa mais relevante do que sangue total, fato de extrema relevância em pacientes transplantados (YERLY *et al.*, 2007, GARRIGUE *et al.*, 2008).

Em relação à região-alvo amplificada, as mais utilizadas consistem em regiões conservadas do genoma viral, dentre elas: genes das glicoproteínas 1 e 2 (PANAGOUE *et al.*, 2016), pp 65 (LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2015), DNA polimerase viral (UL54) (COBAS(®)AmpliPrep/COBAS(®) TaqMan(®)CMV, Roche Molecular Systems Inc.), UL83 (proteína do tegumento relacionada à modulação do sistema imune) (KHANSARINEJADA *et al.*, 2012) e genes iniciais imediatos (UL123) (WOLFF *et al.*, 2009). A escolha da região mais adequada assim como o desenho ideal dos *primers* também irá influenciar diretamente o tamanho final dos amplicons (DNA amplificado) gerados em cada reação. Em estudo realizado por Preiksaitis e cols. (2016), foi observado que o tamanho do amplicon também influencia no valor final da carga viral de forma que amplicons de menor tamanho parecem gerar cargas virais maiores do que aquelas detectadas em ensaios que geram amplicons maiores. Já se sabe também que a maior parte do DNA de CMV presente no plasma é composta por DNA livre, podendo estar altamente fragmentado, sendo mais um fator interferente na quantificação, já que fragmentos menores podem não ser detectados por ensaios que geram amplicons de maior tamanho (BOOM *et al.*, 2002).

No presente estudo, utilizamos *primers* já descritos na literatura (MENDEZ *et al.*, 1998), específicos para a região dos genes iniciais imediatos. Nas reações realizadas com os *primers* escolhidos, houve a formação de dímeros de *primers*,

como se pode observar nas figuras dos géis de agarose realizados com os produtos de PCR convencionais após a transformação das bactérias e no teste realizado com duas amostras de pacientes após transformação. Esses dímeros são responsáveis pela formação de um pico anterior na diluição de 10^{-5} ng/mL e nos brancos da reação. Dessa forma, como perspectivas, inclui-se o desenho de novos *primers*, com objetivo de se eliminar o ruído de amplificação decorrente dos dímeros de *primer*.

Em relação à metodologia de quantificação, a mais utilizada pelos estudos e kits comerciais consiste no uso das sondas TaqMan® (GRYS *et al.*, 2011; KHANSARINEJADA *et al.*, 2012; SLAVOV *et al.*, 2016; Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan CMV test). Apesar de serem altamente específicos, ensaios que utilizam sondas possuem custos elevados, dificultando o seu uso na rotina laboratorial e em larga escala principalmente no serviço público. Uma alternativa para o custo elevado das sondas é o reagente SYBR Green, que já vem sendo utilizado para detecção de outros vírus, como HIV (vírus da imunodeficiência humana), HCV (vírus da hepatite C), Zika vírus e vírus do Oeste do Nilo (MACHADO *et al.*, 2017 *in press*; GIBELLINI *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2016; GARCÍA-RUIZ *et al.*, 2016). Muitos autores relatam uma maior especificidade no uso das sondas, porém quando utilizado de forma correta, o SYBR Green torna-se tão específico quanto. A especificidade necessária para que um teste baseado no SYBR Green seja validado, é adquirida através da análise da curva de dissociação do teste (curva de *Melting*). A curva de *Melting* de um teste específico deve apresentar um padrão homogêneo entre as amostras e possuir um único pico em temperaturas similares, demonstrando que não há amplificações inespecíficas.

O SYBR Green foi a metodologia de escolha para o protocolo testado nesse trabalho por apresentar menor complexidade de uso, baixo custo, especificidade e sensibilidade satisfatórias. O protocolo desenvolvido constitui um ensaio qualitativo, sendo útil no contexto de monitoramento periódico desses pacientes, ao longo de um período de tempo (como por exemplo, monitoramento semanal nos primeiros 3 meses após o transplante) através da análise da variação dos CTs. Dessa forma, a alteração de mais de 2 logs no CT de um mesmo paciente, já seria suficiente para alterar a conduta clínica.

Como se pode observar, existem diversas fontes de variação e interferentes quando se trata de quantificação da carga viral de CMV. Pang e cols. (2009)

realizaram um estudo onde a variabilidade interlaboratorial dos testes diagnósticos de CMV foi avaliada, sendo incluídos 33 laboratórios localizados no Canadá, EUA e Europa. Um painel utilizando-se 2 amostras negativas, 7 amostras desenvolvidas a partir de nucleocapsídeos de CMV purificados e 3 amostras clínicas de plasma foi elaborado, e observou-se uma variação de $2.0 \log_{10}$ a $4.0 \log_{10}$ cópias/mL nos resultados das amostras. Essa diferença no número de cópias já é suficiente para modificar a estratégia terapêutica adotada pela equipe médica.

