

JOSÉ OTTO REUSING JUNIOR

**Predição de infecção clinicamente relevante  
por citomegalovírus utilizando o teste  
Quantiferon-CMV em receptores de  
transplante renal CMV-soropositivos**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Elias David Neto

(versão original)

**São Paulo**

**2022**

JOSÉ OTTO REUSING JUNIOR

**Predição de infecção clinicamente relevante  
por citomegalovírus utilizando o teste  
Quantiferon-CMV em receptores de  
transplante renal CMV-soropositivos**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Elias David Neto

(versão original)

**São Paulo**

**2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Reusing Junior, José Otto

Predição de infecção clinicamente relevante por citomegalovirus utilizando o teste Quantiferon-CMV em receptores de transplante renal CMV-soroativos / José Otto Reusing Junior. -- São Paulo, 2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientador: Elias David Neto.

Descritores: 1.Citomegalovirus 2.Infecções por citomegalovirus 3.Infecções oportunistas 4.Transplante de rim 5.Imunologia de transplantes 6.Predição 7.Regressão logística

USP/FM/DBD-285/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

## DEDICATÓRIA

Em todos os meus atos e pensamentos existe a marca de vocês, Olívia e André, mãe e companheiro, duas formas diferentes de amor e que têm me acompanhado nessa jornada.

Obrigado pela minha criação, pelo convívio, pelo amor, pelo incentivo e possibilidade de chegar até aqui, e pela paciência de abrir mão do nosso tempo juntos para que este trabalho fosse possível. Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, sujeitos deste estudo, vai o mais importante agradecimento. Obrigado por consentirem participar, terem seu sangue coletado e fornecido seus dados. A construção do nosso horizonte terapêutico comum é o que dá sentido a este trabalho.

Ao professor Elias, meu orientador, pelo aprendizado, confiança, exemplo e estímulo. Espero um dia estar à altura das suas expectativas.

À Lígia, minha coorientadora de fato, com quem eu tanto aprendi, pela parceria, ensino, paciência e companhia na luta por um país melhor.

À dra. Camille Kotton, coautora da publicação científica, por sua confiança e pronta ajuda, por suas sugestões e correções fundamentais neste trabalho.

À enfermeira Fabiana e à técnica de enfermagem Margarete, pela organização e coleta dos testes de QuantiFERON-CMV e demais exames necessários ao estudo.

Aos colegas médicos do Serviço de Transplante Renal do HCFMUSP, pelo cuidado dos pacientes, registro das informações clínicas, críticas e sugestões que aprimoraram este trabalho.

Aos parceiros dos laboratórios DASA, do Instituto de Medicina Tropical da USP e da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP, pela execução dos diversos testes necessários.

À Universidade de São Paulo, através de sua estrutura, seus professores e suas disciplinas de pós-graduação, com as quais eu tanto aprendi e me transformei como médico pesquisador e médico mais humano.

Aos meus familiares, mãe, pai, irmãs, cunhados, sobrinhos, tios, primos, sogros: sei da expectativa que vocês depositaram em mim e dos votos de sucesso.

Aos amigos queridos que dão sentido à minha vida e me acompanharam nessa jornada.

Obrigado a todos vocês.

*“Quem anda no trilho é trem de ferro.  
Sou água que corre entre pedras – liberdade caça jeito”  
(Manoel de Barros).*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIC	<i>Akaike information criterion</i>
AUC	área sob a curva (area under de curve)
ATG	globulina antitimocitária (Timoglobulina)
CMV-CS	infecção clinicamente significativa por citomegalovírus
CMV	citomegalovírus
d30	dia 30 pós-transplante
DLC	Divisão de Laboratório Central
DNA	ácido desoxirribonucléico
E	especificidade
Elisa	<i>enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , ensaio imunoenzimático
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HLA	antígeno leucocitário humano
ICE-CMV	imunidade celular CMV-específica
IIQ	intervalo interquartil
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
mTOR	<i>mammalian-target of rapamycine</i>
ns	não-significativo
PRA	panel reactive antibodies, painel reativo de anticorpos
QFCMV	QuantIFERON®-CMV
qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR - quantitative real-time polymerase chain reaction)
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> , ou curva característica de operação do receptor
RTR	receptor de transplante renal
R+	receptor CMV IgG positivo
S	sensibilidade
TFGe	taxa de filtração glomerular estimada
TOS	transplante de órgãos sólidos
TRIPOD	<i>Transparent reporting of a multivariable prediction model for prognosis or diagnosis</i>
Tx	transplante



VIF	fator de inflação da variância
VPN	valor preditivo negativo
VPP	valor preditivo positivo

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Etapas do processamento pré-analítico do QuantiFERON®-CMV .....	18
Figura 2 – Fluxograma do estudo. Cada paciente poderia ter mais de um critério de não-elegibilidade .....	26
Figura 3 – Gráfico de barras (100% empilhadas) para o resultado do QuantiFERON-CMV segundo o momento de coleta. ....	37
Figura 4 – Gráfico de barras (100% empilhadas) para o resultado do QuantiFERON-CMV segundo o momento de coleta.. ....	37
Figura 5 – Proposta de algoritmo em árvore de decisão para monitoramento do citomegalovírus (CMV) em receptores de transplante renal de risco intermediário. ....	48
Gráfico 1 - Curvas de Kaplan-Meier mostrando que não houve diferença significativa na ocorrência do primeiro evento CMV-CS.....	33
Gráfico 2 - Gráfico de caixas do QuantiFERON-CMV no pré-transplante e no dia 30, de acordo com a ocorrência de evento CMV-CS.....	34
Gráfico 3 - Curva ROC do QFCMV do dia 30 para evento CMV.....	35
Gráfico 4 – Curvas de Kaplan-Meier para a ocorrência de um primeiro evento CMV-CS de acordo com o resultado do teste QFCMV do dia 30.....	36
Gráfico 5 - Dendrograma com as variáveis preditoras de evento CMV .....	41
Gráfico 6 – Gráficos com a relação das variáveis contínuas preditoras e o logit do desfecho (evento CMV-CS) no modelo múltiplo estendido .....	43
Gráfico 7 – Matriz de correlação das variáveis preditoras.....	44
Gráfico 8 – Curvas de calibração dos modelos de predição. ....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características basais da coorte de estudo.....	27
Tabela 2 – Características dos eventos CMV.....	29
Tabela 3 – Resultados dos testes de pesquisa de CMV e aderência ao monitoramento .....	30
Tabela 4 – Principais complicações após o transplante renal e função do enxerto..	31
Tabela 5 – Ocorrência de evento CMV-CS de acordo com o resultado do QuantiFERON-CMV.....	32
Tabela 6 – Complicações infecciosas após o dia 30 do transplante conforme o resultado do QuantiFERON-CMV do dia 30 .....	39
Tabela 7 – Modelos de predição para um primeiro evento CMV-CS.....	42
Tabela 8 – Medidas de performance e de acurácia dos modelos de predição .....	46

## RESUMO

Reusing Junior JO. Predição de infecção clinicamente relevante por citomegalovírus utilizando o teste Quantiferon-CMV em receptores de transplante renal CMV-soropositivos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

A prevenção de doença por citomegalovírus (CMV) após o transplante renal (TR) é cara e de difícil logística. Apesar da utilidade promissora para estratificação de risco, o QuantiFERON-CMV® (QFCMV) não tem sido adotado na prática clínica. O QFCMV mede o interferon- $\gamma$  liberado das células CD8+ após estimulação com peptídeos relacionados ao CMV; o teste reagente indica presença de imunidade celular específica contra o CMV. Neste estudo de coorte prospectivo, testamos a associação do QFCMV e variáveis clínicas com a ocorrência de um evento CMV clinicamente significativo (doença por CMV ou viremia assintomática com necessidade de tratamento – CMV-CS) no primeiro ano pós-transplante. A coorte foi composta por 100 receptores adultos de TR, CMV IgG+, que receberam indução com basiliximabe e mantidos sob corticosteróide, micofenolato e tacrolimo. A prevenção utilizada foi a terapia preventiva com monitoramento semanal do CMV (dias 14-98) e então quinzenal (dias 100-180). 39 pacientes desenvolveram CMV-CS (doença por CMV=10, viremia assintomática=29). O resultado não-reagente ou indeterminado do QFCMV do dia 30 (mas não do QFCMV pré-transplante) foi associado a CMV-CS. A utilização de um valor de corte de QFCMV mais alto para reatividade ( $>1,0$  UI/ml) superou o corte da fabricante ( $>0,2$  UI/ml) para prever proteção contra CMV-CS. QFCMV do dia 30, idade do receptor e tipo de doador compuseram um modelo de predição simplificado para CMV-CS; essas variáveis em sua forma contínua mais a contagem de células CD8+ do dia 30 constituíram um modelo de predição principal. Ambos os modelos mostraram boa capacidade discriminativa ponderada e valor preditivo negativo de 93% e 95% para CMV-CS, respectivamente. Aplicando o modelo simplificado para orientar a decisão de prevenção, 42% de nossa coorte poderia ser seguida sem monitoramento de CMV, decisão que implicaria a ocorrência de 3 casos não previstos de evento CMV-CS. Esses

modelos de predição com QFCMV poderiam identificar pacientes soropositivos sob indução com basiliximabe a serem poupados de medidas preventivas de CMV, contribuindo assim para a redução de custos e direcionando a prevenção aos indivíduos de maior risco.

Palavras-chave: Citomegalovírus. Infecções oportunistas. Transplante de rim. Imunologia de transplantes. Predição. Regressão logística.

## ABSTRACT

Reusing Junior JO. A predictive model utilizing Quantiferon-CMV for clinically significant cytomegalovirus infection in CMV seropositive kidney transplant recipients [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

Cytomegalovirus (CMV) prevention after kidney transplant (KT) is costly and burdensome. Despite promising utility in risk stratification, QuantiFERON-CMV (QFCMV) has not been widely adopted into clinical practice. QFCMV measures interferon- $\gamma$  released from CD8<sup>+</sup> cells after stimulation with CMV-related peptides as a surrogate for CMV-specific cellular immunity. In this prospective cohort study, we tested the association of QFCMV and clinical variables with the occurrence of a clinically significant CMV event (CMV disease or asymptomatic viremia requiring treatment – CS-CMV) in the first posttransplant year. The cohort comprised 100 adults. KT-recipients, CMV IgG<sup>+</sup>, who were given basiliximab induction therapy and maintained on steroid/mycophenolate/tacrolimus. Monitoring was done with weekly PCR/antigenemia (days 14-98) and then every other week (days 100-180). 39 patients developed CS-CMV (CMV disease=10, asymptomatic viremia=29). A non-reactive or indeterminate QFCMV result at day 30 (but not pre-transplant QFCMV) was associated with CS-CMV. Utilization of a higher QFCMV cutoff for reactivity (>1.0 IU/ml) outperformed the manufacturer's cutoff (>0.2 IU/ml) for predicting protection from CS-CMV. Day 30 QFCMV, recipient age and type of donor comprised a simplified prediction model for CS-CMV; these variables in their continuous form plus day 30 CD8<sup>+</sup> count comprised a main prediction model. Both models showed good optimism-corrected discriminative ability and negative predictive value of 93% and 95% for CS-CMV, respectively. Using the simplified model to guide decision on prevention, 42% of our cohort could be followed without CMV monitoring at the hazard of 3 non-predicted CMV events. These prediction models could identify seropositive/basiliximab patients to be spared from CMV prevention, contributing to cost saving and directing prevention to the most needed.

Keywords: Cytomegalovirus. Opportunistic infections. Kidney transplantation. Transplant immunology. Prediction. Logistic regression.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de ilustrações

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo principal</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos secundários</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Desenho do estudo e participantes</b> .....	<b>12</b>
<b>3.2</b>	<b>Participantes</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3</b>	<b>Critérios de elegibilidade</b> .....	<b>12</b>
<b>3.4</b>	<b>Definições e desfechos</b> .....	<b>13</b>
3.4.1	Desfecho principal .....	13
3.4.2	Desfechos secundários .....	14
<b>3.5</b>	<b>Procedimentos</b> .....	<b>15</b>
3.5.1	Imunossupressão .....	15
3.5.2	Prevenção e manejo de CMV .....	15
3.5.3	Coleta de exames e das informações clínicas .....	16
3.5.4	Métodos laboratoriais .....	16
<b>3.6</b>	<b>Cálculo do tamanho da amostra</b> .....	<b>21</b>
<b>3.7</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>21</b>
3.7.1	Análise descritiva .....	21
3.7.2	Aderência e dados faltantes .....	21
3.7.3	Modelos de predição .....	22
<b>3.8</b>	<b>Suporte financeiro</b> .....	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>População do estudo</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>Desfechos</b> .....	<b>28</b>
4.2.1	Eventos CMV .....	28
4.2.2	Outros eventos após o transplante .....	30



<b>4.3</b>	<b>QuantiFERON-CMV .....</b>	<b>32</b>
4.3.1	QuantiFERON-CMV pré-transplante e eventos CMV .....	32
4.3.2	QuantiFERON-CMV pós-transplante (dia 30) e eventos CMV.....	33
4.3.3	Novo valor de corte para o QuantiFERON-CMV pós-transplante .....	35
4.3.4	QuantiFERON-CMV e outros eventos infecciosos .....	38
<b>4.4</b>	<b>Modelos de predição para infecção por CMV clinicamente significativa</b>	<b>40</b>
4.4.1	Seleção <i>a priori</i> de variáveis preditoras .....	40
4.4.2	Modelo de Predição Principal .....	41
4.4.3	Modelos de Predição Simplificados (A e B) .....	44
4.4.4	Qualidade dos modelos.....	45
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>

Referências bibliográficas

Apêndice



*“A doença é a zona noturna da vida, uma cidadania mais onerosa. Todos que nascem têm dupla cidadania, no reino dos sãos e no reino dos doentes. Apesar de todos preferirmos só usar o passaporte bom, mais cedo ou mais tarde nos vemos obrigados, pelo menos por um período, a nos identificarmos como cidadãos desse outro lugar”*  
(Susan Sontag, em Doença como metáfora).

## **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

O transplante renal é o tratamento que aumenta o tempo e melhora a qualidade de vida do indivíduo com doença renal crônica avançada,(1) porém esse benefício se acompanha de problemas relacionados à imunossupressão. As drogas imunossupressoras tão necessárias para prevenir a rejeição e manter o enxerto renal funcionando também aumentam o risco de infecção oportunista e, a longo prazo, de câncer.(2,3) O citomegalovírus (CMV) é o principal patógeno oportunista no transplante renal.(4)

Como os outros vírus da família *Herpesviridae*, o CMV fica latente após a infecção primária e pode se reativar ao longo da vida do hospedeiro. A infecção pelo CMV frequentemente causa doença nos indivíduos transplantados de órgão, ao contrário das pessoas imunocompetentes cuja infecção costuma ser oligossintomática.(5) No transplante, a doença citomegálica (ou doença pelo CMV) pode se apresentar como síndrome viral ou como doença invasiva grave, seja de trato gastrointestinal, pulmonar, renal, hepática, ocular, ou de outros órgãos.(6) A doença pelo CMV também leva aos chamados efeitos indiretos do vírus: menor sobrevida do enxerto e do paciente, ocorrência de rejeição aguda, infecção oportunista sobreposta e diabetes mellitus pós-transplante. (7)

Os principais fatores de risco para doença citomegálica são o status sorológico e a intensidade da imunossupressão. O risco de doença é maior na infecção primária oriunda do enxerto, que ocorre quando o órgão transplantado vem de um doador infectado e vai para um receptor que nunca teve contato com o vírus.(8) Sem prevenção, até 67% dos receptores soronegativos (R-, sorologia CMV IgG negativa) desenvolvem doença após receberem órgão de doador soropositivo (D+).(9) A doença citomegálica também pode ocorrer em receptores soropositivos (R+), mas geralmente por reativação da infecção latente ou por super-infecção por cepa diferente vinda do doador. Entre os R+ sem nenhuma prevenção, a incidência de doença em nosso serviço foi de 17%, mas pode ser mais alta com imunossupressão mais potente (9–11). O imunossupressor mais impactante no risco de doença é a globulina depletora de linfócitos/timócitos (12,13), como a globulina antitimocitária (ATG) de coelho que é utilizada como terapia de indução no transplante de alto risco imunológico.

Como outros vírus da família herpes, o CMV se mantém latente no hospedeiro por toda a vida e apresenta diversos mecanismos de evasão imune, com períodos intermitentes de replicação assintomática. Os linfócitos T CD4+ e CD8+ compõem o principal braço da resposta imune para o controle do vírus.(14) E no transplante, os linfócitos estão especialmente afetados pelos imunossupressores.

A prevenção da doença ou da infecção pelo CMV é complexa, cara e expõe o paciente a efeitos tóxicos do antiviral.(8,15–17) Não existe vacina eficaz e a presença de anticorpos contra o vírus é importante mas não suficiente para evitar a doença. No transplante renal, existem duas estratégias preventivas: profilaxia universal e terapia preemptiva. Ambas têm eficácia equivalente, porém têm vantagens e dificuldades diferentes.(8) A escolha da estratégia preventiva leva em consideração o risco de doença e a disponibilidade de recurso logístico e financeiro.

Em geral, a profilaxia com antiviral por três a seis meses é preferida nos casos de alto risco de doença citomegálica, que são aqueles pacientes que recebem indução com ATG e nos transplantes soro-discordantes, ou seja, doador soropositivo com receptor soronegativo (D+/R-) (8,16). A profilaxia é muito eficaz e previne também a reativação de outros herpesvírus, porém tem efeitos mielotóxicos (ganciclovir, valganciclovir) ou neurotóxicos (valaciclovir). Além disso, o custo mensal do valganciclovir profilático para um indivíduo com taxa de filtração glomerular (TFG) de 70 ml/min é de R\$ 9.455,20<sup>1</sup> (preço máximo de venda ao governo no Estado de São Paulo), mas pode chegar a 11.177,00 reais (medicamento genérico, preço máximo ao consumidor). Quando não é possível receber o valganciclovir oral, o paciente recebe diariamente ganciclovir endovenoso, que implica incômodo físico e gasto extra para sua administração.

Já a terapia preemptiva requer o monitoramento semanal rigoroso e demanda estrutura logística adequada para coleta do sangue, checagem do resultado e início rápido do tratamento antiviral antes do aparecimento de qualquer sintoma.(8) Esse monitoramento é feito através da pesquisa do vírus pela reação em cadeia da polimerase em tempo-real quantitativa (*qPCR - quantitative real-time polymerase chain reaction*) ou pela pesquisa do antígeno pp65 do CMV (antigenemia) no sangue.

---

<sup>1</sup> Valores extraídos da lista de preços dos medicamentos regulados do portal da Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicada em 11/5/2022 e acessada em 28/7/2022. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/cmed/precos>

Cabe notar que cerca de 94% dos transplantados renais em nosso Serviço são soropositivos (R+).(10,18)

No Brasil, foram realizados 6.296 transplantes de rim em 2019, um ano antes da pandemia de Covid-19.(19) Baseado na incidência de doença, pode-se concluir que 50-85% dos pacientes submetidos à prevenção não desenvolveriam doença citomegálica. Identificar esses indivíduos de antemão poderia facilitar o seguimento de grande número de pacientes, reduzir gastos com a prevenção e torná-la mais segura ao expor menos pacientes a seus efeitos adversos.

Outros fatores de risco para doença por CMV já foram identificados, tanto relacionados ao doador, ao receptor e ao transplante em si.(20) Cada vez mais, alelos específicos em genes de citocinas, imunoglobulina e receptores da resposta inata têm sido associados a proteção ou suscetibilidade ao CMV.(21) Recentemente, um algoritmo proposto para estratificar risco continha a genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único de alguns desses genes.(22) No nosso serviço, nós desenvolvemos um escore de risco clínico para doença por CMV tardia em pacientes que receberam ATG; as variáveis preditoras foram doador falecido, disfunção do enxerto e linfopenia.(18) Outros estudos demonstraram que linfopenia (23,24), hipogamaglobulinemia (25) e hipocomplementemia (26) se associaram à ocorrência de doença por CMV, enquanto que os inibidores da mTOR (everolimo ou sirolimo) são protetores. (27,28)

Em receptores CMV soropositivos, o curso da infecção pelo vírus é dirigido principalmente pela resposta linfocitária CMV-específica. Uma maneira de identificar pacientes de maior risco de infecção ou doença por CMV é através da avaliação da imunidade celular CMV-específica (ICE-CMV). Essa imunidade é demonstrada pela produção linfocitária de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ou de outros marcadores após o estímulo com antígenos do CMV. Algumas técnicas de avaliação da ICE-CMV foram desenvolvidas. Os ensaios de marcação de citocina intracelular com citometria de fluxo e marcação de peptídeos por tetrâmeros marcados são trabalhosos e restritos à área de pesquisa.(29) Há também outros ensaios disponíveis comercialmente, já padronizados e que são de mais fácil execução. Esses últimos são o QuantiFERON<sup>®</sup>-CMV (QFCMV) (Qiagen, Germantown, Estados Unidos da América) e os ensaios baseados na técnica de ELISPOT (ponto de imunoabsorção ligado a enzima, em tradução livre), como T-Track e T-SPOT.CMV. Os testes de ELISPOT quantificam o IFN- $\gamma$  produzido por linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> isolados e estimuladas por proteínas

virais, como a IE-1 e a pp65. Já o QFCMV mede, através de ensaio imunoenzimático, o IFN- $\gamma$  produzido apenas por linfócitos CD8+ estimulados por um conjunto de 22 peptídeos do CMV. (30,31) Como o estímulo no QFCMV é feito por peptídeos restritos a alguns alelos HLA de classe I (os mais prevalentes), pacientes com alelos HLA não cobertos pelo teste podem gerar resultado falso-negativo. (29,32) O Anexo 1 do Apêndice mostra os peptídeos do ensaio QFCMV e os alelos HLA correspondentes. Dos ensaios disponíveis comercialmente, o QFCMV não demanda separação de células sanguíneas mononucleares. (32)

Apesar de diversos estudos (Quadro 1), o uso dos ensaios de ICE-CMV não está difundido na prática clínica.(33,34)(35) Estudos observacionais e de intervenção publicados nos últimos três anos devem encorajar o uso desses testes em cenários específicos. Os testes do tipo ELISPOT demonstraram boa performance como critério de extensão da profilaxia antiviral. As evidências do uso do QFCMV em populações de risco intermediário ou baixo são mais limitadas. Ainda faltam estudos que definam os melhores valores de corte do QFCMV em populações com riscos distintos de CMV, especificados por tipo de indução, imunossupressão de manutenção e perfil sorológico. (8) Ainda quanto ao QFCMV, os melhores momentos para sua aplicação também não estão claros. (32)

O uso desses testes de ICE-CMV deve incorporar também outros preditores clínicos já conhecidos. Por fim, faltam estudos de custo-efetividade que avaliem também a segurança da tomada de decisão baseada nesses testes.

Nossa hipótese é que o QFCMV combinado com outras variáveis clínicas possa prever a ocorrência de infecção clinicamente relevante por CMV em indivíduos soropositivos e que não recebem ATG. A intenção é direcionar melhor a prevenção para reduzir, de modo seguro, seu custo e incômodo.

