


## Validação clínica de um ensaio de PCR *in house* quantitativo em tempo real para infecção por citomegalovírus usando o 1º Padrão Internacional da OMS em pacientes com transplantados renais

Clinical validation of an in-house quantitative real time PCR assay for cytomegalovirus infection using the 1<sup>st</sup> WHO International Standard in kidney transplant patients

### Autores

Cassia F.B. Caurio<sup>1,2</sup> 

Odelta S. Allende<sup>1</sup>

Roger Kist<sup>1,2</sup>

Kênya L. Santos<sup>2</sup>


Izadora C.S. Vasconcelos<sup>1,2</sup>

Franciéli P. Rozales<sup>1</sup>

Daiane F. Dalla Lana<sup>2</sup>

Bruno M. Praetzel<sup>2</sup>

Ana Paula Alegretti<sup>3</sup>

Alessandro C. Pasqualotto<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

Data de submissão: 27/09/2020.

Data de aprovação: 18/01/2021.

### Correspondência para:

Alessandro C. Pasqualotto.

E-mail: pasqualotto@ufcspa.edu.br

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2020-0214>

### RESUMO

**Introdução:** Citomegalovírus (CMV) é um dos agentes infecciosos mais comuns em pacientes com transplante de órgãos sólidos, com morbidade e mortalidade significativas. **Objetivo:** Este estudo visou estabelecer um limite para o início do tratamento preemptivo. Além disso, comparou o desempenho da antigenemia com os resultados da qPCR *in house*. **Desenho do estudo:** Este foi um estudo de coorte prospectivo realizado em 2017 em um centro único de transplante renal no Brasil. A validação clínica foi realizada comparando resultados de qPCR *in house*, com o padrão de atendimento na época (Antigenemia para CMV Pp65). A análise da curva ROC foi realizada para determinar o limite ideal para o início da terapia preemptiva baseado nos resultados do teste qPCR *in house*. **Resultados:** 232 amostras de 30 pacientes foram testadas com antigenemia e qPCR, das quais 163 (70,26%) foram concordantes (Coeficiente Kappa: 0,435,  $p < 0,001$ ; Correlação Spearman: 0,663). PCR permitiu diagnósticos precoces. O número médio de dias para o primeiro resultado positivo foi 50 (intervalo, 24-105) para antigenemia e 42 (intervalo, 24-74) para qPCR ( $p < 0,001$ ). A análise da curva ROC revelou que em um limite de 3.430 UI/mL (Log 3,54), qPCR teve sensibilidade de 97,06% e especificidade de 74,24% (AUC 0,92617 ± 0,0185,  $p < 0,001$ ), na previsão de 10 células/10<sup>5</sup> leucócitos por antigenemia e na decisão do médico de tratar. **Conclusões:** Antigenemia para CMV Pp65 e qPCR para CMV mostraram uma concordância aceitável e uma correlação moderada neste estudo. qPCR *in house* revelou-se um método preciso para determinar DNAemia do CMV em pacientes transplantados renais, obtendo resultados positivos semanas antes da antigenemia.

**Descritores:** Citomegalovírus; PCR, Tratamento Farmacológico, diagnóstico.

### ABSTRACT

**Introduction:** Cytomegalovirus (CMV) is one of the most common agents of infection in solid organ transplant patients, with significant morbidity and mortality. **Objective:** This study aimed to establish a threshold for initiation of preemptive treatment. In addition, the study compared the performance of antigenemia with qPCR results. **Study design:** This was a prospective cohort study conducted in 2017 in a single kidney transplant center in Brazil. Clinical validation was performed by comparing in-house qPCR results, against standard of care at that time (Pp65 CMV Antigenemia). ROC curve analysis was performed to determine the ideal threshold for initiation of preemptive therapy based on the qPCR test results. **Results:** Two hundred and thirty two samples from 30 patients were tested with both antigenemia and qPCR, from which 163 (70.26%) were concordant (Kappa coefficient: 0.435,  $p < 0.001$ ; Spearman correlation: 0.663). PCR allowed for early diagnoses. The median number of days for the first positive result was 50 (range, 24-105) for antigenemia and 42 (range, 24-74) for qPCR ( $p < 0.001$ ). ROC curve analysis revealed that at a threshold of 3,430 UI/mL (Log 3.54), qPCR had a sensitivity of 97.06% and a specificity of 74.24% (AUC 0.92617 ± 0.0185,  $p < 0.001$ ), in the prediction of 10 cells/10<sup>5</sup> leukocytes by antigenemia and physician's decision to treat. **Conclusions:** CMV Pp65 antigenemia and CMV qPCR showed fair agreement and a moderate correlation in this study. The in-house qPCR was revealed to be an accurate method to determine CMV DNAemia in kidney transplant patients, resulting in positive results weeks before antigenemia.

**Keywords:** Cytomegalovirus; PCR, Drug Therapy, Diagnosis



## ANTECEDENTES

O Citomegalovírus (CMV) (Ordem *Herpesvirales*, Família *Herpesviridae*, Subfamília *Betaherpesvirinae*, Gênero *Cytomegalovirus*, Espécie *Betaherpesvirus Humano 5*) é uma das causas mais relevantes de infecção em receptores de órgãos transplantados, resultando em morbidade e mortalidade significativas<sup>1</sup>. A infecção pode originar-se do órgão transplantado ou mais comumente devido à reativação de infecção prévia (latente) por CMV no receptor do transplante<sup>2</sup>.

A maioria dos pacientes sob risco de infecção/doença por CMV é monitorada com testes diagnósticos visando uma detecção precoce de infecção por CMV, na assim chamada estratégia “preemptiva”. O monitoramento laboratorial para terapia preemptiva foi realizado nos primeiros anos com antigenemia para CMV Pp65. No entanto, os ensaios moleculares substituíram a antigenemia para se tornarem o padrão-ouro para o diagnóstico e monitoramento do CMV<sup>3</sup>. Contudo, devido a grandes variações entre ensaios, nenhum consenso universal foi alcançado sobre o limite para iniciar a terapia contra o vírus<sup>3-5</sup>.

Neste cenário, este estudo visou estabelecer um limite para o início do tratamento preemptivo contra o CMV em uma coorte de pacientes transplantados renais no Brasil. Além disso, o estudo comparou o desempenho da antigenemia e um novo ensaio de PCR quantitativo *in house* em tempo real (qPCR), que foi calibrado usando o 1º Padrão Internacional da OMS para CMV Humano.

## MATERIAL E MÉTODOS

### PACIENTES E AMOSTRAS

Este foi um estudo de coorte observacional prospectivo realizado entre Janeiro e Abril de 2017. Todos os pacientes transplantados renais adultos (maiores de 18 anos) em atendimento na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Brasil, foram considerados para inclusão no estudo. Os pacientes foram acompanhados semanalmente por pelo menos três meses após o transplante renal. Amostras de plasma para testes de qPCR para CMV foram coletadas semanalmente usando tubos EDTA de 4 mL. As amostras foram centrifugadas a 1.300 g por 15 minutos para separação do plasma e armazenadas a -80°C até a extração do ácido nucleico ser realizada.

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado para avaliar a sensibilidade e a especificidade do teste,

sendo 204 o número de amostras necessárias para o estudo. Considerando que os pacientes são testados para CMV em média 8 vezes durante os primeiros três meses de acompanhamento (de acordo com dados locais) e considerando uma margem de perda de 20%, 30 pacientes foram inicialmente planejados para serem incluídos no estudo. Entretanto, ao observar a baixa adesão de alguns pacientes em consultas e coletas de exames, foram incluídos 51 pacientes. O critério de inclusão foi para pacientes maiores de 18 anos de idade, que foram encaminhados para transplante renal no hospital e diagnosticados com doença renal crônica. O critério de exclusão foi não assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Como parte dos cuidados hospitalares de rotina, os pacientes receberam terapia anti-CMV com base nos resultados da antigenemia, com um limite de 10 células/10<sup>5</sup> leucócitos - pacientes que apresentaram menor contagem de células, mas mostrando sintomas atribuíveis à doença por CMV, também foram submetidos ao tratamento anti-CMV.

### COLETA DE DADOS

Foram coletados dados clínicos e demográficos para todos os pacientes que aderiram ao estudo. Estas variáveis incluíram doenças subjacentes, terapia de indução após transplante renal, regime de imunossupressão e sorologia para CMV, tanto para doadores quanto para receptores.

### ANTIGENEMIA PARA CMV Pp65

O teste de antigenemia para CMV foi realizado utilizando o Kit CMV Brite™ (IQ Products, Holanda), como parte do monitoramento de rotina dos pacientes para a infecção por CMV.

### ENSAIO DE qPCR *IN HOUSE*

O ensaio qPCR quantitativo *in house* foi validado analiticamente em um estudo prévio<sup>6</sup>. As amostras de plasma utilizadas para o estudo foram extraídas com o Kit de purificação de ácido nucleico viral total Maxwell® 16 (Promega, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

Os primers e sondas utilizados neste estudo foram aqueles descritos por Ho e Barry e as sequências são mostradas no material suplementar com algumas modificações no desenho da sonda<sup>7</sup>.

A reação de PCR foi realizada a um volume final de 20 µL usando 4 µL de água ultrapura, 3 µL de DNA extraído, 0,4 µM de cada *primer*, 0,25 µM de

cada sonda, 10 µL de GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega, EUA) e 0,4 µL de carboxi-X-rodamina (CXR) em uma diluição de 1:50. As condições de termociclagem para as reações de qPCR foram: 1 ciclo de 2 minutos a 50°C, 2 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C, e 1 min a 60°C, em um sistema de PCR em tempo real de 7500 (Thermo Scientific, EUA).

O padrão de calibração primário utilizado foi o 1º Padrão Internacional da OMS para CMV Humano (código NCBI 09/132). O material foi preparado conforme indicado pelo fabricante.