Grys e cols. (2011), também avaliaram a precisão de um teste desenvolvido *in-house* em 3 laboratórios diferentes, utilizando a mesma metodologia. A variação interlaboratorial foi de $0.18 \log_{10}$ cópias/mL, valor bem abaixo daquele encontrado no estudo citado acima, o que demonstra que mesmo apesar dos interferentes pré e pós-analíticos, o uso de um mesmo método para quantificação da carga viral seria o ideal para se atingir a harmonização entre os resultados de carga viral.

Diante desse cenário, e com o objetivo de harmonizar os resultados interlaboratoriais de CMV, em 2010 a OMS e o NIBSC desenvolveram um padrão internacional pelo qual todos os testes devem ser recalibrados (HIRSCH *et al.*, 2013; RAZONABLE *et al.*, 2013). Com o uso desse padrão, esperava-se padronizar os resultados de carga viral em diferentes instituições. Entretanto, já se sabe atualmente que mesmo com o seu uso, ainda é possível detectar uma variação entre os resultados, devido às características específicas de cada método e a variações decorrentes das fases pré e pós-analíticas. Essa variação poderia ser minimizada com a comercialização de um kit o qual englobasse todo o processo, desde a etapa de preparação da amostra para extração até a quantificação final (HIRSCH *et al.*, 2013; BABADY *et al.*, 2015).

Além disso, os resultados obtidos no presente trabalho através da amplificação de nove amostras de pacientes revelaram valores de CT sugestivos de amostras positivas para CMV. Com o objetivo de comprovar esses resultados, realizamos a reação de qPCR utilizando kit comercial Kit Master CMV (XGEN), onde as amostras apresentaram amplificação dentro dos valores de curva padrão do kit (6 – 6000 cópias/ μ L), indicando o resultado de amostras positivas. Ainda que haja uma variação nos valores de CT de cada teste, devido ao fato de serem baseados em metodologias diferentes, esses resultados estão de acordo com os obtidos pelo

protocolo desenvolvido, demonstrando que o mesmo é promissor, mas ainda necessita de validação.

O protocolo desenvolvido possui algumas limitações, dentre elas o pequeno número de amostras testadas e a formação de dímeros pelos *primers* que afetam a curva de *Melting* e também a sensibilidade do teste. Dessa forma, como perspectivas, incluem-se novo desenho de *primers* mantendo-se a região alvo dos genes iniciais imediatos, e também o uso do corante Eva Green. Assim como o SYBR Green, este corante também é um intercalante inespecífico de DNA, porém possui a vantagem de se intercalar a todos os nucleotídeos, enquanto que o SYBR Green se intercala apenas à nucleotídeos com ligações triplas (C-G). Dessa forma, possibilita a análise de *High Resolution Melting* (HRM), levando a uma análise mais fidedigna da curva de *Melting*, além de possuir custos similares ao SYBR Green.

Portanto, apesar de diversas metodologias desenvolvidas *in house* já terem sido descritas, o presente estudo mostra-se relevante no contexto da infecção pelo CMV, pois revela um método de monitoramento da carga viral acessível devido ao custo reduzido, de fácil manuseio, específico e com *primers* já descritos na literatura. O teste ainda necessita de aprimoramento visando melhor desenho de *primers*, porém seu uso é promissor no monitoramento da infecção pelo CMV em pacientes transplantados renais no contexto do serviço público de saúde.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados, chegamos as seguintes conclusões:

- Através de uma *Nested* PCR foi possível a amplificação da região dos genes imediatos precoces de CMV, gerando fragmento de 150 pb.
- O protocolo de qPCR apresentou uma sensibilidade correspondente até a diluição de 10^{-5} ng/ μ L. A especificidade foi analisada através da curva de *Melting*, que demonstrou um padrão homogêneo de dissociação, apresentando picos nas temperaturas de 84 - 86°C.
- Os resultados obtidos através da amplificação de 9 amostras de pacientes foram concordantes com os obtidos pelo *kit* comercial. Ainda são necessárias maiores confirmações, porém pode-se afirmar que o protocolo desenvolvido é aplicável e promissor para utilização no contexto abordado.