Quadro 1 - Estudos com QuantiFERON-CMV e transplante de órgão sólido

Autor, ano	População	Foco	Resultado	Comentários
Walker, 2007 (31)	TOS (n=25: coração, pulmão) + 37 voluntários saudáveis	Compara QFCMV com Elispot	QFCMV se correlacionou com sorologia e Elispot	Nenhum Tx renal. Sem desfecho clínico ou viremia. Estudo que estabeleceu o ponto de corte do QFCMV
Westall, 2008 (36)	Tx pulmão (n=39); R-: 26% Profilaxia 5m	QFCMV e infecção CMV (CMV em LBA)	QFCMV indeterminado 30% R+: 21% com viremia alta, dos quais 40% com QFCMV ~0,8-1,0 UI/ml	Nenhum Tx renal
Kumar, 2009 (37)	TOS (n=108); Rim (n=32); R-: 32%, ATG: 36% Profilaxia 3m	QFCMV ao final da profilaxia. Desfecho: Doença CMV tardia	Doença CMV 16,6%, em rim 9% QFCMV indeterminado 30%. $\geq 0,1$ UI/ml: 5,3% doença (vs 22.9%); $\geq 0,2$ : 3,3% doença (vs 21.8%)	Poucos desfechos e poucos Tx renal. Corte $\geq 0,2$ prediria apenas 1 caso a mais
Lochman ova, 2010 (38)	Tx renal (n=14); R-: 14%	QFCMV e viremia. Desenho transversal	Sugere que é o QFCMV é sensível para detectar resposta CMV específica	Número pequeno. Os resultados não estão claros
Lisboa, 2012 (39)	TOS (n=37); Rim (n=20) R-: 8%, ATG: 30%	QFCMV. Desfecho: clareamento viral espontâneo	QFCMV $\geq 0,2$ : 1/15 (rim) e 1 (fígado) não clarearam viremia curva ROC 0,84 (p=0,003); QFCMV $\geq 0,4$ : proteção S 66% E 88% VPP 95% VPN 41% p=0,038	Poucos Tx renal. Cenário de viremia positiva; prediz clareamento e não doença. Testou outros pontos de corte (sugere que corte maior pode ser usado)
Cantisán, 2013 (40)	TOS (n=55); Rim (n=32) R+: 80%, ATG: 2%	QFCMV pré-Tx Desfecho: viremia	Viremia: 30% (9% doença). QFCMV $< 0,2$ UI/ml: 48% viremia (vs 13%, p=0,007). Modelo múltiplo com QFCMV: curva ROC 0,8, S 56%, E 92%	Predomina risco intermediário. QFCMV pré-Tx, qualquer viremia
Manuel, 2013 (41)	TOS (n=127); Rim (n=68); R-: 100%; ATG/ alentuzum.: 40%	QFCMV ao final da profilaxia. Desfecho: doença CMV ou proteção	Doença CMV 22%; QFCMV indeterminado 10%; $\geq 0,1$ UI/ml: 6% doença (vs 27%). Para proteção: S 30% E 93% VPP 93% VPN 27%	Somente alto risco (R-). Correlação clínica. Ponto de corte para proteção pós-profilaxia
Abate, 2013 (42)	Tx renal (n=120) + 39 voluntários saudáveis R+: 83% (terapia preemptiva)	Compara QFCMV com Elispot pós-Tx (tempo variado). Desfecho: proteção contra viremia significativa até 60 dias após o QFCMV	Viremia: 27% . Curva ROC 0,66. QFCMV $> 1-6$ UI/ml QFCMV: bom valor preditivo para proteção	Referência importante. Período do QFCMV aleatório no pós-Tx Sugere que um ponto de corte maior pode prever proteção.
Sood, 2015 (43)	Tx fígado (n=75);	QFCMV ao final da profilaxia. Desfecho: viremia tratada	Viremia tratada: 50%. QFCMV $< 0,1$ UI/ml no dia 15: 80% viremia (vs	Nenhum Tx renal. Sugere que outro ponto



	R+: 77% (terapia preemptiva)		39%, p=0,002). S 42%, E 89%	de corte pode ser usado. Propõe estratificação
Cantisán, 2016 (44)	TOS (n=68); Rim (n=51); R-: 8%, ATG: 30%	Impacto da prevenção sobre a diferenciação de CD8+. QFCMV em subanálise	Doença CMV 25%, viremia 66%	Sem correlação com evento clínico ou viremia
Tarasewicz, 2016 (45)	Tx renal (n=25), R+: 60%, ATG: 8%	QFCMV pós-Tx em tempos variáveis (transversal)	Doença CMV: 4/4 em indeterminado e 7/21 em QFCMV não-reag/reag.	Inclui casos mesmo após doença CMV. Correlação com tubo Mitógeno mas não com tubo CMV
Kumar, 2017 (46)	TOS (n=27), Rim (n=7) R+: 48%, ATG: 22%	QFCMV ao final do tratamento de viremia para prever risco de recorrência	Recorrência de viremia: QFCMV $\geq 0,2$ : 7% recorreu CMV (vs 69%)	Estudo de intervenção para recorrência de CMV. Poucos Tx renal
Kwon, 2017 (47)	Tx renal (n=47), R+: 100%, ATG: 8%	Compara QFCMV pré-Tx e Elispot para prever viremia em 6m (qualquer nível)	Viremia: QFCMV $\geq 0,2$ : 15% (vs 29%);	Apenas QFCMV pré-Tx, sem associação com CMV (mas o Elispot sim). Poderia ter explorado maior ponto de corte
Lee, 2017 (48)	Tx renal (n=124), R+: 100%, ATG: 14%	QFCMV pré- e pós-Tx (1 e 3m). Compara com Elispot. Desfecho: qualquer viremia	Viremia: 12.9% (apenas 1 tratada). QFCMV sem correlação com viremia. Elispot IE1 1 mês: S 90% VPP 21%, VPN 95%	Estudo com grande número de R+ de Tx renal. Sem associação com QFCMV. Somente um caso de viremia significativa.
Chierighini, 2018 (49)	Tx coração (n=44), R+: 100% (39% profilaxia, 61% preemptivo)	QFCMV ao final da profilaxia e diversos pontos pós-Tx. Desfecho: viremia	Viremia: 55%. Alta prevalência de indeterminado. QFCMV muda ao longo do ano. QFCMV indet.: 67% virem (vs 14%); QFCMV não-reag/ind: 40%	Poderia ter explorado mais os dados. Desfecho foi qualquer viremia
Gliga, 2018 (50)	Tx renal (n=30), R+: 80%, ATG: 10%	QFCMV e Elispot no d30 (preemptivo) e final da profilaxia. Desfecho: proteção contra viremia (780 UI/ml R+ ou 62 UI/ml R-)	Viremia 57%. Proteção contra viremia (ROC): QFCMV AUC 0,47 ou 0,36; corte >85 UI/ml S 11% E 100%; TTrack AUC IE1 0,8 e pp65 0,62	Poucos casos. Analisa R+ e R- juntos. Análise estatística discutível (AUC <0,5 para QFCMV?). Propõe novo ponto de corte para proteção
Thompson, 2018 (51)	TOS (n=49); Rim (n=24). R+: 78%	QFCMV ao final da profilaxia. Desfecho: qualquer viremia	Incidência de viremia sem diferença entre grupos QFCMV, porém mais baixa no QFCMV reag.	Desfecho não adequado (mesmo viremia <100 UI/ml)
Dęborska-Materkowska, 2018 (52)	Tx renal (n=86), R+: 78%, ATG: 8%. Todos com profilaxia	QFCMV d30 e d90. Corte $\geq 0,2$ UI/ml. Desfecho: qualquer viremia pesquisada apenas nos dias	Viremia pós-profilaxia: 24%. $\geq 0,2$ UI/ml: 16% viremia (vs 43%). Modelo múltiplo: QFCMV não-reag. OR 4,2 e hipogamaglobul. OR 7,6	Modelo preditivo pós-profilaxia. Desfecho limitado: qualquer viremia apenas nos dias 90 e 360 ou doença

30, 90 e 360 pós-Tx

Gabant, 2018 (53)	Tx renal (n=53), R+: 100%, ATG ou basiliximabe. Terapia preemptiva	Compara QFCMV (pós-Tx sequencial) com marcação por citometria de fluxo. Desfecho: viremia alta tratada ou doença	Viremia alta 36%. QFCMV $\geq 0,2$ : 18% com viremia alta (vs 64%). S 85% E 63% VPN 71% para proteção	Descrição incompleta das características basais, resultado confuso. Recomenda seu uso na terapia preemptiva
Westall, 2019 (54)	Tx pulmão (n=118), R+: 75%, ATG ou basiliximabe. Terapia preemptiva	Intervenção: profilaxia estendida se QFCMV $\leq 0,2$ UI/ml (vs 5 meses). Desfecho: CMV no lavado broncoalveolar em 18 meses	CMV em 37% do grupo profilaxia estendida pelo QFCMV (vs 58% na profilaxia padrão). Sem diferença para viremia no sangue	Nenhum Tx renal. Estudo de intervenção randomizado. Não avalia o poder preditivo do QFCMV
Ruan, 2019 (33)	Tx renal. 4 estudos QFCMV, 6 estudos Elispot	Metanálise. Desfecho: Viremia	QFCMV: S 38%, E 38%; pooled OR 1,02 (ns), AUC 0,41; Elispot IE1: S 84%, E 46%, OR 5	QFCMV sem poder preditivo. Inconsistência alta por heterogeneidade dos métodos dos estudos; poucos estudos incluídos. Recomenda novos estudos com QFCMV
Poglajen et al., 2020 (55)	Tx cardíaco (n=154). R-: 17%, basiliximabe 100%	Prospectivo de intervenção, não randomizado. Profilaxia dirigida vs cuidado padrão. Desfecho: viremia e doença	Profilaxia dirigida: 5 vs 19% de infecção, porém com antiviral mais prolongado e mais leucopenia	Estudo não randomizado.
Fernandez-Ruiz et al., 2020 (56)	Tx Renal (n = 120). R+, ATG Todos com profilaxia	Observacional. QFCMV nos meses 2, 3, 4 e 5. Desfecho: viremia (qualquer nível)	Predição de proteção com cutoff 0,2 UI/ml: S 77%, E 34%, PPV 64%, sem diferença na incidência de viremia entre QFCMV nr/indet vs reagente. O corte 1,13 UI/ml prevUI melhor proteção (VPP 71%)	QFCMV pós-profilaxia não predispe CMV (corte 0,2). Sugere corte mais alto. Coorte de alto risco e homogênea. Desfecho fraco (qualquer viremia)

Tx, transplante; TOS, transplante de órgão sólido; CMV, citomegalovírus; QFCMV, QuantiFERON-CMV; ATG, globulina antitimocitária; VPN, valor preditivo negativo; VPP, valor preditivo, positivo; nr, não reagente; indet, indeterminado; R+, receptor CMV-soropositivo; R-, receptor CMV-soronegativo; LBA, lavado broncoalveolar.

*“— Lembro! Doutor apessoado, engraçado... Vivia atrás dos mosquitos, conhecia as raças lá deles, de olhos fechados, só pela toada da cantiga... Disse que não era das frutas e nem da água... Que era o mosquito que punha um bichinho amaldiçoado no sangue da gente... Ninguém não acreditou... Nem no arraial. Eu estive lá, com ele...”*  
(João Guimarães Rosa, no conto Sarapalha).

## **OBJETIVOS**

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo principal**

Avaliar a performance preditiva do teste QuantiFERON-CMV (QFCMV) para a ocorrência de infecção por CMV clinicamente significativa (CMV-CS) em receptores de transplante renal de risco intermediário para doença citomegálica que não recebem profilaxia.

### **2.2 Objetivos secundários**

- a) Descrever os episódios de CMV-CS e a probabilidade de sua ocorrência no primeiro ano de transplante conforme o resultado do teste QFCMV.
- b) Definir o melhor valor de corte do QFCMV para predizer ocorrência ou proteção de CMV-CS.
- c) Avaliar a aderência ao monitoramento da carga viral do CMV.
- d) Construir um modelo de predição para CMV-CS e avaliar sua performance.
- e) Avaliar se a ocorrência de CMV-CS se associa a outros eventos importantes após o transplante renal: rejeição aguda, infecção oportunista ou bacteriana, função do enxerto, evento cardiovascular, óbito e perda do enxerto.

*“O sentido forte de diálogo na perspectiva hermenêutica é o de fusão de horizontes (GADAMER, 2004), isto é, de produção de compartilhamentos, de familiarização e apropriação mútua do que até então nos era desconhecido no outro, ou apenas supostamente conhecido. Não basta, nesse caso, apenas fazer o outro falar sobre aquilo que eu, profissional de saúde, sei que é relevante saber. É preciso também ouvir o que o outro, que demanda o cuidado, mostra ser indispensável que ambos saibamos para que possamos colocar os recursos técnicos existentes a serviço dos sucessos práticos almejados.”*

(José Ricardo CM Ayres, em “Uma Concepção Hermenêutica de Saúde”).

## **MÉTODOS**

### **3 MÉTODOS**

#### **3.1 Desenho do estudo e participantes**

Este foi um estudo de coorte prospectivo e unicêntrico que avaliou a capacidade do teste QuantiFERON-CMV (QFCMV) predizer a ocorrência de infecção por CMV clinicamente significativa (CMV-CS) no primeiro ano após o transplante renal. O estudo foi conduzido no Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

O tempo de seguimento foi de um ano a partir do transplante renal.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP com registro na Plataforma Brasil (CAAE 81204017.1.0000.0068) e [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (NCT03858907).

#### **3.2 Participantes**

Pacientes submetidos a transplante renal no Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

#### **3.3 Critérios de elegibilidade**

Foram considerados elegíveis para o estudo todos os pacientes que internaram para transplante renal de agosto/2018 até agosto/2019.

Os critérios de inclusão foram:

- a) receptor de transplante isolado de rim;
- b) idade  $\geq$  18 anos;
- c) sorologia do pré-transplante CMV IgG positiva do receptor;
- d) fornecimento de consentimento livre e esclarecido com assinatura do termo (TCLE).

Os critérios de exclusão foram:

- a) óbito ou perda do enxerto renal nos primeiros 19 dias do transplante;
- b) retirada do TCLE pelo paciente;
- c) uso de globulina antitimocitária (ATG, timoglobulina) como terapia de indução.

### 3.4 Definições e desfechos

#### 3.4.1 Desfecho principal

“Evento CMV-CS” é o desfecho principal, que é o primeiro episódio de infecção por CMV clinicamente significativa (CMV-CS). Este foi definido pelo diagnóstico de doença citomegálica ou de viremia CMV assintomática que requeresse tratamento preemptivo. O tratamento preemptivo foi instituído quando o monitoramento do CMV detectava viremia  $\geq 4$  células/ $3 \times 10^5$  neutrófilos pela antigenemia ou  $\geq 3.500$  UI/ml de plasma pelo qPCR.

Os episódios recorrentes de CMV-CS (segundo, terceiro) não foram considerados para o desfecho principal.

A definição de doença citomegálica (doença por CMV) seguiu os critérios propostos por Ljungman et al. (57) que estão resumidos Quadro 2.

Quadro 2 – Critérios diagnósticos de doença citomegálica

	<b>Critérios</b>
Síndrome citomegálica	<p>Deteção de viremia por CMV mais 2 dos seguintes critérios, na ausência de outra causa mais provável):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• febre <math>\geq 38^{\circ}\text{C}</math> por pelo menos 2 dias,</li> <li>• mal-estar moderado novo ou fadiga intensa,</li> <li>• leucopenia (<math>&lt;3.500</math> células/<math>\text{mm}^3</math> ou queda de 20%) ou neutropenia (<math>&lt;1.500</math> células/<math>\text{mm}^3</math> ou queda 20%) nova em pelo menos 2 medidas com intervalo <math>&gt; 24</math> horas,</li> <li>• linfocitose atípica <math>\geq 5\%</math>,</li> <li>• plaquetopenia (<math>&lt;100.000</math> ou queda <math>&gt;20\%</math>) nova,</li> <li>• aumento de transaminases <math>&gt; 2x</math> o limite superior.</li> </ul>
Doença citomegálica invasiva confirmada	<p>Presença dos 3 critérios: sintomas de acometimento do órgão, evidência de lesão macroscópica (por exemplo, úlcera em exame endoscópico) e deteção de CMV em amostra histológica (inclusões virais sugestivas ou imuno-histoquímica)</p>
Doença citomegálica invasiva provável	<p>Doença invasiva pelo CMV suspeita, sem outro diagnóstico mais provável, mas com apenas 2 dos critérios de doença invasiva confirmada.</p>

Os diagnósticos de doença citomegálica e viremia assintomática com terapia preemptiva foram feitos inicialmente pelo médico assistente do paciente. Posteriormente, todos esses eventos CMV foram revisados pelo pesquisador principal e, quando necessário, reclassificados de acordo com os critérios acima.

### 3.4.2 Desfechos secundários

- a) Rejeição aguda foi o episódio de rejeição aguda registrado em prontuário e que tenha sido ou confirmado por biópsia renal ou recebido tratamento com pulsoterapia de corticosteróide ou ATG.
- b) Infecção relevante se refere à ocorrência de infecção oportunista ou bacteriana/viral grave conforme descrito abaixo.
- c) Infecção oportunista foi o evento de infecção causado por patógeno oportunista típico do transplante e que tenha implicado tratamento dirigido. Exemplos de infecção oportunista aqui considerados (não incluindo CMV): monilíase esofágica, fungemia, parvovirose, infecção intestinal por germe oportunista (parasitas, fungos, vírus), herpes genital e visceral, herpes zóster, nefropatia pelo poliomavírus (mesmo que presumida), tuberculose, micobacteriose atípica, criptococose, encefalite, pneumocistose, aspergilose, doença de Chagas aguda ou reativação, entre outras.
- d) Infecção bacteriana/viral grave foi o evento de infecção causado por bactéria ou vírus comum e que tenha prolongado ou levado à internação hospitalar ou ao óbito. O diagnóstico se baseava no quadro clínico com cultura positiva, ou quadro clínico mais tratamento antimicrobiano. As infecções bacterianas/virais aqui consideradas foram: pielonefrite aguda, infecção de corrente sanguínea, infecção associado a cateter venoso, sepse, infecção de sítio cirúrgico, pneumonia, enterocolite por rotavírus, osteomielite, abscesso, abdome agudo, Covid-19, influenza, etc.
- e) Neutropenia foi definida como contagem de neutrófilos em sangue periférico  $< 1.500/\text{mm}^3$ .
- f) Evento cardiovascular se refere a infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico ou obstrução arterial aguda.
- g) Função renal retardada se refere à necessidade de diálise na primeira semana do transplante. A função do enxerto foi quantificada pela taxa



de filtração glomerular estimada pela fórmula MDRD-4 (*Modification of Diet in Renal Disease 4*) a partir da creatinina plasmática.

### 3.5 Procedimentos

#### 3.5.1 Imunossupressão

A imunossupressão, descrita abaixo, seguiu o protocolo assistencial do Serviço de Transplante Renal do HCFMUSP.

A terapia de indução foi escolhida de acordo com o risco imunológico: receptores sensibilizados, ou seja, aqueles com painel (*PRA, panel reactive antigen*) diferente de zero, recebiam globulina antitimocitária de coelho (ATG); receptores não-sensibilizados (*PRA* igual a zero) recebiam basiliximabe. O basiliximabe foi administrado em dose única de 20mg no momento do transplante juntamente com metilprednisolona 500 mg.

A imunossupressão de manutenção consistia na associação de três drogas:

- a) prednisona 0,5 mg/kg/dia no início, reduzida progressivamente até atingir 5 mg/dia no segundo mês que foi mantida indefinidamente;
- b) micofenolato de sódio 720 mg a cada 12 horas, reduzido para 540 mg a cada 12 horas no segundo mês;
- c) tacrolimo com dose inicial de 0,1 mg/kg a cada dose horas, ajustado para atingir nível sanguíneo entre 8-12 ng/dl nos primeiros 2 meses e 5-10 ng/dl nos meses seguintes.

A critério do médico assistente, outros imunossupressores (sirolimo, everolimo, ciclosporina, azatioprina, leflunomida) podiam ser introduzidos para manejo de complicações clínicas ou em caso de intolerância ao esquema inicial.

#### 3.5.2 Prevenção e manejo de CMV

A estratégia de prevenção empregada foi o monitoramento viral com terapia preemptiva. O monitoramento foi feito com pesquisa de CMV no sangue através de

dois testes: pesquisa de antígeno pp65 (antigenemia) no sangue e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) no plasma.

O sangue para pesquisa de CMV foi colhido semanalmente entre os dias 14 e 91 e então quinzenalmente entre os dias 92 e 180, totalizando 18 coletas por paciente. Em caso de perda do enxerto renal, o monitoramento de CMV foi interrompido. O tratamento preemptivo foi indicado quando a viremia atingiu os seguintes valores de corte: antigenemia  $\geq 4$  células/ $3 \times 10^5$  (10) ou qPCR  $\geq 3.500$  UI/ml no plasma.

Tanto o tratamento preemptivo de viremia assintomática como de doença citomegálica seguiu as recomendações do consenso internacional.(8) Viremia assintomática e doença citomegálica leve foram tratadas preferencialmente com valganciclovir oral na dose de 900 mg a cada 12 horas por no mínimo 14 dias e até que duas pesquisas de CMV resultassem negativas. Os casos graves de doença foram tratados em regime hospitalar com ganciclovir endovenoso 5 mg/kg de peso a cada 12 horas, também por no mínimo 14 dias e até resolução da viremia e dos sintomas. A dose do antiviral foi ajustada pela taxa de filtração glomerular conforme as recomendações do consenso. Durante o tratamento, a pesquisa de CMV foi semanal.

### 3.5.3 Coleta de exames e das informações clínicas

Após a inclusão no estudo e antes do transplante renal, coletou-se 6 mililitros de sangue do participante em tubo de heparina-lítio para o teste QFCMV "pré-Tx".

Uma segunda amostra de sangue foi coletada 30 dias após o transplante para realização do QFCMV do "dia 30". Os participantes do grupo ATG tiveram ainda uma terceira amostra de sangue coletada no dia 90.

As informações clínicas e demográficas foram obtidas do prontuário eletrônico do STR-HCFMUSP.

