

Avaliação de métodos diagnósticos para infecção ativa por citomegalovírus em receptores de transplante renal

Evaluation of diagnostic tests for cytomegalovirus active infection in renal transplant recipients

Autores

Rodrigo Fontanive Franco ¹

Rosângela Munhoz Montenegro ¹

Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado ¹

Fernanda de Paris ¹

Denise Silva Menezes ¹

Roberto Ceratti Manfro ¹

¹ Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Data de submissão: 29/5/2016.

Data de aprovação: 2/12/2016.

Correspondência para:

Roberto Ceratti Manfro.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Avenida Ramiro Barcelos, nº 2350, Porto Alegre, RS, Brasil.
CEP: 90035-003

E-mail: rmanfro@hcpa.edu.br

DOI: 10.5935/0101-2800.20170008

RESUMO

Introdução: Citomegalovírus (CMV) é uma importante causa de infecção viral após o transplante renal. Os métodos diagnósticos presentemente utilizados são a antigenemia pp-65 e os métodos que utilizam a amplificação de ácidos nucleicos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e visam à detecção da replicação viral. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a incidência de infecção ativa por CMV em pacientes transplantados renais pelos dois métodos e estabelecer a melhor correlação clínico-laboratorial. **Métodos:** Trinta pacientes transplantados renais sequenciais em um único centro foram incluídos em um estudo de coorte prospectiva. Amostras de sangue periférico foram coletadas a partir do 15º dia até o 6º mês pós-transplante e avaliadas para replicação de CMV por Antigenemia pp-65 e PCR quantitativo (qPCR). **Resultados:** Foram analisadas 240 amostras e a incidência de infecção ativa foi similar pelos dois métodos. O tempo médio transcorrido desde o transplante até o primeiro teste com resultado positivo foi quase idêntico entretanto mais amostras tiveram resultado positivo por qPCR do que antigenemia, um comportamento que se manteve quase uniforme ao longo do tempo. Concordância entre os testes foi observada em 217 amostras (90,4%; kappa = 0,529; $p < 0,001$) e em 25 pacientes (83,3%; kappa = 0,667; $p < 0,001$). A avaliação dos parâmetros diagnósticos para replicação de CMV revelaram maior sensibilidade para qPCR (82,1%) contra antigenemia (59,0%). PCR quantitativo também foi levemente mais preciso do que antigenemia. **Conclusão:** Nossos dados demonstram que ambos os métodos são adequados e tem precisão quase equivalente para a detecção da replicação do CMV após o transplante renal. A escolha entre um ou outro deve levar em consideração a demanda, capacidade de execução e custo-efetividade em cada instituição.

Palavras-chave: citomegalovírus; transplante de rim; reação em cadeia da polimerase; imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Introduction: Cytomegalovirus (CMV) infection is a main viral infection after kidney transplantation. The diagnostic methods currently employed are pp65 antigenemia and nucleic acid amplification by polymerase chain reaction (PCR) and aim at detecting viral replication. **Objective:** The goal of this study was to evaluate and compare by both methods the incidence of CMV active infection in kidney transplant patients and to establish the best clinical-laboratory correlation. **Methods:** Thirty sequential kidney transplant recipients were enrolled in a single center prospective cohort study. Peripheral blood samples were drawn from day 15 until the 6th month after transplantation and tested for CMV replication by pp65 antigenemia and quantitative PCR assays (qPCR). **Results:** Two hundred forty samples were analyzed and the incidence of active infection was similar by both methods. Time elapsed to the first positive test was almost identical but more samples tested positive by qPCR than by antigenemia in a behavior that was almost evenly distributed overtime. Agreement between tests was observed in 217 samples (90.4%; kappa = 0.529; $p < 0.001$) and in 25 patients the tests were concordant (83.3%; kappa = 0.667; $p < 0.001$). The evaluation of the diagnostic parameters for CMV replication revealed higher sensitivity for the qPCR test (82.1%) against antigenemia (59.0%). Quantitative PCR was also slightly more accurate than antigenemia. **Conclusion:** Our data demonstrate that both methods are suitable and have almost equivalent accuracy for the detection of post-transplant cytomegalovirus replication. The choice for either test must take in consideration the demand, execution capability and cost-effectiveness at each institution.

Keywords: cytomegalovirus; immunohistochemistry; kidney transplantation; polymerase chain reaction.