Dessa forma, a metodologia de PCR em Tempo Real desenvolvida neste trabalho consiste em um método promissor de detecção e monitoramento da infecção pelo CMV rápido, com baixo custo e específico, tornando-se útil no acompanhamento desses pacientes no período pós-transplante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT K.C., HYPOLITE I.O., VIOLA R., POROPATICH R.K., HSHIEH P., CRUESS D., HAWKES C.A., AGODOA L.Y. Hospitalizations for cytomegalovirus disease after renal transplantation in the United States. **Ann Epidemiol.** 6:402–409, 2002
- Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Dados numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: JANEIRO / SETEMBRO – 2016, **Registro Brasileiro de Transplantes**, ABTO, Ano XXII Nº 3, 2016
- ALDEA C., ALVAREZ C.P., FOLGUEIRA L., DELGADO R., OTERO J.R. Rapid detection of herpes simplex virus DNA in genital ulcers by real-time PCR using SYBR green I dye as the detection signal. **Journal Clin Microbiol.** 40: 1060 – 1062, 2002
- ALMEIDA L.N., AZEVEDO R.S., AMAKU M., MASSAD E. Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community of São Paulo, Brazil. **Rev Saude Publica** 35(2):124-9, 2001
- AZEVEDON L.S. , PIERROTTI L.C., ABDALA E., COSTA S.F., STRABELLI T.M., CAMPOS S.V. *et al.* Cytomegalovirus infection in transplant recipients. **Clinics.** 70(7):515-523, 2015
- BABADY N.E., CHENG C., CUMBERBATCH E., STILES J., PAPANICOLAOU G., TANG Y.W. Monitoring of cytomegalovirus viral loads by two molecular assays in whole-blood and plasma samples from hematopoietic stem cell transplant recipients. **Journal Clin Microbiol.** Apr;53(4):1252-7, 2015
- BALDANTI F., LILLERI D., GERNA G. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. **Journal Clin Virol** 41: 237, 2008
- BATE S.L., DOLLARD S.C., CANNON M.J. Trends in US CMV Seroprevalence, 1988–1994, **Clinical Infectious Diseases**, 50(11):1439–1447, 2010
- BECKMANN C., DUMOULIN A., RINALDO C.H., HIRSCH H.H. Comparison of a UL111a real-time PCR and pp65 antigenemia for the detection of cytomegalovirus, **Journal of Medical Virology** 83:2143–2150, 2011
- BHADAURIA D., SHARMA R.K., KAUL A, PRASAD N., GUPTA A., SRIVASTAVA A. Cytomegalovirus Disease in Renal Transplant Recipients: A Single-Center Experience. **Indian Journal Microbiol**, 52(3):510–515, 2012
- BOECKH M., HUANG M., FERRENBURG J., STEVENS-AYERS T., STENSLAND L., NICHOLS W.G., COREY L. Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. **Journal Clin Microbiol.** 42, 1142-1148, 2004

- BOOM R., CEES JA., SCHURMANN T. Human cytomegalovirus DNA in plasma and serum specimens of renal transplant recipients is highly fragmented. **Journal Clin Microbiol** 40:4105–13, 2002
- BRENNAN D.C. Cytomegalovirus in Renal Transplantation, **Journal Am Soc Nephrol** 12: 848–855, 2001
- BRENNAN D.C., LEGENDRE C., PATEL D., MANGE K., WILAND A., MCCAGUE K., SHIHAB F.S. Cytomegalovirus incidence between everolimus versus mycophenolate in de novo renal transplants: pooled analysis of three clinical trials. **Am Journal Transplant.** 11:2453-62, 2011
- BRITT W. CMV maturation and egress. Apud: Arvin, AM. *et al.* Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis. **Cambridge Press**, p. 311-323, 2007
- CALIENDO A.M., SHAHBAZIAN M.D., SCHAPER C., INGERSOLL J., ABDUL-ALI D., BOONYARATANAKORNKIT J., PANG X.L., FOX J., PREIKSAITIS J., SCHONBRUNNER E.R. A commutable cytomegalovirus calibrator is required to improve the agreement of viral load values between laboratories. **Clin. Chem.** 55, 1701-1710, 2009
- CALIENDO A.M., GEORGE K.S., KAO S.Y., ALLEGA J., TAN B.K., FONTAINE R.L., BUI L., RINALDO C.R. Comparison of Quantitative Cytomegalovirus (CMV) PCR in Plasma and CMV Antigenemia Assay: Clinical Utility of the Prototype AMPLICOR CMV MONITOR Test in Transplant Recipients. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2122–2127, 2000
- COSTA C., SIDOTI F., MANTOVANI S., GREGORI G., PROIETTI A., GHISSETTI V., CAVALLO R. COMPARISON of two molecular assays for detection of cytomegalovirus DNA in whole blood and plasma samples from transplant recipients, **New Microbiologica**, 39, 3, 186-191, ISN 1121-7138, 2016
- CORDERO E., CASASOLA C., ECARMA R., DANGUILAN R. Cytomegalovirus Disease in Kidney Transplant Recipients: Incidence, Clinical Profile, and Risk Factors. **Transplantation Proceedings**, 44, 694 –700, 2012
- CRAIG J.M., MACAULEY J.C., WELLER T.H., WIRTH P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. **Proc Soc Exp Biol Med** 94: 4–12, 1957
- CROUGH T., KHANNA R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 76–98 Vol. 22, 2009
- CUNHA C.B., PONCE DE LEÓN A.C., SCHRAMM J.M.A., CARVALHO M.S., SOUZA JR P.R.B., CHAIN R. Tempo até o transplante e sobrevida em pacientes com insuficiência renal crônica no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, 1998-2002, **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 23(4):805-813, abr, 2007