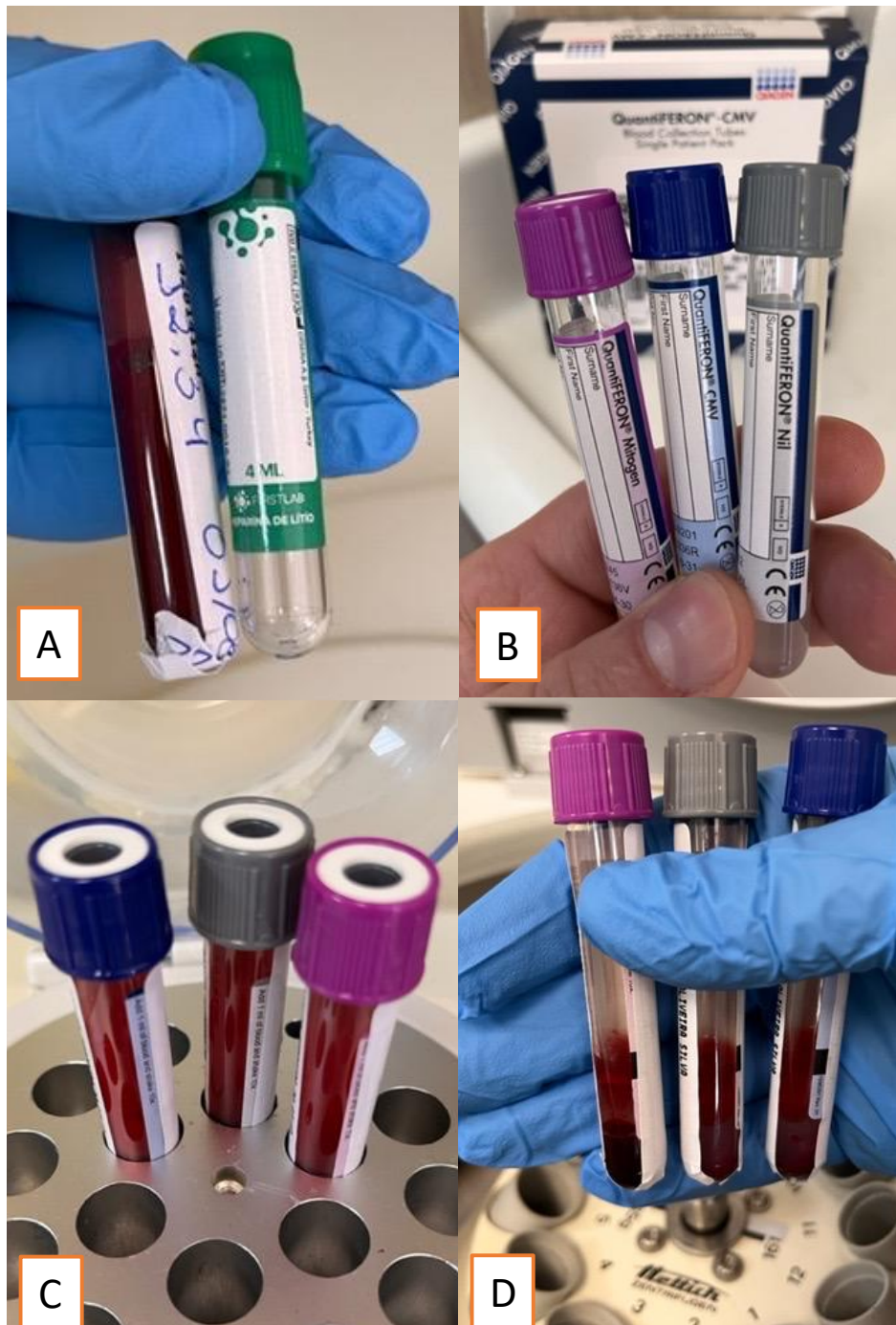
### 3.5.4 Métodos laboratoriais

Os testes de QuantiFERON foram realizados pelo Laboratório DASA utilizando kits da Qiagen. Todos os demais exames, incluindo as pesquisas de vírus, fazem parte da rotina assistencial do STR-HCFMUSP.

#### 3.5.4.1 QuantiFERON-CMV

Para o teste QFCMV, o sangue do paciente foi coletado em tubo de heparinólítio (6 ml) e armazenado por até 48 horas em câmara de refrigeração científica a 2-8°C. Um mililitro do sangue foi transferido para cada um dos três tubos do kit QFCMV: Mitogen (controle positivo), CMV, Nil (controle negativo). Esses tubos eram então incubados a 37°C na Sala de Pesquisa do Serviço de Transplante Renal do HCFMUSP por um período de 16 a 24 horas. Na sequência, os tubos de QFCMV eram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rotações por minuto e guardados na câmara de refrigeração até serem enviados semanalmente ao laboratório DASA. Este processamento pré-analítico está ilustrado nas fotografias da **Error! Reference source not found.**

Figura 1 – Etapas do processamento pré-analítico do QuantiFERON®-CMV. A – Coleta do sangue em tubos de heparina de lítio (refrigerado por até 48h). B – Tubos do ensaio QuantiFERON-CMV: Mitogen (tampa roxa, controle positivo), CMV (tampa azul), Nil (tampa cinza, controle negativo). C – Tubos com sangue incubados a 37°C por 16-24h. D – Tubos centrifugados com soro sobrenadante.



Fonte: do próprio autor

No laboratório DASA foi realizado o ensaio de detecção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) através de imunoabsorção enzimática (Elisa – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), conforme instrução da fabricante Qiagen. O resultado foi apresentado de duas formas: um quantitativo e outro categórico. O resultado quantitativo foi dado pela subtração da concentração de IFN- $\gamma$  do tubo CMV pelo IFN- $\gamma$  do tubo Nil e representava a variável contínua “QFCMV”. Na outra forma, as categorias eram “reagente”, “não-reagente” e “indeterminado”, a depender da concentração de IFN- $\gamma$  nos tubos (). Os resultados do QFCMV não estavam disponíveis à equipe médica assistencial durante o período do estudo, porém, o pesquisador principal teve acesso ao resultado dos primeiros 60 pacientes em maio/2019 quando eles já estavam com pelo menos 6 meses de seguimento. Portanto, nenhuma tomada de decisão ou conduta clínica foi tomada em base no teste QFCMV.

Quadro 3 – Classificação do resultado do QuantiFERON-CMV proposta pela fabricante

Tubo CMV-Nil (UI/ml)	Tubo Mitogen-Nil (UI/ml)	Resultado QFCMV
< 0,2	$\geq 0,5$	não-reagente
$\geq 0,2$	qualquer valor	reagente
< 0,2	< 0,5	indeterminado

Fonte: Manual de instruções do kit de coleta do QuantiFERON®-CMV (Qiagen, EUA)

#### 3.5.4.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A qPCR utilizada quantifica o DNA do CMV no plasma através da amplificação de regiões altamente conservadas dos genes UL34 e UL80.5. Este ensaio foi feito com o kit comercial Abbott RealTime CMV pelo Laboratório de Biologia Molecular da Divisão de Laboratório Central (DLC) do HCFMUSP. Ele consiste em um sistema de amplificação e detecção de DNA empregando como sonda um *primer* fluorescente bifuncional de fita simples. Quando a sonda não está ligada ao DNA viral, a extremidade com o fluoróforo fica próxima à do *quencher* devido ao seu formato em espiral e dessa forma não há emissão de sinal fluorescente. Na presença de DNA

viral, se houver ligação da sonda, o fluoróforo emite sinal pois fica afastado da outra extremidade.

O ensaio foi padronizado pela referência internacional da Organização Mundial de Saúde e seu resultado expresso em Unidades Internacionais/ml (UI/ml). O valor de corte indicativo de terapia preemptiva no HCFMUSP é  $\geq 3.500$  UI/ml de plasma. Apesar deste ponto de corte não ter sido formalmente testado para terapia preemptiva, ele foi definido por consenso entre a equipe médica assistencial em 2017 e se baseou em dados publicados.(58–61)

#### 3.5.4.3 Antigenemia pp65

A pesquisa de antígeno pp65 no sangue (antigenemia) foi feita pelo Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP em até 4 horas após a coleta do sangue conforme previamente descrito.(62) Sumariamente, o antígeno do CMV é detectado através da marcação por imunoperoxidase indireta em neutrófilos citocentrifugados utilizando anticorpo monoclonal contra a fosfoproteína 65 (pp65) expressa nas células infectadas. O resultado é lido em número de células marcadas por  $3 \times 10^5$  neutrófilos. Qualquer valor acima de zero foi considerado como resultado positivo, ou seja, presença de viremia. A terapia preemptiva, entretanto, foi indicada quando a antigenemia resultava  $\geq 4$  células/ $3 \times 10^5$  neutrófilos (10).

#### 3.5.4.4 Demais exames laboratoriais

Os exames de tipificação HLA do receptor e do doador e PRA pré-transplante foram realizados pelo Laboratório de Imunologia do Incor.

A análise histopatológica de produtos de biópsia foi feita no Serviço de Patologia do HCFMUSP.

O resultado dos demais exames laboratoriais foi extraído do prontuário eletrônico. Estes exames eram feitos na Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP e seguiam a rotina assistencial do Serviço de Transplante Renal: hemograma, creatinina, sorologia CMV, dosagem sanguínea de tacrolimo, imunofenotipagem de linfócitos (contagem de CD4+, CD8+, NK), IgG total, complemento C3. A taxa de filtração glomerular (TFG) foi estimada pela fórmula MDRD-4 (*Modification of Diet in Renal Disease 4*) a partir da creatinina plasmática.(63)

### 3.6 Cálculo do tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi estimado a partir do estudo espanhol de Cantisán *et al.*, 2013 e se baseou na habilidade do teste QFCMV pré-transplante predizer a ocorrência de viremia CMV (40). Naquele estudo, 68% dos receptores soropositivos tinham o teste reagente. A incidência de viremia foi 50% (7/14) entre os receptores com teste não-reagente/indeterminado versus 13% (4/30) no grupo com teste reagente.

Para um teste bicaudal com alfa de 5%, beta 10% e proporção 2:1 entre os grupos conforme QFCMV pré-transplante (reagente:não-reagente/indet.), o tamanho da amostra foi calculado em 78 indivíduos (Software G\*Power versão 3.1.9.2). Considerando 15% de retirada de consentimento e coleta inadequada de exames, e 5% de perda de enxerto nos primeiros 6 meses de transplante, estimamos o tamanho da amostra final em 100 participantes. Esse tamanho de amostra também foi conveniente pois havíamos recebido a doação de 220 testes QFCMV pelo laboratório DASA para utilizarmos em pacientes sob basiliximabe (2 testes por paciente).

### 3.7 Análise estatística

#### 3.7.1 Análise descritiva

Os dados demográficos e as características basais dos transplantes foram analisados com estatística descritiva. A idade foi descrita por média  $\pm$  desvio-padrão (DP); as demais variáveis contínuas foram expressas em mediana e seu intervalo interquartil de 25 e 75% (IIQ). As variáveis contínuas foram comparadas com teste de Wilcoxon não-pareado e as categóricas com qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou teste exato de Fisher. O teste de Spearman avaliou a correlação entre as variáveis contínuas.

Foi feita análise de sobrevivência através de curvas de Kaplan-Meier para mostrar a probabilidade de um primeiro evento CMV-CS, juntamente com teste de Log-Rank para comparar os grupos conforme resultado do QFCMV.

#### 3.7.2 Aderência e dados faltantes

A aderência ao monitoramento de CMV foi avaliada pela proporção de testes de CMV faltantes (antigenemia e qPCR) em relação ao número de testes esperados.

Ao final de um ano, cada participante deveria ter 18 coletas de sangue para antigenemia e qPCR, caso não tenha perdido o enxerto ou morrido.

Os dados faltantes (*missing data*) foram analisados quanto sua frequência e motivo da sua falta. Para a construção dos modelos de predição para evento CMV-CS, os dados faltantes das variáveis independentes (preditoras) ocorridos por ausência aleatória ou ausência totalmente aleatória (*missing at random* e *missing completely at random*) foram tratados por imputação múltipla. Neste processo de imputação, foram construídos 20 conjuntos de dados através da função *aregImpute* do programa estatístico R utilizando a abordagem de equação em cadeia. Por meio de emparelhamento de médias preditivas, os valores imputados foram preditos a partir de modelos aditivos flexíveis ajustados em reamostragens de *bootstrap*. Cada valor ausente recebeu, portanto, 20 imputações que levavam em consideração as demais variáveis e também algum grau de aleatoriedade. Na equação de regressão para estimar o dado imputado, foram incluídos os preditores candidatos para evento CMV-CS, o próprio desfecho evento CMV-CS e dados adicionais do paciente como TFGc com 3 meses, tempo de diálise e contagens de linfócitos de 2, 3 e 6 meses. Os preditores para imputação de dados foram mantidos em sua forma original.

### 3.7.3 Modelos de predição

Modelos de regressão logística múltipla foram construídos para predição de risco de evento CMV-CS. A seleção das variáveis preditoras que comporiam o modelo de predição teve duas fases: uma pré-seleção teórica e outra estatística. Inicialmente o conjunto de preditores candidatos foi filtrado de acordo com o conhecimento teórico prévio, levando-se em consideração a relevância clínica, a confiabilidade da medida e características basais da coorte, mas sem considerar o desfecho. Para reduzir o vício das estimativas do modelo, procuramos manter a relação entre número de variáveis preditoras e número de desfechos próxima a 1:10. Tentamos manter preditores que representassem diferentes *clusters* de variáveis relacionadas, além do QFCMV. As variáveis foram mantidas em sua forma contínua se tivessem relação linear com o *log-odds* do desfecho. Para reduzir a colinearidade, as variáveis altamente correlacionadas pelo teste de Spearman foram reduzidas a uma única variável.



Em seguida, o processo de modelagem por regressão logística múltipla foi feito em cada banco de dados imputado através da função *fit.mult.impute* do software R. Estes resultados foram então combinados seguindo a regra de Rubin para estimar os coeficientes e erros-padrão das variáveis preditoras. O método de bootstrap 0,632 (200 iterações 10 vezes) foi utilizado para seleção dos preditores por Stepwise regressivo (eliminação escalonada) a partir do conjunto pré-selecionado de preditores. Esta abordagem também forneceu os valores ponderados de R<sup>2</sup>, índice de Brier e de concordância (validação interna). O critério de informação de Akaike (AIC) foi aplicado como regra de parada na seleção dos preditores. O modelo de predição fornecido por este processo foi chamado de Modelo Principal e continha as variáveis na sua forma contínua quando possível.

Outro modelo de predição, chamado de Modelo Simplificado, foi construído com preditores categóricos para que pudesse ter fácil aplicação na prática clínica. As variáveis contínuas foram categorizadas com base em estudos publicados. Como exceção, as categorias do QFCMV foram escolhidas por análise da curva ROC para o desfecho (evento CMV-CS). A seleção das variáveis preditoras seguiu o mesmo processo do Modelo Principal.

As seguintes suposições dos modelos de regressão múltipla foram avaliadas: linearidade entre a variável independente contínua e o desfecho; multicolinearidade através de matriz de correlação entre das variáveis explicativas e teste do fator de inflação da variância; verificação de outliers pelo método de Distância de Cook.

O desempenho e a qualidade dos modelos de predição foram avaliados através de testes de desempenho geral (R<sup>2</sup> Nagelkerke, score de Brier), calibração (inclinação da curva e gráfico de calibração) e discriminação (índice de concordância, gráfico de curva ROC). As medidas de acurácia (sensibilidade e especificidade) foram calculadas a partir da probabilidade predita de cada indivíduo nos 20 bancos de dados imputados.

A análise estatística e os gráficos foram feitos com o software R (RStudio 2022.02.1+461 "Prairie Trillium" Release para macOS). Foram utilizados os pacotes *tidyverse*, *compareGroups*, *rmda*, *gmodels*, *stats*, *pROC*, *rms*, *ResourceSelection*, *caret*, *ggpubr*, *inspectdf*, *dca*, *glmnet*, *Hmisc* e *survival*. A significância estatística foi definida por p bicaudal < 0,05.

### **3.8 Suporte financeiro**

O teste de QFCMV foi realizado pelo Laboratório DASA através de uma parceria com a Qiagen sem custos para o HCFMUSP e nem para os pesquisadores envolvidos. Os demais exames fizeram parte da rotina assistencial do STR-HCFMUSP. Não houve financiamento externo para esta pesquisa.

*“...ciência e humanidades, é verdade, são fundamentalmente diferentes uma da outra, no que fazem e dizem. Mas elas são complementares na origem e emergem do mesmo processo criativo da mente humana. Se o poder heurístico e analítico da ciência puder ser unificado à criatividade introspectiva das humanidades, a existência humana ascenderá a um significado infinitamente mais produtivo e interessante.”*  
(Edward O Wilson, em O sentido da existência humana).

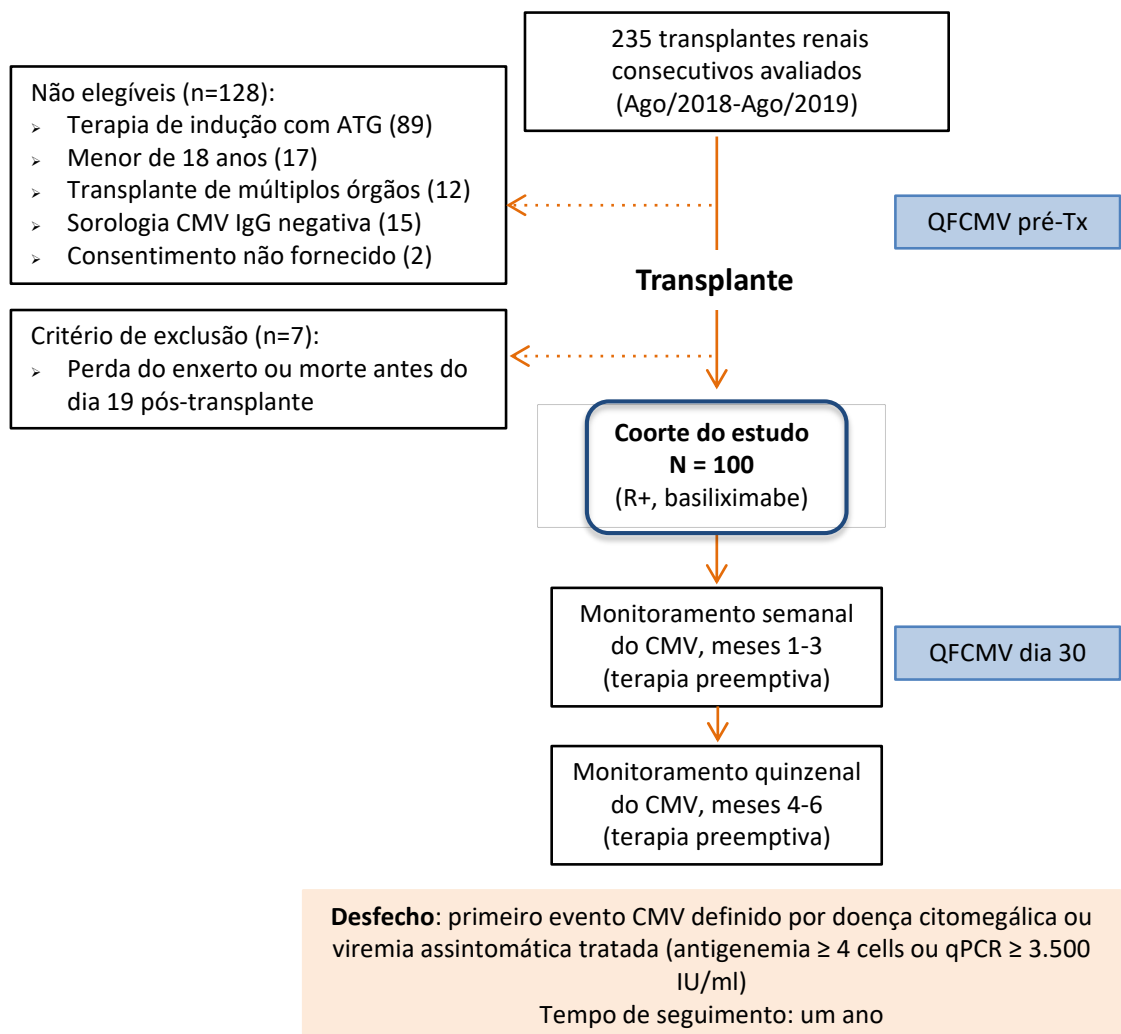
## **RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 População do estudo

No período de inclusão, 235 pacientes receberam um transplante renal, dos quais 100 compuseram a população final do estudo. A Figura 1 mostra o fluxograma de inclusão, os critérios de exclusão e detalhes do desenho do estudo.

Figura 2 – Fluxograma do estudo. Cada paciente poderia ter mais de um critério de não-elegibilidade



Fonte: do próprio autor

As características clínicas e demográficas basais dos participantes estão descritas na

Tabela 1. Predominaram receptores masculinos e a idade média foi 50,6 anos. Nenhum receptor tinha anticorpos HLA no dia do transplante e nenhum recebeu ATG como terapia de indução. Todos os pacientes, exceto um, estavam sob terapia dialítica na época do transplante.

Tabela 1 – Características basais da coorte de estudo (n = 100) e ocorrência do evento CMV-CS

Característica	Todos (n = 100)	Sem evento CMV-CS (n = 61)	Com evento CMV-CS (n = 39)
<b>Receptor:</b>			
Gênero masculino, n (%)	67 (67)	38 (62,3)	29 (74,4)
Idade, média de anos (DP)	50,6 (13,2)	47,2 (12,2)	56 (13,2)
Idade > 60 anos, n (%)	28 (28)	8 (13,1)	20 (51,3)
Branco, n (%)	72 (72)	51 (83,6)	21 (53,8)
Presença do antígeno HLA-A2, n (%)	44 (44)	35 (57,4)	9 (23,1)
<b>Causa da insuficiência renal, n (%):</b>			
Glomerulonefrite crônica	44 (44)	28 (45,9)	16 (41)
Nefropatia diabética	22 (22)	10 (16,4)	12 (30,8)
Outras	34 (34)	23 (37,7)	11 (28,2)
Tempo de diálise, mediana de meses (IIQ)	42 (22; 79)	30 (17; 72)	56.0 (37.5; 90.5)
Transplante renal prévio, n (%)	6 (6)	5 (8,2)	1 (2,6)
Priorização em lista (falência de acesso vascular), n (%)	12 (12)	8 (13,1)	4 (10,3)
<b>Doador:</b>			
Doador falecido <sup>a</sup> , n (%)	75 (75)	38 (62,3)	37 (94,9)
Gênero masculino, n (%)	51 (51)	28 (45,9)	23 (59,0)
Idade, média de anos (DP)	45,3 (14,7)	42,6 (14,1)	49,4 (14,9)
Caucasiano, n (%)	58 (58)	40 (65,6)	18 (46,2)
Doador de critério expandido (falecido), n (%)	27 (36)	10 (26,3)	17 (45,9)
KDRI (doador falecido), mediana (IIQ)	1,26 (0,93; 1,46)	1,12 (0,85; 1,35)	1,33 (1,06; 1,6)
Sorologia CMV IgG positiva do doador <sup>b</sup> , n (%)	35/39 (89,7)	26 (89,7)	9 (90)

Transplante:

Tempo de isquemia fria (doador falecido), mediana de horas (IIQ)	29 (24; 32)	30 (24; 31,8)	27 (24; 34)
Incompatibilidades HLA-ABDR, mediana (IIQ)	2 (1.75; 3)	2 (1; 4)	2 (2; 3)
Função retardada do enxerto, n (%)	25 (25)	15 (24,6)	10 (25.6)
Variáveis clínicas e laboratoriais do dia 30:			
TFGe, mediana ml/min/1.73m <sup>2</sup> (IIQ)	40 (27; 51)	42,3 (31; 55)	32.9 (21.3; 44.7)
IgG total <sup>b</sup> , mediana (IIQ)	858 (731; 1.091)	852 (732; 1.057)	864 (732; 1096)
Complemento C3 <sup>b</sup> , mediana (IIQ)	117 (102; 129)	116 (101; 129)	118 (104; 130)
Contagem total de linfócitos, mediana de células/mm <sup>3</sup> (IIQ)	1430 (923; 2.520)	1.550 (1.080; 2.600)	1.210 (715; 2.170)
Contagem de CD4+ <sup>b</sup> , mediana de células (IIQ)	668 (452; 1.170)	788 (476; 1.390)	558 (351; 872)
Contagem de CD8+ <sup>b</sup> , mediana de células (IIQ)	368 (215; 581)	442 (300; 673)	249 (170; 393)
Contagem de NK <sup>b</sup> , mediana de células (IIQ)	119 (72; 204)	144 (91; 222)	84 (60; 159)
Nível sanguíneo de tacrolimo, mediana ng/ml (IIQ)	9,1 (7,3; 11,7)	9 (7; 11,6)	9,1 (7,5; 11,8)
Dose de ácido micofenólico, mediana mg/kg/day (IIQ)	16,2 (13,5; 18,8)	16,3 (13,3; 18,8)	15,9 (14,1; 19,7)

DP, desvio-padrão; IIQ, intervalo interquartil; TFGe, taxa de filtração glomerular estimada pela fórmula MDRD-4.