INTRODUÇÃO

O citomegalovírus (CMV) pertence à família *herpesviridae*, e a infecção por este patógeno tem elevada prevalência em todo o mundo. Embora a infecção seja geralmente inofensiva em hospedeiros imunocompetentes, ela pode ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade em receptores de transplante de órgãos.¹ As taxas relatadas de infecção ativa variam entre 40-100% em diferentes casuísticas de receptores de transplante renal.^{2,3}

Infecção e doença por CMV são mais comuns em pacientes sem exposição prévia ao vírus que receberam órgãos de doadores com infecção latente ou em receptores com exposição prévia que tenham recebido intensa terapia imunossupressora, especialmente as que empregam anticorpos depletos de linfócitos T, como a imunoglobulina antitimócito.²⁻⁵

A fim de obter melhores resultados nas populações de transplantes de órgãos, o tratamento eficaz da infecção ativa ou doença e o uso de estratégias preventivas requerem um diagnóstico preciso e precoce. Portanto, métodos diagnósticos rápidos e precisos são necessários e devem ser utilizados.⁶⁻⁸

Os testes atualmente disponíveis na prática clínica para monitorizar a infecção ativa por CMV são a antigenemia pp65, que detecta a presença da fosfoproteína pp65 nos leucócitos do sangue periférico, e a detecção de DNA viral por métodos de amplificação de ácidos nucleicos, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que podem ser qualitativos ou quantitativos.⁹⁻¹⁷ Métodos sorológicos para detectar imunoglobulinas das classes IgM e IgG e culturas virais não são adequados para uso na prática clínica por conta de sua baixa precisão e demora excessiva para a obtenção de resultados.¹¹⁻¹³

Estudos anteriores demonstraram a existência de uma boa correlação entre os ensaios quantitativos de PCR (qPCR) e a antigenemia pp65 para detecção de replicação viral.^{6,10,18-25} Atualmente, as recomendações ditam que tanto a antigenemia como o qPCR podem ser utilizados para monitorizar a replicação viral e a resposta à terapia antiviral. A escolha de um ou outro método depende basicamente da disponibilidade de pessoal e recursos econômicos nas instituições de saúde em questão.^{11,18,20,26,27}

O objetivo do presente artigo foi avaliar a precisão desses testes através de um estudo longitudinal que incluiu pacientes receptores de transplantes renais de nossa instituição.

MATERIAIS E MÉTODOS

PACIENTES

Duzentas e quarenta amostras de sangue periférico foram colhidas prospectivamente entre abril de 2012 e fevereiro de 2013, de trinta de cada cem pacientes submetidos a transplante renal em nossa instituição no decurso desse período. Foram considerados a aceitação dos pacientes em participar e respeitar a programação do estudo, bem como o orçamento alocado ao mesmo. Os pacientes que concordaram em participar foram incluídos independentemente de sua condição em relação à dosagem de IgG para CMV ou da terapia de indução. As amostras foram colhidas sequencialmente 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 e 180 dias após o transplante. A replicação viral foi avaliada por meio do exame para detecção da antigenemia pp65 e por amplificação do DNA viral por qPCR.

O regime imunossupressor ministrado a todos os pacientes consistiu de combinação de tacrolimus, micofenolato sódico e prednisona. Os pacientes que receberam rins de doadores falecidos foram submetidos a terapia de indução com Basiliximab ou anticorpos policlonais depletos de linfócitos T. Além das amostras do protocolo, foram colhidas amostras adicionais de antigenemia conforme as necessidades relativas ao manejo clínico.

Sempre que possível, antes dos transplantes foram realizados testes serológicos de IgM e IgG específicos para CMV nos doadores e receptores. As doses intravenosas e orais de ganciclovir foram ajustadas segundo a TFG estimada pela equação do MDRD.

Pacientes sob risco elevado de infecção, receptores CMV/IgG- que receberam órgão de doadores CMV/IgG+ e indivíduos tratados com anticorpos depletos de linfócitos T para profilaxia ou tratamento de rejeição aguda receberam ganciclovir por via intravenosa seguido de ganciclovir oral até seis meses após o transplante. Pacientes sob risco moderado, doadores CMV/IgG+ e receptores ou receptores CMV/IgG+ apenas foram monitorizados com antigenemia seriada e preventivamente tratados. O diagnóstico de infecção ativa por CMV foi feito pela positividade do ensaio de antigenemia pp65 sem o conhecimento do ensaio qPCR. Casos de infecção ativa foram tratados com ganciclovir intravenoso em doses ajustadas para a função do enxerto.