CUNNINGHAM C., GATHERER D., HILFRICH B., BALUCHOVA K., DARGAN D.J., THOMSON M. Sequences of complete human cytomegalovirus genomes from infected cell cultures and clinical specimens. **Journal Gen Virol** 91(Pt 3):605–15, 2010

Dados Numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: janeiro / junho – 2014, **Registro Brasileiro de Transplantes**, Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, Ano XX Nº 2

DOLLARD S.C., GROSSE S.D., ROSS D.S. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. **Rev Med Virol.** 17:355–363, 2007

EMERY V. Cytomegalovirus: recent progress in understanding pathogenesis and control. **QJM**, 105:401–5, 2012

EMERY V., ZUCKERMAN M., JACKSON G., AITKEN C., OSMAN H., PAGLIUCA A., POTTER M., PEGGS K., CLARK A. Management of cytomegalovirus infection in haemopoietic stem cell transplantation. **Br. Journal Haematol.** 162, 25-39, 2013

FOWLER K.B., DAHLE A.J., BOPANA S.B., PASS R.F. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? **Journal Pediatr.** Jul;135(1):60-4. 1999

FRYER J.F., HEATH A.B., ANDERSON R., MINOR P.D. and the collaborative study group. Collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO international standard for human cytomegalovirus for nucleic acid amplification-based assays. **WHO/BS/10.2138**, 1-40. Geneva, Switzerland, 2010

GANDHI M.K., KHANNA R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. **Lancet Infect Dis.** 4(12):725-38, 2004

GARCÍA-RUÍZ D., MARTÍNEZ-GUZMÁN M.A., CÁRDENAS-VARGAS A., MARINO-MARMOLEJO E., GUTIÉRREZ-ORTEGA A., GONZÁLEZ-DÍAZ E., *et al.*: Detection of dengue, west Nile virus, rickettsiosis and leptospirosis by a new real-time PCR strategy. **Springerplus.** 20;5(1):671 2016.

GARRIGUE I., DOUSSAU A., ASSELINEAU J., BRICOUT H., COUZI L., RIO C., MERVILLE P., FLEURY H., LAFON M.E., THIEBAUT R. Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients. **Journal of Clinical Microbiology** 46, 493–498, 2008

GIBELLINI D., GARDINI F., VITONE F., SCHIAVONE P., FURLINI G., RE M.C. Simultaneous detection of HCV and HIV-1 by SYBR Green real time multiplex RT-PCR technique in plasma samples. **Mol Cell Probes.** 20: 223 – 229, 2006

GRYS T.E., DUQUETTE D.L., WHITE B., IRISH C., HATA D.J., PRITT B.S. Precision across the analytical measuring range of a quantitative real-time PCR

assay for cytomegalovirus detection among three clinical laboratories. **Journal Clin Microbiol** 49:3044 –3046, 2011

HAMER R.A., EL NAHAS A.M. The burden of chronic kidney disease is rising rapidly worldwide. **BMJ** 332:563–4, 2006

HEID C.A., STEVENS J., LIVAK K.J., WILLIAMS P.M. Real Time Quantitative PCR, **GENOME RESEARCH**. 993, 1996

HIRSCH H., LAUTENSCHLAGER I., PINSKY B.A., CARDENOSO L., ASLAM S., COBB B., VILCHEZ R.A., VALSAMAKIS A. An international multicenter performance analysis of cytomegalovirus load tests. **Clin. Infect. Dis.** 56, 367-373, 2013