O padrão secundário utilizado no estudo foi um plasmídeo sintetizado pela Applied Biosystems (Thermo Scientific, Brasil) com uma sequência de genoma do CMV (material suplementar) e foi validado utilizando o 1º Padrão Internacional da OMS para o CMV Humano (OMS), gerando um fator de conversão para unidades internacionais. O padrão tinha uma concentração inicial de  $9,65 \times 10^{10}$  cópias/mL.

Para determinar o limite de quantificação (LQ) e o fator de conversão, dois operadores diferentes realizaram os testes de sensibilidade analítica, em três dias distintos. O teste consistiu em uma curva que foi amplificada em paralelo para uma diluição de base 10 do padrão primário e dos padrões secundários. O limite de detecção (LD) foi determinado pelo ponto mais baixo da curva, amplificado em 95% do tempo, diluído em base dois, em triplicata. A concentração que amplificou consistentemente 95% do tempo foi testada novamente, em triplicata.

O fator de conversão foi calculado pela mediana da divisão da concentração de CMV (UI/mL) a partir do padrão primário (80% de eficiência na extração) pelo número médio de cópias/mL, para ambos os genes, encontrado nos três dias do teste para cada um dos pontos da curva do padrão secundário. Os parâmetros para qPCR são mostrados na Figura S1 no material suplementar. Somente resultados acima do limite de quantificação e detecção foram considerados positivos.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre os testes foi realizada utilizando o coeficiente Kappa de Cohen e o coeficiente de correlação de Spearman. Os resultados foram interpretados de acordo com Altman *et al.* (1990)<sup>8</sup> e Akoglu *et al.* (2018)<sup>9</sup>, respectivamente. A comparação de medianas

de antigenemia e resultados de qPCR entre pacientes assintomáticos e sintomáticos foi feita usando o teste T para amostras independentes. Uma análise da Curva Característica de Operação do Receptor (ROC, do inglês Receiver Operator Characteristics) foi realizada para determinar o limite para iniciar a terapia preemptiva. As análises estatísticas foram realizadas pelo SPSS Software (Statistical Package for the Social Sciences), versão 18.0.

#### ASPECTOS ÉTICOS

Os comitês de ética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre aprovaram o presente estudo, de acordo com os preceitos da Declaração de Helsinque, pelos seguintes números de protocolo: 1.820.875 e 1.885.683. O consentimento por escrito foi obtido para todos os pacientes antes de entrar no estudo. Todos os experimentos foram realizados em conformidade com leis relevantes e diretrizes institucionais e de acordo com os padrões éticos da Declaração de Helsinque.

#### RESULTADOS

De Dezembro de 2016 a Dezembro de 2017, foram realizados 300 procedimentos de transplante renal no hospital, dos quais 51 pacientes participaram do estudo. Vinte e um pacientes foram excluídos devido à baixa adesão à coleta de exames laboratoriais e/ou consultas perdidas. A população final do estudo consistiu em 232 amostras de plasma de 30 pacientes (média de 7,7 amostras por paciente, variando de 5-14). As características demográficas dos pacientes são apresentadas na Tabela 1.

Cento e duas (44,0%) amostras foram negativas tanto para qPCR quanto para antigenemia. Foram observados resultados positivos em 130 (56,0%) amostras: 61 (46,9%) foram positivas para ambos os métodos, 68 amostras (52,3%) foram positivas apenas para qPCR e 1 amostra (0,008%) foi positiva apenas para antigenemia. A qPCR e os testes de antigenemia foram concordantes em 163 amostras (70,3%) (teste de coeficiente Kappa=0,435;  $p < 0,001$ , teste de correlação de Spearman=0,663  $p < 0,001$ ). O gráfico de correlação de Spearman é mostrado na Figura 1. Das 69 amostras discordantes entre qPCR e antigenemia, 54 (78,3%) ocorreram imediatamente antes (mediana de 12 dias, intervalo, 0-25 dias) ou logo após (mediana de 9 dias, intervalo, 0-28) a antigenemia tornar-se positiva ou

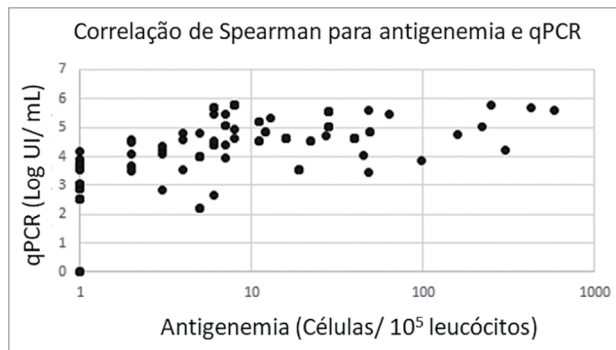
**TABELA 1** CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES AVALIADOS NESTE ESTUDO

<b>Características dos Pacientes</b>	<b>Frequência (%)</b>
Receptor	
Sexo	
Masculino	60
Idade (anos)	
Mediana (intervalo)	53,5 (21-71)
Etnia	
Caucasiana	83,3
Causa da DRET	
Desconhecida	26,7
Rins policísticos	20
Glomerulosclerose segmentar focal	13,3
Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	13,3
Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	6,7
Lúpus eritematoso sistêmico	6,7
Hipertensão arterial sistêmica	3,3
Doença de Berger	3,3
Doença de Alport	3,3
Glomerulonefrite crônica	3,3
PRA classe I (%)	
0	60
1-49	26,7
50-79	10
≥ 80	3,3
PRA classe II (%)	
0	40
1-49	33,3
50-79	23,3
≥ 80	3,3
Quantidade de DSA (%)	
1	8
Terapia de indução	
Tacrolimus + Micofenolato de sódio + Esteróides	100
Globulina antitimócito	40
Basiliximab	60
Hemodiálise até a 1ª semana após o transplante	
Sim	40
<b>Doador</b>	
Sexo	
Masculino	66,7
Idade	
Mediana (intervalo)	49,5 (1-70)
<b>Condição sorológica doador/receptor para infecção por CMV</b>	
D+ / R+	53,3
D- / R+	33,3

**TABELA 1 . CONTINUAÇÃO.**

D+ / R-	6,7
D- / R-	3,3

Legenda: D: doador, DSA: anticorpo doador específico, DRET: doença renal em estágio terminal, HLA: antígeno leucocitário humano, PRA: painel de reatividade de anticorpos, R: receptor e DP: desvio padrão.



**Figura 1.** Resultado gráfico para o teste de correlação de Spearman.

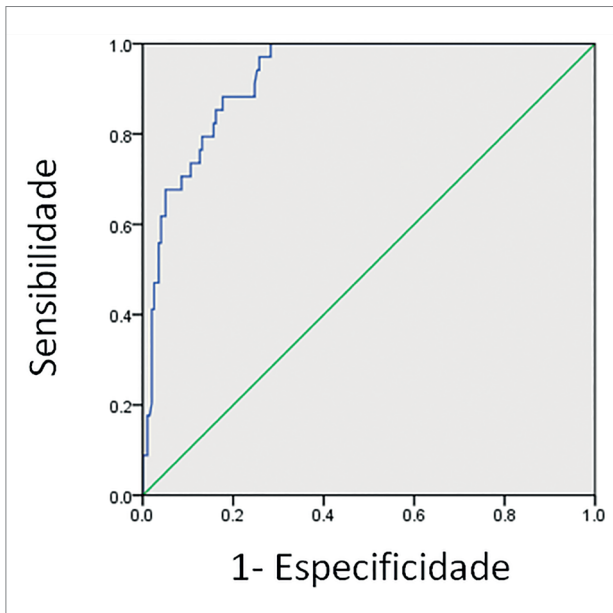
negativa, respectivamente. Em relação as 15 amostras (21,7%) que foram qPCR-positivas e antigenemia-negativas, os resultados de qPCR variaram de Log 2,79 UI/mL a Log 3,97 UI/mL. O único caso de antigenemia positiva (1 célula/10<sup>5</sup> leucócitos) com qPCR negativa ocorreu em um paciente que apresentou DNAemia nas semanas anteriores, e o paciente tornou-se negativo após algumas semanas tanto para os testes de antigenemia quanto para qPCR. É importante notar que todos os pacientes realizaram exames de sangue, apenas 4 amostras apresentaram contagem de neutrófilos abaixo de 1000/mm<sup>3</sup>, todos foram negativos para ambos os testes. A contagem média de leucócitos foi de 6845/mm<sup>3</sup>, sendo 4895/mm<sup>3</sup> para neutrófilos.

Durante o estudo, dos 30 pacientes incluídos, apenas cinco foram negativos para ambos os testes em comparação. Entre os 25 pacientes com testes positivos, 21 (84,0%) tiveram pelo menos um resultado positivo para ambos os testes e quatro (16,0%) tiveram apenas positividade para qPCR. O coeficiente Kappa foi de 0,636 ( $p < 0,001$ ). O número médio de dias para o primeiro resultado positivo ocorrer foi 50 (intervalo, 24-105 dias) para antigenemia e 42 (intervalo, 24-74 dias) para qPCR ( $p < 0,001$ ). Destes 25 pacientes, 17 (68,0%) foram tratados com ganciclovir intravenoso para infecção ou doença por CMV, 4 (16,0%) tiveram a imunossupressão diminuída sem a necessidade de tratamento antiviral. Quatro outros (16,0%) não receberam intervenção uma vez que a antigenemia foi negativa e o médico não estava ciente dos resultados da qPCR. Dos 25 pacientes com um

resultado positivo, 11 (44,0%) eram sintomáticos, mas apenas 3 (12%) desenvolveram doença por CMV, e 22 (88,0%) tiveram infecção por CMV. Os sintomas relacionados ao CMV foram: leucopenia ( $n=7$ ; 28,0%), trombocitopenia ( $n=6$ ; 24,0%), diarreia ( $n=3$ ; 12,0%), e lesões da mucosa oral ( $n=1$ ; 4,0%). A pancitopenia foi observada em 1 (4,0%) caso de doença por CMV. Uma diferença significativa foi encontrada entre o número médio de células em pacientes que eram sintomáticos e pacientes que não eram: a mediana foi, respectivamente, 7,0 células/10<sup>5</sup> leucócitos (variando de 1 a 580 células/10<sup>5</sup> leucócitos) e 3,0 células/10<sup>5</sup> leucócitos (intervalo, 1-48 células/10<sup>5</sup> leucócitos) ( $p=0,021$ ). Os resultados de qPCR, também, foram significativamente diferentes entre pacientes sintomáticos e assintomáticos, com resultados medianos de 15.539,02 UI/mL (intervalo, 528,66 a 605.059,08 UI/mL) e 3.490,12 UI/mL (intervalo 166,04 a 486.978,25 UI/mL), respectivamente ( $p < 0,001$ ). Entre 5 (16,7%) pacientes que receberam terapia antiviral profilática, todos apresentaram DNAemia detectável com resultados medianos de 9.896,05 UI/mL (intervalo, 528,66 a 605.059,08 UI/mL), mas nenhum desenvolveu doença. Dos 25 (83,3%) pacientes em terapia preemptiva, 20 (80%) desenvolveram DNAemia por CMV e 3 (12%) tiveram doença por CMV.

Avaliando doadores e receptores de transplante de acordo com o status sorológico do CMV, dos 30 pacientes, 16 (53,3%) eram D+/R+, e 15 (93,8%) deles apresentaram DNAemia por CMV e 2 (12,5%) desenvolveram doença por CMV. No grupo D-/R+, 90,0% apresentaram DNAemia por CMV e 1 desenvolveu doença por CMV. Em D+/R- pacientes, 50,0% tiveram DNAemia. O único paciente do grupo D-/R- não apresentou DNAemia por CMV.

A Figura 2 mostra o desempenho do teste de qPCR *in house* na previsão dos resultados relevantes da antigenemia para CMV, bem como a decisão dos médicos de iniciar a terapia anti-CMV. Três limites diferentes foram testados e os resultados de sensibilidade e especificidade para cada um são mostrados na figura.



**Figura 2.** Desempenho do teste de qPCR *in house* na previsão de resultados relevantes de antigenemia para CMV (ou seja, limite usado na instituição para iniciar terapia anti-CMV, 10 células/10<sup>5</sup> leucócitos), bem como a decisão dos médicos de iniciar terapia anti-CMV. Foram testados três limites: 2.750 UI/mL (Log 3,44), 3.430 UI/mL (Log 3,54), e 3.650 UI/mL (Log 3,56), resultando em sensibilidade de qPCR de 100,0; 97,1; e 91,2%, respectivamente. A especificidade para os mesmos limites foi de 72,0; 74,2; e 75,3%, respectivamente. Considerando a sensibilidade e especificidade dos limites, o valor de 3.430 UI/mL (Log 3,54) foi escolhido para iniciar a terapia (AUC 0,92617 ± 0,0185,  $p < 0,001$ ). O coeficiente de correlação Kappa entre qPCR e antigenemia foi de 0,604.

## DISCUSSÃO

Apesar dos avanços no campo de diagnósticos, a infecção por CMV ainda resulta em altas taxas de morbidade e mortalidade entre os receptores de transplante de órgãos sólidos<sup>1</sup>. Nesta coorte prospectiva de pacientes de transplante renal, foi observada uma alta taxa de infecção (83,3%), enquanto a doença por CMV ocorreu em 10,0% dos pacientes. Um estudo realizado na mesma instituição em 2004 utilizando a antigenemia para CMV como uma ferramenta de diagnóstico observou 60,0% de infecção e 38,4% de doença<sup>10</sup>. Em um estudo realizado em outro hospital da mesma cidade no Brasil, com uma composição de pacientes semelhante à do presente estudo, a incidência de infecção por CMV foi de 53,3%<sup>11</sup>. Esta coorte foi caracterizada por uma elevada soroprevalência de infecção por CMV tanto em doadores quanto em receptores, e por uma proporção limitada de pacientes em profilaxia anti-CMV universal (16,6% dos pacientes em comparação com 50,0% no estudo de Franco *et al.* (2017))<sup>11,12,13</sup>. Outro estudo realizado no Brasil em

uma população de receptores de transplante renal de baixo risco encontrou uma taxa de incidência de 69,6% usando metodologias de antigenemia e qPCR<sup>14</sup>, porém um estudo de coorte realizado em receptores de transplante cardíaco encontrou uma taxa de 93,3% de incidência<sup>15</sup>. As taxas de incidência encontradas no Brasil são semelhantes a estudos no Japão (70,8%)<sup>16</sup> e na Índia (73,7%)<sup>17</sup>, mas diferem de países como a Coreia, onde a literatura mostra taxas de 30-40%<sup>18-21</sup>, Finlândia de 27%<sup>22</sup> e nos EUA, em uma população pediátrica de transplante renal, foi encontrada uma taxa de 27%<sup>23</sup>.

A comparação entre os dois testes diagnósticos realizados neste estudo mostrou uma concordância entre os resultados de 70,3%, de acordo com estudos anteriores que demonstraram concordâncias que variam de 66,6-94,3%<sup>11,15,18-20,23-25</sup>. Entretanto, a maioria destes estudos foi realizada antes do advento do padrão da OMS, bem como antes do conhecimento de fatores relacionados à apresentação do vírus em diferentes matrizes biológicas<sup>5,26,27</sup>. Estes fatores influenciam drasticamente a reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade de testes moleculares. Kamei *et al.* (2016)<sup>25</sup> encontraram concordância de 87,4% entre os resultados metodológicos utilizando um ensaio calibrado pelo padrão da OMS em pacientes submetidos à transplante hepático. O teste Kappa revelou uma concordância aceitável entre os testes, o que, também, foi visto por Franco *et al.* (2017)<sup>11</sup>, Rhee *et al.* (2011)<sup>28</sup> e Choi *et al.* (2009)<sup>21</sup>. Nos estudos de Rha *et al.* (2012)<sup>23</sup> e Kwon *et al.* (2015)<sup>18</sup>, foram encontradas fortes concordâncias (0,61 e 0,66). A correlação entre os testes foi aceitável quando os limites de Log 3,44 e Log 3,56 foram considerados para resultados positivos e moderada quando Log 3,54 foi usado como limite. A concordância entre os testes torna-se boa quando avaliada entre os pacientes, semelhante a estudos anteriores<sup>11</sup>. Ao realizar uma análise para avaliar a correlação entre os ensaios, encontramos uma relação moderada; este resultado, também, foi encontrado por Ishii *et al.* (2017)<sup>16</sup>, Kamei *et al.* (2016)<sup>25</sup> e Rhee *et al.* (2011)<sup>19</sup>. Esta relação moderada entre testes pode ser explicada pelo fato de que a antigenemia é uma técnica semi-quantitativa dependente do operador e a qPCR é uma técnica quantitativa que permite a automação de várias etapas. Além disso, a maioria dos resultados discordantes é explicada pela maior sensibilidade dos ensaios moleculares quando comparados à

antigenemia, uma vez que os resultados positivos na qPCR tornaram-se positivos e negativos mais de uma semana antes e depois do teste de antigenemia para CMV<sup>18</sup>. Também foi observado que apenas 4 amostras apresentaram contagem de neutrófilos abaixo de 1000/mm<sup>3</sup>, o que é uma das limitações de análise para a técnica de antigenemia<sup>3</sup>, mas todas elas foram negativas para ambos os testes, portanto não consideradas uma das causas de discrepância entre os testes. O número médio de dias para positividade da antigenemia foi 50 e para qPCR 42. Este resultado é semelhante ao encontrado por David-Neto *et al.* (2014)<sup>29</sup> em um estudo duplo-cego para determinar o ponto de corte para o início do tratamento pela estratégia preemptiva em pacientes transplantados renais de baixo risco. É importante notar que a maioria dos pacientes neste estudo foi considerada de baixo risco (D+/R+).

Após quase dez anos do lançamento do padrão da OMS, ainda não foi definido um limite consensual para o tratamento de CMV<sup>3,30</sup>. O terceiro consenso internacional sobre o manejo do CMV em pacientes com transplantes de órgãos sólidos indica que é desejável que os centros definam seu próprio limite levando em conta o tipo de ensaio, o tipo de amostra biológica e os fatores de risco dos pacientes<sup>3</sup>. A fim de equilibrar a sensibilidade e especificidade do ponto de corte, 3.430 UI/mL (Log 3,54) foi escolhido para iniciar a terapia se 10 células/10<sup>5</sup> leucócitos na antigenemia e a decisão dos médicos de tratar fossem usados como padrões-ouro. A sensibilidade do limite estabelecido neste estudo foi alta (97,06%) enquanto a especificidade não foi ideal (74,2%), mas é importante enfatizar que a maioria dos resultados ocorreu dias antes ou depois de resultados positivos de antigenemia. Estudos anteriores de plasma usaram pontos de corte diferentes para pacientes de baixo risco, um incluindo 3.983 UI/mL (log 3,60 UI/mL), e outro 2.750 UI/mL (log 3,44 UI/mL) para pacientes de baixo risco, e 1.500 UI/mL (log 3,18 UI/mL) para pacientes de alto risco<sup>31,32</sup>. Considerando os pacientes neste estudo com resultados positivos de qPCR que apresentaram antigenemia negativa (4/30), apenas dois atingiram o ponto de corte de Log 3,54 - portanto, a especificidade foi de 93,3%.

Este estudo apresenta algumas limitações, sendo a principal delas o pequeno número de pacientes investigados. Vinte e um pacientes foram excluídos do estudo devido à má adesão à coleta de exames

laboratoriais ou pelo não comparecimento a consultas. Além disso, a população do estudo é composta em sua maioria por pacientes de baixo risco, não permitindo que nossos valores limites sejam generalizados para outras populações de pacientes. Entretanto, enfatizamos que isto ocorreu devido à alta soroprevalência de infecção por CMV nesta população.

Em conclusão, os dois testes de diagnóstico de CMV utilizados neste estudo, qPCR e antigenemia, mostraram uma correlação aceitável. O conhecimento recente sobre a relevância da cinética viral permite o desenvolvimento de testes moleculares cada vez mais sensíveis e uma melhor avaliação da DNAemia do CMV em pacientes, com resultados positivos à frente do que era visto anteriormente apenas com antigenemia. No entanto, esta alta sensibilidade requer uma avaliação clínica cuidadosa do limite para o início do tratamento, a fim de evitar tratamentos desnecessários. Aqui demonstramos o ponto de corte ideal para um novo qPCR *in house* no manejo da infecção por CMV em pacientes transplantados renais, usando o padrão da OMS. São necessários mais estudos usando a qPCR calibrados com o padrão da OMS para que os pontos de corte possam ser comparados na busca por um que possa ser extrapolado para populações de pacientes com riscos diferentes.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela infraestrutura para este estudo.

Este estudo foi apoiado por uma bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. A.C.P recebeu uma bolsa da CNPq, um órgão de pesquisa brasileiro. As fontes de financiamento não estiveram envolvidas no desenho do estudo, na coleta, análise e interpretação dos dados, na redação do artigo e na decisão de submeter o artigo para publicação.

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores participaram no desenho do projeto, assim como participaram e aprovaram a versão final deste artigo. C.F.B.C. escreveu o projeto, participou de consultas, coletou exames, realizou

testes laboratoriais, analisou dados e redigiu o artigo. O.S.A., A.P.A., e A.C.P. supervisionaram o aluno de mestrado, C.F.B.C., no desenvolvimento deste trabalho. R.K. participou nas consultas de pacientes, auxiliou na aplicação do IC, na coleta de exames, na análise de dados e na redação do artigo. K.L.S., I.C.S.V, F.P.R., D.F.D., e B.M.P. participaram na coleta de amostras, testes laboratoriais, análise de dados e redação do artigo.

## CONFLITO DE INTERESSE

Nenhum a declarar.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

O seguinte material online está disponível para o presente artigo:

Material Suplementar para “Validação clínica de um ensaio de PCR quantitativo interno em tempo real para infecção por citomegalovírus usando o 1º Padrão Internacional da OMS em pacientes com transplante renal”.

## REFERÊNCIAS

- Stern M, Hirsch H, Cusini A, Val Delden C, Manuel O, Meylan P, et al. Cytomegalovirus serology and replication remain associated with solid organ graft rejection and graft loss in the era of prophylactic treatment. *Transplantation*. 2014 Nov;98(9):1013-8. DOI: <https://doi.org/10.1097/TP.000000000000160>
- Sunwen C. Acquisition of donor strains of cytomegalovirus by renal-transplant recipients. *N Engl J Med*. 1986 May;314:1418-23. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJM198605293142205>
- 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.
- Preiksaitis JK, Hayden RT, Tong Y, Pang XL, Fryer JF, Heath AB, et al. Are we there yet? Impact of the first international standard for cytomegalovirus DNA on the harmonization of results reported on plasma samples. *Clin Infect Dis*. 2016 Sep;63(5):583-9. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciw370>
- Hayden RT, Yan X, Wick MT, Rodriguez AB, Xiong X, Ginocchio CC, et al. Factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: a multivariate analysis. *J Clin Microbiol*. 2012 Jan;50(2):337-45. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01287-11>
- Caurio CFB, Allende OS, Kist R, Vasconcellos ICS, Rozales FP, Reck-Kortmann M, et al. Cost minimization analysis of an in-house molecular test for cytomegalovirus in relation to a commercial molecular system. *Braz J Infect Dis*. 2020 May/June;24(3):191-200. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.04.015>
- Ho SY, Barry CP, inventor; WIPO, assignee. Materials and method for detecting cytomegalovirus (CMV). United States patent US WO2012097105 A1. 2012 Jun 19.
- Altman DG. *Practical statistics for medical research*. London: Chapman and Hall/CRC; 1990.
- Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turkish J Emerg Med*. 2018 Sep;18(3):91-3. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tjem.2018.08.001>
- Schroeder R, Michelon T, Fagundes I, Bortolotto A, Lammert E, Oliveira J, et al. Cytomegalovirus disease latent and active infection rates during the first trimester after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2004 May;36(4):896-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.03.085>
- Franco RF, Montenegro RM, Machado ABMP, Paris F, Menezes DS, Manfro RC. Evaluation of diagnostic tests for cytomegalovirus active infection in renal transplant recipients. *J Bras Nefrol*. 2017 Mar;39(1):46-54. DOI: <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20170008>
- Amaral RP, Amaral RP, Saidneuy AEKT, Ribeiro WL, Andrade J. Serological profile of potential solid organ donors in Santa Catarina, Brazil. *Transplant Proc*. 2008 Apr;40(3):665-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.03.003>
- Souza MA, Passos AM, Treitinger A, Spada C. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Aug;43(4):359-61. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000400004>
- David-Neto E, Triboni AHK, Paula FJ, Vilas Boas LS, Machado CM, Agena E, 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;98(10):1077-81. DOI: <https://doi.org/10.1097/TP.000000000000189>
- Camargo LFA, Uip DE, Simpson AAG, Andrew AG, Caballero O, Stolf NAG, et al. Comparison between antigenemia and a quantitative-competitive polymerase chain reaction for the diagnosis of cytomegalovirus infection after. 2001 Feb;71(3):412-7. DOI: <https://doi.org/10.1097/00007890-200102150-00013>
- Ishii K, Onishi Y, Miyamura N, Fukuhara N, Ishizawa K, Nakanishi M, et al. Development and evaluation of a quantitative assay detecting cytomegalovirus transcripts for preemptive therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Med Virol*. 2017 Feb;89(7):1265-73. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.24775>
- Madhavan HN, Samson MY, Ishwarya M, Vijayakumar R, Jambulingam M. pp65 antigenemia and real time polymerase chain reaction (PCR) based-study to determine the prevalence of human cytomegalovirus (HCMV) in kidney donors and recipients with follow-up studies. *Virol J*. 2010 Nov;7(1):322. DOI: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-322>
- Kwon S, Jung BK, Ko SY, Lee CK, Cho Y. Comparison of quantitation of cytomegalovirus DNA by real-time pcr in whole blood with the cytomegalovirus antigenemia assay. *Ann Lab Med*. 2015 Jan;35(1):99-104. DOI: <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.1.99>
- Rhee JY, Peck KR, Lee NY, Song JH. Clinical usefulness of plasma quantitative polymerase chain reaction assay: diagnosis of cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *Transplant Proc*. 2011 Sep;43(7):2624-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.05.054>
- Kim DJ, Kim SJ, Park J, Choi GS, Lee S, Kwon CD, et al. Real-time PCR assay compared with antigenemia assay for detecting cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *Transplant Proc*. 2007 Jun;39(5):1458-60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.01.088>
- Choi SM, Lee DG, Lim J, Park SH, Choi JH, Yoo JH, et al. Comparison of quantitative cytomegalovirus real-time PCR in whole blood and pp65 antigenemia assay: clinical utility of CMV real-time PCR in hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Korean Med Sci*. 2009 Aug;24(4):571-8. DOI: <https://doi.org/10.3346/jkms.2009.24.4.571>
- Piiparinen H, Helanterä I, Lappalainen M, Suni J, Koskinen P, Grönhagen-Riska C, et al. Quantitative PCR in the diagnosis of



- CMV infection and in the monitoring of viral load during the antiviral treatment in renal transplant patients. *J Med Virol.* 2005 May;76(3):367-72. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.20367>
23. Rha B, Redden D, Benfield M, Lakeman F, Whitley RJ, Shimamura M. Correlation and clinical utility of pp65 antigenemia and quantitative polymerase chain reaction assays for detection of cytomegalovirus in pediatric renal transplant patients. *Pediatr Transplant.* 2012 Jun;16(6):627-37. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3046.2012.01741.x>
  24. Cariani E, Pollara CP, Valloncini B, Perandin F, Bonfanti C, Manca N. Relationship between pp65 antigenemia levels and real-time quantitative DNA PCR for Human Cytomegalovirus (HCMV) management in immunocompromised patients. *BMC Infect Dis.* 2007 Nov;7:138. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-7-138>
  25. Kamei H, Ito Y, Onishi Y, Suzuki M, Imai H, Kurata N, et al. Cytomegalovirus (CMV) monitoring after liver transplantation: comparison of CMV pp65 antigenemia assay with real-time PCR calibrated to WHO international standard. *Ann Transplant.* 2016;21:131-6. DOI: <https://doi.org/10.12659/AOT.895677>
  26. Tsai HP, Tsai YY, Lin IT, Kuo PH, Chen TY, Chang KC, 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;11(8):e0160493. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160493>
  27. Naegele K, Lautenschlager I, Gosert R, Loginov R, Bir K, Helanterä I, et al. Cytomegalovirus sequence variability, amplicon length, and DNase-sensitive non-encapsidated genomes are obstacles to standardization and commutability of plasma viral load results. *J Clin Virol.* 2018 Jul;104:39-47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.04.013>
  28. Rhee JY, Peck KR, Lee NY, Song JH. Clinical usefulness of plasma quantitative polymerase chain reaction assay: diagnosis of cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *Transplant Proc.* 2011 Sep;43(7):2624-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.05.054>
  29. 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;98(10):1077-81. DOI: <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000189>
  30. Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD; World Health Organization (WHO). Collaborative study to evaluate the proposed 1st who international standard for human cytomegalovirus (HCMV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. Geneva: WHO; 2011.
  31. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.09.017>
  32. Martín-Gandul C, Pérez-Romero P, Blanco-Lobo P, Benmarzouk-Hidalgo OJ, Sánchez M, Gentil MA, et al. Viral load, CMV-specific T-cell immune response and cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients at higher risk for cytomegalovirus infection during preemptive therapy. *Transpl Int.* 2014 Jun;27(10):1060-8. DOI: <https://doi.org/10.1111/tri.12378>