MÉTODOS

ANTIGENEMIA PP65

Depois de extraídos do sangue periférico, os leucócitos foram incubados com anticorpos monoclonais C10/C11 e outros reagentes do CMV Brite Turbo de acordo com as recomendações do fabricante (IQ® Products, Groningen, Holanda). Os leucócitos com antigenemia positiva exibiram padrão nuclear homogêneo amarelo-esverdeado quando observados por microscopia de fluorescência. O resultado da antigenemia pp65 foi considerado diagnóstico para replicação viral quando houve uma ou mais células positivas por 200.000 analisadas.²¹

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA

A quantificação de ácidos nucleicos foi realizada utilizando o CMVQ - PCR Alert Kit (Nanogen Advanced Diagnostics, Turim, Itália) em amostras de DNA extraídas de plasma coletado em tubos contendo EDTA, de acordo com as instruções do fabricante. Cinco microlitros de DNA foram transferidos para uma microplaca de amplificação contendo uma mistura de reagentes que incluía iniciadores e sondas específicas para CMV, além de um controle interno e Taq polimerase.

O procedimento consiste em uma reação de amplificação em tempo real em uma microplaca com variação e controle de temperatura programável e um sistema de detecção de fluorescência óptica utilizado simultaneamente à reação em um termociclador. O sistema foi padronizado em torno de equipamentos Applied Biosystems ABI PRISM 7000. O resultado do PCR foi considerado diagnóstico para replicação quando a carga viral foi de pelo menos 1250 cópias/mL.²¹

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A ocorrência de infecção ativa foi verificada pelos métodos de antigenemia e qPCR. A concordância entre os testes foi avaliada por meio do coeficiente Kappa. O teste *t* de Student para amostras independentes foi utilizado na avaliação das diferenças entre pacientes infectados e não infectados, pelos dois métodos, para as seguintes variáveis: idade do doador; idade do receptor; e creatinina e taxa de filtração glomerular estimada pela equação do MDRD²⁸ no início do estudo e no sexto e décimo-segundo meses após o

transplante. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas por meio do software estatístico SPSS, versão 20.

Para estabelecer os parâmetros diagnósticos dos dois ensaios, a replicação viral foi considerada presente quando o resultado de qualquer teste fosse positivo e ausente quando os resultados de ambos os ensaios fossem negativos. O estudo foi aprovado em seus aspectos técnicos e metodológicos pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre de acordo com os preceitos da Declaração de Helsinque. Os pacientes incluídos no estudo concordaram em participar e assinaram termos de consentimento livre e esclarecido.

RESULTADOS

Os dados demográficos da amostra estudada são apresentados na Tabela 1. O número médio de amostras por paciente foi de 8 ± 1 . Na análise, 23 amostras (9,6%) foram positivas pela pesquisa de antigenemia e 32 (13,3%) foram positivas pelo teste qPCR. Não houve diferença no tempo médio transcorrido desde o transplante até o primeiro resultado positivo, que foi de 64 ± 23 dias para a antigenemia e 62 ± 21 dias para o qPCR ($p = 1,0$).

TABELA 1 DADOS DEMOGRÁFICOS E SOBRE IMUNOSSUPRESSÃO INICIAL

Receptores	Frequência	%
Idade média (anos, média \pm DP)	42 ± 12	(intervalo: 14 - 64)
Raça branca/não-branca	25/5	(83,3/16,7)
Sexo masculino/feminino	18/12	(60/40)
CMV IgG +	30	(100)
CMV IgG -	0	(0)
Diabetes pré-transplante	3	(10)
Doadores		
Vivos/falecidos	3/27	(10/90)
CMV IgG +	16	(53,3)
CMV IgG -	7	(23,3)
CMV IgG desconhecido	7	(23,3)
Imunossupressão inicial*		
Sem indução com anticorpos	3	(10)
Indução com Basiliximab	16	(53,3)
Indução com ATG	11	(36,7)

CMV: citomegalovírus; indução com ATG: terapia de indução com anticorpos depletors de linfócitos. * Todos os pacientes receberam inibidores da calcineurina, micofenolato sódico e prednisona.

Muitas amostras deram resultado positivo ao mesmo tempo. Contudo, uma amostra foi positiva apenas no qPCR quinze dias após o transplante e em cada ponto da análise temporal. A exceção foram as amostras do trigésimo e sexagésimo dias, em que houve mais amostras positivas no qPCR do que na pesquisa de antigenemia. Além disso, não houve amostras positivas 180 dias após o transplante (Figura 1). Dentre as amostras positivas pela pesquisa de antigenemia, o número médio de células positivas foi de $5 \pm 6/200.000$, enquanto que nos testes positivos de qPCR a média foi de 5987 ± 10.623 cópias virais/mL.

Devido ao pequeno número de amostras positivas, nenhum dos testes levou à identificação de um padrão de proliferação viral.