HOLLAND, P.M. *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' -* 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase (ofigonucleotide probe/human immunodeficiency virus). **Biochemistry**. Vol. 88, pp. 7276-7280, August, 1991

LJUNGMAN P., HAKKI M., BOECKH M. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. **Hematol Oncol Clin**. February ; 25(1): 151–169 2011

MARCELIN J.R., BEAM E., RAZONABLE R. Cytomegalovirus infection in liver transplant recipients: Updates on clinical management. **World Journal Gastroenterol**. August 21; 20(31): 10658-10667, 2014

MEDINA-PESTANA J.O., VAZ M.L., PARQUE S.I., GARCIA V.D. , ABBUD-FILHO M., Holanda H. O transplante de órgãos no Brasil no ano de 2002, **Transplantation Proceedings**, 36:799–801, 2004

KALEJTA R.F. Tegument proteins of human cytomegalovirus. **Microbiol Mol Biol Rev**, 72:249-265, 2008

KARLSEN F., STEEN H.B., NESLAND J.M. SYBR green I DNA staining increases the detection sensitivity of viruses by polymerase chain reaction. **Journal Virol Methods**. 1995; 55: 153 – 156

KASISKE B.L., ZEIER M.G., CHAPMAN J.R., CRAIG J.C., EKBERG H., GARVEY C.A., *et al.* Kidney Disease: Improving Global Outcomes. Clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. **Kidney International**, 77(4):299-311, 2010

KHANSARINEJADA B., SOLEIMANJAHIA H., SAMIEEB S.M., HAMIDIEHC A.A., PARYAND M., SANAHMADI Y. Quantitation of human cytomegalovirus DNA in plasma using an affordable in-house qPCR assay. **Journal of Virological Methods**, 183, 170– 175, 2012

KLEMOLA E., KAARIANINEN L. Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. **Br Med J** 2:1099 –1102, 1965

- KRAFT C., ARMSTRONG W., CALIENDO A. Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. **Clin Infect Dis**, 54:1793–7, 2012
- KOTTON C., KUMAR D., CALIENDO A.M., ASBERG A., CHOU S., DANZIGER-ISA KOV L., HUMAR A. Transplantation Society International CMV Consensus Group. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. **Transplantation**. 96(4):333-60, 2013
- LAUTENSCHLAGER I., LOGINOV R., MÄKISALO H., HÖCKERSTEDT K. Prospective long-term study on primary CMV infections in adult liver transplant (D+/R-) patients after valganciclovir prophylaxis; **Journal of Clinical Virology** 71, 73–75, 2015
- LERUEZ-VILLE M., OUACHE´E M., DELARUE R., SAUGET A.S., BLANCHE S., BUZYN A., ROUZIOUX C. Monitoring Cytomegalovirus Infection in Adult and Pediatric Bone Marrow Transplant Recipients by a Real-Time PCR Assay Performed with Blood Plasma. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2040–2046, 2003
- LEVINSON W. **Microbiologia Médica e Imunologia**, 10ª Ed. 2010
- LISBOA L.F., KUMAR D., WILSON L.E., HUMAR A. Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. **Transplantation**, 93, 195-200, 2012
- LISBOA L.F., ASBERG A., KUMAR D., PANG X., HARTMANN A., PREIKSAITIS J.K. *et al.* The clinical utility of whole blood versus plasma cytomegalovirus viral load assays for monitoring therapeutic response. **Transplantation** 91:231–236, 2011
- LOPO S., VINAGRE E., PALMINHA P., PAIXÃO M.T., NOGUEIRA P., FREITAS M.G. Seroprevalence to Cytomegalovirus in the portuguese population. **Eurosurveillance**, Volume 16, Issue 25, 23 June 2011
- MACHADO S.L., GONÇALVES G., DUDLEY D., O’CONNOR D., TOMA H.K., FERNANDES J.C., TANURI A. Development of a Qualitative Quantitative Polymerase Chain Reaction Test to Identify Patients Failing First-Line Therapy to Non-nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitor. **AIDS Research and Human Retroviruses**, *in press*, 2017
- MANFRO R., NORONHA I.L., SILVA FILHO A.P. **Manual de Transplante Renal**, São Paulo: Manole, 2004
- MATTIA D., STROFFOLINI T., ARISTA S., PISTOIA D., GIAMMANCO A., MAGGIO M., CHIARAMONTE M., MOSCHEN M.E., MURA I., RIGO G., SCARPA B. Prevalence of Cytomegalovirus Infection in Italy. **Epidemiology and Infection**, Vol. 107, No. 2, pp. 421-427, 1991
- MELLO R.O., MARTINY P.B., SATURI J.B., DE PARIS F., MACHADO A.B.P., SENGER M.B. *et al.* Comparação dos métodos de PCR e Antigenemia pp6 para o

diagnóstico de infecção por CMV em pacientes imunossuprimidos. **Rev HCPA**, 28(1):16-20, 2008