<sup>a</sup>Nenhuma das doações ocorreu após morte circulatória (com coração parado). <sup>b</sup>As quantidades de observações faltantes foram: C3 (2), IgG (3), CD8+ (4), CD4+ (4), NK+ (4) e sorologia CMV do doador (61).

## 4.2 Desfechos

### 4.2.1 Eventos CMV

Ao final do mês 12, 39 pacientes haviam apresentado um primeiro evento CMV-CS (desfecho primário) a uma mediana de 54 dias (IIQ 43; 76) do transplante. Nove pacientes tiveram ainda um segundo evento CMV-CS. Entre os 39 eventos do desfecho primário, 29 (74,4%) foram classificados como viremia assintomática que requereu tratamento, e dez (25,6%) como doença citomegálica (Tabela 2).

Sete pacientes necessitaram internação hospitalar mas nenhum morreu por doença citomegálica. Todos os casos de doença invasiva foram de acometimento gastrointestinal. A Tabela 2 descreve tais eventos.

Tabela 2 – Características dos eventos CMV (N = 100)

<b>Evento CMV-CS</b>	<b>Número (%)</b>	<b>N (denominador)</b>
Primeiro evento CMV-CS (desfecho primário)	39 (39%)	100
Síndrome citomegálica	1 (2,6%)	39
Doença invasiva pelo CMV provável	5 (12,8%)	39
Doença invasiva pelo CMV confirmada	4 (10,3%)	39
Viremia pelo CMV assintomática <sup>a</sup>	29 (74,4%)	39
Tempo até o 1º evento CMV-CS, mediana de dias (IIQ)	54 (43; 76)	39
Segundo evento CMV-CS	9 (23,1%)	39
Síndrome citomegálica	2 (22,2%)	9
Doença invasiva pelo CMV possível	1 (11,1%)	9
Viremia pelo CMV assintomática <sup>a</sup>	6 (66,7%)	9
Tempo até o 2º evento CMV-CS, mediana de dias (IIQ)	121 (119; 131)	9
Hospitalização por doença citomegálica	7 (53,8%)	13

<sup>a</sup> Viremia pelo CMV assintomática foi definida como viremia pelo CMV  $\geq 4$  células (antigenemia pp65) ou  $\geq 3.500$  UI/ml plasma (qPCR) que requereu tratamento antiviral

Quanto ao protocolo de monitoramento do CMV, foram coletadas 1.326 (76%) amostras de sangue de um total de 1.745 amostras que seriam esperadas para pesquisa com qPCR mais antigenemia. Os motivos para não coleta das amostras faltantes foram: 1) não comparecimento do paciente ao laboratório; 2) falta de testes qPCR no laboratório; 3) indisponibilidade de teste antigenemia nos finais-de-semana e feriados. Ainda assim, o número mediano de coletas de sangue por paciente foi de 14 (IIQ 12; 16). Especificamente, das 18 amostras planejadas por pacientes, o número mediano de qPCR disponível foi 10 (IIQ 7,75; 12,25) e de antigenemia foi 13 (IIQ 10; 15). Em algumas amostras foi feito apenas um dos testes.

Entre os nove casos de doença por CMV ocorridos durante o período de monitoramento (primeiros 180 dias), cinco casos ocorreram apesar da antigenemia negativa, porém a qPCR não fora realizada na semana anterior ao início dos sintomas. Em 3 casos, ambos os testes de CMV (antigenemia e qPCR) estavam ausentes na semana anterior aos sintomas. Em um caso o tratamento preemptivo não foi iniciado

devido à falha do contato telefônico. A Tabela 3 resume os resultados dos testes de CMV. Os pacientes que desenvolveram doença citomegálica tiveram pico de viremia mais alto pelo qPCR do que aqueles que tiveram apenas viremia assintomática tratada. A maioria dos eventos CMV foi diagnosticada com qPCR.

Tabela 3 – Resultados dos testes de pesquisa de CMV e aderência ao monitoramento

Teste	Todos os 1 <sup>os</sup> eventos CMV (N=39)	Viremia assintomática tratada (N=29)	Doença CMV (N=10)	p
Método diagnóstico inicial do evento CMV-CS:				0,261
Apenas antigenemia	5 (12,8%)	5 (17,2%)	0	
Antigenemia e qPCR	18 (46,2%)	13 (44,8%)	5 (50%)	
Apenas qPCR	15 (38,5%)	11 (37,9%)	4 (40%)	
Biópsia tecidual	1 (2,6%)	0	1 (10%)	
Pico mediano de antigenemia, em número de células <sup>b</sup> (IIQ)	4 (1,5; 16)	4 (2; 12)	3,5 (1,5; 182)	0,593
Pico mediano de qPCR, em UI/ml (IIQ)	10.910 (4.286; 28.021)	6.780 (4.059; 15.192)	50.152 (17.338; 103.518)	0,020

<sup>a</sup>A porcentagem de testes disponíveis se refere à proporção de testes efetivamente realizados em relação ao total de testes esperados por paciente. <sup>b</sup>Antigenemia pp65 como número de células/300.000 neutrófilos.

qPCR, reação em cadeia da polimerase em tempo real; IIQ, intervalo interquartil.

#### 4.2.2 Outros eventos após o transplante

As principais complicações pós-transplante estão descritas na Tabela 4. A proporção de pacientes com rejeição aguda foi de 20%, dos quais 16 receberam pulso de corticosteróide e quatro receberam tratamento com ATG. Após o ATG, esses pacientes receberam profilaxia antiviral com valganciclovir por 90 dias. Pelo dia 90 pós-transplante, sete pacientes haviam trocado o micofenolato para algum inibidor da mTOR devido a intolerância gastrointestinal.

Quatro pacientes (4%) perderam o enxerto: um por rejeição aguda, dois por pielonefrite e um por não-funcionamento primário. Um participante perdeu o seguimento após sua transferência para outra instituição.



Quanto às complicações infecciosas que não CMV, 38 pacientes apresentaram alguma infecção importante (oportunistas ou bacteriana/viral grave) ao longo do seguimento (Tabela 4). Não houve diferença na frequência de infecções não-CMV entre os indivíduos com evento CMV-CS (41%) e sem evento CMV-CS (36,1%) ( $p = 0,774$ ). Em destaque, sete indivíduos desenvolveram herpes-zóster e doze tiveram pielonefrite aguda.

As infecções que especificamente ocorreram após o dia 30 estão detalhadas na Tabela 6 conforme o resultado do QFCMV.

Tabela 4 – Principais complicações após o transplante renal e função do enxerto

Pacientes com evento pós-transplante <sup>a</sup>	Todos (N = 100)	Sem evento CMV-CS (N = 61)	Com evento CMV-CS (N = 39)	P
Rejeição aguda, n (%)	20 (20)	14 (23)	6 (15,4)	0,505
Tempo até o 1o episódio de rejeição aguda (dias)	70 (14; 177)	69 (17; 198)	74 (24; 131)	0,509
Rejeição aguda tratada com ATG, n (%)	4 (4)	3 (4,9)	1 (2,6)	1,000
Perda de enxerto censurada para óbito, n (%)	4 (4)	2 (3,3)	2 (5,1)	0,642
Óbito, n (%)	1 (1)	0	1 (2,6)	
TFGe do dia 90 <sup>b</sup> , mediana ml/min/1,73m <sup>2</sup> (IIQ)	46 (33; 55)	49 (38; 57)	35 (28; 47)	0,014
TFGe do mês 12 <sup>b</sup> , mediana ml/min/1,73m <sup>2</sup> (IIQ)	43 (31; 54)	45 (36; 57)	41 (28; 50)	0,078
Infecção importante (não-CMV), n (%)	38 (38)	22 (36,1)	16 (41)	0,774
Infecção oportunista (não-CMV), n (%)	18 (18)	9 (14,8)	9 (23,1)	0,430
Infecção bacteriana/viral grave, n (%)	28 (28)	16 (26,2)	12 (30,8)	0,791
Neutropenia (<1.500 células/mm <sup>3</sup> ), n (%)	9 (9)	4 (6,6)	5 (12,8)	0,306
Evento cardiovascular (IAM ou AVE), n (%)	4 (4)	2 (3,3)	2 (5,1)	0,642
DM pós-transplante, n (%)	11 (11)	9 (14,8)	2 (5,1)	0,194
Uso de inibidor da mTOR (em qualquer momento), n (%)	16	7 (11,5)	9 (23,1)	0,206
Tempo até a introdução do inib. mTOR, dias (IIQ)	102 (80,8; 161)	86 (41; 173)	123 (90; 154)	0,266

ATG, globulina antitimocitária; TFGe, taxa de filtração glomerular estimada pela fórmula MDRD; IIQ, intervalo interquartil; IAM, infarto agudo do miocárdio; AVE, acidente vascular encefálico; DM, diabetes mellitus.

<sup>a</sup>Os números se referem à quantidade de pacientes que apresentaram o evento; os pacientes que apresentaram eventos repetidos foram contados apenas uma vez. <sup>b</sup>Uma paciente não tinha TFGe

perto do dia 90 e um paciente perdeu o seguimento e não tinha TFGe do mês 12; aos pacientes que perderam enxerto ou que morreram foi atribuída TFGe de 0.

### 4.3 QuantiFERON-CMV

#### 4.3.1 QuantiFERON-CMV pré-transplante e eventos CMV

O QFCMV pré-transplante teve resultado não-reagente (CMV-Nil < 0.2 UI/ml) em 23/89 pacientes (25,8% dos testados) (Tabela 5); nenhum teste pré-transplante teve resultado indeterminado. Embora o resultado pré-transplante não-reagente (CMV-Nil < 0,2 UI/ml) não tenha se associado a evento CMV-CS (47,8% vs 33%,  $p = 0,323$ ) (Gráfico 1), o nível quantitativo do CMV-Nil foi maior nos pacientes que não desenvolveram evento CMV-CS: 2,94 UI/ml vs 0,68 UI/ml ( $p = 0,036$ ) (Gráfico 2).

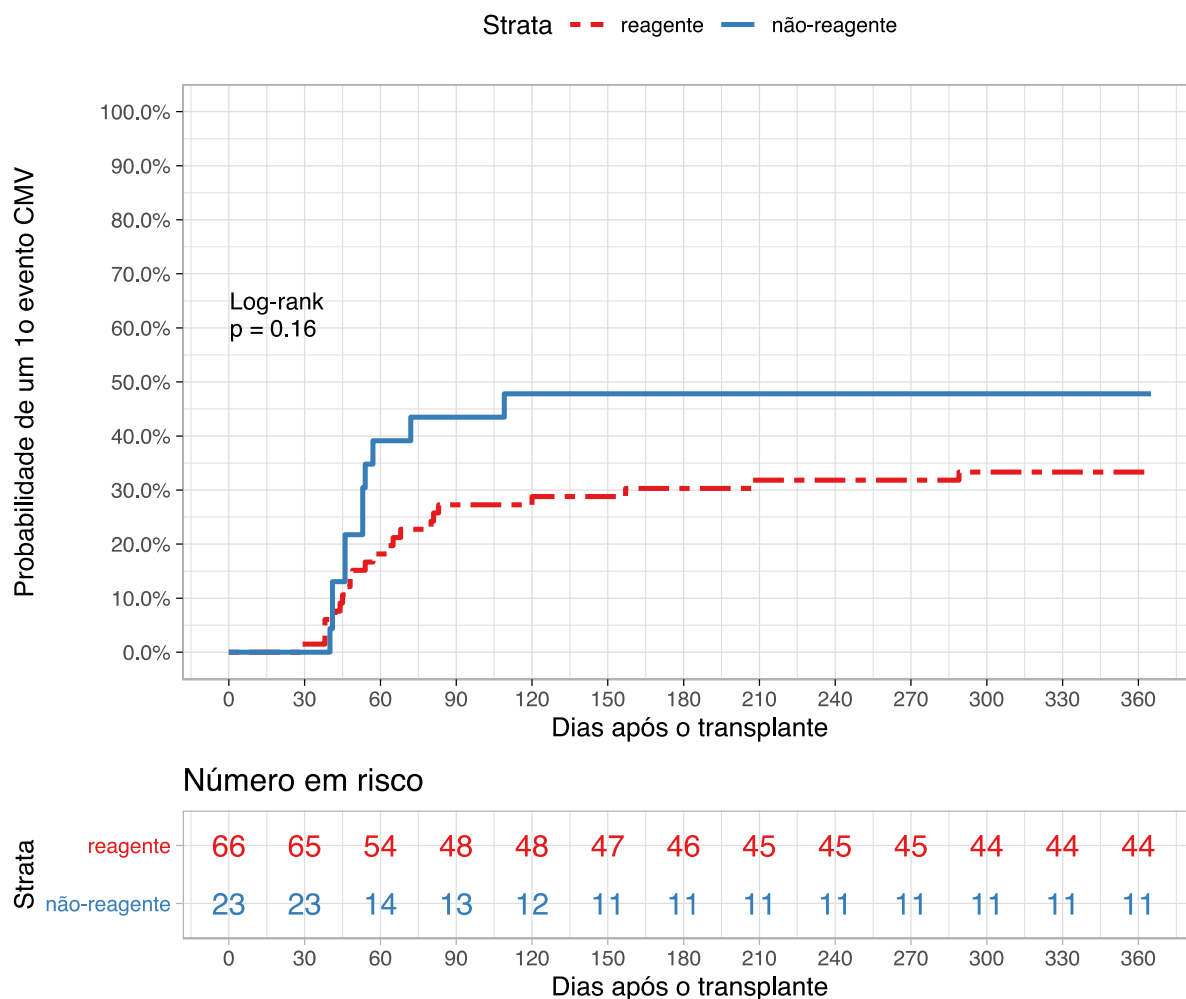
Tabela 5 – Ocorrência de evento CMV-CS de acordo com o resultado do QuantiFERON-CMV. As frequências estão apresentadas com porcentagem da linha

Testes QuantiFERON-CMV	Número	Sem evento CMV-CS	Com evento CMV-CS	p
Resultados do QFCMV pré-transplante:	89 <sup>a</sup>			
reagente (CMV-Nil $\geq$ 0,2 UI/ml), n (%)	66	44 (66,7)	22 (33,3)	0,323
não-reagente (CMV-Nil < 0,2 UI/ml), n (%)	23	12 (52,2)	11 (47,8)	
indeterminado, n (%)	0			
CMV-Nil, mediana UI/ml (IIQ)	1,63 (0,17; 6,09)	2,94 (0,33; 8,72)	0,68 (0,12; 3,07)	0,036
Resultados do QFCMV do dia 30:				
<sup>b</sup> reagente (CMV-Nil $\geq$ 0,2 UI/ml), n (%)	60	44 (73,3)	16 (26,7)	0,003
<sup>b</sup> não-reagente (CMV-Nil < 0,2 UI/ml), n (%)	28	14 (50)	14 (50)	
<sup>b</sup> indeterminado, n (%)	12	3 (25)	9 (75)	
<sup>c</sup> reagente (CMV-Nil $\geq$ 1,0 UI/ml), n (%)	38	32 (84,2)	6 (15,8)	<0,001
<sup>c</sup> não-reagente (CMV-Nil < 1,0 e Mit-Nil $\geq$ 0,5 UI/ml), n (%)	47	26 (55,3)	21 (44,7)	
<sup>c</sup> indeterminado, (CMV-Nil < 1,0 e Mit-Nil < 0,5 UI/ml), n (%)	15	3 (20)	12 (80)	
CMV-Nil, mediana UI/ml (IIQ)	0,52 (0,03; 4,56)	1,11 (0,18; 10)	0,07 (0,01; 0,55)	<0,001

QFCMV, QuantiFERON-CMV; IIQ, intervalo interquartil.

<sup>a</sup>Faltaram 11 observações do QFCMV pré-transplante. <sup>c</sup>Valor de corte de 1,0 UI/ml explorado na seção 4.3.3

Gráfico 1 - Curvas de Kaplan-Meier mostrando que não houve diferença significativa na ocorrência do primeiro evento CMV-CS entre indivíduos com teste QFCMV pré-transplante não-reagente (CMV-Nil < 0,2 UI/ml, linha contínua azul) e indivíduos com teste reagente.



Fonte: do autor

#### 4.3.2 QuantiFERON-CMV pós-transplante (dia 30) e eventos CMV

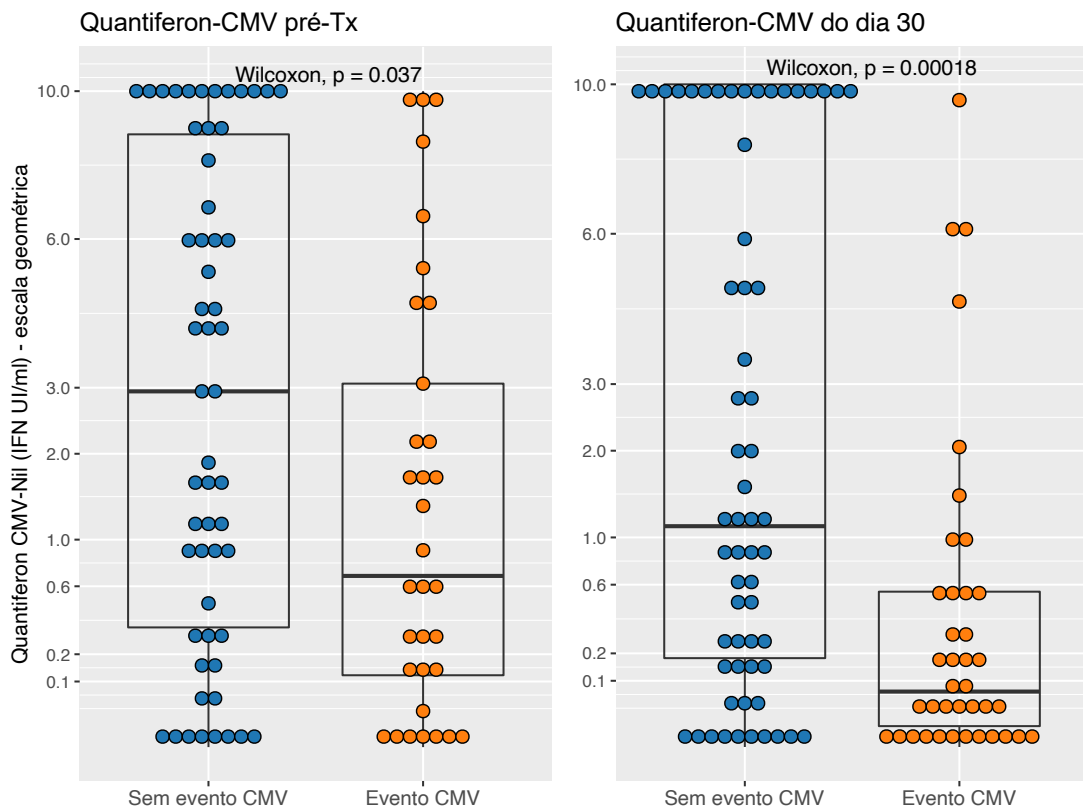
O QFCMV pós-transplante foi coletado a uma mediana de 30 dias (IIQ 28, 33) após o transplante. 60 (60%) dos pacientes tiveram resultado reagente, 28% tiveram resultado não-reagente e 12% tiveram resultado indeterminado pelo valor do

fabricante. O resultado não-reagente se associou a evento CMV-CS subsequente (50% vs 26,7% com resultado reagente,  $p = 0,003$ ) (Tabela 5). 9/12 (75%) dos pacientes com resultado indeterminado desenvolveram evento CMV-CS. Os pacientes que não desenvolveram evento CMV-CS tiveram nível mediano de CMV- Nil pós-transplante maior: 1,11 vs 0,07 UI/ml,  $p < 0,001$  (Gráfico 2 e Tabela 5

Tabela 1).

Como nota, três pacientes (3%) não possuíam nenhum dos antígenos HLA cobertos pelo teste QFCMV. Apesar disso, um deles testou reagente (CMV- Nil 0,64 UI/ml); os antígenos sorológicos dessa paciente eram A74, 74 e B18, 18.

Gráfico 2 - Gráfico de caixas do QuantiFERON-CMV (como CMV- Nil em UI de IFN- $\gamma$ /ml) no pré-transplante e no dia 30, de acordo com a ocorrência de evento CMV-CS. Os pacientes que desenvolveram evento CMV-CS tiveram níveis mais baixos de CMV- Nil. Entre os 6 casos de evento CMV-CS precedidos por QFCMV  $> 1,0$  UI/ml do dia 30, 3 casos foram caracterizados como doença CMV e 3 casos como viremia assintomática.