DETECÇÃO DE INFECÇÃO ATIVA POR ANTIGENEMIA

Segundo a pesquisa de antigenemia, 16 pacientes (53,3%) desenvolveram infecção ativa. Em 11 indivíduos a sorologia IgG foi positiva tanto para

doadores como para receptores, e em dois casos apenas o receptor tinha anticorpos. A sorologia do doador era desconhecida em três transplantes. Não houve associação estatisticamente significativa entre sorologia pré-transplante de doadores e receptores e ocorrência de infecção ativa diagnosticada por este método ($p = 0,169$). Não foi observado nenhum caso de citomegalovírus.

DETECÇÃO DE INFECÇÃO ATIVA POR qPCR

Segundo este teste, 15 pacientes (50%) desenvolveram infecção ativa. Em nove receptores, a sorologia IgG foi positiva tanto para doadores como para receptores; em três, apenas o receptor apresentou anticorpos; e anticorpos IgG para CMV estavam presentes em outros três em que a sorologia do doador era desconhecida. Não houve associação estatisticamente significativa entre sorologia pré-transplante de doadores e receptores e ocorrência de infecção por CMV diagnosticada por qPCR ($p = 0,667$).

Figura 1. Número de testes positivos por antigenemia pp65 e qPCR em cada momento de amostragem do estudo.

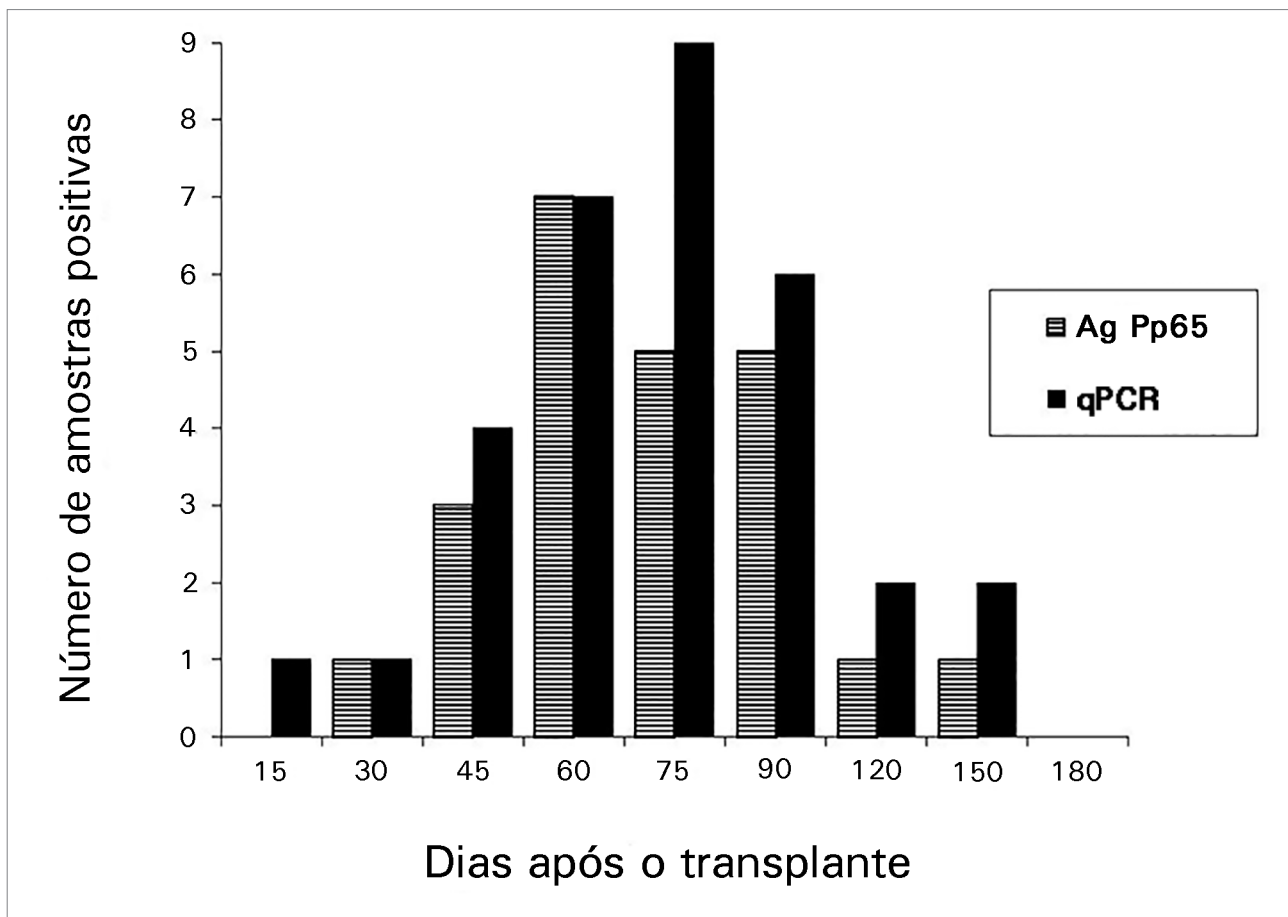


TABELA 2 PARÂMETROS DIAGNÓSTICOS DOS ENSAIOS DE REPLICAÇÃO DE CITOMEGALOVÍRUS

Teste/Parâmetro	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Precisão
antigenemia pp65	59,0%	100%	100%	92,6%	93,3%
Quantitative PCR	82,1%	100%	100%	96,6%	97,1%

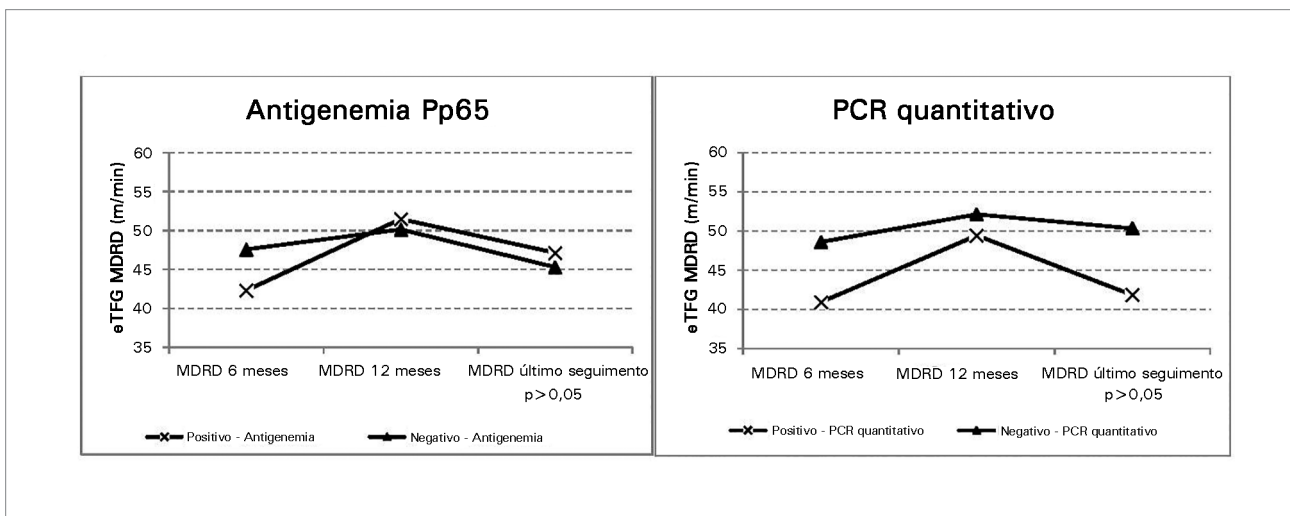
PCR: reação em cadeia da polimerase; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

TABELA 3 FATORES DE RISCO PARA DESENVOLVIMENTO DE INFECÇÃO ATIVA POR CITOMEGALOVÍRUS

Teste Variável	Antigenemia pp65			PCR quantitativo		
	Infecção	Sem infecção	<i>p</i>	Infecção	Sem infecção	<i>p</i>
Idade (anos)	42,3	42,1	0,982	39,2	45,2	0,200
Sexo (M/F)	10/6	8/6	0,765	8/7	10/5	0,456
Raça (B/N)	14/2	11/3	0,642	11/4	14/1	0,330
Pré-TxDM (Y/N)	2/14	1/13	1,0	0/15	3/12	0,224
D+R+/D-R+	11/2	5/5	0,169	9/3	7/4	0,667
Profilaxia (Y/N)	3/13	12/2	< 0,001	4/11	11/4	0,011
Indução (Y/N)	14/2	13/1	1,0	13/2	14/1	1,0
Rejeição (Y/N)	6/10	3/11	0,440	7/8	2/13	0,109

M: Masculino; F: Feminino; B: Branco; N: Negro; DM: *diabetes mellitus*.

Figura 3. Taxa de filtração glomerular estimada pela equação do MDRD em pacientes com ou sem infecção ativa avaliados por antigenemia pp65 (painel A) e qPCR (painel B). Diferenças não estatisticamente significativas.



mL/min e a dose profilática de ganciclovir foi de 1 g três vezes ao dia.

A profilaxia com ganciclovir foi ministrada a 15 pacientes. Pelo critério de antigenemia, três pacientes (20%) que receberam tratamento profilático desenvolveram infecção ativa, comparado

a 13 (86,7%) dentre os que não receberam profilaxia ($p < 0,001$). Na análise segundo os critérios do qPCR, quatro (26,7%) pacientes que receberam tratamento profilático desenvolveram infecção ativa em comparação a 11 (73,3%) que não receberam profilaxia ($p = 0,011$).

Não foram identificadas diferenças significativas entre os pacientes que desenvolveram infecção ativa e os que não o fizeram para os parâmetros idade de doadores e receptores, sexo, raça, presença de *diabetes mellitus* antes ou após o transplante, distribuição de sorologias anti-CMV, terapia de indução com anticorpos ou ocorrência de rejeição (Tabela 3).

A TFG estimada pela equação do MDRD não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de pacientes com e sem infecção ativa por CMV no sexto e décimo-segundo meses ou tampouco na última avaliação, por qualquer método diagnóstico (Figura 3). A terapia profilática com ganciclovir oral evitou o desenvolvimento de infecção ativa segundo os critérios diagnósticos por antigenemia (RR: 0,22; IC 95% 0,07-0,62; $p < 0,001$) e qPCR (RR: 0,36; IC 95%: 0,15-0,88; $p = 0,026$).

DISCUSSÃO

No presente estudo, a amostra de pacientes é representativa da população atual de receptores de transplante na região sul do Brasil. Os pacientes são predominantemente jovens caucasianos do sexo masculino submetidos a terapia de indução com anticorpos, que receberam rins de doadores falecidos. As variáveis envolvidas na replicação viral e relacionadas aos desfechos dos enxertos foram analisadas em relação aos métodos diagnósticos, e não foram estabelecidas correlações entre estas e o desenvolvimento de infecção ativa.

Avaliamos os dois métodos diagnósticos atualmente recomendados para o diagnóstico de infecção ativa por CMV, antigenemia pp65 e qPCR. A comparação entre os dois revela vantagens e desvantagens de um em relação ao outro.

O teste de PCR não exige equipe altamente treinada, pode ser realizado em pacientes com leucopenia, é automatizado, permite o processamento simultâneo de várias amostras e não requer materiais biológicos frescos. Entretanto, são necessários equipamentos e reagentes mais caros, especialmente no PCR quantitativo (qPCR), que é mais preciso. Os testes de qPCR foram padronizados em 2010 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), por meio de um padrão de referência produzido no *National Institutes of Biological Standards and Controls* do Reino Unido. A titulação padrão é de 5×10^6 UI/mL. Os testes comerciais e laboratoriais devem ser recalibrados de forma a mostrar colinearidade

em relação a esta Referência.^{8,29}. Em função de sua baixa especificidade, o PCR qualitativo não é atualmente utilizado para o diagnóstico de infecção por CMV.^{9,11,18,30}

A antigenemia pp65 é um método semi-quantitativo que detecta, através de técnicas de imunistoquímica ou imunofluorescência, a presença da fosfoproteína 65 expressa em leucócitos do sangue periférico infectado por CMV.^{11-13,18,31}

Dentre suas vantagens destacam-se a elevada sensibilidade e especificidade, o baixo custo e a facilidade de execução, que não requer equipamentos sofisticados. Contudo, a execução do método exige pessoal treinado, a amostra de sangue total deve ser processada dentro de seis a oito horas, e a sensibilidade do teste é perdida na presença de neutropenia. Além disso, a antigenemia pode ser negativa ou apresentar contagens baixas em casos de patologia invasiva tecidual. Enfim, este método consome bastante tempo e exige trabalho intensivo da parte do pessoal do laboratório.^{2,3,11,13}

A avaliação do objetivo principal deste estudo - analisar a correlação entre os dois métodos diagnósticos - revelou que ambos apresentam boa correlação. Este achado está de acordo com os dados da literatura para os métodos de antigenemia pp65 e qPCR para o diagnóstico de infecção ativa por CMV.^{12,18-20,25,32} Rhee *et al.*¹⁸ analisaram resultados de antigenemia pp65 e qPCR para 899 amostras de 111 pacientes de transplante renal no período pós-transplante recente, em grupo que apresentava perfil demográfico semelhante ao da população do nosso estudo. Os autores apontaram concordância entre 84% das amostras e indicaram correlação estatisticamente significativa entre os métodos diagnósticos.

Cariani *et al.*¹⁹ compararam 475 amostras consecutivas obtidas de 156 pacientes de transplante (rim e medula óssea), indivíduos com infecção por HIV e pacientes com neoplasias malignas hematológicas, e observaram uma correlação significativa entre os testes com concordância em 77% das amostras. Gouarin *et al.*²² analisaram 248 peças de 21 pacientes de transplante renal e identificaram uma correlação significativa entre qPCR em sangue total e antigenemia pp65, considerando o qPCR para CMV em sangue total uma alternativa adequada para diagnosticar e monitorizar a infecção por CMV em pacientes transplantados renais.

Piiparinen *et al.*²⁴ encontraram uma correlação quase linear entre os resultados dos dois testes em 253 amostras consecutivas de sangue de pacientes submetidos a transplantes de rim ou fígado. Mengelle *et al.*²⁵ relataram uma boa correlação entre qPCR com o DNA extraído de leucócitos e antigenemia pp65 a partir de 198 amostras de sangue de 14 pacientes submetidos a transplantes de rim, fígado ou coração, considerando o qPCR uma boa alternativa ao ensaio de antigenemia pp65.

Em nosso estudo, possivelmente por conta dos critérios do padrão-ouro para o diagnóstico de replicação viral, o qPCR apresentou maior sensibilidade para a identificação da replicação viral; porém, todos os demais parâmetros diagnósticos foram semelhantes. Em corroboração a esta ideia, devemos ressaltar que o qPCR revelou mais amostras positivas do que a antigenemia na maior parte da amostragem programada para o estudo.

O presente estudo apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, o tamanho da amostra é limitado e um percentual considerável dos doadores não tinha sorologia IgG disponível para avaliação, o que prejudicou a análise deste fator de risco. Além disso, o tempo de seguimento poderia ter sido mais longo e não houve casos de patologia invasiva tecidual. Apesar destas limitações, os resultados mostraram que o tamanho da amostra foi adequado para a avaliação dos métodos diagnósticos testados.

Concluímos que antigenemia pp65 e qPCR são métodos comparáveis para a detecção de replicação viral. A escolha de um método em detrimento do outro deve levar em conta os fatores locais, a presença de conhecimento especializado, os custos e o número necessário de exames a serem realizados em um programa de transplante específico, além da estratégia adotada pelo programa de transplante para monitorizar infecção ativa e doença por CMV. No entanto, o qPCR é um teste provavelmente mais sensível e ligeiramente mais preciso para a detecção de replicação viral, podendo substituir a antigenemia pp65 à medida em que se avoluma a necessidade de executar testes em programas de transplante.

REFERÊNCIAS

- Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 2003;98:269-97. PMID: 12782241 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7258\(03\)00034-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7258(03)00034-2)
- Aguado JM, Navarro D, San Juan R, Castón JJ. Cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012;30:57-62. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(12\)70083-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(12)70083-6)
- Brennan DC. Cytomegalovirus in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:848-55.
- Browne BJ, Young JA, Dunn TB, Matas AJ. The impact of cytomegalovirus infection ≥ 1 year after primary renal transplantation. *Clin Transplant* 2010;24:572-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0012.2010.01208.x>
- Kotton CN, Fishman JA. Viral infection in the renal transplant recipient. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1758-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2004121113>
- Camargo LF, Uip DE, Simpson AA, Caballero O, Stolf NA, Vilas-Boas LS, et al. Comparison between antigenemia and a quantitative-competitive polymerase chain reaction for the diagnosis of cytomegalovirus infection after heart transplantation. *Transplantation* 2001;71:412-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-200102150-00013>
- Hoffmann TW, Halimi JM, Büchler M, Velge-Roussel F, Goudeau A, Al-Najjar A, et al. Association between a polymorphism in the human programmed death-1 (PD-1) gene and cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *J Med Genet* 2010;47:54-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2009.068841>
- Koetz AC, Delbrück R, Furtwangler A, Hufert FT, Neumann-Haefelin D, Kirste G, et al. Cytomegalovirus pp65 antigen-guided preemptive therapy with ganciclovir in solid organ transplant recipients: a prospective, double-blind, placebo-controlled study. *Transplantation* 2001;72:1325-7. PMID: 11602864 DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-200110150-00025>
- de Keyzer K, van Laecke S, Peeters P, Vanholder R. Human cytomegalovirus and kidney transplantation: a clinician's update. *Am J Kidney Dis* 2011;58:118-26.
- Caliendo AM, St George K, Kao SY, Allega J, Tan BH, LaFontaine R, et al. Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV antigenemia assay: clinical utility of the prototype AMPLICOR CMV MONITOR test in transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000;38:2122-7. PMID: 10834964
- Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al.; Transplantation Society International CMV Consensus Group. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2013;96:333-60. PMID: 23896556 DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e31829df29d>
- Tanabe K, Todumoto T, Ishikawa N, Koyama I, Takahashi K, Fuchinoue S, et al. Comparative study of cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay, polymerase chain reaction, serology, and shell vial assay in the early diagnosis and monitoring of CMV infection after renal transplantation. *Transplantation* 1997;64:1721-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-199712270-00016>
- van der Bij W, Schirm J, Torensma R, van Son WJ, Teqzess AM, The TH. Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J Clin Microbiol* 1988;26:2531-5.
- Wolf DG, Spector SA. Early diagnosis of human cytomegalovirus disease in transplant recipients by dna amplification in plasma. *Transplantation* 1993;56:330-4. PMID: 8395098 DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-199308000-00014>
- Gerna G, Lilleri D, Chiesa A, Zelini P, Furione M, Comolli G, et al. Virologic and Immunologic Monitoring of Cytomegalovirus to Guide Preemptive Therapy in Solid-Organ Transplantation. *Am J Transplant* 2011;11:2463-71. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03636.x>
- Caballero OL, Menezes CL, Costa MC, Fernandes SC, Anacleto TM, de Oliveira RM, et al. Highly sensitive single-step PCR protocol for diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 1997;35:3192-7.

17. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 2000;355:2032-6. PMID: 10885354 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02350-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02350-3)
18. 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;43:2624-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.05.054>
19. 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;7:138. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-7-138>
20. Meyer-Koenig U, Weidmann M, Kirste G, Hufert FT. Cytomegalovirus infection in organ-transplant recipients: diagnostic value of pp65 antigen test, qualitative polymerase chain reaction (PCR) and quantitative Taqman PCR. *Transplantation* 2004;77:1692-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000133992.89191.52>
21. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:533-54.
22. Gouarin S, Vabret A, Gault E, Petitjean J, Regeasse A, Hurault de Ligny B, et al. Quantitative analysis of HCMV DNA load in whole blood of renal transplant patients using real-time PCR assay. *J Clin Virol* 2004;29:194-201. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532\(03\)00124-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532(03)00124-0)
23. Tong CY, Cuevas L, Williams H, Bakran A. Use of laboratory assays to predict cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 1998;36:2681-5.
24. Piiparinen H, Höckerstedt K, Grönhagen-Riska C, Lappalainen M, Suni J, Lautenschlager I. Comparison of plasma polymerase chain reaction and pp65-antigenemia assay in the quantification of cytomegalovirus in liver and kidney transplant patients. *J Clin Virol* 2001;22:111-6. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532\(01\)00173-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532(01)00173-1)
25. Mengelle C, Pasquier C, Rostaing L, Sandres-Sauné K, Puel J, Berges L, et al. Quantitation of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplants by real-time quantitative PCR and pp65 antigenemia. *J Med Virol* 2003;69:225-231. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.10277>
26. Roberts TC, Brennan DC, Buller RS, Gaudreault-Keener M, Schnitzler MA, Sternhell KE, et al. Quantitative polymerase chain reaction to predict occurrence of symptomatic cytomegalovirus infection and assess response to ganciclovir therapy in renal transplant recipients. *J Infect Dis* 1998;178:626-35. PMID: 9728529 DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/515383>
27. David-Neto E, Triboni AH, 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;98:1077-81. PMID: 24839894 DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/TP.000000000000189>
28. Pierrat A, Gravier E, Saunders C, Caira MV, Ait-Djafer Z, Legras B, et al. Predicting GFR in children and adults: a comparison of the Cockcroft-Gault, Schwartz, and modification of diet in renal disease formulas. *Kidney Int* 2003;64:1425-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00208.x>
29. Hayden RT, Gu Z, Sam SS, Sun Y, Tang L, Pounds S, et al. Comparative evaluation of three commercial quantitative cytomegalovirus standards by use of digital and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2015;53:1500-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03375-14>
30. Kanaan A, Cour I, Alvarez-Lafuente R, Benedicto M, Culebras E, Prats D, et al. Significance of nested PCR and quantitative real time PCR for cytomegalovirus detection in renal transplant recipients. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24:455-62. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.06.012>
31. Wirgart BZ, Claesson K, Eriksson BM, Brundin M, Tufveson G, Tötterman T, et al. Cytomegalovirus (CMV) DNA amplification from plasma compared with CMV pp65 antigen (ppUL83) detection in leukocytes for early diagnosis of symptomatic CMV infection in kidney transplant patients. *Clin Diagn Virol* 1996;7:99-110. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0197\(96\)00258-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0197(96)00258-9)
32. Tong CY, Cuevas LE, Williams H, Bakran A. Prediction and diagnosis of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients using qualitative and quantitative polymerase chain reaction. *Transplantation* 2000;69:985-91. PMID: 10755562 DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-200003150-00054>