MENDEZ J.C., MARK J. ESPY, THOMAS F. SMITH, JENNIE A. WILSON, PAYA C.V. Evaluation of PCR Primers for Early Diagnosis of Cytomegalovirus Infection following Liver Transplantation. 526–530 Vol. 36, No. 2. **American Society for Microbiology**. 1998

MOCARSKI E.S., SHENK T., PASS R.F. Cytomegaloviruses, **Fields virology**, 5 edition. Edited by: Knipe DM, Howley PM. Philadelphia, PA, Lippincott Williams 2701-2772, 2007

MUNOZ-COBO B., GIMENEZ E., REMIGIA M.J., AMAT P., CLARI M.A., BRAVO D. *et al.* Pre-emptive antiviral therapy for active CMV infection in adult allo-SCT patients guided by plasma CMV DNAemia quantitation using a real-time PCR assay: clinical experience at a single center. **Bone Marrow Transplant**. 48, 1010-1012, 2013

National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. **Am J Kidney Dis**, 39,2Suppl 1:S1-266,2002

NYGREN, J.; SVANVIK, N.; KUBISTA, M. The interaction between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. **Biopolymers**, New York, v. 46, p. 39-51, 1998

NOVAK Z., CHOWDHURY N., ROSS S.A., PATI S.K., FOWLER K., BOPPANA S.B. Diagnostic consequences of cytomegalovirus glycoprotein B polymorphisms. **Journal Clin Microbiol**, 49:3033-5, 2011

PANG X.L., FOX J.D., FENTON J.M., MILLER G.G., CALIENDO A.M., PREIKSAITIS J.K. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. **Am Journal Transplant**, 9 (2):258-68, 2009

PANAGOUE E., ZAKOUT G., KESHANI J., SMITH C., IRISH D., MACKINNON S., KOTTARIDIS P., FIELDING A., GRIFFITHS PD. Cytomegalovirus pre-emptive therapy after hematopoietic stem cell transplantation in the era of real-time quantitative PCR: comparison with recipients of solid organ transplants, **Transplant Infectious Disease**, 18: 405–414, 2016

PREIKSAITIS J.K., HAYDEN R.T., TONG Y., PANG X.L., FRYER J.F., HEATH A.B., COOK L., PETRICH A.K., YU B., CALIENDO A.M. Are We There Yet? Impact of the First International Standard for Cytomegalovirus DNA on the Harmonization of Results Reported on Plasma Samples. **Clinical Infectious Diseases**, 2016

RAZONABLE R., RIVERO A., RODRIGUEZ A., *et al.* Allograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir. **Journal Infect Dis** 184:1461-4, 2001

RAZONABLE R., ASBERG A., ROLLAG H., DUNCAN J, BOISVERT D., YAO J.D., CALIENDO A.M., HUMAR A., DO T.D. Virologic suppression measured by a cytomegalovirus (CMV) DNA test calibrated to the World Health Organization international standard is predictive of CMV disease resolution in transplant recipients. **Clin. Infect. Dis.** 56, 1546-1553, 2013

REQUIÃO-MOURA L.R., MATOS A.C.C., PACHECO-SILVA A. Infecção pelo citomegalovírus no transplante de rim: aspectos clínicos, manejo e perspectivas. **Einstein**, 13(1):142-8, 2015

ROBERTS T.C., BRENNAN D.C., BULLER R.S., GAUDREAU-KEENER M., SCHNITZLER M.A., STERNHELL K.E., *et al.* Quantitative polymerase chain reaction to predict occurrence of symptomatic cytomegalovirus infection and assess response to ganciclovir therapy in renal transplant recipients. **The Journal of Infectious Diseases**, 178: 626–635, 1998

SAADI M.I., YAGHOBI R., KARIMI M.H., GERAMIZADEH B., RAMZI M., ZAKERINIA M. Association of the co stimulatory molecule gene polymorphisms and active cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell transplant patients. **Mol Biol Rep.**, 40 (10):5833–4; 2013

SAFFERT R.T., PENKERT R.R., KALEJTA R.F. Cellular and viral control over the initial events of human cytomegalovirus experimental latency in CD34+ cells. **Journal Virol**, 84:5594-5604, 2010