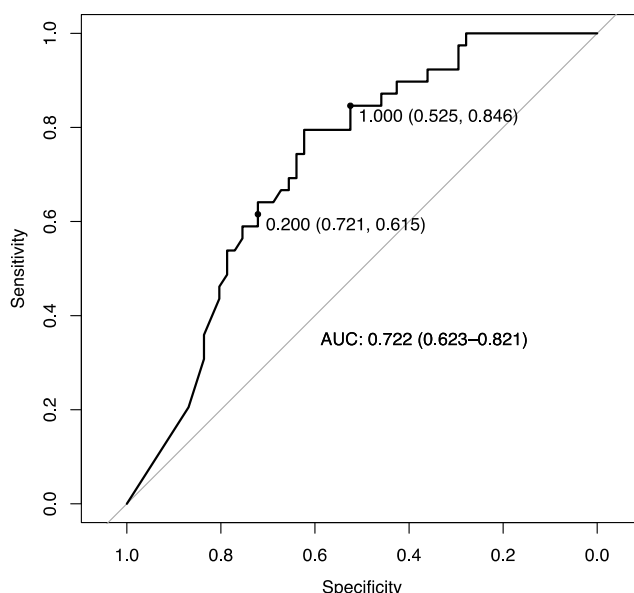


Fonte: do próprio autor

#### 4.3.3 Novo valor de corte para o QuantiFERON-CMV pós-transplante

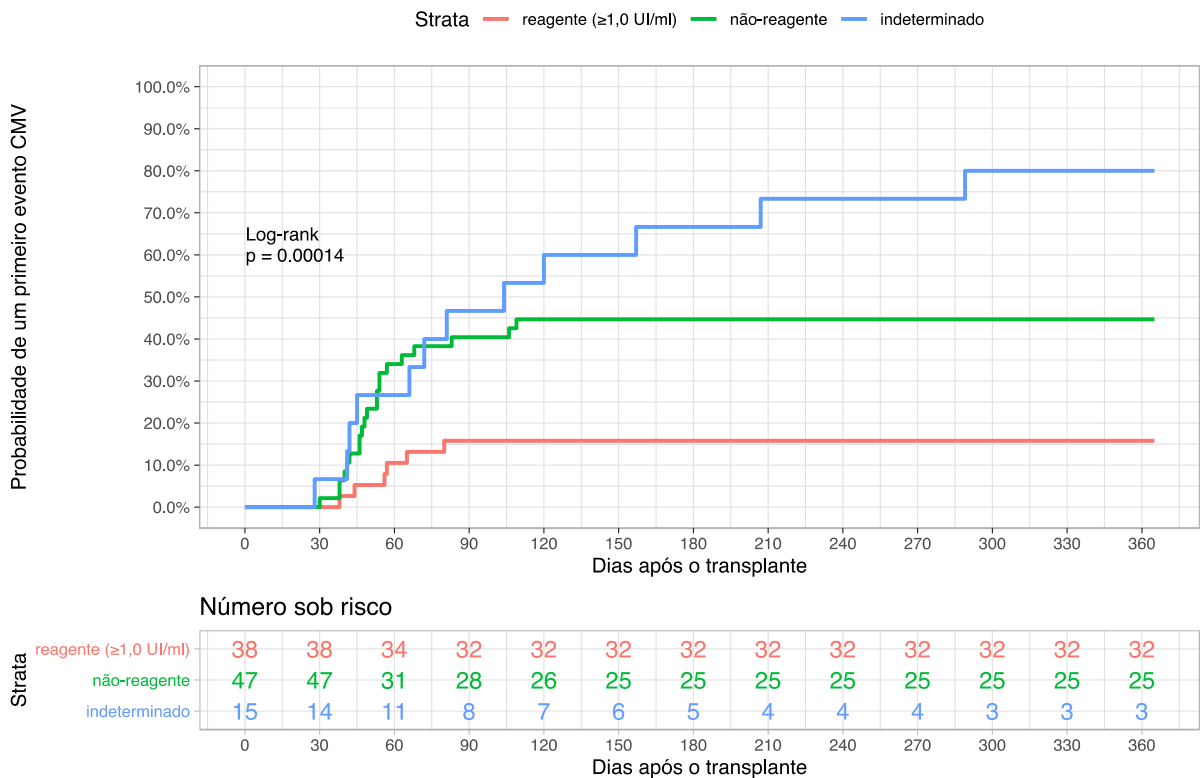
Nós exploramos um novo valor de corte para o QFCMV (CMV-Nil) do dia 30 para melhor discriminar os pacientes protegidos do evento CMV-CS. Através da análise da curva ROC (AUC = 0,722, IC 95% 0,623 a 0,821), o valor de corte do CMV-Nil  $\geq 1,0$  UI/ml para teste reagente teve um maior valor preditivo negativo (VPN) para evento CMV-CS (84%) do que o valor de corte 0,2 do fabricante (73%) (Gráfico 3). A probabilidade de um primeiro evento CMV-CS foi 15,8% (IC 95% 3,4 a 26,6) em pacientes com QFCMV do dia 30 (CMV-Nil)  $\geq 1,0$  UI/ml, 44,7% (IC 95% 28,5 a 57,2) para CMV-Nil  $< 1,0$  e 80% (IC 95% 45 a 92,7) para resultado indeterminado (Log-rank,  $p < 0,001$ ), conforme mostra a Gráfico 4.

Gráfico 3 - Curva ROC do QFCMV do dia 30 (CMV-Nil, em UI de IFN- $\gamma$ /ml) para prever um evento CMV clinicamente significativo após o transplante renal. Os dois pontos de corte de 0,2 e 1,0 são mostrados com seus valores de especificidade e sensibilidade entre parênteses, respectivamente. AUC é a área sob a curva ROC e corresponde ao índice de concordância com seu intervalo de confiança de 95%.



Fonte: do próprio autor

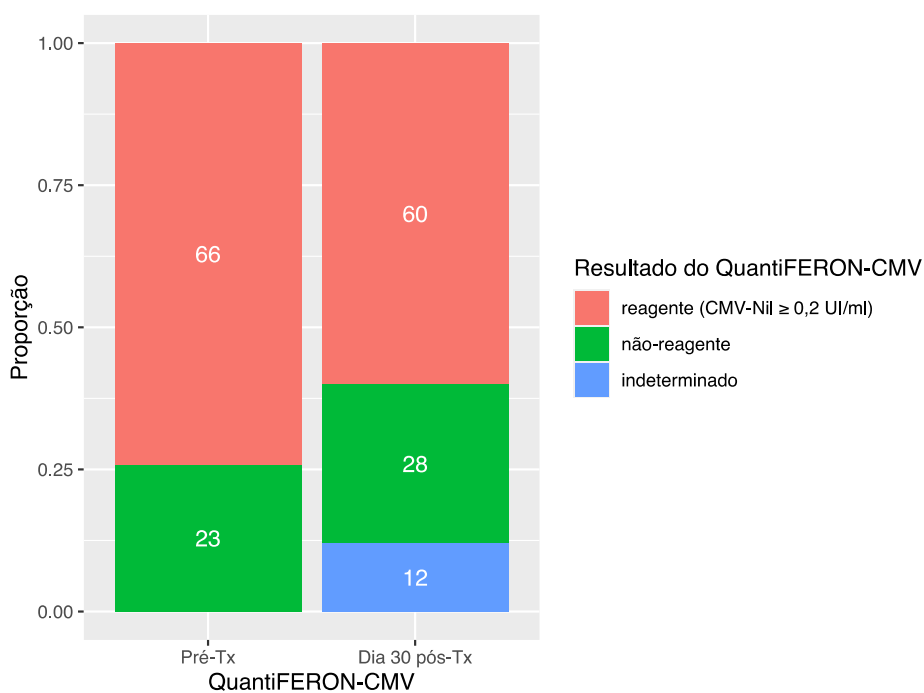
Gráfico 4 – Curvas de Kaplan-Meier para a ocorrência de um primeiro evento CMV-CS de acordo com o resultado do teste QFCMV do dia 30 (valor de corte proposto pelo autor). Os receptores com resultado não-reagente (CMV-Nil < 1,0 e Mit-Nil  $\geq$  0,5 UI/ml, linha verde) e indeterminado (CMV-Nil < 1,0 e Mit-Nil < 0,5 UI/ml, linha azul) tiveram maior probabilidade de evento (Log-rank,  $p < 0,0014$ ) do que os pacientes com teste reagente (CMV-Nil  $\geq$  1,0 UI/ml, linha vermelha). A maioria dos eventos ocorreu entre os dias 30 e 90 pós-transplante.



Fonte: do próprio autor

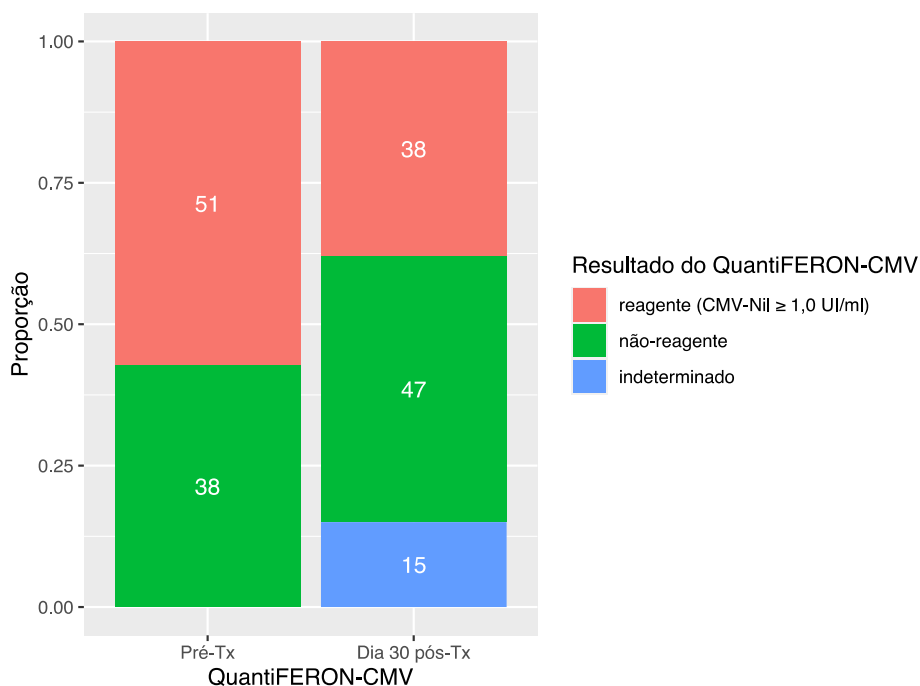
Entre os 23 pacientes com QFCMV pré-transplante não-reagente pelo corte da fabricante (CMV-Nil < 0,2 UI/ml), apenas um (4,3%) passou a ter o QFCMV acima de 1,0 UI/ml no dia 30 pós-transplante. E ao contrário, entre os 66 pacientes com QFCMV pré-Tx reagente (CMV-Nil  $\geq$  0,2 UI/ml), 13 (20%) passaram a testar não-reagente (< 0,2 UI/ml) ou indeterminado no dia 30.

Figura 3 – Gráfico de barras (100% empilhadas) para o resultado do QuantiFERON-CMV segundo o momento de coleta. Após o transplante, aumenta a proporção de resultados não-reagentes e aparecem resultados indeterminados, segundo a classificação do fabricante (valor de corte CMV-Nil  $\geq 0,2$  UI/ml para resultado reagente).



Fonte: do próprio autor

Figura 4 – Gráfico de barras (100% empilhadas) para o resultado do QuantiFERON-CMV segundo o momento de coleta. Após o transplante, aumenta a proporção de resultados não-reagentes e aparecem resultados indeterminados, segundo a classificação proposta pelo autor (valor de corte CMV-Nil  $\geq 1,0$  UI/ml para resultado reagente).



Fonte: do próprio autor

#### 4.3.4 QuantiFERON-CMV e outros eventos infecciosos

Nós também testamos se o QFCMV do dia 30 poderia prever a ocorrência de infecções relevantes subsequentes. As principais infecções oportunistas após o dia 30 foram nefropatia pelo poliomavírus BK (5 casos) e herpes zóster (7 casos). Vinte pacientes tiveram infecção bacteriana grave (que requereu internação hospitalar; a principal causa foi pielonefrite aguda (8 casos). As demais causas de infecção estão descritas na Tabela 6.

Classificamos o resultado do QFCMV conforme o valor de corte explorado no parágrafo anterior em que o resultado “reagente” é definido pelo CMV-Nil  $\geq 1,0$  UI IFN- $\gamma$ /ml e o resultado indeterminado é definido pelo CMV-Nil  $< 1,0$  UI/ml com Mit-Nil  $< 0,5$  UI/ml. Não houve associação entre o resultado do QFCMV do dia 30 e a ocorrência de infecção oportunista não-CMV ou de infecção bacteriana grave (Tabela 6).



Tabela 6 – Complicações infecciosas após o dia 30 do transplante conforme o resultado do QuantifERON-CMV do dia 30 (valor de corte CMV-Nil 1,0 IFN- $\gamma$  UI/ml)

	Todos (N=100)	QFCMV reag. (>1,0 UI/ml) (N=38)	QFCMV não- reagente (n=47)	QFCMV indeterm. (N=15)	p
<b>Infecção relevante (incluindo CMV) após o dia 30, n (%)</b>	54 (54)	15 (39,5)	26 (55,3)	13 (86,7)	0,008
Evento CMV-CS, n (%)	39 (39)	6 (15,8)	21 (44,7)	12 (80)	<0,001
Tipo do evento CMV-CS, n (%)					
Síndrome citomegálica	1 (1)	0	1 (2,1)	0	
Doença invasiva possível	5 (5)	2 (5,3)	2 (4,3)	1 (6,7)	
Doença invasiva confirmada	4 (4)	1 (2,6)	3 (6,4)	0	
Viremia assintomática tratada	29 (29)	3 (7,9)	15 (31,9)	11 (73,3)	
<b>Infecção oportunista (não- CMV), n (%):</b>	15 (15)	6 (15,8%)	7 (14%)	2 (13,3%)	1,000
Enterocolite por rotavírus	1 (1)	0	1 (2,1)	0	
Herpes zóster	7 (7)	4 (10,5)	2 (4,3)	1 (6,7)	
Encefalite	1 (1)	0	1 (2,1)	0	
Nefropatia pelo poliomavírus	5 (5)	1 (2,6)	3 (6,4)	0	
Monilíase esofágica	3 (3)	1 (2,6)	2 (4,3)	0	
<b>Infecção bacteriana grave, n (%):</b>	20 (20)	7 (18,4)	10 (21,3)	3 (20)	0.943
Pneumonia	5 (5)	2 (5,3)	2 (4,3)	1 (6,7)	
Sepse	2 (2)	0	2 (4,3)	0	
Infecção de sítio cirúrgico	2 (2)	1 (2,6)	1 (2,1)	0	
Infecção de corrente sanguínea	5 (5)	3 (7,9)	1 (2,1)	1 (6,7)	
Infecção associada a catéter venoso	3 (3)	1 (2,6)	1 (2,1)	1 (6,7)	
Osteomielite	1 (1)	0	1 (2,1)	0	
Pielonefrite aguda	8 (8)	3 (7,9)	3 (6,4)	2 (13,3)	
Enterocolite por rotavírus	1 (1)	0	1 (2,1)	0	

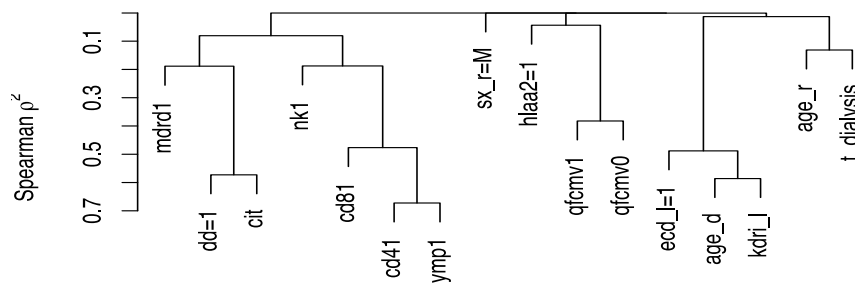
#### 4.4 Modelos de predição para infecção por CMV clinicamente significativa

Como os eventos CMV ocorreram após o dia 30, consideramos as variáveis basais e as do dia 30 como potenciais preditores. Em relação aos dados faltantes, onze amostras de QFCMV pré-transplante estavam ausentes devido a restrição a coleta adequada em final de semana e incubação oportuna. Quatro observações de dia 30 para contagem de células CD4+, CD8+ e NK estavam ausentes porque o ensaio de imunofenotipagem de linfócitos não havia sido agendado. Consideramos que a ausência dos dados ocorreu independente do desfecho; os dados faltantes foram tratados como *missing at random* (dados perdidos aleatoriamente).

##### 4.4.1 Seleção *a priori* de variáveis preditoras

Dois modelos de predição foram construídos por meio de regressão logística múltipla. Para reduzir a incerteza dos modelos devido ao pequeno tamanho da amostra, inicialmente os seguintes preditores candidatos foram descartados com base em literatura prévia e sem considerar sua relação com o desfecho: gênero e alelo HLA-A2 do receptor.(20) A rejeição aguda foi descartada porque teria que ser analisada como covariável tempo-dependente (seu efeito sobre o risco de evento CMV-CS varia conforme o momento em que a rejeição ocorre); a variável rejeição também traria fatores de confusão como tipo de tratamento da rejeição e uso de profilaxia antiviral pós-rejeição, de modo que exigiria mais graus de liberdade na regressão. Os seis preditores restantes entraram no modelo completo: idade do receptor, tipo de doador, QFCMV (dia 30), TFG<sub>e</sub> (dia 30) e contagens de CD4+ e CD8+ do dia 30. Procuramos manter preditores de clusters distintos (Figura 3), a exceção da contagem CD4+ e CD8+.

Gráfico 5 - Dendrograma com as variáveis predictoras de evento CMV-CS agrupadas por similaridade



Legenda: mdrd1, taxa de filtração glomerular estimada do dia 30; dd, doador falecido; cit, tempo de isquemia fria; nk1, contagem de células NK do dia 30; cd81, contagem de células CD8+ do dia 30; cd41, contagem de células CD4+ do dia 30; lymp1, contagem de linfócitos totais do dia 30; sx\_r=M, receptor masculino; hlaa2, receptor com alelo HLA-A2; qfcmv1, QFCMV do dia 30; qfcmv0, QFCMV pré-transplante; ecd\_l, doador de critério expandido; age\_d, idade do doador; kdri\_l, índice de KDRI do doador; age\_r, idade do receptor; t\_dialysis, tempo de diálise.

Fonte: o próprio autor

#### 4.4.2 Modelo de Predição Estendido

Para construção do modelo de predição estendido, um modelo completo com os seis preditores selecionados *a priori* foi submetido ao método de *bootstrap* 0,632 para eliminação passo a passo (*stepwise*) de variáveis; este processo computou todos os conjuntos de dados imputados. As variáveis foram mantidas em sua forma original contínua, quando era o caso, e um modelo de regressão logística múltipla para o evento CMV-CS foi construído. A Tabela 7 mostra os quatro preditores finais do Modelo Estendido com seus coeficientes e erros-padrão: QFCMV do dia 30, contagem de CD8+ do dia 30, idade do receptor e tipo de doador.

Tabela 7 – Modelos de predição para um primeiro evento CMV-CS (100 pacientes, 39 eventos). A tabela mostra os coeficientes ( $\beta$ ) das regressões logísticas múltiplas

Modelos ajustados	Preditor	Coef. $\beta$	EP	OR	IC 95%	P
Modelo Estendido	Intercepto	-2,633				
	Idade do receptor, décadas	0,462	0,21	1,59	1,18 – 2,39	0,027
	Doador falecido	1,892	0,86	6,63	4,95 – 35,8	0,028
	Contagem de CD8+ no dia 30, células/mm <sup>3</sup> x 10 <sup>-2</sup>	-0,307	0,13	0,74	0,49 – 0,94	0,014
	QFCMV do dia 30 (CMV-Nil, em UI IFN- $\gamma$ /ml)	-0,282	0,09	0,75	0,57 – 0,91	0,003
Modelo Simplificado A	Intercepto	-3,195				
	Idade do receptor $\geq$ 60 anos	1,681	0,56	5,37	3,71 – 16	0,003
	Doador falecido	2,034	0,82	7,64	6,03 – 38,4	0,014
	QFCMV do dia 30 não-reagente (CMV-Nil < 0.2 UI/ml)	1,011	0,57	2,75	1,63 – 8,4	0,076
	QFCMV do dia 30 indeterminado	2,045	0,83	7,73	6,09 – 39,7	0,014
Modelo Simplificado B	Intercepto	-4,047				
	Idade do receptor $\geq$ 60 anos	1,87	0,62	6,49	5,27 – 22	0,003
	Doador falecido	2,022	0,84	7,56	5,92 – 38,9	0,016
	QFCMV do dia 30 não-reagente (CMV-Nil < 1,0 UI/ml)	1,744	0,64	5,72	4,46 – 20,1	0,007
	QFCMV do dia 30 indeterminado (CMV-Nil < 1,0 e Mit-Nil < 0,5 UI/ml)	3,066	0,92	21,5	19,7 – 130	<0,001

EP, erro-padrão; OR, razão de chance ou *odds-ratio*; IC, intervalo de confiança.

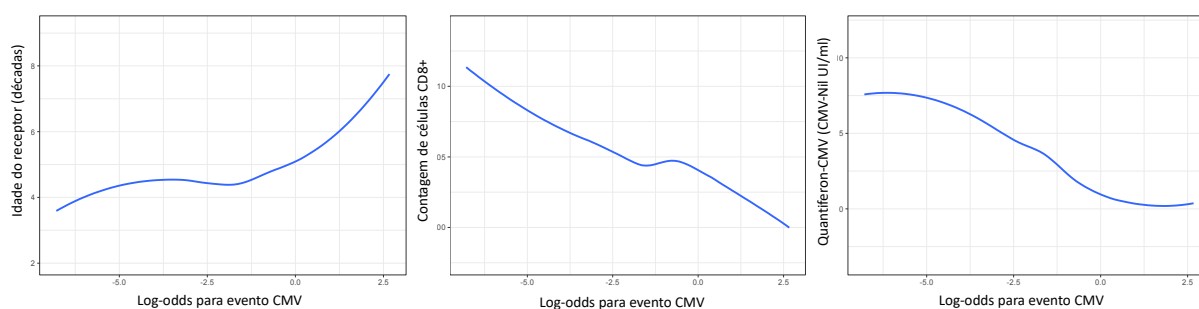
A fórmula para estimar a probabilidade (risco) de um evento CMV-CS no Modelo Estendido é:

Probabilidade (Modelo Estendido) =  $1/[1 + \exp(-2,633 + 0,462*(\text{idade do receptor em décadas}) + 1,892*(\text{doador falecido}) - 0,307*(\text{CD8+ do dia 30} \times 10^{-2} \text{ céls./mm}^3) - 0,282*(\text{QFCMV do dia 30 em CMV-Nil UI/ml}))]$ .

Quanto aos requisitos para construção do modelo por regressão logística múltipla, a suposição de linearidade foi atendida: os gráficos da relação dos preditores contínuos com o *logit* do desfecho foram aproximadamente lineares (Gráfico 6) e o teste boxTidwell foi não-significativo ( $p > 0,05$ ) para todos os preditores. O termo de

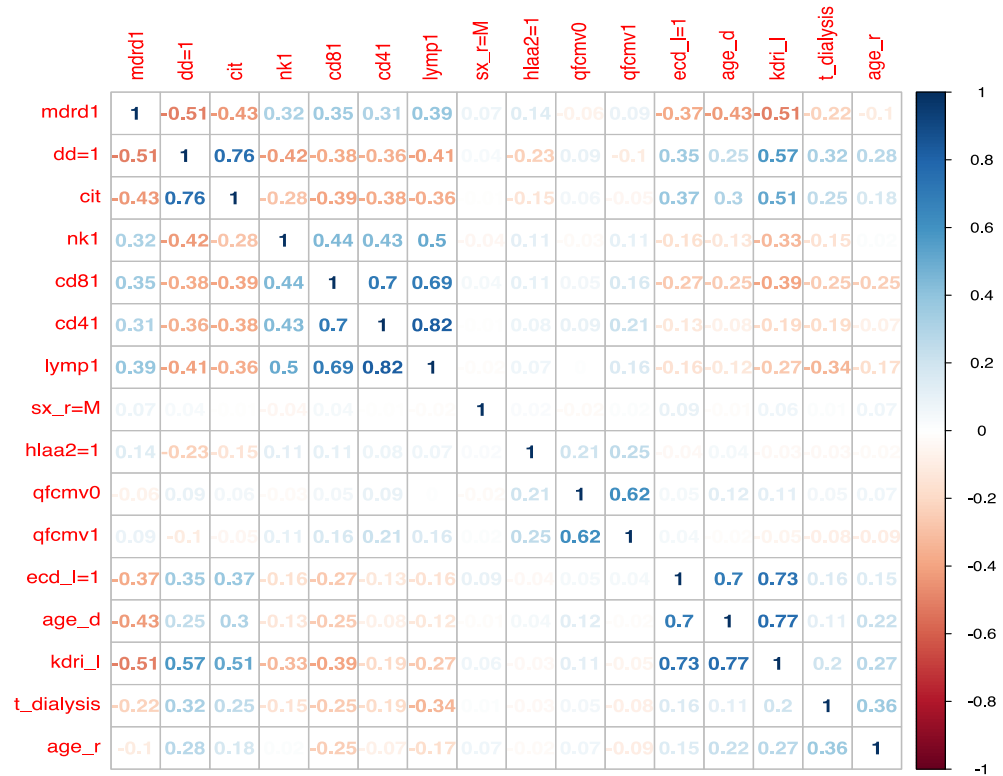
interação entre idade e QFCMV não foi significativo ( $p = 0,213$ ). Entre as variáveis incluídas no modelo final, não houve correlação significativa entre QFCMV e idade do receptor (rho de Spearman,  $p = 0,37$ ) e nem entre QFCMV e contagem de CD8+ (rho de Spearman,  $p = 0,084$ ). Houve fraca correlação negativa entre idade do receptor e contagem de CD8+ (rho de Spearman  $-0,25$ ,  $p = 0,024$ ) (Figura 4). Entretanto, os fatores de inflação da variância (VIF) foram: muito alto para idade do receptor (VIF = 18,1), indicando alguma multicolinearidade, alto para tipo de doador (VIF = 9,6), e adequado para CD8+ (VIF = 3,81) e QFCMV (VIF = 1,31). Como se trata de construção de um modelo de predição, e não avaliação de fatores de risco, a variável idade do receptor não foi excluída, apesar da multicolinearidade.

Gráfico 6 – Gráficos com a relação das variáveis contínuas preditoras (idade do receptor, contagem de CD8+ do dia 30 e QuantiFERON-CMV do dia 30) e o logit do desfecho (evento CMV-CS) no modelo múltiplo estendido



Fonte: do próprio autor

Gráfico 7 – Matriz de correlação das variáveis predictoras. Não houve correlação relevante entre as variáveis incluídas no modelo de predição: QFCMV do dia 30 (qfcmv1), contagem de CD8+ do dia 30 (cd81), idade do receptor (age\_r).



Fonte: do próprio autor

#### 4.4.3 Modelos de predição simplificados (A e B)

Para chegarmos aos modelos de predição simplificados A e B, as variáveis predictoras foram categorizadas e submetidas ao mesmo processo de eliminação passo a passo (*stepwise*) por *bootstrap* do modelo principal. Para a variável idade do receptor, a categoria  $\geq 60$  anos foi escolhida porque é a definição de idoso no Brasil (Estatuto do Idoso, Lei 10.741/03 de 1/outubro/2003) e também porque representa um ponto mediano de idade dos estudos que mostraram sua associação com infecção por CMV no transplante. (20,64–66) As contagens de células CD8+ e CD4+ do dia 30 foram substituídas pela contagem total de linfócitos pois o exame de imunofenotipagem de linfócitos não está prontamente disponível em muitos centros.

Para o QFCMV do dia 30, os pontos de corte 0,2 (Modelo Simplificado A) e 1,0 UI/ml (Modelo Simplificado B) foram aplicados. Após o processo de eliminação de preditores, os modelos simplificados finais foram compostos por 3 preditores categóricos: idade do receptor, QFCMV do dia 30 e tipo de doador (Tabela 7).

As fórmulas para estimar a probabilidade (risco) de um evento CMV nos modelos simplificado são:

**Probabilidade pelo Modelo Simplificado A** =  $1/[1 + \exp(-3,195 + 1,681*(idade \text{ do receptor} \geq 60 \text{ anos}) + 2,034*(doador \text{ falecido}) + 1,011*(QFCMV \text{ do dia } 30 \text{ não-reagente}) + 2,045*(QFCMV \text{ do dia } 30 \text{ indeterminado})]$

**Probabilidade pelo Modelo Simplificado B** =  $1/[1 + \exp(-4,047 + 1,87*(idade \text{ do receptor} \geq 60 \text{ anos}) + 2,022*(doador \text{ falecido}) + 1,744*(QFCMV \text{ do dia } 30 \text{ não-reagente}) + 3,066*(QFCMV \text{ do dia } 30 \text{ indeterminado})]$ .

#### 4.4.4 Qualidade dos modelos de predição

As medidas de performance dos modelos de predição estão resumidas na Tabela 8. Tanto o Modelo Estendido como o Modelo Simplificado B (valor de corte do QFCMV de 1,0 UI/ml) demonstraram boa habilidade discriminatória pelo índice de concordância (*c-statistic*) ponderado pelo método de *bootstrap*, com R<sup>2</sup> de 0,82 para ambos. O tamanho da variação (R<sup>2</sup>) ponderada explicada pelos modelos foi de 39% (Modelo Estendido) e 42% (Modelo Simplificado B). O Modelo Simplificado A (corte da fabricante do QFCMV 0,2 UI/ml) teve pior desempenho (R<sup>2</sup> ponderado, 33%) e foi menos preciso que o modelo B, com acurácia de 0,6 e 0,75, respectivamente.

Tabela 8 – Medidas de performance e de acurácia dos modelos de predição para um primeiro evento CMV-CS clinicamente significativo (100 pacientes, 39 eventos)

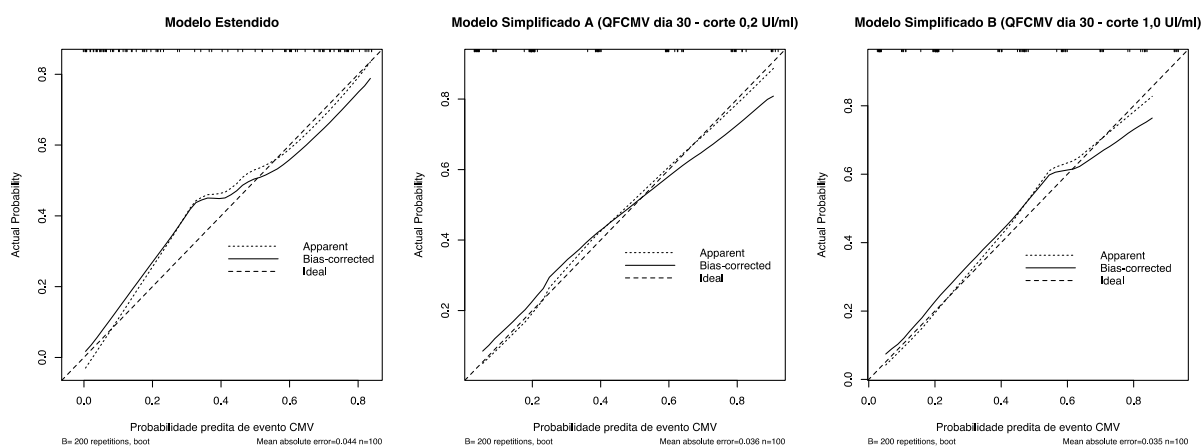
Aspecto	Teste estatístico	Modelo Estendido (preditores contínuos)	Modelo Simplificado A (QFCMV corte 0,2 UI/ml)	Modelo Simplificado B (QFCMV corte 1,0 UI/ml)
Performance geral	R <sup>2</sup>	0,49	0,42	0,5
	R <sup>2</sup> ponderado	0,39	0,33	0,42
	Brier ponderado	0,178	0,189	0,172
Discriminação	c-statistic (IC95%)	0,86 (0,80 – 0,94)	0,83 (0,75 – 0,91)	0,86 (0,78 – 0,93)
	c-statistic ponderado	0,82	0,78	0,82
Calibração	Hosmer-Lemeshow	12,7 (p = 0,124)	0,259 (p = 0,999)	1,38 (p = 0,995)
	Inclinação da curva de calibração	0,85	0,84	0,86
Parâmetros de acurácia e classificação (limiar de probabilidade de 20%)	Acurácia (IC95%)	0,77 (0,68 – 0,84)	0,6 (0,5 – 0,7)	0,75 (0,65 – 0,83)
	Kappa	0,556	0,285	0,517
	Sensibilidade	0,949	0,974	0,923
	Especificidade	0,656	0,361	0,639
	VPN	0,952	0,956	0,929
	Número abaixo do valor de corte Falso-negativo	42 2	23 1	42 3

VPN, valor preditivo negativo; *c-statistic*, índice de concordância; IC, intervalo de confiança.

Os modelos de predição mostraram boa calibração pelo teste de Hosmer-Lemeshow (todos com  $p > 0,05$ ) (Tabela 8). O Gráfico 8 mostra as curvas de calibração dos modelos após procedimento de *bootstrap* com 200 repetições. As curvas tiveram inclinação (*slope*) menor do que 1, indicando que riscos baixos foram subestimados e riscos altos superestimados (*overfitting*).



Gráfico 8 – Curvas de calibração dos modelos de predição: Modelo Principal (4 preditores, variáveis contínuas), Modelo Simplificado A (3 preditores categóricos, valor de corte do QFCMV 0,2 UI/ml) e Modelo Simplificado B (3 preditores categóricos, valor de corte do QFCMV 1,0 UI/ml).



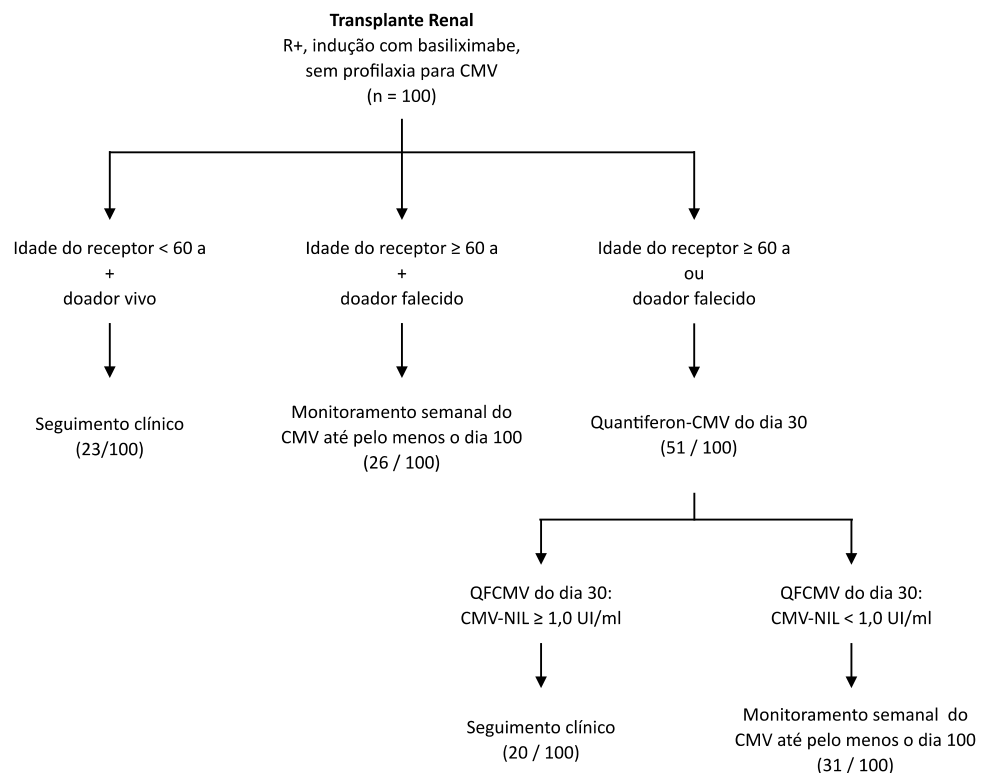
Fonte: o próprio autor

A partir do Modelo Simplificado B, nós derivamos uma árvore de decisão (Figura 5) para predição de evento CMV-CS. Estabelecemos o limiar de probabilidade em 20%, ou seja, o indivíduo é classificado como de alto risco para evento CMV-CS se sua probabilidade predita for acima de 20%. Como exemplo de aplicação da equação de regressão, um indivíduo com doador falecido, 65 anos de idade e com o QFCMV do dia 30 de 1,8 UI/ml teria uma probabilidade predita de 46% para desenvolver o evento CMV-CS. Como esta probabilidade predita está acima do limiar sugerido de 20%, este indivíduo é classificado como alto risco para evento CMV-CS. No caso do Modelo Simplificado B, uma probabilidade acima de 20% equivale à presença de pelo menos 2 das 3 variáveis predictoras (doador falecido, QFCMV do dia 30 < 1,0 UI/ml, idade do receptor  $\geq$  60 anos), ou alternativamente, a presença isolada de resultado indeterminado do QFCMV. Se um paciente tiver apenas um preditor de risco (exceto QFCMV indeterminado), sua probabilidade calculada fica abaixo de 20% e ele é classificado como de baixo risco.

Utilizando essa árvore de decisão na presente coorte de 100 pacientes, nós poderíamos poupar 42 pacientes do monitoramento de CMV. Entretanto, 3 desses

pacientes classificados como baixo risco (probabilidade predita abaixo do limiar de 20%) pelo Modelo Simplificado B acabariam desenvolvendo um evento CMV-CS. Pelo Modelo Estendido, 2 casos de evento CMV-CS não teriam sido preditos. Esses resultados correspondem ao valor preditivo negativo para evento CMV-CS de 92,9% (Modelo Simplificado B) e 95,2% (Modelo Estendido). Em nossa coorte, os 3 casos de falso-negativo pelo Modelo Simplificado B foram leves: viremia assintomática (n=2) e síndrome citomegálica (n = 1).

Figura 5 – Proposta de algoritmo em árvore de decisão para monitoramento do citomegalovírus (CMV) em receptores de transplante renal de risco intermediário. A decisão se baseia na idade do receptor, tipo de doador e resultado do QuantiFERON-CMV (QFCMV) do dia 30 pós-transplante. O algoritmo requer validação externa. Nesta coorte de pacientes (n=100), o algoritmo não prediria 3 eventos CMV: 2 casos de viremia assintomática e 1 caso de síndrome citomegálica.



Fonte: o próprio autor

*“A verdade não se importa com o que queremos. Não se importa com os nossos governos, ideologias, religiões. Ela ficará à espera para sempre”*  
(Valery Alexeyevich Legasov, na minissérie Chernobyl).

## **DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo, nós melhoramos a performance preditiva do teste QFCMV pós-transplante para evento CMV-CS através do aumento do valor de corte do teste e de sua combinação com outros parâmetros clínicos simples. Com este modelo de predição, cerca de 40% dos pacientes CMV-soropositivos poderiam ser dispensados do monitoramento de CMV após o transplante.

Um evento CMV-CS ocorreu em 39% dos pacientes, sendo que 10% tiveram doença citomegálica. Dentre os casos de doença, predominou o acometimento do trato gastrointestinal e metade dos casos requereu ou prolongou internação hospitalar. O evento CMV-CS não se associou a ocorrência de complicações clínicas (evento cardiovascular, neutropenia, rejeição aguda), de outras infecções, a perda ou disfunção do enxerto renal.

A profilaxia universal de CMV não é comumente utilizada no Brasil para pacientes de risco intermediário (R+, sem ATG) devido ao seu alto custo quando comparada à terapia preemptiva.(67) Por outro lado, a implementação da terapia preemptiva requer estrutura logística trabalhosa e monitoramento rigoroso.(8)(68) Este último é oneroso e não facilmente seguido pelos pacientes e médicos mesmo dentro de um estudo clínico.(69) No presente estudo, a porcentagem de amostras faltantes para pesquisa de antigenemia/DNAemia foi de 24%. Os poucos estudos em terapia preemptiva que relatam a taxa de amostras faltantes descrevem taxas de não aderência de 1,4 a 9%.(70–73) Ainda assim, o conjunto dos trabalhos sugere que a incidência de doença citomegálica é menor quando o monitoramento é mais frequente. Como exemplo, numa coorte brasileira sob monitoramento quinzenal e terapia preemptiva, a incidência de doença citomegálica foi 17%.(74)

No nosso serviço, a adoção da estratégia preemptiva reduziu a incidência de doença citomegálica de 17% em 2014 (10) para 10% na presente coorte. Essa incidência residual de doença é próxima da de outras coortes com risco semelhante.(20,69)(75) Ela demonstra que, no “mundo real”, uma prevenção de CMV mais efetiva e acessível é bastante desejável.

Dado o papel central da imunidade celular no controle da reativação e replicação do CMV, os ensaios de ICE-CMV conseguem identificar os pacientes de maior risco de viremia entre os receptores soropositivos. Nós encontramos uma

discordância entre a imunidade humoral (IgG positivo para CMV) e a celular (QFCMV pré-transplante não-reagente) numa proporção similar a de outros estudos com QFCMV e ELISpot (*enzyme-linked immune absorbent spot*).<sup>(40,42,76,77)</sup> Num outro estudo, os indivíduos com discordância humoral-celular pelo QFCMV ainda apresentaram alguma resposta, porém baixa, quando avaliados por ensaio de citometria de fluxo após estímulo com lisado de CMV,<sup>(77)</sup> que é um teste mais sensível para ICE-CMV. Apesar dessa resposta fracamente positiva, a proliferação de linfócitos foi mais baixa nos indivíduos com QFCMV não-reagente do que naqueles com QFCMV reagente.<sup>(77)</sup>

Estudos de intervenção têm demonstrado a utilidade potencial do QFCMV e do ELISpot para otimizar a descontinuação do tratamento antiviral<sup>(46)</sup> e da profilaxia.<sup>(54,78)</sup> Apesar da utilidade prometida em numerosas publicações, a avaliação da ICE-CMV não tem sido amplamente adotada no cuidado do paciente transplantado renal.<sup>(35)</sup> Em pacientes R+ sob terapia preemptiva, um ensaio clínico randomizado recente mostrou boa habilidade preditiva do ELISpot realizado 15 dias após o transplante, com valor preditivo negativo de 94% no braço basiliximabe.<sup>(79)</sup> Nesse estudo, entre os pacientes com teste reagente, apenas um (4,5%) precisou de tratamento para infecção por CMV e nenhum desenvolveu doença citomegálica. Entretanto, a evidência para predição pelo QFCMV tem sido menos consistente,<sup>(33,50,56)</sup> e o valor de corte ideal do teste para guiar a prevenção em R+, não induzidos com ATG, não está bem definida.<sup>(42,43)</sup> Em coortes de R+/basiliximabe, um estudo demonstrou predição de viremia pelo QFCMV pré-transplante<sup>(40)</sup>, mas outro estudo não confirmou esse achado.<sup>(80)</sup>

Comparando com os demais ensaios de ICE-CMV (ELISPOT e citometria de fluxo), o QFCMV é facilmente processado em laboratórios comuns equipados com plataforma ELISA,<sup>(32)</sup> o que torna este sofisticado teste mais acessível para países de renda média. Os demais ensaios de ICE-CMV requerem a separação de linfócitos no processamento inicial <sup>(32)</sup> e podem analisar tanto a função de CD4+ como CD8+, enquanto que o QFCMV é restrito à análise da função de CD8+. Entretanto, o significado prático dessa diferença análise de CD4+ e de CD8+ ainda não está claro.

Como sugerido recentemente <sup>(35)</sup> e utilizado num estudo multicêntrico,<sup>(81)</sup> nós adotamos como desfecho principal apenas as infecções por CMV clinicamente relevantes, ou seja, doença citomegálica e viremia alta requerendo tratamento preemptivo. A importância de níveis baixos de viremia por CMV é controversa. Nos

pacientes R+/basiliximabe do nosso serviço, a viremia baixa assintomática foi geralmente autolimitada.(10)(59,82) Adicionalmente, as atuais estratégias de prevenção parecem mitigar o efeito da replicação do CMV nas taxas de rejeição e na sobrevida do enxerto em alguns estudos,(83,84) mas não em todos.(85)

No nosso estudo, a performance preditiva do QFCMV do dia 30 superou a do QFCMV pré-transplante de modo similar aos resultados com T-SPOT®.CMV(79) e com citometria de fluxo no dia 15.(86) Avaliar a ICE-CMV entre os dias 15 e 30 parece ser vantajoso porque este é o período que geralmente precede os eventos CMV mas que por outro lado já reflete o efeito da imunossupressão na proliferação de células T.(86)(87) Corroborando esse efeito da imunossupressão na imunidade celular, 20% dos pacientes que testaram QFCMV reagente no pré-transplante tornaram-se não-reagente ou indeterminado no teste pós-transplante pelo valor de corte do fabricante. Para um futuro estudo ou aplicação prática, a coleta no dia 15 poderia ser ainda mais interessante pois captaria alguns eventos CMV que ocorrem antes do dia 30. Na nossa coorte, houve um evento no dia 28 e outro no dia 29, porém ambos ocorreram após a coleta do QFCMV.

O subgrupo com QFCMV indeterminado foi o que teve a maior incidência de evento CMV-CS, com probabilidade de 80% pelo novo valor de corte que propusemos. Isso mostra a importância desse resultado, indicando um profundo estado de imunossupressão e alto risco de evento CMV-CS.

Um uso prático desejável do QFCMV seria na identificação de indivíduos com probabilidade muito baixa de desenvolver infecção CMV-CS a fim de poupá-los da prevenção de modo seguro. Com a finalidade de dispensar pacientes do oneroso e frequentemente desnecessário monitoramento semanal do CMV, a avaliação de risco deve ter um alto valor preditivo negativo (VPN) para o evento CMV-CS. O valor de corte do QFCMV proposto pelo fabricante de 0,2 UI/ml teve VPN de 73% no nosso estudo. O valor de corte de 1,0 UI/ml que propusemos aumentou o VPN para 84%, o que ainda é um tanto insuficiente para uma população de risco intermediário. Portanto, utilizar o QFCMV isoladamente não parece ser seguro o suficiente para dispensar medidas preventivas.(87)(35) Com esse corte de 1,0 UI/ml, o QFCMV sozinho não predisse a ocorrência de 6 dentre 39 eventos CMV-CS, incluindo 3 casos de doença citomegálica. Para aqueles indivíduos com resultado reagente do QFCMV do dia 30, a incidência de CMV-CS foi 16%, enquanto que a incidência total na coorte foi 39%.

Portanto, na nossa experiência, o uso de uma única variável preditora para CMV-CS, mesmo o QFCMV isolado com novo valor de corte, não seria suficiente para selecionar os pacientes que pudessem ser dispensados da terapia preemptiva.(35,87) Para melhorar a estratificação de risco, nós adicionamos as variáveis idade do receptor  $\geq 60$  anos e doador falecido ao QFCMV do dia 30 no modelo de predição, o qual demonstrou melhora do VPN de 84% para 93% (Tabela 8). Ambos os modelos de predição, estendido e simplificado B, mostraram boa capacidade discriminatória mesmo após a ponderação pela validação interna (correção do otimismo). O modelo simplificado B se baseou em 3 preditores categóricos (CMV-Nil  $< 1,0$  UI/ml, doador falecido, idade do receptor  $\geq 60$  anos). A presença de pelo menos dois desses preditores ou de resultado indeterminado indica alta probabilidade de evento CMV-CS. Se esse modelo fosse validado e aplicado na prática clínica, um indivíduo jovem com transplante de doador vivo e com QFCMV do dia 30 reagente não precisaria ser submetido ao monitoramento viral semanal. Os receptores idosos ou de doador falecido, mas com QFCMV não-reagente, seriam considerados de alto risco para evento CMV-CS, implicando a adoção de alguma medida preventiva.

O preditor idade do receptor tem sido associado positivamente com a ocorrência de infecção por CMV após o transplante.(20,88)(89)(90)(66)(91)(65)(64)(92) O efeito dessa associação parece ser bidirecional. Por um lado, o CMV está relacionado a imunossenescência acelerada, que é caracterizada por maior mortalidade, maior risco de infecção, e menor resposta a vacinas.(93) Especificamente na infecção crônica pelo CMV, há características de anergia e exaustão imune: enquanto a relação de células T naïve/memória e a diversidade de células T estão reduzidas, a diferenciação tardia de células CD8+ está inflada. E do outro lado, a própria inflamação crônica de baixa intensidade vista em idosos induz mais frequentemente a reativação do CMV.(94–96) Essa inflamação sustentada pode ser induzida por carga aumentada de patógenos e por translocação intestinal, aumentando juntamente o compartimento de células CD8+ CMV-específicas.(97)

A ligação entre tipo de doador e evento CMV-CS pode ser explicada porque doador falecido e tempo de isquemia são também fatores de risco para lesão de isquemia-reperfusão.(98) Essa lesão induz a reativação do CMV presente no enxerto através de vias de sinalização dependentes e não-dependentes de TNF- $\alpha$ .(99)

Utilizando nosso modelo de predição simplificado B, nós poderíamos ter poupado do monitoramento do CMV 42% de nossa amostra de estudo. Essa incorporação do modelo preditivo com QFCMV teria uma falha em não predizer 3/39 (7,7%) dos eventos CMV-CS, o que representa 3% da coorte total. Essa significativa taxa de proteção ao CMV predita pelos nossos modelos sugere potencial aplicação prática para dispensar do monitoramento pacientes com perfil de risco semelhante. A prevenção seria então direcionada aos indivíduos que mais se beneficiariam de suas medidas, sejam a profilaxia antiviral ou o monitoramento rigoroso. Essa taxa de 42% dos pacientes dispensados do monitoramento representa uma grande economia relacionada aos custos da pesquisa viral, ou seja, 12 a 18 testes de qPCR ou antigenemia por paciente. Além disso, haveria alívio para o paciente ao preservá-lo do deslocamento ao laboratório e de eventuais terapias preemptivas desnecessárias. Esse é um potencial econômico tentador para países de renda baixa a média-alta, porém os modelos de predição requerem validação externa. Apesar da representatividade desta coorte estudada, nossos modelos não são aplicáveis a pacientes sob profilaxia antiviral e nem sob imunossupressão baseada em inibidor de mTOR ou indução com ATG.

Ainda em relação aos resultados do QFCMV, curiosamente, um participante que testou reagente tinha tipificação HLA não contemplada na lista de HLAs para os quais os peptídeos do teste são restritos. Através de uma ferramenta virtual disponível no sítio <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCpan-4.0>,(100) pudemos prever que os peptídeos IMREFNSYK, KMQVIGDQY e QYDPVAALF presentes no tubo CMV do QFCMV têm afinidade de ligação fraca e forte com os antígenos HLA A\*74 e B\*18 da paciente. Nós presumimos que tais peptídeos poderiam ser de fato apresentados aos linfócitos através das moléculas HLA dessa paciente, produzindo o resultado reagente que inicialmente não seria esperado.

Este estudo seguiu as recomendações do TRIPOD (*Transparent reporting of a multivariable prediction model for prognosis or diagnosis*) para reportar modelos de predição multivariados.(101) Porém, nosso trabalho tem algumas limitações. Primeiro, dado o número limitado de testes QFCMV que tivemos disponíveis por doação, nós não calculamos o tamanho da amostra para construção de um modelo de regressão logística múltipla, mas sim para uma simples associação entre o QFCMV pré-transplante e evento CMV-CS. Segundo, os amplos intervalos de confiança das razões de chance (*odds-ratio*) das variáveis preditoras indicam tamanho amostral



pequeno, o que aumenta a chance de viés de seleção de variável e sobreajuste (*overfitting*) do modelo.(102) Esses vieses foram minimizados com os procedimentos de validação interna por *bootstrap*. Terceiro, a categorização das variáveis idade e resultado do QFCMV se baseou em valores de corte um tanto arbitrários, o que pode não representar um real efeito biológico distinto entre os grupos.

Apesar da aplicação direta e fácil do modelo de predição simplificado, é possível que ele apresente performance insuficiente em outras populações. No processo de construção de modelos de predição, a categorização de preditores quantitativos leva a perda de informação relevante.(103) As categorias raramente refletem fenômenos biológicos de modo adequado. Uma pessoa de 61 anos pode, na realidade, não ter um risco muito maior do que outra de 59 anos, embora tenham sido classificadas em categorias diferentes quanto à idade.

Para superar algumas dessas limitações dos modelos simplificados, nós desenvolvemos um modelo estendido com preditores em sua forma contínua original. Esse modelo estendido poderia apresentar melhor eficiência e estabilidade, e poderia reduzir fatores de confusão residual.(103) O modelo estendido incluiu as variáveis QFCMV do dia 30 na forma quantitativa em CMV-Nil UI IFN- $\gamma$ /ml, a idade do receptor em décadas, tipo de doador e contagem de CD8+ no sangue do dia 30. A concentração de CMV-Nil IFN- $\gamma$  teve relação linear negativa com o log da “chance” (*log-odds*) de evento CMV-CS, apesar do limite máximo de detecção ter sido 10 UI/ml. Essa relação linear aponta para um efeito protetor quantitativo do IFN- $\gamma$ , efeito demonstrado num estudo *in vitro*.(104) Esta citocina IFN- $\gamma$  promove proteção contra a replicação viral por meio da ativação de macrófagos e células NK, por regulação positiva da apresentação de antígenos por moléculas HLA, por estimulação da diferenciação de linfócitos Th1 e por ativação de funções efetoras antivirais.(105) Assim, a aplicação do QFCMV como preditor quantitativo (concentração de CMV-Nil IFN- $\gamma$ ) no lugar de uma interpretação dicotômica poderia fornecer uma estimativa de risco mais confiável para o evento CMV-CS. De todo modo, ambos os modelos demonstraram performance preditiva similar na nossa coorte, porém supomos que o modelo estendido tenha maior validade externa. Por outro lado, o modelo simplificado pode estimar o risco de evento CMV-CS através de uma “regra de bolso”, facilmente lembrada para aplicação na prática clínica.

Quanto à representatividade desta população de estudo, estima-se que mais de 90% dos adultos brasileiros são CMV IgG positivos.(106)(69) A imunossupressão

de manutenção baseada em tacrolimo e ácido micofenólico corresponde a mais de 90% dos transplantes renais no registro americano *Scientific Registry of Transplant Recipients*.<sup>(107)</sup> O basiliximabe, por sua vez, tem sido utilizado em cerca de 60% dos transplantes em nosso centro e na maioria dos transplantes na Europa.<sup>(108)</sup> E quanto à justificativa para o critério de exclusão “óbito ou perda do enxerto antes do dia 19”, ele se deu porque não temos observado a ocorrência de doença por CMV antes do 19º dia pós-transplante em receptores que não recebem ATG como indução.

Em resumo, nós aprimoramos a estratificação de risco de CMV ao combinar o QFCMV pós-transplante com variáveis clínicas simples em dois modelos de predição. Nós utilizamos uma população específica (receptores de transplante renal CMV soropositivos), imunossupressão única (com tacrolimo/ácido micofenólico e sem ATG), e um desfecho bem definido (infecção por CMV clinicamente relevante) para estreitar a variabilidade preditiva do teste que foi destacada numa revisão recente.<sup>(109)</sup> Tais modelos de predição são uma nova aplicação para o uso do QFCMV pós-transplante e poderão ser considerados como métodos acurados de selecionar pacientes para os quais o monitoramento do CMV possa ser dispensado de modo seguro.<sup>(109,110)</sup> Estudos de validação externa são necessários para reforçar nossos achados e assim confirmar que este é um importante avanço no campo do cuidado personalizado em transplante.

## **CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

O teste QuantiFERON-CMV (QFCMV) precoce após o transplante renal predisse proteção contra infecção clinicamente significativa por CMV em receptores soropositivos e sem ATG na indução. A performance preditiva do teste foi incrementada com a elevação do seu valor de corte para resultado “reagente”.

Apesar da terapia preemptiva, alguns pacientes sob regime de imunossupressão padrão com tacrolimo e micofenolato desenvolveram doença citomegálica, principalmente por falha na aderência ao monitoramento viral.

Nós desenvolvemos ainda um modelo de predição para identificar pacientes de baixo risco para infecção por CMV que possam ser dispensados das medidas preventivas, direcionando assim a prevenção aos pacientes de maior risco. Esse modelo tem como preditores o QFCMV do dia 30 (com valor de corte mais alto do que o proposto pela fabricante), a idade do receptor e o tipo de doador. Adicionalmente, um modelo de predição estendido, com preditores em sua forma contínua, foi desenvolvido para ter maior precisão e validade externa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Knoll GA. Is kidney transplantation for everyone? The example of the older dialysis patient. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Dec;4(12):2040–4.
2. Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005 Oct;56(1):23–46.
3. Wagner SJ, Brennan DC. Induction therapy in renal transplant recipients: how convincing is the current evidence? *Drugs*. 2012 Mar 26;72(5):671–83.
4. Razonable RR, Humar A, AST Infectious Diseases Community of Practice. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013 Mar;13 Suppl 4:93–106.
5. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Jan;22(1):76–98, Table of Contents.
6. Britt W. Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;325:417–70.
7. Freeman RB. The “indirect” effects of cytomegalovirus infection. *Am J Transplant*. 2009 Nov;9(11):2453–8.
8. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation*. 2018 Jun;102(6):900–31.
9. De Keyzer K, Van Laecke S, Peeters P, Vanholder R. Human cytomegalovirus and kidney transplantation: a clinician’s update. *Am J Kidney Dis*. 2011 Jul;58(1):118–26.
10. David-Neto E, Triboni AHK, Paula FJ, Vilas Boas LS, Machado CM, Agena F, et al. A double-blinded, prospective study to define antigenemia and quantitative real-time polymerase chain reaction cutoffs to start preemptive therapy in low-risk, seropositive, renal transplanted recipients. *Transplantation*. 2014 Nov 27;98(10):1077–81.
11. Castro MCR, Araujo LMP, Nahas WC, Arap S, David-Neto E, Ianhez LE. Induction versus noninduction therapy in kidney transplantation: considering different PRA levels and different induction therapies. *Transplant Proc*. 2004 May;36(4):874–6.

12. Issa NC, Fishman JA. Infectious complications of antilymphocyte therapies in solid organ transplantation. *Clin Infect Dis*. 2009 Mar 15;48(6):772–86.
13. San Juan R, Aguado JM, Lumbreras C, Fortun J, Muñoz P, Gavalda J, et al. Impact of current transplantation management on the development of cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Clin Infect Dis*. 2008 Oct 1;47(7):875–82.
14. Jackson SE, Mason GM, Wills MR. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Res*. 2011 May;157(2):151–60.
15. Reusing Junior JO, David-Neto E. Cytomegalovirus infection after transplantation: prevention is still the challenge. *J Bras Nefrol*. 2017 Dec;39(4):353–4.
16. Hodson EM, Ladhani M, Webster AC, Strippoli GFM, Craig JC. Antiviral medications for preventing cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Feb 28;(2):CD003774.
17. Kotton CN. Updates on antiviral drugs for cytomegalovirus prevention and treatment. *Curr Opin Organ Transplant*. 2019 Aug;24(4):469–75.
18. Reusing JO, Feitosa EB, Agena F, Pierrotti LC, Azevedo LSF, Kotton CN, et al. Cytomegalovirus prophylaxis in seropositive renal transplant recipients receiving thymoglobulin induction therapy: Outcome and risk factors for late CMV disease. *Transpl Infect Dis*. 2018 Oct;20(5):e12929.
19. Garcia VD, Pacheco L, editors. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2014-2021) [Internet]. Ano XXVIII No 4. ABTO - Associação Brasileira de Transplante de Órgãos; 2021 [cited 2022 Jul 5] p. 7. Available from: <https://site.abto.org.br/rbt/>
20. Raval AD, Kistler KD, Tang Y, Murata Y, Snyderman DR. Epidemiology, risk factors, and outcomes associated with cytomegalovirus in adult kidney transplant recipients: A systematic literature review of real-world evidence. *Transpl Infect Dis*. 2021 Apr;23(2):e13483.
21. Sezgin E, An P, Winkler CA. Host genetics of cytomegalovirus pathogenesis. *Front Genet*. 2019 Jul 23;10:616.
22. Navarro D, Fernández-Ruiz M, Aguado JM, Sandonís V, Pérez-Romero P. Going beyond serology for stratifying the risk of CMV infection in transplant recipients. *Rev Med Virol*. 2019 Jan;29(1):e2017.
23. Meesing A, Razonable RR. Absolute lymphocyte count thresholds: A simple, readily available tool to predict the risk of cytomegalovirus infection after transplantation. *Open Forum Infect Dis*. 2018 Oct;5(10):ofy230.
24. Calarota SA, Zelini P, De Silvestri A, Chiesa A, Comolli G, Sarchi E, et al. Kinetics of T-lymphocyte subsets and posttransplant opportunistic infections in

heart and kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2012 Jan 15;93(1):112–9.

25. Florescu DF, Kalil AC, Qiu F, Schmidt CM, Sandkovsky U. What is the impact of hypogammaglobulinemia on the rate of infections and survival in solid organ transplantation? A meta-analysis. *Am J Transplant*. 2013 Oct;13(10):2601–10.
26. Fernández-Ruiz M, López-Medrano F, Varela-Peña P, Morales JM, García-Reyne A, San Juan R, et al. Hypocomplementemia in kidney transplant recipients: impact on the risk of infectious complications. *Am J Transplant*. 2013 Mar;13(3):685–94.
27. Tedesco-Silva H, Felipe C, Ferreira A, Cristelli M, Oliveira N, Sandes-Freitas T, et al. Reduced incidence of cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients receiving everolimus and reduced tacrolimus doses. *Am J Transplant*. 2015 Oct;15(10):2655–64.
28. Mallat SG, Tanios BY, Itani HS, Lotfi T, McMullan C, Gabardi S, et al. CMV and BKPyV Infections in Renal Transplant Recipients Receiving an mTOR Inhibitor-Based Regimen Versus a CNI-Based Regimen: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017 Aug 7;12(8):1321–36.
29. Egli A, Humar A, Kumar D. State-of-the-art monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity after organ transplant: a primer for the clinician. *Clin Infect Dis*. 2012 Dec;55(12):1678–89.
30. Giulieri S, Manuel O. QuantiFERON®-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011 Jan;11(1):17–25.
31. Walker S, Fazou C, Crough T, Holdsworth R, Kiely P, Veale M, et al. Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl Infect Dis*. 2007 Jun;9(2):165–70.
32. Yong MK, Lewin SR, Manuel O. Immune monitoring for CMV in transplantation. *Curr Infect Dis Rep*. 2018 Mar 14;20(4):4.
33. Ruan Y, Guo W, Liang S, Xu Z, Niu T. Diagnostic performance of cytomegalovirus (CMV) immune monitoring with ELISPOT and QuantiFERON-CMV assay in kidney transplantation: A PRISMA-compliant article. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Apr;98(16):e15228.
34. Melendez D, Razonable RR. Immune-based monitoring for cytomegalovirus infection in solid organ transplantation: is it ready for clinical primetime? *Expert Rev Clin Immunol*. 2014 Sep;10(9):1213–27.
35. Kumar D, Humar A. CMV immune monitoring-Where do we go from here? *Am J Transplant*. 2020 Aug;20(8):1961–2.

36. Westall GP, Mifsud NA, Kotsimbos T. Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8+ T-cell immunity. *Am J Transplant*. 2008 Aug;8(8):1749–54.
37. Kumar D, Chernenko S, Moussa G, Cobos I, Manuel O, Preiksaitis J, et al. Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009 May;9(5):1214–22.
38. Lochmanova A, Lochman I, Tomaskova H, Marsalkova P, Raszka J, Mrazek J, et al. Quantiferon-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2010 Nov;42(9):3574–7.
39. Lisboa LF, Kumar D, Wilson LE, Humar A. Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation*. 2012 Jan 27;93(2):195–200.
40. Cantisán S, Lara R, Montejo M, Redel J, Rodríguez-Benot A, Gutiérrez-Aroca J, et al. Pretransplant interferon- $\gamma$  secretion by CMV-specific CD8+ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am J Transplant*. 2013 Mar;13(3):738–45.
41. Manuel O, Husain S, Kumar D, Zayas C, Mawhorter S, Levi ME, et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis*. 2013 Mar;56(6):817–24.
42. Abate D, Saldan A, Mengoli C, Fiscon M, Silvestre C, Fallico L, et al. Comparison of cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immunosorbent spot and CMV quantiferon gamma interferon-releasing assays in assessing risk of CMV infection in kidney transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 2013 Aug;51(8):2501–7.
43. Sood S, Haifer C, Yu L, Pavlovic J, Gow PJ, Jones RM, et al. Targeted individual prophylaxis offers superior risk stratification for cytomegalovirus reactivation after liver transplantation. *Liver Transpl*. 2015 Dec;21(12):1478–85.
44. Cantisán S, Páez-Vega A, Pérez-Romero P, Montejo M, Cordero E, Gracia-Ahufinger I, et al. Prevention strategies differentially modulate the impact of cytomegalovirus replication on CD8(+) T-cell differentiation in high-risk solid organ transplant patients. *Antiviral Res*. 2016 Jul 1;132:244–51.
45. Tarasewicz A, Dębska-Ślizień A, Rutkowski B. Clinical Utility of QuantIFERON-Cytomegalovirus Test in Management of Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc*. 2016 Jun;48(5):1650–3.
46. Kumar D, Mian M, Singer L, Humar A. An Interventional Study Using Cell-Mediated Immunity to Personalize Therapy for Cytomegalovirus Infection After Transplantation. *Am J Transplant*. 2017 Sep;17(9):2468–73.



47. Kwon J-S, Kim T, Kim S-M, Sung H, Shin S, Kim YH, et al. Comparison of the Commercial QuantiFERON-CMV and Overlapping Peptide-based ELISPOT Assays for Predicting CMV Infection in Kidney Transplant Recipients. *Immune Netw.* 2017 Oct 25;17(5):317–25.
48. Lee H, Park KH, Ryu JH, Choi A-R, Yu JH, Lim J, et al. Cytomegalovirus (CMV) immune monitoring with ELISPOT and QuantiFERON-CMV assay in seropositive kidney transplant recipients. *PLoS ONE.* 2017 Dec 12;12(12):e0189488.
49. Chiereghin A, Potena L, Borgese L, Gibertoni D, Squarzone D, Turello G, et al. Monitoring of Cytomegalovirus (CMV)-Specific Cell-Mediated Immunity in Heart Transplant Recipients: Clinical Utility of the QuantiFERON-CMV Assay for Management of Posttransplant CMV Infection. *J Clin Microbiol.* 2018 Mar 26;56(4).
50. Gliga S, Korth J, Krawczyk A, Wilde B, Horn PA, Witzke O, et al. T-Track-CMV and QuantiFERON-CMV assays for prediction of protection from CMV reactivation in kidney transplant recipients. *J Clin Virol.* 2018 Jun 12;105:91–6.
51. Thompson G, Boan P, Baumwol J, Chakera A, MacQuillan G, Swaminathan S, et al. Analysis of the QuantiFERON-CMV assay, CMV viraemia and antiviral treatment following solid organ transplantation in Western Australia. *Pathology.* 2018 Aug;50(5):554–61.
52. Deborska-Materkowska D, Perkowska-Ptasinska A, Sadowska A, Gozdowska J, Cizek M, Serwanska-Swietek M, et al. Diagnostic utility of monitoring cytomegalovirus-specific immunity by QuantiFERON-cytomegalovirus assay in kidney transplant recipients. *BMC Infect Dis.* 2018 Apr 16;18(1):179.
53. Gabanti E, Lilleri D, Scaramuzzi L, Zelini P, Rampino T, Gerna G. Comparison of the T-cell response to human cytomegalovirus (HCMV) as detected by cytokine flow cytometry and QuantiFERON-CMV assay in HCMV-seropositive kidney transplant recipients. *New Microbiol.* 2018 Jul 20;41(3):195–202.
54. Westall GP, Cristiano Y, Levvey BJ, Whitford H, Paraskeva MA, Paul E, et al. A Randomized Study of Quantiferon CMV-directed Versus Fixed-duration Valganciclovir Prophylaxis to Reduce Late CMV After Lung Transplantation. *Transplantation.* 2019 May;103(5):1005–13.
55. Poglajen G, Zemljič G, Frljak S, Cerar A, Andročec V, Božič T, et al. QuantiFERON-CMV guided virostatic prophylaxis after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2020 Mar;39(3):278–81.
56. Fernández-Ruiz M, Rodríguez-Goncer I, Parra P, Ruiz-Merlo T, Corbella L, López-Medrano F, et al. Monitoring of CMV-specific cell-mediated immunity with a commercial ELISA-based interferon- $\gamma$  release assay in kidney transplant recipients treated with antithymocyte globulin. *Am J Transplant.* 2020 Aug;20(8):2070–80.

57. Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, et al. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. *Clin Infect Dis*. 2017 Jan 1;64(1):87–91.
58. Tremblay M-A, Rodrigue M-A, Deschênes L, Boivin G, Longtin J. Cytomegalovirus quantification in plasma with Abbott RealTime CMV and Roche Cobas Amplicor CMV assays. *J Virol Methods*. 2015 Dec 1;225:1–3.
59. Martín-Gandul C, Pérez-Romero P, Sánchez M, Bernal G, Suárez G, Sobrino M, et al. Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection. *J Clin Virol*. 2013 Jan;56(1):13–8.
60. Noble J, Gatault P, Sautenet B, Gaudy-Graffin C, Beby-Defaux A, Thierry A, et al. Predictive factors of spontaneous CMV DNAemia clearance in kidney transplantation. *J Clin Virol*. 2018;99–100:38–43.
61. Tsai H-P, Tsai Y-Y, Lin I-T, Kuo P-H, Chen T-Y, Chang K-C, et al. Comparison of Two Commercial Automated Nucleic Acid Extraction and Integrated Quantitation Real-Time PCR Platforms for the Detection of Cytomegalovirus in Plasma. *PLoS ONE*. 2016 Aug 5;11(8):e0160493.
62. Pannuti CS, Kallás EG, Muccioli C, Roland RK, Ferreira EC, Bueno SM, et al. Cytomegalovirus antigenemia in acquired immunodeficiency syndrome patients with untreated cytomegalovirus retinitis. *Am J Ophthalmol*. 1996 Dec;122(6):847–52.
63. David-Neto E, Triboni AHK, Ramos F, Agena F, Galante NZ, Altona M, et al. Evaluation of MDRD4, CKD-EPI, BIS-1, and modified Cockcroft-Gault equations to estimate glomerular filtration rate in the elderly renal-transplanted recipients. *Clin Transplant*. 2016 Nov 6;30(12):1558–63.
64. Kaminski H, Jarque M, Halfon M, Taton B, Di Ascia L, Pfirmann P, et al. Different impact of rATG induction on CMV infection risk in D+R- and R+ KTRs. *J Infect Dis*. 2019 Jul 31;220(5):761–71.
65. Hemmersbach-Miller M, Alexander BD, Pieper CF, Schmader KE. Age matters: older age as a risk factor for CMV reactivation in the CMV serostatus-positive kidney transplant recipient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Mar;39(3):455–63.
66. Díaz J, Henao J, Rodelo J, García A, Arbeláez M, Jaimes F. Incidence and risk factors for cytomegalovirus disease in a Colombian cohort of kidney transplant recipients. *Transplant Proc*. 2014 Feb;46(1):160–6.
67. Luan FL, Kommareddi M, Ojo AO. Universal prophylaxis is cost effective in cytomegalovirus serology-positive kidney transplant patients. *Transplantation*. 2011 Jan 27;91(2):237–44.

68. Fehr T, Cippà PE, Mueller NJ. Cytomegalovirus post kidney transplantation: prophylaxis versus pre-emptive therapy? *Transpl Int.* 2015 Dec;28(12):1351–6.
69. Felipe CR, Ferreira AN, Bessa A, Abait T, Ruppel P, Paula MI de, et al. The current burden of cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients receiving no pharmacological prophylaxis. *J Bras Nefrol.* 2017 Dec;39(4):413–23.
70. Witzke O, Hauser IA, Bartels M, Wolf G, Wolters H, Nitschke M, et al. Valganciclovir prophylaxis versus preemptive therapy in cytomegalovirus-positive renal allograft recipients: 1-year results of a randomized clinical trial. *Transplantation.* 2012 Jan 15;93(1):61–8.
71. Khoury JA, Storch GA, Bohl DL, Schuessler RM, Torrence SM, Lockwood M, et al. Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2006 Sep;6(9):2134–43.
72. Kliem V, Fricke L, Wollbrink T, Burg M, Radermacher J, Rohde F. Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: results of a randomized clinical trial. *Am J Transplant.* 2008 May;8(5):975–83.
73. Reischig T, Jindra P, Hes O, Svecová M, Klaboč J, Treska V. Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Am J Transplant.* 2008 Jan;8(1):69–77.
74. Henrique Pinto C, Tedesco-Silva H, Rosso Felipe C, Nicolau Ferreira A, Cristelli M, Almeida Viana L, et al. Targeted preemptive therapy according to perceived risk of CMV infection after kidney transplantation. *Braz J Infect Dis.* 2016 Sep 25;20(6):576–84.
75. Emery VC, Asher K, Sanjuan C de J. Importance of the cytomegalovirus seropositive recipient as a contributor to disease burden after solid organ transplantation. *J Clin Virol.* 2012 Jun 1;54(2):125–9.
76. Jarque M, Melilli E, Crespo E, Manonelles A, Montero N, Torras J, et al. CMV-specific Cell-mediated Immunity at 3-month Prophylaxis Withdrawal Discriminates D+/R+ Kidney Transplants at Risk of Late-onset CMV Infection Regardless the Type of Induction Therapy. *Transplantation.* 2018 Nov;102(11):e472–80.
77. Valle-Arroyo J, Aguado R, Páez-Vega A, Pérez AB, González R, Fornés G, et al. Lack of cytomegalovirus (CMV)-specific cell-mediated immune response using QuantiFERON-CMV assay in CMV-seropositive healthy volunteers: fact not artifact. *Sci Rep.* 2020 Apr 28;10(1):7194.

78. Páez-Vega A, Gutiérrez-Gutiérrez B, Agüera ML, Facundo C, Redondo-Pachón D, Suñer M, et al. Immunoguided Discontinuation of Prophylaxis for Cytomegalovirus Disease in Kidney Transplant Recipients Treated with Antithymocyte Globulin: A Randomized Clinical Trial. *Clin Infect Dis*. 2021 Jun 22;
79. Jarque M, Crespo E, Melilli E, Gutiérrez A, Moreso F, Guirado L, et al. Cellular immunity to predict the risk of cytomegalovirus infection in kidney transplantation: A prospective, interventional, multicenter clinical trial. *Clin Infect Dis*. 2020 Dec 3;71(9):2375–85.
80. Pongsakornkullachart K, Chayakulkeeree M, Vongwiwatana A, Kantakamalakul W, Skulratanasak P, Phoompoung P. QuantiFERON-Cytomegalovirus Assay for Prediction of Cytomegalovirus Viremia in Kidney Transplant Recipients: Study From High Cytomegalovirus Seroprevalence Country. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 May 12;12:893232.
81. Kumar D, Chin-Hong P, Kayler L, Wojciechowski D, Limaye AP, Osama Gaber A, et al. A prospective multicenter observational study of cell-mediated immunity as a predictor for cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2019 Feb 15;
82. Florescu DF, Qiu F, Schmidt CM, Kalil AC. A direct and indirect comparison meta-analysis on the efficacy of cytomegalovirus preventive strategies in solid organ transplant. *Clin Infect Dis*. 2014 Mar;58(6):785–803.
83. Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP, Osnes K, Leivestad T, Foss A, et al. Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int*. 2004 Jul;66(1):329–37.
84. Leeaphorn N, Garg N, Thamcharoen N, Khankin EV, Cardarelli F, Pavlakis M. Cytomegalovirus mismatch still negatively affects patient and graft survival in the era of routine prophylactic and preemptive therapy: A paired kidney analysis. *Am J Transplant*. 2019 Feb;19(2):573–84.
85. Bischof N, Wehmeier C, Dickenmann M, Hirt-Minkowski P, Amico P, Steiger J, et al. Revisiting cytomegalovirus serostatus and replication as risk factors for inferior long-term outcomes in the current era of renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2020 Feb 1;35(2):346–56.
86. Fernández-Ruiz M, Giménez E, Vinuesa V, Ruiz-Merlo T, Parra P, Amat P, et al. Regular monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity in intermediate-risk kidney transplant recipients: predictive value of the immediate post-transplant assessment. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Mar;25(3):381.e1-381.e10.
87. Prakash K, Chandorkar A, Saharia KK. Utility of CMV-Specific Immune Monitoring for the Management of CMV in Solid Organ Transplant Recipients: A Clinical Update. *Diagnostics (Basel)*. 2021 May 13;11(5).

88. López-Oliva MO, Flores J, Madero R, Escuin F, Santana MJ, Bellón T, et al. Cytomegalovirus infection after kidney transplantation and long-term graft loss. *Nefrologia*. 2017;37(5):515–25.
89. Cervera C, Cofan F, Hernandez C, Soy D, Marcos MA, Sanclemente G, et al. Effect of mammalian target of rapamycin inhibitors on cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients receiving polyclonal antilymphocyte globulins: a propensity score-matching analysis. *Transpl Int*. 2016 Nov;29(11):1216–25.
90. Fernández-Ruiz M, Arias M, Campistol JM, Navarro D, Gómez-Huertas E, Gómez-Márquez G, et al. Cytomegalovirus prevention strategies in seropositive kidney transplant recipients: an insight into current clinical practice. *Transpl Int*. 2015 Sep;28(9):1042–54.
91. Radtke J, Dietze N, Spetzler VN, Fischer L, Achilles EG, Li J, et al. Fewer cytomegalovirus complications after kidney transplantation by de novo use of mTOR inhibitors in comparison to mycophenolic acid. *Transpl Infect Dis*. 2016 Feb 3;18(1):79–88.
92. Hemmersbach-Miller M, Alexander BD, Sudan DL, Pieper C, Schmader KE. Infections after kidney transplantation. Does age matter? *Clin Transplant*. 2019 Apr;33(4):e13516.
93. Jackson SE, Sedikides GX, Okecha G, Poole EL, Sinclair JH, Wills MR. Latent Cytomegalovirus (CMV) Infection Does Not Detrimentally Alter T Cell Responses in the Healthy Old, But Increased Latent CMV Carriage Is Related to Expanded CMV-Specific T Cells. *Front Immunol*. 2017 Jun 26;8:733.
94. Furui Y, Satake M, Hoshi Y, Uchida S, Suzuki K, Tadokoro K. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in Japanese blood donors and high detection frequency of CMV DNA in elderly donors. *Transfusion*. 2013 Oct;53(10):2190–7.
95. Stowe RP, Kozlova EV, Yetman DL, Walling DM, Goodwin JS, Glaser R. Chronic herpesvirus reactivation occurs in aging. *Exp Gerontol*. 2007 Jun;42(6):563–70.
96. Forte E, Zhang Z, Thorp EB, Hummel M. Cytomegalovirus latency and reactivation: an intricate interplay with the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Mar 31;10:130.
97. Gress RE, Deeks SG. Reduced thymus activity and infection prematurely age the immune system. *J Clin Invest*. 2009 Oct;119(10):2884–7.
98. Cavallé-Coll M, Bala S, Velidedeoglu E, Hernandez A, Archdeacon P, Gonzalez G, et al. Summary of FDA workshop on ischemia reperfusion injury in kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2013 May;13(5):1134–48.

99. Kim SJ, Varghese TK, Zhang Z, Zhao LC, Thomas G, Hummel M, et al. Renal ischemia/reperfusion injury activates the enhancer domain of the human cytomegalovirus major immediate early promoter. *Am J Transplant*. 2005 Jul;5(7):1606–13.
100. Gfeller D, Bassani-Sternberg M. Predicting Antigen Presentation-What Could We Learn From a Million Peptides? *Front Immunol*. 2018 Jul 25;9:1716.
101. Moons KGM, Altman DG, Reitsma JB, Ioannidis JPA, Macaskill P, Steyerberg EW, et al. Transparent Reporting of a multivariable prediction model for Individual Prognosis or Diagnosis (TRIPOD): explanation and elaboration. *Ann Intern Med*. 2015 Jan 6;162(1):W1-73.
102. Heinze G, Wallisch C, Dunkler D. Variable selection - A review and recommendations for the practicing statistician. *Biom J*. 2018 May;60(3):431–49.
103. Royston P, Altman DG, Sauerbrei W. Dichotomizing continuous predictors in multiple regression: a bad idea. *Stat Med*. 2006 Jan 15;25(1):127–41.
104. Shakya AK, O’Callaghan DJ, Kim SK. Interferon Gamma Inhibits Varicella-Zoster Virus Replication in a Cell Line-Dependent Manner. *J Virol*. 2019 Jun 15;93(12).
105. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004 Feb;75(2):163–89.
106. Tuon FF, Wollmann LC, Pegoraro D, Gouveia AM, Andrejow AP, Schultz AT, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, cytomegalovirus and Epstein Barr virus in 578 tissue donors in Brazil. *J Infect Public Health*. 2019;12(2):289–91.
107. Hart A, Lentine KL, Smith JM, Miller JM, Skeans MA, Prentice M, et al. OPTN/SRTR 2019 annual data report: kidney. *Am J Transplant*. 2021 Feb;21 Suppl 2:21–137.
108. Hellemans R, Bosmans JL, Abramowicz D. Induction Therapy for Kidney Transplant Recipients: Do We Still Need Anti-IL2 Receptor Monoclonal Antibodies? *Am J Transplant*. 2017 Jan;17(1):22–7.
109. Hall VG, Humar A, Kumar D. Utility of Cytomegalovirus Cell-Mediated Immunity Assays in Solid Organ Transplantation. *J Clin Microbiol*. 2022 Aug 17;60(8):e0171621.
110. Azar MM, Turbett S, Gaston D, Gitman M, Razonable R, Koo S, et al. A consensus conference to define the utility of advanced infectious disease diagnostics in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2022 Jul 13;.

## APÊNDICE

### Anexo 1. Restrição HLA dos peptídeos do QuantiFERON-CMV

Peptide	Sequence	CMV Protein	HLA Restriction
1	VTEHDTLLY	pp50	A1
2	VLEETSVML	IE-1	A2
3	NLVPMVATV	pp65	A2
4	IMREFNSYK	gB	A3
5	AYAQKIFKIL	IE-1	A23 & A24
6	QYDPVAALF	pp65	A24
7	DIYRIFAEL	pp65	A26
8	TPRVTGGGAM	pp65	B7
9	QIKVRVDMV	IE-1	B8
10	ARVYEIKCR	pp28	B27
11	CPSQEPMSIYVY	pp65	B35
12	ELRRKMMYM	IE-1	B8
13	FEQPTETPP	IE-2	B41
14	QEFFWDANDI	pp65	B44
15	QAIRETVEL	pp65	B57 & B58
16	QMVVQARLTV	pp65	B52
17	PTFTSQYRIQGKL	pp65	A24
18	GPISGHVLK	pp65	A11
19	DALPGPCI	pp65	B51
20	KMQVIGDQY	pp65	B40/B60
21	CEDVPSGKL	pp65	B40/B60
22	TRATKMQVI	pp65	Cw6 (A30/B13)

## Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Quantiferon-CMV no Transplante Renal  
Versão 1/11/17

### **HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

---

#### **DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME: .....

DOC. DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: M F DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº: ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL > .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): .....

DOC. DE IDENTIDADE: ..... SEXO: M F DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº: ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

---

#### **DADOS SOBRE A PESQUISA**

##### **1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:**

Quantiferon-CMV para estratificação de risco de citomegalovirose no transplante renal de receptores soropositivos para CMV

##### **2. PESQUISADORES:**

- Pesquisadores Responsáveis:

Elias David-Neto<sup>1</sup> (orientador). Médico chefe do Serviço de Transplante Renal do HCFMUSP. Inscrição Conselho Regional de Medicina n.xxxx. Contato: Serviço de Transplante Renal, Instituto Central do HCFMUSP, av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 7º andar, sala 7036, tel. 11-26618089

Lígia Camera Pierrotti<sup>2,3</sup>. Médica infectologista da divisão de Moléstias Infecciosas do HCFMUSP e do DASA

- Pesquisador Executante: José Otto Reusing Junior<sup>1</sup> (doutorando).

- Pesquisadores: Fabiana Avena<sup>1</sup>, Acram Zahredine Abdul Latif<sup>4</sup>, Luiz Sérgio Azevedo<sup>1</sup>

##### **3. INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

<sup>1</sup> Serviço de Transplante Renal do HCFMUSP;

<sup>2</sup> Divisão de Moléstias Infecciosas do HCFMUSP;

<sup>3</sup> DASA



4 Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP / Laboratório de Investigação Médica 3 da FMUSP.

**4. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**

RISCO MÍNIMO  RISCO MÉDIO   
RISCO BAIXO  RISCO MAIOR

**5. DURAÇÃO DA PESQUISA:**

24 meses.

**A. Introdução**

O senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do estudo **Quantiferon-CMV para estratificação de risco de citomegalovirose no transplante renal de receptores soropositivos para CMV**. Trata-se de um projeto que faz parte da tese de doutorado do pesquisador executante (José Otto). Com sua participação, o senhor(a) poderá contribuir para avanços na área da saúde, especificamente na prevenção de doença causada pelo vírus CMV após o transplante renal.

**B. Objetivos do estudo**

Após o transplante de rim, devido à baixa imunidade causada pelos remédios imunossupressores, muitos pacientes desenvolvem doença pelo citomegalovírus (CMV), que pode causar alterações no sangue, anemia, hepatite, diarreia, úlceras no estômago e intestino, pneumonia, além de aumentar o risco de rejeição. Sem nenhum tipo de prevenção, a chance de desenvolver doença pelo vírus varia entre 20 e 50%, e ela acontece principalmente nos primeiros meses após o transplante.

Para prevenir a doença pelo vírus CMV, alguns pacientes recebem um remédio ~~antiviral~~. demais pacientes fazem monitoramento com exame de sangue que é colhido uma vez por semana nos primeiros 3 meses, e então a cada 15 dias até completar 6 meses do transplante. Esse exame é para detectar a presença do vírus CMV no sangue, e se ele atingir um determinado nível, este paciente recebe o remédio antiviral para tratamento do vírus antes mesmo de desenvolver qualquer sintoma, e assim fica ~~sem sintomas~~.

recebem o medicamento Timoglobulina (tipo de imunossupressor) no dia do transplante, e fazemos o “monitoramento com terapia preemptiva” para aqueles que recebem o medicamento Basiliximabe (outro imunossupressor) no dia do transplante.

Sabemos que cerca de metade dos pacientes não precisariam fazer nenhum tipo de prevenção contra o CMV pois nunca desenvolveriam a doença. O problema é que não conseguimos saber quem são esses pacientes com menor risco de desenvolver a doença pelo vírus CMV. Neste estudo, queremos testar se o exame de sangue chamado Quantiferon-CMV consegue determinar o risco de cada paciente ter ou não a doença pelo vírus. Acreditamos que este teste poderá apontar quem são os pacientes que não precisam de nenhuma prevenção. Se der certo, isso poderia poupar vários pacientes de tomar remédio sem necessidade e de ter seus efeitos colaterais. Poderia poupar também muitos pacientes de fazer exame semanal para monitoramento do vírus, de modo a reduzir custos para o sistema de saúde e para o paciente.

Além disso, queremos avaliar os custos de cada tipo de prevenção e da realização do exame Quantiferon-CMV; o aparecimento de rejeição e outras complicações após o transplante, sempre correlacionando elas com a ocorrência de infecção pelo vírus CMV. O custo será comparado com a qualidade de vida após o transplante. O resultado de alguns exames laboratoriais que você normalmente faz após o transplante serão correlacionados com o resultado do e o resultado do teste Quantifeorn-CMV. Por fim, um outro exame de sangue chamado de Quantiferon-Monitor será avaliado quanto a sua capacidade de prever infecção por outros vírus.

**C. O que acontecerá com o(a) senhor(a) – procedimentos do estudo**

O estudo terá duração de um ano. Caso o(a) senhor(a) participe, serão feitos os exames chamados Quantiferon-CMV e Quantiferon-Monitor com sangue colhido antes e nos meses seguintes do transplante de rim. Serão feitos um total de 6 ou 7 exames de Quantiferon, a depender do remédio que o senhor(a) receber no dia do transplante.

Para prevenção da doença pelo CMV, você seguirá o tratamento/prevenção que normalmente é feito no Serviço de Transplante Renal do HCFMUSP, sem nenhuma mudança em função do estudo. Isso significa que:

- se você receber o medicamento Basiliximabe no dia do transplante, você colherá exame de sangue toda semana por 3 meses e então a cada 15 dias até completar o

sexto mês de transplante. Caso o vírus CMV seja detectado no seu sangue numa quantidade mínima, você receberá o remédio para tratá-lo antes mesmo de desenvolver qualquer sintoma da doença (“Terapia preemptiva”).

- se você receber o medicamento Timoglobulina no dia do transplante, você vai tomar o remédio antiviral valganciclovir (ou ganciclovir) por 3 meses para prevenir a doença pelo vírus CMV (“Profilaxia”).

Não será feito para nosso estudo nenhum procedimento que lhe traga risco de vida. Seu atendimento médico, número de consultas, medicações e demais exames serão os mesmos que os outros pacientes transplantados de rim fazem neste hospital.

**D. Riscos possíveis e/ou efeitos secundários**

A coleta de sangue para os exames será feita por profissionais devidamente capacitados deste Serviço de Transplante Renal ou da rede de laboratórios DASA, com uso de material descartável. Ainda assim pode ocorrer dor no local da picada, pequenos extravasamentos sanguíneos que podem deixar manchas arroxeadas mas que desaparecem após alguns dias.

**E. Novos achados significantes**

Qualquer informação importante que for obtida no decorrer deste estudo e que possa influenciar a sua vontade de continuar a participar nele será comunicada ao senhor(a).

**F. Benefícios**

O principal benefício possível é saber melhor seu risco de desenvolver doença pelo vírus CMV (citomegalovírus). Não há outros benefícios diretos.

**G. Armazenamento de amostras biológicas**

As amostras de sangue colhidas para o Quantiferon (CMV e Monitor) serão encaminhadas ao laboratório da rede DASA. A análises dos demais exames de sangue serão feitas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas. Essas amostras não serão vendidas e nem usadas para fazer produtos comerciais.

A qualquer tempo você poderá mudar de ideia e sair do estudo, e então suas amostras de sangue guardadas serão destruídas. Para isso basta você informar sobre sua desistência ao seu médico ou enfermeiro do transplante renal.

**H. Pagamento**

O(a) senhor(a) não será pago pela participação neste estudo.

**I. Tratamentos alternativos**

Se o(a) senhor(a) decidir não participar ou abandonar o estudo depois de tê-lo começado, o seu tratamento não será prejudicado.

**J. Direito a fazer perguntas e esclarecimentos adicionais**

Se o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, precisar de qualquer informação adicional, ou ainda achar que sofreu algum dano relacionado à pesquisa, por favor, entre em contato a qualquer momento com o seu médico ou com o dr. José Otto Reusing Junior (pesquisador executante), no telefone: (11) 2661-8089 ou (11) 2661-6331 ou pelo e-mail [jose.otto@me.com](mailto:jose.otto@me.com)

Se o(a) senhor(a) tiver qualquer pergunta em relação aos seus direitos como participante neste estudo, o(a) senhor(a) deve entrar em contato com Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - Rua Ovídio Pires de Campos, 225 - 5º andar - Tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou e-mail: [marcia.carvalho@hc.fm.usp.br](mailto:marcia.carvalho@hc.fm.usp.br) para quem o(a) senhor(a) pode comunicar qualquer queixa e fazer qualquer pergunta relacionadas ao estudo.

**K. Custos adicionais**

O(a) senhor(a) não terá custos adicionais como resultado de sua participação nesta pesquisa médica. Todos os exames do estudo e testes laboratoriais de acompanhamento realizados para esta pesquisa serão gratuitos.

**L. Participação voluntária e condições de abandono**

Sua participação nesta pesquisa médica é inteiramente voluntária. O(a) senhor(a) poderá se recusar a participar nesta pesquisa ou poderá desistir em qualquer momento depois de ter aceitado participar. O(a) senhor(a) continuará sendo acompanhado(a) por seu médico sem nenhuma restrição e seu tratamento será mantido sem nenhum prejuízo.

**M. Confidencialidade**

Os registros de sua participação neste estudo são confidenciais e serão mantidos sob sigilo. As Autoridades Regulatórias aplicáveis têm o direito de verificar os seus documentos médicos originais, desde que autorizado pelo médico do estudo e pelo hospital. O objetivo é assegurar que as informações são verdadeiras e corretas. Todas as

legislações, resoluções e códigos de ética brasileiros serão cumpridos no decorrer deste estudo.

**N. Compromisso**

Todas as amostras de sangue serão utilizadas somente para os propósitos deste estudo. Se o(a) senhor(a) desejar poderá ter acesso a todos os resultados de exames realizados neste Protocolo de Estudo.

**O. Contato em situações de emergência**

Em caso de emergência, favor contatar a qualquer momento o Investigador Principal deste Protocolo de Estudo, o Dr. Elias David-Neto, nos telefones: (11) 2661-8089 ou (11) 2661-6331.

**Consentimento**

Eu, \_\_\_\_\_, li as informações acima e entendi o objetivo do estudo, assim como os riscos e benefícios esperados com minha participação nesta pesquisa clínica. Eu tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas, e todas as minhas perguntas foram respondidas. Assinando este termo, eu forneço meu consentimento informado em participar neste estudo e não abro mão de nenhum dos meus direitos como paciente. Eu entendo que há riscos e efeitos secundários com os procedimentos do estudo. Eu receberei uma cópia datada e assinada deste termo de consentimento antes de iniciar qualquer avaliação ou procedimento de estudo.

---

Assinatura

Data

Eu, abaixo assinado, expliquei todos os detalhes deste estudo para o paciente acima identificado e/ ou para o representante legal autorizado a consentir pelo paciente.

---

Nome do Investigador ou Co-Investigador

---

Assinatura

Data