SAYDAH S., EBERHARDT M., RIOS-BURROWS N. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Prevalence of chronic kidney disease and associated risk factors - United States, 1999-2004. **MMWR**; 56:161-5, 2007

SEALE H., MACINTYRE C.R., GIDDING H.F., BACKHOUSE J.L., DWYER D.E., GILBERT L. National Serosurvey of Cytomegalovirus in Australia. **Clinical and Vaccine Immunology**, 1181–1184, 2006

SEED C.R., PISCITELLI L.M., MAINE G.T., LAZZAROTTO T., DOHERTY K., STRICKER R., STRICKER R., IRIARTE B., PATEL C. Validation of an automated immunoglobulin G-only cytomegalovirus (CMV) antibody screening assay and an assessment of the risk of transfusion transmitted CMV from seronegative blood. **Transfusion**. 49: 134, 2009

SESSO R.C., LOPES A.A., THOMÉ F.S., LUGON J.R., WATANABE Y., SANTOS D.R. Relatório do Censo Brasileiro de Diálise Crônica, 2012, **Journal Bras Nefrol**. 36(1): 48-53, 2014

SHAHZAMANI K., SABAHI F., MERAT S., SADEGHIZADEH M., LASHKARIAN H.E., REZVAN H., ARZANANI M.K., JABBARI H., MALEKZADEH R. Rapid low-cost detection of hepatitis C virus RNA in HCV-infected patients by real-time RT-PCR using SYBR Green I, **Arch Iran Med**. 14(6):396-400, 2011

SHENK T., STINSKI F.M. Human Cytomegalovirus. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Volume 325, 1 edition. Berlin: Springer; 2008

SIA I.G., PATEL R. New Strategies for Prevention and Therapy of Cytomegalovirus Infection and Disease in Solid-Organ Transplant Recipients. *ClinMicrobiol Rev.*, 13(1):83-121, 2000

SINCLAIR J., SISSONS P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. **Journal Gen Virol**, 87:1763-1779, 2006

SIMON D.M., LEVIN S. Infectious complications of solid organ transplantations. **Infect Dis Clin of North Am.** 15(2):521–49, 2001

SISSONS J.C.. Human cytomegalovirus infection. **Thorax.** 44:241-6, 1989

SLAVOV S.N., OTAGUIRI K.K., DE FIGUEIREDO G.G., YAMAMOTO A.Y., MUSSI-PINHATA M.M., KASHIMA S., COVAS D.T. Development and optimization of a sensitive TaqMan® real-time PCR with synthetic homologous extrinsic control for quantitation of Human cytomegalovirus viral load. **Journal Med Virol.** Sep;88(9):1604-12, 2016

SMITH M.G. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. **Proc Soc Exp Biol Med** 92:424-430, 1956

SOLANO C., MUNOZ-COBO B., GIMENEZ E., REMIGIA M.J., AMAT P., CLARI M.A., BRAVO D., BENET I., MONTORO J., NAVARRO D. Pre-emptive antiviral therapy for active CMV infection in adult allo-SCT patients guided by plasma CMV DNAemia quantitation using a real-time PCR assay: clinical experience at a single center. **Bone Marrow Transplant.** 48, 1010-1012, 2013

SOUZA S.R., GALANTE N.Z., BARBOSA D.A., PESTANA J.O.M. Incidência e fatores de risco para complicações infecciosas no primeiro ano após o transplante renal. **Journal Bras Nefrol**, 32(1):77-84, 2010

STARAS S.A., DOLLARD S.C., RADFORD K.W., FLANDERS W.D., PASS R.F., CANNON M.J. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. **Clin Infect Dis.** 2006 Nov 1;43(9):1143-51, 2006

STORCH G.A. Viral infections in immunocompromised patients. **Diagnostic Virology**, 1st Ed., pp 203–232, 2000

STOWELL J.D., FORLIN-PASSONI D., DIN E., RADFORD K., BROWN D., WHITE A., BATE S.L., DOLLARD S.C., BIALEK S.R., CANNON M.J., SCHMID D.S. Cytomegalovirus survival on common environmental surfaces: opportunities for viral transmission. *J. Infect. Dis.*, 205:211–214, 2012

- SUASSUNA J.H., LEITE L.L., VILLELA L.H. Prevalence of cytomegalovirus infection in different patient groups of an urban university in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** 28(2):105-8, 1995
- TANDON R., MOCARSKI E.S. Viral and host control of cytomegalovirus maturation. **Trends Microbiol.**, August ; 20(8): 392–401, 2012
- TOMTISHEN III J.P. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28), **Virology Journal**, 9:22, 2012
- TOO, H. P. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v.114, p.146-154, 2003
- TOYODA M., CARLOS J.B., GALERA O.A., GALFAYAN K., ZHANG X., SUN Z., CZER L.S., JORDAN S.C. Correlation of cytomegalovirus DNA levels with response to antiviral therapy in cardiac and renal allograft recipients. **Transplantation**, 63: 957–963, 1997
- TREMBLAYA M., RODRIGUE M., DESCHÊNES L., BOIVIND G., LONGTIN J. Cytomegalovirus quantification in plasma with Abbott RealTime CMV and Roche CobasAmplicor CMV assays, **Journal of Virological Methods**, 225:1-3, 2015
- VAN DE POL A.N., MOCARSKI E., SAEDERUP N., VIEIRA J., MEIER T.J. Cytomegalovirus Cell Tropism, Replication, and Gene Transfer in Brain. **The Journal of Neuroscience**, 19(24):10948–10965, 1999
- VON MÜLLER L., HINZ J., BOMMER M., HAMPL W., KLUWICK S., WIEDMANN M., BUNJES D., MERTENS T. CMV monitoring using blood cells and plasma: a comparison of apples with oranges? **Bone Marrow Transplant**. Mar;39(6):353-7 2007
- WITTER C.T., HERRMANN M.G., MOSS A.A., RASMUSSEN R.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **Biotechnology** 22, 130–138, 1997
- WOLFF D.J., HEANEY D.L., NEUWALD P.D., STELLRECHT K.A., PRESS R.D. Multi-site PCR-based CMV viral load assessment-assays demonstrate linearity and precision, but lack numeric standardization: a report of the association for molecular pathology. **Journal Mol Diagn** 11:87–92, 2009
- XU M.Y., LIU S.Q., DENG C.L., ZHANG Q.Y., ZHANG B. Detection of Zika virus by SYBR Green one-step real-time RT-PCR. **Journal Virol Methods**. Oct; 236:93-7, 2016
- YERLY S., PERRIN L., VAN DELDEN C., SCHAFFER S., THAMM S., WUNDERLI W., KAISER L. Cytomegalovirus quantification in plasma by an automated real-time PCR assay. **Journal Clin Virol**. 38, 298-303, 2007

ANEXOS**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Análise, via implementação de antígenemia, do impacto da infecção/doença por citomegalovírus no pós-transplante renal**

Coordenador do estudo: Prof. Dr. Jocemir Ronaldo Lugon.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Jorge Reis Almeida

Laboratório Multidisciplinar de Apoio a Pesquisa, Faculdade de Medicina, HUAP, Universidade Federal Fluminense.

Telefones para contato: (21) 2629-9110

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos R.G. _____

Responsável legal: _____

R.G. Responsável legal: _____

O(A) Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa *Análise, via implementação de antígenemia, do impacto da infecção/doença por citomegalovírus no pós-transplante renal* de responsabilidade do pesquisador Jocemir Ronaldo Lugon. Nosso objetivo é acompanhar a infecção e ou a doença pelo citomegalovírus em pacientes que realizam transplante renal. Esta pesquisa poderá ajudar no seu tratamento após o transplante. Assim, antes do transplante examinaremos sangue para saber se você tem ou não o vírus. Para saber se há uma possível infecção após o transplante você será examinado várias vezes depois do transplante. Examinaremos sangue uma vez por semana durante os três primeiros meses, uma vez após seis meses e uma vez após um ano. O risco desta pesquisa é baixo, mas poderá haver hematomas no local da coleta de sangue provocando dores e desconforto. Para minimizar estes riscos, as amostras de sangue serão obtidas por profissionais treinados em coleta de sangue

pertencentes ao Serviço de Patologia Clínica do HUAP. Após utilização no projeto de pesquisa seu sangue será jogado fora.

Os pesquisadores se comprometem a manter segredo das informações geradas (idade, medicamento, cidade de origem, sexo) sobre sua pessoa tanto as obtidas de prontuários como as obtidas pelo médico atendente.

Sua participação é *voluntária* e seu aceite em participar do estudo poderá ser retirado a qualquer tempo, sem prejuízos ao seu tratamento neste hospital.

Em caso de dúvidas acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos da pesquisa o Sr.(a) poderá entrar em contato com o pesquisador responsável pelos telefones descritos acima.

Eu, _____, RG nº _____
 declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Ou

Eu, _____, RG nº _____,
 responsável legal por _____,
 RG nº _____ declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Niterói, ____ de _____ de _____

Nome e assinatura do paciente ou seu responsável legal

Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento