UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JOSÉ LIDIO DE SOUZA JÚNIOR

O papel da PCR quantitativa para citomegalovírus no diagnóstico e manejo de pessoas vivendo com HIV/aids no Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto.

Ribeirão Preto
2020

JOSÉ LIDIO DE SOUZA JÚNIOR

O papel da PCR quantitativa para citomegalovírus no diagnóstico e manejo de pessoas vivendo com HIV/aids no Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto.

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo para obtenção de Título de Mestre em Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica.

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Valdes R. Bollela

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza Júnior, José Lidio

O papel da PCR quantitativa para citomegalovírus no diagnóstico e manejo de pessoas vivendo com HIV/aids no Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto.

78 p. : il.: 30 cm.

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Clínica Médica.

Orientador: Bollela, Valdes Roberto.

1. Citomegalovirus 2. HIV 3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa 4. Diagnóstico

FOLHA DE APROVAÇÃO

José Lidio de Souza Júnior

O papel da PCR quantitativa para citomegalovírus no diagnóstico e manejo de pessoas vivendo com HIV/aids no Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto.

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências Médicas, Programa de Clínica Médica

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr.

Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

A todas as pessoas que permitiram que esse projeto fosse concluído. Em especial para Eduardo Carvalho, por todo suporte nos momentos de dificuldade.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para prosseguir e não desanimar com as dificuldades.

À minha família que sempre me motivou e entendeu os períodos de ausência.

À Dr^a Fernanda Guioti Puga que me incentivou para que esse projeto pudesse ter início.

À Dr^a Aparecida Yulie Yamamoto por toda ajuda e conhecimento.

Ao Prof. Dr. Valdes Roberto Bollela pelo constante incentivo, disponibilidade, paciência e bom-humor. Não poderia ter escolhido melhor orientador.

Aos meus amigos que indiretamente me deram suporte para chegar ao fim desse projeto. Vocês fizeram todos momentos de dificuldade parecerem mais leves.

Obrigado em especial a Ana Paula Oliveira, Eduardo Gomes, João Elias, João Vitor, Marcos Gomes e Samira Moreira.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o sucesso deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

SOUZA JÚNIOR, J.L. **O papel da PCR quantitativa para citomegalovírus no diagnóstico e manejo de pessoas vivendo com HIV/AIDS no Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto.** 78 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O citomegalovirus (CMV) é um β herpes-vírus que infecta a maioria dos indivíduos no mundo. Em situações de imunossupressão prolongada, como ocorre nos pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), pode ocorrer sua reativação levando a manifestações clínicas. O reconhecimento de viremia, através da utilização de reação em cadeia da polimerase quantitativa para CMV (qPCR-CMV) não é universalmente recomendada para detecção de lesão ativa pelo CMV, pois pode ocorrer viremia assintomática em pacientes com baixos valores de linfócitos T CD4+. Porém, apesar da ausência de um protocolo clínico para uso da qPCR - CMV em pacientes HIV+ este teste tem sido amplamente utilizado no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). O objetivo deste trabalho foi, portanto, avaliar o papel deste exame na definição de doença causada por CMV e na indicação de tratamento antiviral específico. Foi realizado um estudo transversal e descritivo que incluiu os pacientes que tiveram pelo menos um exame de qPCR-CMV solicitado no período entre 01 de janeiro de 2015 e 30 de junho de 2016. Foram analisados 325 testes, os quais pertenciam a 238 indivíduos, sendo que 180 (55,38%) foram realizados em amostras de plasma, 134 (41,23%) em líquido e 11 (3,39%) em outros materiais. Já os sintomas que motivaram sua realização foram principalmente os neurológicos. Todos os exames foram solicitados com finalidade diagnóstica. Quanto ao resultado, 270 testes (83,08%) foram negativos e 55 (16,92%) positivos. Em mais de 90% das vezes não se iniciou tratamento direcionado para CMV antes do resultado da qPCR-CMV, havendo uma tendência de se iniciar terapêutica específica se o resultado fosse positivo e de se manter, não iniciar ou suspender o antiviral caso o resultado fosse negativo. O valor de CD4 abaixo de 100 células/mm³ se associou com a positividade da qPCR-CMV e há maior chance de óbito nos pacientes com qPCR-CMV acima de 6 log₁₀ cópias/ml ao final da internação e 3 e 6 meses após coleta desse exame. Este estudo evidenciou que no local estudado a qPCR-CMV é utilizada primariamente com finalidade diagnóstica sem uma uniformização nos critérios para sua solicitação e para a interpretação de seus resultados. Considerando as limitações na investigação da doença invasiva por CMV seria indicado iniciar tratamento antiviral específico naqueles pacientes com maior risco de evoluir a óbito (qPCR-CMV com resultado acima de 6 log₁₀ cópias/ml).

Palavras-chave: Citomegalovirus. HIV. Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa. Diagnóstico.

ABSTRACT

SOUZA JUNIOR, J.L. **The role of quantitative CRP for cytomegalovirus diagnosis and management of people living with HIV/AIDS in the Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto.** 78 f. Dissertation (Master's Degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Cytomegalovirus (CMV) is a β herpes-virus that infects most individuals in the world. In situations of prolonged immunosuppression, as occurs in patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV), its reactivation may occur leading to clinical manifestations. The recognition of viraemia, through the use of quantitative polymerase chain reaction for CMV (qCRP-CMV) is not universally recommended for active CMV injury detection, as asymptomatic viraemia can occur in patients with low T CD4+ lymphocyte values. However, despite the absence of a clinical protocol for the use of qCRP-CMV in HIV+ patients, this test has been widely used in the Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). The objective of this study was, therefore, to evaluate the role of this test in defining the disease caused by CMV and in indicating specific antiviral treatment. A cross-sectional and descriptive study was carried out that included patients who had at least one qCRP-CMV exam requested in the period between January 1st, 2015 and June 30th, 2016. A total of 325 tests were analysed, which belonged to 238 individuals being that 180 (55,38%) in plasmatic samples, 134 (41,23%) in liquor and 11 (3,39%) in other materials. The symptoms that motivated the tests were mainly neurological. All the tests were requested for diagnostic purposes. As for the result, 270 tests (83,08%) were negative and 55 (16,92%) positive. In more than 90% of the times, treatment directed to CMV was not initiated before the result of the qCRP-CMV, and there was a tendency to initiate specific therapy if the result was positive and to maintain it, not to initiate or suspend the antiviral if the result was negative. The value of CD4 below 100 cells/mm³ has been associated with the positivity of qCRP-CMV and there is a higher chance of death in patients with qCRP-CMV above 6 log₁₀ copies/ml at the end of hospitalization and 3 and 6 months after collection of this test. This study showed that in the studied site qCRP-CMV is used primarily for diagnostic purposes without a uniformity in the criteria for its request and for the interpretation of its results. Considering the limitations in the investigation of invasive CMV disease, would be indicated to initiate specific antiviral treatment in those patients at higher risk of death (qCRP-CMV with result above 6 log₁₀ copies/ml).

Keywords: Cytomegalovirus. HIV. Quantitative real time polymerase chain reaction. Diagnosis.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Soroprevalência de CMV em mulheres em idade fértil em países do mundo	16
Figura 2 - Patogênese do CMV humano.	17
Figura 3 - Possíveis mecanismos no qual o CMV pode ajudar na persistência do HIV.	20
Figura 4 - Interação entre CMV, HIV, linfócitos T CD4 + e CD8 +.....	21
Figura 5 - Retinite por CMV.	22
Figura 6 - Achados histopatológicos de doença invasiva por CMV.	24
Figura 7 - Descrição geral das amostras no período de 01 de janeiro de 2015 a 30 de junho de 2016.....	33
Figura 8 - Manejo sugerido de pacientes HIV+ em uso de TARV utilizando PCR-CMV.	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição do número de qPCR- CMV por paciente.....	34
Gráfico 2 - Distribuição da idade, em anos e por sexo no momento da solicitação da qPCR-CMV	36
Gráfico 3 - Sinais e sintomas que motivaram a solicitação da qPCR – CMV	37
Gráfico 4 - Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV antes do resultado da qPCR-CMV todas as espécimes clínicas	39
Gráfico 5 - Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV antes do resultado da qPCR-CMV realizada em Líquor	39
Gráfico 6 - Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV antes do resultado da qPCR-CMV realizada em sangue	40
Gráfico 7 - Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV	40
Gráfico 8 - Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV, segundo valor de carga viral (log10 cópias/ml).....	41
Gráfico 9 - Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV realizada em Líquor	42
Gráfico 10 - Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV, em realizada em Líquor, segundo valor em escala logarítmica	42
Gráfico 11 - Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV, em realizada em Líquor, segundo a carga viral do CMV	43
Gráfico 12 - Conduta quanto ao tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV, realizada em amostras plasmáticas.....	43
Gráfico 13 - Conduta quanto ao tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV, realizada em amostras plasmáticas segundo a carga viral.....	44
Gráfico 14 - Conduta quanto ao tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV, realizada em amostras plasmáticas, segundo carga viral.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Apresentação dos materiais em que foram realizados os exames de qPCR-CMV e a composição qualitativa dos resultados	34
Tabela 2 - Caracterização dos pacientes estudados quanto a idade, sexo e tempo de diagnóstico de HIV	35
Tabela 3 - Caracterização dos pacientes estudados quanto a contagem de linfócitos CD4+ (unidade/mm ³), quantificação da carga viral do HIV (cópias/mm ³) e resultado de sorologia IgG para CMV	36
Tabela 4 – Fatores que se correlacionaram com o valor da qPCR-CMV.....	38
Tabela 5 - Distribuição do número de qPCR-CMV por lesão de órgão alvo em casos de doença invasiva pelo CMV	45
Tabela 6 - Comportamento das qPCR-CMV em casos em que a di-CMV foi excluída	46
Tabela 7 - Razão de chance de óbito associado ao valor da qPCR-CMV.....	46
Tabela 8 – Acurácia e <i>cut-off</i> da qPCR-CMV para diagnóstico de lesão invasiva por CMV em pacientes HIV+.	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTG	Aids Clinical Trials Group
Aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida
CMV	Citomegalovírus
di-CMV	Doença invasiva por citomegalovírus
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
LBA	Lavado broncoavelolar
LCR	Líquido cefalorraquidiano
PCR	Reação de cadeia da polimerase
qPCR-CMV	Reação de cadeia da polimerase quantitativa para citomegalovírus
SNC	Sistema nervoso central
TARV	Terapia antirretroviral
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Citomegalovírus: agente etiológico e transmissão	15
1.2 Citomegalovírus: epidemiologia	15
1.3 Citomegalovírus: patogênese	16
1.4 Citomegalovírus: manifestações clínicas	17
1.5 Citomegalovírus e HIV	18
1.5.1 Interação entre CMV e HIV	19
1.5.2 Manifestações clínicas do CMV em pacientes HIV/aids	21
1.5.3 Diagnóstico de CMV em pacientes HIV/aids	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Desenho do estudo	29
3.1.1 Critérios de inclusão	29
3.1.2 Critérios de exclusão	29
3.2 Processamento das amostras	29
3.3 Metodologia da qPCR-CMV em tempo real TaQman-MGB	29
3.4 Revisão dos casos e correlação clínico-laboratorial	30
3.5 Análise estatística	30
3.6 Comitê de Ética em Pesquisa	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Descrição geral das amostras clínicas de pacientes incluídos no estudo	33
4.2. Caracterização dos eventos	35
4.3 Manifestações clínicas dos pacientes que foram investigados por meio da qPCR-CMV para doença por CMV	36

4.4 Características clínicas e laboratoriais associadas a positividade da qPCR-CMV	37
4.5 Conduta tomada quanto ao início de tratamento direcionado para CMV antes do resultado da qPCR-CMV	38
4.6 Conduta tomada quanto ao início de tratamento direcionado para CMV após resultado da qPCR-CMV	40
4.7 Diagnóstico de doença invasiva por CMV e comportamento da qPCR-CMV	44
4.8 Desfechos associados ao resultado da qPCR-CMV	46
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE	68
APÊNDICE A – Formulário utilizado para coleta de dados	69
APÊNDICE B – Critérios para definição de doença invasiva por CMV em pacientes com HIV/aids utilizados neste estudo	71
ANEXOS	73
ANEXO A – Aprovações do comitê de ética do Hospital das Clínicas de Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Citomegalovírus: agente etiológico e transmissão

A primeira descrição de uma inclusão citomegálica é datada de 1881 e foi realizada por cientistas alemães que acreditavam se tratar de um possível protozoário. Porém, foi apenas entre 1956 e 1957 que este agente conseguiu ser cultivado em amostras de ratos e de humanos. Weller nomeou então o recém descoberto vírus como “citomegalovírus” (CMV) (HO, 2008).

Métodos modernos de diagnóstico permitiram identificar que o CMV é um vírus pertencente a subfamília dos β herpes-vírus que infecta a maioria dos indivíduos no mundo (BOECKH; GEBALLE, 2011). A infecção pelo CMV geralmente ocorre no período perinatal de fonte materna por via transplacentária ou no momento do parto, por excreção viral no cérvix uterino, ou através da amamentação (leite materno). Em outros períodos da infância o contágio pode ocorrer por via oral (saliva) e através de fômites. Após a puberdade existe o risco de transmissão por contato sexual e, independente da idade, ainda pode ocorrer via transfusão de hemoderivados e transplante de órgãos sólidos. Após a infecção primária pode haver eliminação do vírus na saliva, na lágrima, na urina, secreção cervical e seminal e no leite materno por anos (PASS, 1985). Salienta-se que os principais meios de transmissão são aqueles descritos no período perinatal (até os dois anos de idade) e durante a vida sexual do indivíduo após a adolescência (HO, 2008).

1.2 Citomegalovírus: epidemiologia

A prevalência da doença por CMV varia de acordo com o país, inclusive com variações regionais e segundo o perfil socioeconômico. Estudo de soroprevalência, realizado em 19 países, evidenciou uma variação de 44 a 100% em mães e de três a 95% em crianças de seis meses a quatro anos, com valores maiores em países subdesenvolvidos (KRECH; TOBIN, 1981). Há ainda maior predominância em indivíduos não brancos, do sexo feminino e em pessoas de baixas classes sociais. No Brasil a ocorrência de CMV é superior a 90% em mulheres em idade fértil (figura 1) (CANNON; SCHMID; HYDE, 2010). Estudo realizado em gestantes de 12 a 46 anos, da região de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, evidenciou que 97% delas eram soropositivas para CMV (YAMAMOTO et al., 2013). Ainda em Ribeirão Preto, a prevalência da infecção congênita por CMV no período compreendido entre março de

1994 a outubro de 1996, foi de 2,6%, valor semelhante ao encontrado em outros países com alta soroprevalência para CMV (YAMAMOTO; FIGUEIREDO; MUSSI-PINHATA, 1999).

Figura 1 - Soroprevalência de CMV em mulheres em idade fértil em países do mundo

Fonte: Cannon, Schmid e Hyde (2010).

1.3 Citomegalovírus: patogênese

Após a infecção inicial, que se dá por contato com fluídos corporais, o vírus se dissemina, via corrente sanguínea através de monócitos. A partir da interação com células endoteliais os monócitos adentram os tecidos e se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas, permitindo a ativação do CMV, a multiplicação viral e a infecção de novos sítios, incluindo células de mucosa e células precursoras na medula CD34+, as quais serão os reservatórios para o vírus quiescente. Essas células medulares a partir de estímulos externos, como citocinas, poderão se diferenciar em monócitos, mantendo assim o vírus no hospedeiro. A partir das células mucosas o vírus pode ser transmitido a outros indivíduos (figura 2) (LANDAIS; NELSON, 2013).

A partir da infecção primária é iniciada uma resposta imune inata que permite a criação de um estado antiviral, que será reforçado pela resposta imune adaptativa. A

ação dos linfócitos T é crucial neste momento para manter o vírus inativo, de uma maneira quiescente. No indivíduo adulto pelo menos de 10% da população de linfócitos T circulantes possuem ação contra o CMV (BOECKH; GEBALLE, 2011).

Figura 2 - Patogênese do CMV humano

Fonte: Adaptado de Landais e Nelson (2013).

1.4 Citomegalovírus: manifestações clínicas

As manifestações clínicas da doença por CMV são variáveis de acordo com a faixa etária acometida, podendo ser assintomática na maioria dos casos. Porém, a infecção congênita pode se manifestar como retardo de crescimento intra-uterino, hepatoesplenomegalia, plaquetopenia, aumento de transaminases e de bilirrubina; e em 5 a 10% dos casos há presença de sintomas neurológicos graves e irreversíveis, tais como microcefalia, surdez, encefalite, retardo psicomotor e outros (BOPPANA et al., 1992). As infecções do período perinatal podem em até 30% das vezes levar a

hepatoesplenomegalia, linfanodopatia, hepatite ou pneumonia. Em Ribeirão Preto, estudo que avaliou 189 recém-nascidos com infecção congênita mostrou que todos nasceram assintomáticos, com apenas um apresentando calcificações patológicas ao exame radiológico. Já num segundo grupo de crianças neonatais e lactentes sintomáticas diagnosticadas com CMV congênito as manifestações mais comuns foram hepatoesplenomegalia, icterícia neonatal e alterações neurológicas, como, por exemplo, microcefalia (YAMAMOTO; FIGUEIREDO; MUSSI-PINHATA, 1999). Em adultos imunocompetentes a infecção primária pode se manifestar como uma síndrome de mononucleose, com presença de febre de 2 a 3 semanas, mialgia e linfonodopatia cervical. Menos frequentemente pode haver ainda artropatia, colite ulcerativa, pneumonite, hepatite, meningite asséptica, síndrome de Guillain- Barré e miocardite. Há ainda efeito indireto da infecção por CMV como contribuidor para aterosclerose (DIOVERTI; RAZONABLE, 2016)

A imunossupressão prolongada permite a reativação e replicação viral descontrolada e isso pode levar a doença grave por CMV (GANDHI et al., 2003). Em indivíduos transplantados, a primo-infecção, a reativação deste vírus ou a infecção por outra cepa pode levar a viremia assintomática ou a doença por CMV caracterizada como síndrome por CMV, manifestada com febre, mal-estar, mialgias e citopenias; e ainda a lesão direta de órgãos alvos, (colite, pneumonite, retinite, entre outros). Pode ocasionar ainda “efeitos indiretos” como aumento de infecções por bactérias, vírus e fungos, disfunção e rejeição aguda e crônica do órgão transplantado, doenças vasculares diretamente ou não relacionadas ao transplante e desordem linfoproliferativa pós-transplante (KOTTON et al., 2013; RAZONABLE; HUMAR, 2013).

1.5 Citomegalovírus e HIV

Deve-se individualizar os casos de CMV nos pacientes coinfectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), visto que eles apresentam as doenças invasivas por CMV mais graves, quando excluídas as doenças disseminadas no período neonatal, sendo que a maior parte dos órgãos são suscetíveis a reativação da infecção (HO, 2008).

No período pré terapia antirretroviral de alta potência (TARV) em até 90% dos pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) submetidos a necrópsia

se identificava doença ativa por CMV (REICHERT et al., 1983), sendo que, enquanto vivos, até 40% dos pacientes apresentavam manifestações clínicas que encorriam em risco à vida ou à visão (DREW, 1992). Mesmo após a era do uso disseminado de TARV a presença de retinite por CMV ou a viremia positiva está associada com aumento de mortalidade, respectivamente, em 1,6 e 1,9 vezes (JABS et al., 2005a). E apenas a soropositividade para CMV, isto é, a presença de IgG positiva indicando o contato prévio com este vírus, está associada ao aumento de eventos e de mortalidade não relacionada diretamente à aids, particularmente por aumento de eventos cardio e cerebrovasculares (LICHTNER et al., 2015), podendo ainda estar correlacionado com a progressão mais rápida da infecção assintomática por HIV-1 para o estágio de aids (SKOLNIK; KOSLOFF; HIRSCH, 1988).

1.5.1 Interação entre CMV e HIV

Pessoas infectadas com HIV são quase universalmente co-infectadas com CMV (GIANELLA et al., 2015). Particularmente nesses pacientes podem ocorrer reativações assintomáticas e eliminações auto-limitadas do CMV. Isso é possível devido a interação favorável de ambos vírus. O CMV consegue induzir um ambiente favorável à sua replicação, através de estratégias controladoras do sistema imune, fazendo com que este seja menos efetivo na eliminação viral. Dessa maneira podem ocorrer excreções virais no trato genital, na mucosa oral, no sangue periférico, na urina, nas fezes e no leite materno. Outros vírus, incluindo o HIV, aproveitam-se disso para se proteger e favorecer sua própria sobrevivência (FREEMAN; LEDERMAN; GIANELLA, 2016).

Os mecanismos descritos em que o CMV pode promover a persistência da infecção pelo HIV são: indução de inflamação, da produção de citocinas específicas e de seus receptores levando, por exemplo, ao aumento de linfócitos T CD4+ e CD8+ e a maior expressão de CCR5, o principal co-fator para entrada do HIV; da indução de vias imunes inibitórias, através de menor expressão de complexos de histocompatibilidade e de produção de citocinas anti-inflamatórias, permitindo a evasão do sistema imune; da expansão clonal de células infectadas pelo HIV; da inibição de apoptose induzida pelo sistema imune; e através da ativação direta do HIV, por manipulação celular das vias de transcrição (figura 3) (CHRISTENSEN-QUICK et al., 2017). Em contrapartida, o próprio vírus HIV cria um ambiente pró-inflamatório que

culmina com depleção de linfócitos T CD4⁺ e aumento de linfócitos CD8⁺ disfuncionais, os quais são incapazes de controlar a replicação do CMV, gerando assim um ciclo favorável a ambos os vírus (figura 4). Mesmo naqueles pacientes em uso de TARV, essa interação entre CMV e HIV permite a criação de um estado pró-inflamatório que resulta em aumento dos linfócitos T CD8⁺ circulantes e na diminuição da relação CD4/CD8. Possivelmente essa é a justificativa para o aumento de mortalidade descrita anteriormente (FREEMAN et al., 2016).

Figura 3 - Possíveis mecanismos no qual o CMV pode ajudar na persistência do HIV

As formas circulares com núcleos representam linfócitos T CD4⁺ com ou sem presença do DNA do HIV integrado; os pontos roxos são as citocinas inibitórias; as esferas laranjas são os vírus HIV; as esferas cinzas representam o CMV; as estruturas retangulares são as células epiteliais com inflamação. Fonte: Adaptado de (CHRISTENSEN-QUICK et al., 2017).

Figura 4 - Interação entre CMV, HIV, linfócitos T CD4 + e CD8 +

Fonte: Adaptado de Freeman, Lederman e Gianella (2016).

1.5.2 Manifestações clínicas do CMV em pacientes HIV/aids

Os sinais e sintomas de doença invasiva por CMV nesse grupo de pacientes na maioria das vezes é inespecífica e raramente patognomônica (STEININGER; PUCHHAMMER-STÖCKL; POPOW-KRAUPP, 2006). Costuma acometer indivíduos com imunossupressão avançada com contagem de linfócitos T CD4+ inferior a 100/mm³ (DEAYTON et al., 2004; GALLANT et al., 1992).

Após o uso das TARV houve queda de incidência e de mortalidade de maneira substancial de doença invasiva por CMV. Estima-se diminuição de novos casos de 49% por ano no período entre 1994 e 1999, com redução de 37% na mortalidade neste período (YUST et al., 2004).

A retinite ainda é a manifestação mais comum em 60-70% (JOUAN; KATLAMA, 1999) a 85 % dos casos (GALLANT et al., 1992; MCCUTCHAN, 1995; YUST et al., 2004). Pode ser assintomática, porém em caso de sintomas pode surgir perda de campo e acuidade visual, moscas volantes, dor em globos oculares, olho vermelho e

fotofobia. À fundoscopia há presença de infiltrado retiniano amarelo-branco perivascular com hemorragia retiniana o chamado "queijo amassado e ketchup" (figura 5). Em casos mais avançados há a presença de cicatrizes atróficas finas e se não tratado pode evoluir para cegueira irreversível (BLOOM, 1988; JOUAN; KATLAMA, 1999).

Figura 5 - Retinite por CMV

Fonte: Bloom (1988).

O segundo sítio mais acometido é o trato gastrointestinal, sendo que qualquer parte dele pode ser acometida, porém ocorrendo de maneira mais frequente no esôfago e região colorretal. Nestes sítios ao exame endoscópico é possível observar úlceras rasas e solitárias que irão se manifestar clinicamente, respectivamente, como odinofagia e dor retroesternal; e diarreia crônica e dor abdominal. Complicações como perfurações, fístulas e sangramentos podem ocorrer, porém são infrequentes (STEININGER; PUCHHAMMER-STÖCKL; POPOW-KRAUPP, 2006). Hepatite apesar de ter impacto clínico mínimo está presente em 1/3 dos pacientes com lesões invasivas em outros órgãos; há aumento de transaminases com níveis normais de bilirrubina (DREW, 1992).

O acometimento do sistema nervoso central é infrequente, em apenas 1% dos casos, porém pode resultar em 100% de mortalidade se não tratados. Clinicamente se manifesta dentro de quatro síndromes: mielite/polirradiculopatia lombossacra, encefalite com demência, ventriculoencefalite ou neurite múltipla. A mielite/polirradiculopatia lombossacra apresenta evolução subaguda de para- ou

tetraparesia, perda de sensibilidade e alteração esfinteriana urinária e/ou retal. Por ter característica ascendente pode mimetizar uma síndrome de Guillain-Barre. Na análise do líquido observamos padrão semelhante a meningite bacteriana com pleocitose e predomínio de polimorfonucleares. O exame de ressonância pode mostrar o alargamento do cone medular, agrupamento de raízes lombossacrais, ou realce com gadolínio das leptomeninges da medula espinhal inferior. Nos quadros de encefalite com demência os sintomas apresentados são de apatia, redução de memória, confusão, alteração do nível de consciência e déficits neurológicos focais. O LCR pode ser normal, mostrando possível disseminação hematogênica do CMV. Apesar de semelhante a demência relacionado ao HIV, na demência pelo CMV os sintomas têm evolução mais rápida e mais frequentemente ocorrem em indivíduos com menores contagens de linfócitos T CD4+ e maior tempo de doença pelo retrovírus. Nos casos de ventriculoencefalite a evolução é aguda com letargia, desorientação, paralisia de nervos cranianos e nistagmo. O LCR é inespecífico e frequentemente cursa com pleocitose, hipoglicorraquia e hiperproteínoorraquia. Pode se assemelhar à síndrome de Wernicke-Korsakoff. Em ambos os casos de encefalite os exames de neuroimagem podem evidenciar inflamação periventricular. A neurite múltipla é causada por vasculite de artérias epineurais e se apresenta como déficits motores ou de sensibilidade assimétricos em nervos periféricos ou em pares cranianos (MASCHKE; KASTRUP; DIENER, 2002; MCCUTCHAN, 1995).

Raramente há o acometimento pulmonar, e quando ocorre surge como uma síndrome de pneumonia intersticial: dispneia progressiva, tosse seca e hipoxemia. Ao exame físico, taquidispneia e ausculta pulmonar sem ruídos adventícios. Radiologicamente, há a presença de infiltrados intersticiais (DREW, 1992).

1.5.3 Diagnóstico de CMV em pacientes HIV/aids

Os métodos para investigação de doença por CMV são os testes sorológicos, a cultura de vírus, o estudo histopatológico, a antigenemia (ensaio que consiste na coloração dos leucócitos periféricos para a matriz proteica pp65, do CMV, um marcador de infecção ativa), a detecção genômica de CMV quantitativo ou qualitativo em fluidos corporais, via reação em cadeia da polimerase (PCR), e testes imunológicos, que refletem a resposta imune celular ao CMV (KOTTON, 2013). Entretanto, em pacientes com HIV/aids os métodos sorológicos são utilizados para

detecção de contato prévio com o CMV, e, por conseguinte, risco de reativação deste vírus, visto que a produção de anticorpos de fase aguda pode não ocorrer em pacientes com imunossupressão avançada devido disfunção humoral associada (STEININGER; PUCHHAMMER-STÖCKL; POPOW-KRAUPP, 2006).

Os casos de retinite são diagnosticados pelos achados característicos dessa doença à fundoscopia (BLOOM, 1988; JOUAN; KATLAMA, 1999). Já os casos de lesões invasivas por CMV no trato digestivo, pela associação de achados clínicos, endoscópicos e histopatológicos sugestivos. Microscópicamente o achado evocativo dessa infecção é a presença de uma grande inclusão basofílica intranuclear circundada por um halo, o “olho de coruja” (DREW, 1992), podendo ainda ser realizado estudo imuno-histoquímico para identificação de antígenos virais na amostra tecidual estudada (DIOVERTI; RAZONABLE, 2016) (vide em figura 6).

Figura 6 - Achados histopatológicos de doença invasiva por CMV

À esquerda presença de inclusão intranuclear típica, o “olho de coruja”. À direita presença de amostra tecidual corada por imuno-histoquímica em que as regiões marrons correspondem as inclusões virais. Fonte: Adaptado de (DIOVERTI; RAZONABLE, 2016).

A pneumopatia por CMV é diagnóstica pela associação de alterações clínicas radiológicas e histopatológicas na ausência de outros agentes infecciosos pulmonares mais comuns (CDC, 2018). A presença apenas de cultura positiva para CMV em lavado broncoalveolar, sem achados histológicos, apresentou baixo valor preditivo positivo para diagnóstico de pneumonite por CMV (UBERTI-FOPPA et al., 1998).

A citomegalovirose de sistema nervoso é reconhecida pela apresentação clínica, liquoríca e neurorradiológica com marcadores virais positivos (PCR, antigenemia e cultura) (CDC, 2018; MASCHKE; KASTRUP; DIENER, 2002).

O reconhecimento de viremia, através da utilização de PCR, de testes de antígenos e de culturas em amostras de sangue não é universalmente recomendada para detecção de lesão ativa em pelo CMV (CDC, 2018), pois pode ocorrer viremia assintomática em pacientes com baixos valores de linfócitos T CD4+ (DEAYTON et al., 2004; DODT et al., 1997; ZURLO et al., 1993) e viremia positiva meses antes do aparecimento de doença ativa por CMV (WOHL et al., 2005) . Além disso, a viremia negativa não exclui a possibilidade de doença invasiva por CMV (CDC, 2018), o que torna a PCR quantitativa para CMV (qPCR-CMV) em amostras séricas um método diagnóstico controverso nesta população. Entretanto, a detecção da carga viral em líquido, humor vítreo e aquoso é altamente sugestiva de infecção ativa por CMV (ARRIBAS et al., 1995; SMITH et al., 1999).

Apesar desse uso questionável, há estudos que sugerem um cut-off para qPCR-CMV realizadas em amostras de sangue ou plasma a partir do qual poderia estar presente a doença invasiva pelo CMV, com valores de corte para tratamento e de acurácia do exame variando bastante entre os estudos (BRANTSAETER et al., 2007; LUCHSINGER et al., 2015; MIZUSHIMA et al., 2015; YOSHIDA et al., 2001).

Este trabalho justifica-se por tentar compreender qual o valor da PCR quantitativa para CMV (qPCR-CMV) no manejo de pacientes com HIV/aids em um hospital universitário de referência para alta complexidade onde este teste tem sido amplamente utilizado, mesmo não havendo um protocolo clínico estabelecido com indicações claras de solicitação e de interpretação dos resultados obtidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da qPCR-CMV na definição de doença causada por este vírus e na indicação de tratamento antiviral específico em pacientes com HIV/aids, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o papel da qPCR-CMV na definição diagnóstica de doença invasiva por CMV em pacientes com HIV/aids;
- Analisar se a qPCR-CMV influenciou na decisão do uso da terapêutica antiviral específica para CMV;
- Avaliar associação entre a carga viral da qPCR-CMV e o desfecho dos pacientes em que este exame foi solicitado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Este é um estudo retrospectivo do tipo descritivo e transversal, cuja população é compreendida por pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) infectados pelo HIV.

3.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos os exames de qPCR-CMV dos pacientes diagnosticados com HIV/aids realizados no período compreendido entre 01 de janeiro de 2015 e 30 de junho de 2016.

3.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da análise os exames de qPCR-CMV realizados em um mesmo material biológico e cujo intervalo de coleta tenha sido inferior a 3 meses ao teste anterior; aqueles feitos para avaliar a efetividade de um tratamento para di-CMV já instituído e os que foram solicitados com fins de pesquisa clínica.

3.2 Processamento das amostras

Todos os pacientes incluídos no estudo com diagnóstico de HIV/AIDS eram oriundos de atendimentos nos ambulatorios e/ou enfermarias do HCFMRP-USP.

Todas as amostras foram processadas no laboratório de Virologia Clínica do HCFMRP-USP. Nesta etapa, não houve a intervenção do pesquisador, por tratar-se de um estudo retrospectivo e todos os pedidos médicos de solicitação de qPCR-CMV seguiram uma rotina já pré-estabelecida no hospital.

Foram incluídos no estudo aqueles pacientes que tinham pelo menos uma amostra clínica com resultado de qPCR-CMV disponibilizado no sistema ATHOS do HCFMRP-USP.

3.3 Metodologia da qPCR-CMV em tempo real TaQman-MGB

Este ensaio foi realizado utilizando um kit comercial CMV-PCR, Nanogen, Torino, Italia. Consiste em uma reação de amplificação específica para uma região do

gene CMV MIEA e para uma região do gene da beta-globina humana (como controle interno da reação). Uma sonda específica para o gene MIE do CMV marcada com fluoróforo FAM é ativada quando hibridizada com produto amplificado específico do CMV na reação. Outra sonda específica para o gene da betaglobina é ativada quando hibridizada com produto amplificado específico da betaglobina na reação. A reação foi realizada no equipamento Rotor Gene, Corbett, Australia, serie 3000.

Os ciclos térmicos para amplificação consistiram em uma fase de descontaminação de 2 minutos a 50° C, uma desnaturação inicial a 95° C por 10 minutos e 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto.

O limite inferior de detecção deste ensaio é de 10 cópias de DNA do gene MIEA do CMV por reação de amplificação. Na reação de amplificação de cada amostra o valor de Ct (ciclo em que a fluorescência atinge o limiar threshold) do controle interno é utilizado para validar as etapas de extração, amplificação e detecção do gene alvo.

3.4 Revisão dos casos e correlação clínico-laboratorial

Todos os casos que preenchiam os critérios definidos pelo estudo foram revisados e uma ficha foi preenchida com informações demográficas, clínicas, diagnóstico definitivo, tratamento e desfecho ao final da internação, após 3, 6 e 12 meses da realização da qPCR-CMV (apêndice A).

Foram aplicados critérios adaptados do *Aids Clinical Trial Group* (ACTG) para a definição de doença invasiva por CMV (ERICE *et al.*, 2003) (apêndice B).

3.5 Análise estatística

Foi considerado para análise o primeiro exame realizado em determinado material a cada período de três meses do estudo (por exemplo, primeiro exame feito em sangue, excluindo os demais exames realizados em sangue com intervalo inferior a três meses). Devido ao fato de que para um mesmo paciente poderia apresentar características clínicas e demográficas diferentes, associado ao momento em que o exame foi feito, optou-se por considerar cada qPCR-CMV solicitada como um evento independente para análise. Os resultados inicialmente foram descritos através de frequências absolutas e percentuais (variáveis qualitativas) e por meio de medidas como média, mínimo, mediana e máximo (variáveis quantitativas). O teste exato de

Fisher foi utilizado para examinar associações em análises univariadas entre as características dos pacientes e o valor da carga viral categorizada em negativa, positiva acima do limiar de quantificação e positiva abaixo do limiar de quantificação. A fim de verificar a associação entre o desfecho (sobrevivência ou óbito) ao final da internação e após 3, 6 e 12 meses da realização de determinada qPCR-CMV com o resultado quantitativo do exame (em cópias $\log_{10}/\text{mm}^3$), foi considerado um modelo de regressão logística. Os resultados foram obtidos com a versão 3.5.1 do software R. Todos os valores de P foram bilaterais e considerados significativos em $P = 0,05$.

3.6 Comitê de Ética em Pesquisa

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do HCFMRP-USP, via plataforma Brasil, com o processo número 1.910.018 (anexo A).

4 RESULTADOS

4.1 Descrição geral das amostras clínicas de pacientes incluídos no estudo

O laboratório de Virologia Clínica do HCFMRP-USP, no período de janeiro de 2015 a 30 de junho de 2016, realizou 610 exames de qPCR-CMV em 238 pacientes infectados pelo HIV, dos quais, 285 resultados destes foram excluídos deste estudo seguindo os critérios de exclusão: 175 por pertencerem a pacientes com idade inferior a 18 anos na data de coleta da amostra; 21 por terem sido solicitados apenas para finalidade de pesquisa; e 89 por serem realizados com o objetivo de controle de tratamento ou por terem sido pedidos para um mesmo paciente em um mesmo material biológico com intervalo inferior a três meses do exame prévio. Portanto, foram analisados 325 testes, os quais pertenciam a 238 pacientes (figura 7).

Figura 7 - Descrição geral das amostras do estudo

Fonte: Próprio Autor (2020).

Foram solicitados de um a quatro exames de qPCR-CMV por paciente, com média de 1,36 exames por indivíduo e mediana de 1 exame por pessoa (gráfico 1).

Gráfico 1 - Distribuição do número de qPCR- CMV por paciente

Fonte: Próprio Autor (2020).

Dentre os 325 exames 180 (55,38%) foram solicitados em amostras de sangue, 134 (41,23%) em líquor, quatro (1,23%) em fragmentos de biópsia, dois (0,62%) em humor vítreo e cinco (1,54%) em outros materiais, incluindo aqui urina e lavado broncoalveolar. Quanto aos resultados, 270 testes (83,08%) foram negativos, 13 (4%) positivos com carga viral abaixo do limiar de quantificação e 42 (12,92%) positivos com cargas virais variando entre 2,65 $\log_{10}$ cópias/mm³ a 6,86 $\log_{10}$ cópias/mm³ e com mediana de 3,895 $\log_{10}$ cópias/mm³. Em todos materiais nos quais foram realizados qPCR-CMV predominaram resultados negativos (tabela 1)

Tabela 1 – Distribuição dos materiais onde realizadas as qPCR-CMV e seus resultados

Variável	Exames (%)		
Material onde realizado qPCR-CMV			
Sangue	180 (55,38)		
LCR	134 (41,23)		
Material de biópsia	4 (1,23)		
Humor aquoso ou vítreo	2 (0,62)		
Outros materiais	5 (1,54)		
Resultado de qPCR-CMV por material	Negativo	<10 cópias/mm³	>10 cópias/mm³
Sangue	135 (41,54)	12 (3,69)	33 (10,15)
LCR	126 (38,77)	0 (0,00)	8 (2,46)
Material de biópsia	4 (1,23)	0 (0,00)	0 (0,00)
Humor aquoso ou vítreo	1 (0,31)	1 (0,31)	0 (0,00)
Outros materiais	4 (1,54)	0 (0,00)	1 (0,31)
Total n (%)	270 (83,1%)	13 (4%)	42 (12,9%)

Fonte: Próprio Autor (2020).

4.2. Caracterização dos eventos

Conforme justificado anteriormente, considerou-se cada qPCR-CMV como um evento independente para análise, devido a possibilidade de um mesmo paciente poder apresentar características demográficas e clínicas distintas devido a coleta de mais de um exame em tempos diferentes. Portanto, os 325 resultados das qPCR-CMV analisadas pelo estudo pertenciam a 238 pacientes, cuja maioria era do sexo masculino (60,31%). No momento da solicitação do exame, a idade dos indivíduos variou entre 18 a 76 anos, com mediana de 41 anos, com distribuição de idades semelhantes entre os sexos (tabela 2 e gráfico 3). Referente ao tempo de diagnóstico do HIV, em aproximadamente metade dos eventos (50,77%) as pessoas possuíam menos de cinco anos de diagnóstico (tabela 2).

Predominaram ainda situações em que os doentes estavam com contagem de linfócitos T CD4 inferior a 100 células/mm³ (52,61%) e com carga viral para HIV acima de 40 cópias/mm³ (80,31%) (tabela 3). Quanto ao contato prévio com CMV, 63,87% dos pacientes (em 64,92% dos eventos) eram soropositivos ao CMV, 1,68% eram soronegativos e 34,45% não tiveram contato prévio avaliado (ausência de sorologia para CMV).

Tabela 2 - Caracterização dos pacientes estudados, considerando o momento da solicitação da qPCR-CMV, quanto a idade, sexo e tempo de diagnóstico de HIV

Variável	Eventos (%)
Idade	
18 - 28 anos	28 (8,62)
29 - 39 anos	111 (34,15)
40 - 50 anos	128 (39,38)
51 - 61 anos	42 (12,92)
≥ 62 anos	16 (4,92)
Sexo	
Masculino	196 (60,31)
Feminino	129 (39,69)
Tempo de diagnóstico de HIV	
0 - 5 anos	165 (50,77)
6 - 11 anos	60 (18,46)
12 - 17 anos	35 (10,77)
18 - 23 anos	26 (8,00)
≥ 24 anos	5 (1,54)
Não documentado	34 (10,46)

Fonte: Próprio Autor (2020).

Tabela 3 - Caracterização dos pacientes estudados, considerando o momento da solicitação da qPCR-CMV, quanto a contagem de linfócitos CD4+ (unidade/mm³) e quantificação da carga viral do HIV (cópias/mm³)

Variável	Eventos (%)
CD4	
< 100	171 (52,61)
≥ 100 < 200	60 (18,46)
≥ 200 < 300	32 (9,85)
≥ 300 < 400	10 (3,08)
≥ 400 < 500	13 (4%)
≥ 500 < 1000	19 (5,85%)
≥ 1000	3 (0,92%)
Não documentado	17 (5,23)
CV do HIV	
< 40	45 (13,85)
≥ 40	261 (80,31)
Não documentado	19 (5,85)

Fonte: Próprio Autor (2020).

Gráfico 2 – Distribuição da idade, em anos e por sexo no momento da solicitação da qPCR-CMV

Fonte: Próprio Autor (2020).

4.3 Manifestações clínicas dos pacientes que foram investigados por meio da qPCR-CMV para doença por CMV

Em 100% dos casos os exames foram solicitados com finalidade diagnóstica, ou seja, em pacientes com manifestações clínicas sugestivas de doença invasiva por CMV. Não há relato em prontuários sobre pedido de exame para fins prognósticos.

Os sinais e sintomas que motivaram a solicitação desses exames foram principalmente os neurológicos em 44,31% das vezes, seguido por suspeita de acometimento de mais de um órgão, alterações em hemograma, queixas oftalmológicas e sintomas respiratórios em, respectivamente, 17,85%, 5,85%, 5,54% e 4,61% das ocasiões. Os demais sinais e sintomas com os percentuais associados estão detalhados no gráfico 4.

Gráfico 3– Sinais e sintomas que motivaram a solicitação da qPCR – CMV

Fonte: Próprio Autor (2020).

4.4. Características clínicas e laboratoriais associadas a positividade da qPCR-CMV

Dentre as variáveis estudadas apenas o valor de CD4 abaixo de 100 células/mm³ se associou com o valor da qPCR-CMV. Os demais fatores não se correlacionaram de maneira estatisticamente significativa (tabela 4).

Tabela 4 – Fatores que se correlacionaram com o valor da qPCR-CMV.

Características dos pacientes	Valor da qPCR-CMV			AA
	Negativo (%)	Abaixo do limiar de quantificação (<10 cópias/mm ³) (%)	Acima do limiar de quantificação (>10 cópias/mm ³) (%)	
Idade (em anos)				0.5439
18 - 28 anos	7,69	0,31	0,62	
29 - 39 anos	28,00	2,15	4,00	
40 - 50 anos	32,00	1,54	5,85	
51 - 61 anos	11,69	0,00	1,23	
≥ 62 anos	3,69	0,00	1,23	
Sexo				0.4959
Masculino	51,08	1,85	7,38	
Feminino	32,00	2,15	5,54	
Tempo de diagnóstico do HIV**				0.2465
0 – 5 anos	47,08	1,37	8,25	
6 – 11 anos	17,18	1,03	2,41	
12 – 17 anos	8,59	1,37	2,06	
18 – 23 anos	8,25	0,34	0,34	
≥ 24 anos	1,37	0,00	0,34	
CD4**				0.0177*
< 100	43,51	1,95	10,06	
≥ 100	39,29	1,95	3,25	
CV do HIV**				0.1210
< 40	13,73	0,33	0,65	
≥ 40	69,28	3,59	12,42	

* Significativo a 5%. ** Havia presença de valores não documentados que foram removidos na execução do teste (a tabela do teste aqui é apresentada aqui sem os valores não documentados)

Fonte: Próprio Autor (2020).

4.5 Conduta tomada quanto ao início de tratamento direcionado para CMV antes do resultado da qPCR-CMV

Em mais de 90% dos casos não se iniciou tratamento direcionado para CMV antes do resultado da qPCR-CMV e esta conduta se manteve mesmo quando avaliado individualmente o material biológico em que foi realizado este exame (sangue ou

líquor) (gráficos 5, 6 e 7). Dentre as 23 situações em que o tratamento foi começado antes do resultado do exame de qPCR-CMV, em cinco já havia diagnóstico firmado de doença invasiva por CMV no momento da solicitação desse teste, sendo quatro retinites e uma úlcera esofágica por CMV, confirmada por biópsia. Nos demais casos optado por início de terapêutica anti-CMV devido alta suspeição clínica de doença invasiva por CMV, sendo em 10 vezes pela presença de úlcera esofágica, interpretada como típica, vista em exame endoscópico.

Gráfico 4 – Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV antes do resultado da qPCR-CMV em todas as espécimes clínicas

Fonte: Próprio Autor (2020).

Gráfico 5 – Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV antes do resultado da qPCR-CMV realizada em líquido

Fonte: Próprio Autor (2020).

Gráfico 6 - Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV antes do resultado da qPCR-CMV realizada em sangue

Fonte: Próprio Autor (2020)

4.6 Conduta tomada quanto ao início de tratamento direcionado para CMV após resultado da qPCR-CMV

Referente à conduta frente ao resultado da qPCR-CMV quatro possibilidades eram possíveis: o começo ou não, a manutenção ou a suspensão de tratamento específico para CMV. Analisando os resultados, sem distinção de material no qual foi realizada a qPCR-CMV, viu-se uma tendência a início de terapêutica se o resultado do exame fosse positivo, especialmente quando o exame apresentava resultado com carga viral maior que $3 \log_{10}$ cópias/ml e a de não iniciar ou suspender o antiviral caso o resultado fosse negativo. Paradoxalmente, observou-se uma maior probabilidade de se manter o antiviral mesmo se a qPCR fosse negativa, caso ele tivesse sido iniciado antes do resultado deste exame (gráfico 7 e 8).

Gráfico 7 - Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV

Fonte: Próprio Autor (2020).

Gráfico 8 - Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV, segundo valor de carga viral ($\log_{10}$ cópias/ml)

Fonte: Próprio Autor (2020).

Quando analisados as normas frente aos exames distinguindo os materiais onde eles foram realizados, achou-se que quando os testes foram feitos no LCR, em 100% dos casos foi iniciado ou mantido tratamento antiviral específico para CMV se o resultado da qPCR-CMV fosse positivo, independente da carga viral, sendo a terapêutica não iniciada caso a qPCR-CMV fosse negativa e mantida nos casos em que ela já havia sido iniciada anteriormente ao resultado da qPCR-CMV (gráfico 9 a 11). Foram quatro casos em que o antiviral para CMV foi mantido apesar da qPCR-CMV em líquido ser negativa, sendo que em dois deles havia úlcera esofágica ao exame endoscópico (com biópsia posteriormente negativa para CMV), em um havia hipótese clínica de citomegalovirose disseminada (sem confirmação definitiva de di-CMV posteriormente) e uma mielite, cuja ressonância sugeria etiologia viral (qPCR-CMV sérica positiva e líquórica negativa). Quando o exame foi realizado no sangue não houve uniformidade nas condutas, porém se observou uma tendência a não se indicar tratamento para CMV caso a qPCR-CMV fosse negativa, ou positiva com carga viral menor ou igual a $3 \log_{10}$ cópias/ml e de se iniciar terapêutica quando a carga viral fosse igual ou superior a $4 \log_{10}$ cópias/ml (gráficos 12 a 14).

Nos exames realizados em outras amostras clínicas, também não houve uniformidade de conduta quando considerado a positividade ou não do teste. Em 11 exames de qPCR-CMV apenas dois apresentaram resultados positivos; um deles foi realizada em humor aquoso com resultado positivo, abaixo do limiar de detecção,

sendo iniciado terapia anti-CMV, e o outro realizado em lavado broncoalveolar de um paciente com sintomas respiratório. Apesar de resultado positivo ($6,6 \log_{10}$ cópias/ml) e biópsia compatível com pneumonite por CMV, foi optado por não se iniciar tratamento antiviral específico. Nos demais casos ($n=9$), todas qPCR-CMV foram negativas, sendo que em um evento o tratamento antiviral específico foi iniciado, devido suspeição clínica de esofagite por CMV (úlceras presentes à endoscopia); em um ele foi suspenso, após PCR para toxoplasmose ter sido positiva no humor aquoso; e em um foi mantido, devido suspeição clínica de citomegalovirose disseminada.

Gráfico 9 - Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV realizada em líquido

Fonte: Próprio Autor (2020).

Gráfico 10 - Conduta quanto a tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV, em realizada em líquido, segundo valor em escala logarítmica

Fonte: Próprio Autor (2020).

Fonte: Próprio Autor (2020).

Gráfico 12 - Conduta quanto ao tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV, realizada em amostras plasmáticas

Fonte: Próprio Autor (2020).

Gráfico 13 - Conduta quanto ao tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV, realizada em amostras plasmáticas segundo a carga viral

Fonte: Próprio Autor (2020).

Gráfico 14 - Conduta quanto ao tratamento direcionado para CMV após o resultado da qPCR-CMV, realizada em amostras plasmáticas, segundo carga viral.

Fonte: Próprio Autor (2020).

4.7 Diagnóstico de doença invasiva por CMV e comportamento da qPCR-CMV

Dentre os 238 pacientes analisados, 14 apresentaram diagnóstico confirmado de doença invasiva por CMV (di-CMV) segundo os critérios utilizados no trabalho, o que corresponde a 5,89% dos pacientes, sendo que em um deles foi diagnosticado com a di-CMV duas vezes (uma recidiva). Dentre os 15 casos (sete homens e oito mulheres) com di-CMV houve três casos de retinite (20,0 % dos casos), seis de lesão invasiva em sistema nervoso central (40,0%), na qual se inclui uma recidiva cinco

meses após término do primeiro tratamento, dois de sincronia de retinite e lesão em SNC (13,3%), três de doença invasiva em trato gastrointestinal (20%), sendo duas esofagites e uma colite, e uma pneumonia por CMV (6,7%). Desses 15 casos foram solicitados 20 exames de qPCR-CMV sendo 10 plasmáticas (quatro positivas), oito em líquido (todas com resultado positivo), uma em humor aquoso (resultado positivo) e uma em lavado broncoalveolar (resultado positivo) (valores detalhados na tabela 5).

No total estes 15 casos tiveram 20 eventos (20 qPCR analisadas) e apresentavam no momento do diagnóstico contagem de linfócitos CD4+ variando de 4 a 257 células/mm³ (mediana de 65 células/mm³) e contagem de carga viral do HIV entre 1,75 a 6,3 log/mm³ (mediana de 5,09 log/mm³). Ressalta-se que o exame de contagem de linfócitos CD4+ de 257 células/mm³ distava de mais de seis meses da data de coleta da qPCR-CMV. Em cinco desses pacientes não havia registro de sorologia para CMV, sendo que nos demais a sorologia IgG para CMV era positiva.

Em 12 das 325 qPCR-CMV solicitadas uma possível doença invasiva por CMV foi estabelecida a partir de clínica sugestiva e resposta terapêutica ao antiviral específico, mas sem confirmação ou exclusão da doença por método comprobatório. Nesse grupo nove qPCR-CMV foram realizadas em plasma e com resultado positivo, duas em líquido e uma em outro material, todas com resultado negativo.

Tabela 5 - Distribuição do número de qPCR-CMV por lesão de órgão alvo em casos de doença invasiva pelo CMV.

	Global		Sangue		LCR		Outro Material	
	PCR +	PCR -	PCR +	PCR -	PCR +	PCR -	PCR +	PCR -
Paciente que desenvolveram di-CMV (n=14; PCR=20)	14	6	4	6	8	0	1	1
Retinite (n=3; PCR=3) ¹	1	2	0	2	0	0	1	0
Infecção em SNC (n=5; PCR=8)	7	1	2	1	5	0	0	0
Co-infecção retinite e SNC (n=2; PCR=4)	3	1	1	1	2	0	0	0
Esofagite (n=2; PCR=2)	0	2	0	2	0	0	0	0
Colite (n=1; PCR=1)	1	0	1	0	0	0	0	0
Pneumonite (n=1; PCR=2) ²	2	0	1	0	0	0	1	0

¹ uma PCR realizada em humor aquoso e com valor < 10 cópias/mm³; ² uma PCR realizada em lavado broncoalveolar e com valor 4.068.270 cópias/ml (6,6 log₁₀ cópias/ml). Fonte: Próprio Autor (2020).

Em 200 das qPCR-CMV solicitadas se descartou o diagnóstico de doença invasiva por CMV após realização de exame confirmatório, sendo que em 124 das vezes a confirmação se deu pela realização da própria qPCR-CMV no líquido com resultado negativo. Em 93, excluiu-se o diagnóstico clinicamente sem realização do

padrão ouro de investigação diagnóstica. O compartimento das qPCR-CMV nessas situações está pormenorizado na tabela 6.

Tabela 6- Comportamento das qPCR-CMV em casos em que a di-CMV foi excluída

	Global		Sangue		LCR		Outro Material	
	PCR +	PCR -	PCR +	PCR -	PCR +	PCR -	PCR +	PCR -
Di- CMV excluída após realização de padrão ouro (PCR-CMV=200)	10	190	10	60	0	124	0	6
Di- CMV excluída sem realização de padrão ouro (PCR-CMV=93)	22	71	22	69	0	0	0	2

Fonte: Próprio Autor (2020).

4.8 Desfechos associados ao resultado da qPCR-CMV

Os resultados da regressão mostraram que o óbito tem uma chance maior de ocorrer aos pacientes com carga viral para CMV maior que 6 log₁₀ cópias/ml ao final da internação (OR = 7,06; 95% CI: (1,26; 39,45) e 3 e 6 meses após a coleta do exame; respectivamente (OR: 7,4; 95% CI: 1,19; 57,40) e (OR: 6,73 CI: 1,09; 52,20). Mesma associação não foi vista para os outros valores da carga viral do CMV (tabela 5).

Não foi possível realizar esta análise categorizando o material onde realizada a qPCR-CMV, visto que para o material líquido e para outros materiais (excluindo os realizados em plasma) foi verificado falta de convergência para o modelo de regressão logística. Este problema pode estar relacionado com o tamanho da amostra e com a presença de valores atípicos.

Tabela 7- Razão de chance de óbito associado ao valor da carga viral qPCR-CMV.

Valor qPCR-CMV	Ao final da internação		3 meses		6 meses		12 meses	
	OR	IC 95%	OR	IC 95%	OR	IC 95%	OR	IC 95%
Log 2	7,06	0,27;181,18	4,93	0,19;126,30	4,49	0,17; 114,90	6,76 x 10 ⁶	5,02; NA
log 3	0,78	0,12;2,88	0,7	0,11;2,64	0,64	0,10; 2,40	1,06	0,29; 3,19
log 4	1,01	0,05;5,91	0,7	0,04; 4,10	0,75	0,04; 4,52	2,4	0,46; 11,15
log 5	1,76	0,09; 12,35	2,46	0,11;26,29	2,24	0,10; 23,90	1,6	0,07; 16,94
log6	7,06	1,26;39,45	7,4	1,19; 57,40	6,73	1,09; 52,20	4,78	0,75; 36,99

Fonte: Próprio Autor (2020).

5 DISCUSSÃO

Apesar de redução de aproximadamente 25% quando comparado ao período pré TARV, a di-CMV ainda é uma das infecções oportunistas possíveis em indivíduos com imunossupressão avançada relacionada ao HIV que não estejam usufruindo dos benefícios do uso da TARV, seja por má aderência, intolerância às medicações ou ainda por apresentarem imunodeficiência em uma fase avançada (WOHL et al., 2005). Por apresentar manifestações inespecíficas, muitas vezes simulando outras infecções, a di-CMV é subdiagnosticada e por vezes somente é identificada após o óbito, em estudos de necrópsia (BRANTSAETER et al., 2007). Em nossa população, apesar de não ter ocorrido diagnósticos *post mortem* de di-CMV, em 28,6% das vezes se descartou a di-CMV sem realização de exame padrão ouro preconizado para a suspeita clínica em questão e em, aproximadamente, 3,7% das vezes houve um diagnóstico presuntivo de di-CMV baseado na resposta clínica. Por ser uma infecção de difícil diagnóstico, devido muitas vezes necessitar de comprovação histopatológica da lesão de órgão alvo, métodos alternativos para confirmar e prever a di-CMV se fizeram necessários, criando-se espaço para o uso da qPCR-CMV.

Nosso estudo avaliou 325 exames de qPCR-CMV pertencentes a 238 pacientes HIV positivos, nos quais havia predominância do sexo masculino, faixa etária dos 40 a 50 anos, contagem de linfócitos T CD4+ inferior a 100 células/mm³ e carga viral do HIV detectável (acima de 40 cópias/ml). Apesar disso, em 23% (n=75) das vezes os indivíduos nos quais foram solicitadas uma qPCR-CMV apresentavam linfócitos CD4 + acima de 200 células/mm³, condição incomum para reativação da di-CMV (DEAYTON et al., 2004; GALLANT et al., 1992). Em nossos pacientes houve dois diagnósticos de di-CMV em pessoas com linfócitos T CD4+ acima de 200 células/mm³, sendo em que em deles o diagnóstico foi no contexto de uma reconstituição imune. O outro caso foi uma CMV em sistema nervoso central na forma de mielite.

A despeito de haver a possibilidade de uma infecção primária pelo CMV, em pacientes com aids, a di-CMV ocorre mais comumente pela reativação viral em indivíduos soropositivos para CMV (IgG positivo) (BOWEN, 1999). Em nosso trabalho, em 109 indivíduos (33,54%) não havia essa relação prévia documentada (sorologia não registrada), o que não permite que nós avaliemos se parcela considerável de nossos pacientes estão em risco para reativação do CMV e se a soroprevalência para CMV em nossa população é semelhante ao encontrado em outros estudos. A ausência dessa informação pode ter ocorrido devido a presença do exame não digitalizado em prontuário eletrônico ou a de sua não solicitação.

Em nossa casuística, 5,8% dos pacientes apresentaram pelo menos um caso de di-CMV confirmado. ERICE *et al.*, 2003 em um *trial* prospectivo para avaliar a ocorrência e fatores de risco para di-CMV no período pós uso disseminado de TARV encontrou incidência de 6%, valor próximo ao que encontramos. Entretanto, neste estudo foram seguidos apenas pacientes com contagem de linfócitos CD4+ inferior a 50 células/mm³ e realizados exames oftalmológicos periódicos mesmo em pacientes assintomáticos, diferente da realidade do HCFMRP-USP em que avaliações oftalmológicas foram realizadas apenas em caso de o indivíduo apresentar sintomas oculares, havendo possível perda de diagnósticos em pacientes ainda assintomáticos. Além disso, em nosso estudo a incidência foi calculada baseada em todos indivíduos participantes do estudo, incluindo aqueles com baixa chance de di-CMV (contagem elevadas de linfócitos CD4 +). Existe, portanto a possibilidade de que em nossa prática a incidência de di-CMV ser maior que o descrito em outros estudos, considerando apenas os pacientes com maior risco de reativação do CMV.

No que diz respeito aos órgãos acometidos pelo CMV, segundo os estudos de ERICE *et al.*, 2003; GALLANT *et al.*, 1992; YUST *et al.*, 2004 e revisão de GRØNBORG *et al.*, 2017, o mais agredido durante a reativação do CMV é a retina seguido por algum do TGI (podendo ser esôfago ou cólon), sendo incomum a infecção em sistema nervoso central. Em nossa casuística, entretanto, o sistema nervoso foi o mais acometido em 40% dos casos confirmados. Uma possibilidade para tal fato é a maior suspeição clínica, pelas equipes assistentes, de di-CMV em pacientes com queixas neurológicas, hipótese corroborada pelo achado que dentro os principais sinais e sintomas que motivaram o pedido da qPCR-CMV foram os de origem neurológica em 44,31% das vezes e devido maior facilidade para confirmação de diagnóstico de di-CMV no SNC, quando comparados com outros órgãos que não a retina, pois a obtenção de líquido para processamento da qPCR-CMV é mais factível que a obtenção de uma biópsia, uma vez que há menor dependência da condição clínica do paciente para sua realização. Além disso, muitas vezes, poder haver preferência da equipe médica assistente pela realização de exames menos invasivos, postergando a indicação de biópsias.

Segundo MASCHKE; KASTRUP; DIENER, 2002 o diagnóstico de citomegalovirose em sistema nervoso central é realizado pela associação clínica, radiológica e de marcadores virológicos no LCR, dos quais a qPCR-CMV é o método de escolha. ARRIBAS *et al.*, 1995 correlacionou a positividade deste exame com

achados de necrópsia compatíveis com diagnóstico de citomegalovirose de SNC (células citomegálicas isoladas, necrose parequímica focal, micronódulos, ventriculoencefalite e radiculopatia) em pacientes com aids. Dos 24 pacientes avaliados a qPCR-CMV foi positiva no líquido em 12 de 13 indivíduos com di-CMV de SNC, não havendo positividade em nenhum paciente sem achados histopatológicos de doença ativa. Ainda foi achado que pacientes com carga viral superior a 1.000 cópias/μl de líquido apresentavam formas mais graves da doença, isto é, ventriculoencefalite. Salienta-se que nesse estudo todos os casos de radiculopatia foram associados a ventriculoencefalite. CINQUE *et al.* (1992) também em estudo com pacientes submetidos a necrópsia mostrou que 79% dos pacientes com citomegalovirose de SNC apresentaram qPCR-CMV positiva no líquido, sendo a positividade de 100% considerando 30 dias antes da data de morte e de 25% de 90 a 300 dias antecedendo o óbito; também não foram encontrados exames positivos nos pacientes controles sem di-CMV de SNC. Outros estudos também dão suporte a qPCR-CMV como um método confiável para diagnóstico da di-CMV em SNC (CLIFFORD *et al.*, 1993; GOZLAN *et al.*, 1992; WOLF; SPECTOR, 1992). SHINKAI; SPECTOR, 1995 ainda comprovaram que pacientes com radiculopatia apresentam carga viral para CMV no LCR de três a oito vezes acima dos pacientes com encefalite e que a qPCR-CMV é um método que pode ser utilizado inclusive para monitoramento de tratamento em pacientes recebendo terapêutica específica para di-CMV de SNC.

A retinite foi a segunda di-CMV mais incidente em nossa população. Foram cinco casos, sendo dois associados a infecção em SNC. Quanto as qPCR-CMV nos casos de somente retinite (n=3), em um dos casos ela foi coletada em humor aquoso com resultado positivo, porém com baixa carga viral (abaixo do limiar de detecção); em dois casos foram coletadas no sague, ambas com resultados negativos. SMITH *et al.* (1999) provaram que a qPCR-CMV realizada em humor vítreo e aquoso é um bom método para diferenciar retinite por CMV ativa de inativa ($p < 0,001$), com sensibilidade e especificidade de, respectivamente, 95% e 100% e 93% e 100%. Já SIQUEIRA *et al.* (2004) em um estudo para avaliar a eficácia da qPCR-CMV no diagnóstico de retinite por CMV feito com 54 indivíduos, sendo 29 pertencentes do grupo controle e sem sinais de retinite e 25 do grupo doença, dos quais seis apresentavam retinite ativa, 14 com lesões curadas e cinco com retinite por recuperação imune, mostrou sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) de 50%, 100%, 100% e 86, respectivamente para qPCR realizada no humor

vítreo ou aquoso. A alta especificidade se deveu ao fato de que não houve qPCR-CMV positivas indivíduos do grupo controle.

MILES; BAUGHMAN; LINNEMANN (1990) estudaram a importância do CMV em achados de lavado broncoalveolar em paciente infectados pelo HIV, concluindo que o CMV pouco contribui na maioria das pneumopatias do paciente HIV, uma vez que sua presença não foi associada com hipoxemia, alterações radiológicas, leucopenia ou aumento de mortalidade. Conclusão semelhante foi vista por BOWER *et al.* (1990) que não observaram diferenças estatisticamente significativas quanto a mortalidade de indivíduos que tiveram pneumocistose ou pneumocistose e CMV isolados em LBA e que foram submetidos ou não a terapia específica para CMV. Viram ainda que não houve mudança quanto a ocorrência de di-CMV extra-pulmonar entre grupos de pacientes que receberam ou não tratamento antiviral para CMV. Estudo de LIESNARD *et al.* (1994) realizado com pacientes transplantados e, em menor número, com indivíduos com HIV, concluiu que a qPCR-CMV em LBA é um método possível para detecção de pneumonia por CMV, com sensibilidade semelhante a cultura de LBA. Entretanto, não encontramos estudos específicos avaliando o papel da qPCR-CMV realizada exclusivamente em lavado broncoalveolar de pessoas com HIV/aids. Em nossa população houve um caso confirmado de pneumonia por CMV, baseado em critérios clínicos e histopatológicos, no qual o paciente apresentou uma qPCR-CMV sérica e uma em LBA ambos com resultado positivo.

MCCOY *et al.* (2014) avaliou que a qPCR-CMV em biópsias do trato gastrointestinal é um método de alta sensibilidade e especificidade (respectivamente 96,7% e 98,7%). Pode auxiliar, portanto, principalmente no diagnóstico de di-CMV em casos de biópsias com padrão de imuno-histoquímica duvidoso. Em nosso estudo, apenas quatro qPCR-CMV foram realizadas em material de biópsia, todas com resultado negativo e sem achados histopatológicos de di-CMV.

Estudo sobre a prevalência de viremia para CMV em pacientes HIV+ da Tailândia de DURIER *et al.* (2013) evidenciou sua ocorrência em 26,3% dos indivíduos em início de uso de TARV com média de 548 cópias/ml e de 4,5% após 6 meses de tratamento antiretroviral com carga viral média de CMV de 114 cópias/ml; já estudo realizado no Camboja por MICOL *et al.* (2009) evidenciou ocorrência de viremia para CMV de 42,4% em pacientes virgens de tratamento para HIV, com valor médio de 3,6 log₁₀ cópias/ml. Quando comparamos então esses dados da realidade de outros países em desenvolvimento, vemos que em nosso estudo houve uma prevalência de

viremia positiva para CMV semelhante ao descrito na Tailândia e inferior ao descrito no Camboja quando comparados todos os exames positivos (carga viral detectável em 25% das qPCR-CMV solicitadas), porém com prevalência inferior a ambos quando considerado apenas os exames com carga viral positiva e acima do valor passível de quantificação (18,3% dos testes). Nesta situação tivemos uma carga viral sérica média para CMV de 8.244,5 cópias/ml ($4,22 \log_{10}$ cópias/ml), valor muito superior ao visto na Tailândia e próximo ao observado no Camboja. Não existem estudos de prevalência de viremia para CMV em indivíduos HIV+ brasileiros, porém em nossa amostra o valor médio de viremia para CMV pode ser superior ao descrito na Tailândia devido ao fato de que nossos exames foram solicitados apenas em indivíduos sob investigação para di-CMV ou de outra doença oportunista associada a aids, os quais podem apresentar carga viral para CMV aumentada. Já o valor médio de carga viral para CMV está mais semelhante ao evidenciado no Camboja, pois no estudo deste país havia uma alta prevalência de indivíduos com doença avançada pelo HIV (contagem de linfócitos CD4+ média de 30 células/mm³) e com outras doenças oportunistas associadas a aids.

Ainda no estudo de MICOL *et al.* (2009) os fatores associados a positividade da qPCR CMV sérica foram a presença de febre ou de infecções oportunistas associadas a aids, a baixa contagem de linfócitos CD4+ e a anemia. Em nosso estudo foi avaliada a associação da positividade do exame de qPCR-CMV englobando todos materiais no qual ele foi realizado (sangue, líquido e outros), sendo encontrada apenas associação com contagem de linfócitos CD4+ abaixo de 100 células/mm³.

Estudos já evidenciaram o papel da qPCR-CMV sérica em prever a ocorrência de di-CMV. BOWEN *et al.* (1997) realizou o seguimento de 97 pacientes com contagem de linfócitos CD4 inferior a 50 células/mm³ e mostrou que a presença de viremia positiva aumenta em aproximadamente 20 vezes ($p=0,0001$) a chance de o paciente desenvolver retinite por CMV, inclusive com aumento de chance estatisticamente significativo a cada elevação da carga viral para CMV em $0,25 \log_{10}$ cópias/ml. Resultados semelhantes foram observados por SHINKAI *et al.* (1997) em um estudo com 94 pacientes que evidenciou risco para desenvolvimento de di-CMV de 23 vezes ($p<0,0001$) caso o indivíduo apresentasse qPCR sérica qualitativa positiva para CMV; neste trabalho foi mostrado ainda que todos pacientes que tiveram qPCR-CMV acima de 1.000 cópias/μl desenvolveram di-CMV, diferentemente daqueles com qPCR-CMV abaixo de 100 cópias/μl em que apenas 33% evoluíram

com di-CMV. Já DODT *et al.* (1997) em um estudo realizado com seguimento de 200 pacientes com contagem de linfócitos CD4+ inferior a 100 células/mm³ mostrou que a qPCR-CMV sérica positiva, em média, 46 dias antes de diagnosticada a di-CMV, antecipando inclusive outros métodos como a antigenemia e a hemocultura para vírus, prenunciando uma di-CMV com odds ratio de 10 ($p=0,0001$). SPECTOR *et al.* (1998) por sua vez, mostrou aumento da chance de desenvolver uma di-CMV de 3,1 vezes a cada aumento de um log₁₀ cópias/ml na qPCR-CMV plasmática ($p<0,0001$).

Devido essa possibilidade de prever a di-CMV, BOWEN (1999) sugere que pacientes com estágio avançado pelo HIV, isto é, com linfócitos CD4+ abaixo de 100 unidades/ml, sejam testados regularmente, a cada oito semanas, com qPCR-CMV sérica e caso exame seja positivo passem por avaliação oftalmológica seriada afim de se identificar precocemente os casos de retinite por CMV ou de outras di-CMV. Segundo DEAYTON (2000) a frequência de testagem pode variar de 1 a 3 meses para pacientes sem di-CMV prévia e deve ser realizada mensalmente para os pacientes com di-CMV pregressa, podendo ser suspensa após seis meses que a contagem de linfócitos CD4+ estiver acima de 100 células/mm³.

Figura 8 Manejo sugerido de pacientes HIV+ em uso de TARV utilizando qPCR-CMV

TARV: terapia antirretroviral para HIV. Fonte: Adaptado de DEAYTON (2000).

Ainda segundo BOWEN (1999) uma vez que se identifica que é possível estratificar os pacientes em risco para reativação do CMV, através da qPCR-CMV, duas abordagens terapêuticas são possíveis: o tratamento profilático e o preemptivo para di-CMV. O tratamento profilático é destinado para os indivíduos de baixo risco, ou seja, que tiveram contato prévio com CMV e não apresentam evidência de sua replicação, isto é, sem viremia. Já o tratamento preemptivo seria realizado nos pacientes com alto risco de evolução para di-CMV, portanto, naqueles com qPCR-CMV sérica positiva e ainda sem di-CMV manifesta. Poucos estudos avaliaram os efeitos desses tratamentos. *Trial* duplo cego randomizado controlado com placebo envolvendo pacientes de alto e baixo risco, realizado por SPECTOR *et al.* (1996) evidenciou redução de 49% no risco de desenvolver di-CMV com o uso de ganciclovir oral; porém, a análise de subgrupos evidenciou que o benefício maior se deu nos paciente com viremia para CMV negativa ou baixa. Já o trial controlado por placebo realizado por WOHL *et al.* (2009) que avaliou o efeito do valganciclovir oral como tratamento preemptivo não encontrou benefícios nessa abordagem.

Considerando os pacientes do nosso estudo, vemos que a qPCR-CMV influencia a conduta a curto prazo da equipe médica assistente. Observamos que há uma tendência de se esperar o resultado da qPCR-CMV para se iniciar terapêutica específica anti CMV, excetuando-se os casos de di-CMV já confirmados, como nas retinites, ou os de alta suspeição clínica, como aqueles com presença de lesões ulceradas no TGI. A presença de qPCR-CMV positiva no LCR determina o início de terapêutica específica para CMV, independente de seu valor quantitativo, porém o mesmo não é visto quando se solicita uma qPCR-CMV no sangue, não havendo padronização de conduta frente ao resultado dos exames, ocorrendo divergências quanto ao tratamento frente a resultados quantitativos semelhantes de qPCR-CMV. Não há ainda no HCFMRP-USP protocolo clínico para tratamento de di-CMV em pacientes com HIV/aids e isso deve ser o motivo gerador dessa discrepância. Existem poucos estudos conduzidos para determinar o papel a curto prazo da qPCR-CMV no diagnóstico da di-CMV, isto é, para determinar qual o valor de *cut-off* a partir do qual há infecção ativa por CMV com lesão de órgão alvo associada; e ao os analisar vemos que existe uma grande variação em seus resultados. PELLEGRIN *et al.* (1999) seguiu 58 indivíduos HIV positivos demonstrando que um valor de corte de 400 cópias/ml na qPCR-CMV realizada em plasma apresentava boa acurácia para diagnóstico de di-

CMV. Já YOSHIDA *et al.* (2001) mostrou, em um estudo com 70 indivíduos, que com *cut-off* de 3.000 cópias/ml, e o exame realizado em sangue total, o método apresenta bons valores de sensibilidade, especificidade e valor preditivo negativo (VPN), porém com valor preditivo positivo (VPP) inferior a 75%. Já BRANTSAETER *et al.* (2007), em um estudo *post mortem*, com 125 pacientes submetidos a necrópsia, evidenciou que se acima de 400 cópias/ml e teste realizado em plasma a sensibilidade era apenas de 47%, porém mantendo especificidade, VPP e VPN igual ou superior a 70%. Estudo indiano conduzido por CHAKRABORTY *et al.* (2015) também concluiu que este exame apresenta excelente acurácia para diagnóstico de di-CMV se tiver valor superior a 5,4 $\log_{10}$ cópias/ml. Já MIZUSHIMA *et al.* (2015), em um estudo com 461 pacientes, concluiu que a qPCR-CMV apresenta baixo VPP tanto para diagnóstico de retinite quanto para outras di-CMV se *cut-off* acima de 185 UI/ml ou 10.086 UI/ml (na tabela 6 há maior detalhamento desses estudos). Já SIQUEIRA *et al.* (2004), indicou que a positividade (análise qualitativa) da qPCR-CMV sérica como método diagnóstico para retinite apresenta valor de 50% para sensibilidade, 94,7% para especificidade, 75% para VPP e 85,6% para VPN. Esses trabalhos evidenciam alguns dos problemas para validação do uso da qPCR-CMV como um método diagnóstico: ausência de padronização interinstitucional entre os testes, com diferenças nas unidades de medida utilizadas, nos valores de *cut-off* testados e no material nos quais são realizados os exames.

Tabela 8– Acurácia e *cut-off* da qPCR-CMV para diagnóstico de lesão invasiva por CMV em pacientes HIV+.

Autor	di-CMV	Material	Cut-off	S	E	VPP	VPN
PELLEGRIN, et al., 1999	Global*	Plasma	400 cópias/ml	92,3	97,8	92,3	97,8
YOSHIDA et al., 2001	Global*	Sangue total	3000 cópias/ml	93	89	70	98
		Plasma	1000 cópias/ml	86	85	63	95
BRANTSAETER et al., 2007	Global*	Plasma	>400 cópias/ml	47	89	76	70
			>10000 cópias/ml	17	100	100	62
CHAKRABORTY, et al., 2015	Global*	Plasma	5,4 log10/ml	97,53	96	95,76	97,67
	Disseminado	Plasma	6,4 log10/ml	90,67	96,95	89,47	97,32
MIZUSHIMA et al., 2015	Retinite	Plasma	>10086 UI/ml	26,1	94,1	18,8	96
			>185 UI/ml	91,3	48,2	8,5	99,1
	Global*	Plasma	>10086 UI/ml	32,4	95,3	37,5	94,2
			>185 UI/ml	91,9	49,5	13,7	98,6

* Global: sem especificação de qual órgão acometido pelo CMV. S: sensibilidade do teste; E: especificidade do teste; VPP: valor preditivo positivo do teste; VPN: valor preditivo negativo do teste. UI: unidades internacionais. Fonte: Próprio Autor (2020).

Contrariamente, há maior consistência nos trabalhos avaliando a qPCR-CMV sérica como um método prognóstico de desfechos desfavoráveis em pacientes com HIV/aids. DEAYTON *et al.*, 2004; JABS *et al.*, 2005; SPECTOR *et al.*, 1998 mostraram que a presença de viremia para CMV está associado ao aumento da mortalidade em pacientes HIV+, sendo que para o primeiro autor sua ocorrência ainda está associada com maior ocorrência de doenças definidoras de aids (incluindo a própria di-CMV) e que para o terceiro autor o aumento de mortalidade se dá em 2,2 vezes a cada aumento de um log₁₀ cópias/mm³. Para MICOL *et al.* (2009) o aumento da taxa de óbito ocorre apenas se a carga viral do CMV for igual ou superior a 3,1 log₁₀ cópias/ml, enquanto que para DURIER *et al.* (2013) somente se acima de 500 cópias/ml e para ERICE *et al.* (2003) se houver aumento de 200 cópias/ml entre a realização de duas qPCR-CMV. Em nossa população se evidenciou maior risco de óbito ao final da internação e em 3 e 6 meses após a coleta da qPCR-CMV em pacientes cuja viremia inicial fosse igual ou superior a 6 log₁₀/ml. JABS *et al.* (2005b) demonstrou ainda que pacientes com carga viral de CMV detectável, via qPCR, em plasma e leucócitos acima de 400 cópias/ml e 400 cópias/10⁶ leucócitos estão associados com progressão da retinite por CMV ($p < 0,001$), resistência fenotípica ($p=0,009$ e $p=0,002$) e genotípica ($p<0,001$ e $p=0,004$) a ganciclovir e foscarnet, dois antivirais comumente usados para tratamento dessa doença, além de que aquelas pessoas com qPCR-

CMV acima de 400 cópias/ml detectável no plasma também apresentam maior chance de óbito ($p=0,007$).

Frente ao exposto, vê-se que a qPCR-CMV é útil para diagnóstico de di-CMV ativa se realizado nos materiais líquido, humor aquoso ou vítreo ou biópsia; seu uso em sangue funciona melhor como um marcador de reativação precoce do CMV, permitindo identificar aqueles pacientes em maior risco para evolução para di-CMV e para outros desfechos desfavoráveis tais como outras doenças oportunistas associadas a aids e óbito. Até o momento, o uso da qPCR-CMV para detecção da viremia para diagnóstico de di-CMV ativa é discutível e mais estudos devem ser realizados para validar sua indicação. Salienta-se ainda há necessidade de trabalhos que avaliem a efetividade de se realizar tratamento profilático ou preemptivo para CMV em pacientes com HIV/aids.

Em suma, no HCFMRP-USP a qPCR-CMV é utilizada primariamente com finalidade diagnóstica sem uma uniformização nos critérios para sua solicitação e para a interpretação de seus resultados.

6.1 Limitações do estudo

As principais limitações encontradas no estudo são devidas as restrições do próprio desenho da pesquisa (transversal retrospectivo) e o fato da doença invasiva por CMV em pacientes HIV/aids se tratar de uma doença de baixa prevalência o que reduziu o número de casos confirmados. Além disso, existem dificuldades que não puderam ser superadas, tais como a ausência de determinadas informações necessárias nos prontuários dos pacientes, como por exemplo a sorologia IgG para CMV, que não constava em mais de 30% dos prontuários e principalmente a ausência de exames complementares (estudos histopatológicos) que pudessem caracterizar com segurança a presença de di—CMV em uma parcela dos casos.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados do estudo as principais conclusões são:

- A qPCR-CMV como ferramenta diagnóstica tem importância para a confirmação da di-CMV quando utilizada no líquido, humor vítreo ou aquoso ou em materiais de biópsia. Entretanto, apesar de ainda não se ter estudos suficientes que validem seu uso para diagnóstico de di-CMV, quando realizadas em amostras de plasma, no HCFMRP-USP, em que em uma parcela considerável dos pacientes com suspeita de di-CMV não é submetida a exame histopatológico para diagnóstico de di-CMV, a qPCR-CMV pode ser considerada para tal finalidade, especialmente em pacientes com alta suspeição clínica;
- Em nossa casuística, houve maior mortalidade nos pacientes cujo resultado de qPCR-CMV foi igual ou superior a $6 \log_{10}$ cópias/ml. Considerando que há limitações na investigação da di-CMV em nossa realidade, seria indicado iniciar tratamento antiviral específico para CMV nesses pacientes;
- A qPCR-CMV realizada em sangue também pode ser usada como uma ferramenta prognóstica, com sua positividade associada a maior ocorrência de doenças definidoras de aids e maior mortalidade. Particularmente, no HCFMRP-USP, os pacientes com resultado de qPCR-CMV acima de $6 \log_{10}$ cópias/ml apresentam maior evolução para óbito a curto prazo (ao final da internação e em 3 e 6 meses após realização do exame). Estes pacientes devem ser seguidos com maior frequência e certamente se beneficiariam do tratamento antirretroviral que melhorasse a sua imunidade;
- A qPCR-CMV no HCFMRP-USP é utilizada unicamente para investigação diagnóstica de di-CMV atual. Sugerimos também seu uso para identificação precoce de pacientes com maior risco de evoluir com doença invasiva por CMV;
- Na população estudada, apenas pacientes com contagem de linfócitos CD4+ abaixo de 100 células/ml esteve associada com a positividade da qPCR-CMV;

- Não existe padronização de critérios para solicitação da qPCR-CMV no HCFMRP e também na interpretação dos resultados obtidos (exames solicitados em pacientes com baixo risco para reativação de di-CMV (contagem elevada de linfócitos T CD4+ e com contato prévio ao CMV desconhecido). A revisão destes protocolos pode aumentar a eficiência e efetividade do teste e ao mesmo tempo reduzir os custos associados ao mesmo.
- Apesar de ter sido indicado tratamento antiviral específico para CMV em todos pacientes com exames positivos no líquido houve apenas uma tendência disto ocorrer caso a qPCR-CMV tivesse sido realizada no plasma e com resultado igual ou superior a 4 log₁₀ cópias/ml. Seria interessante definir um protocolo clínico para tomada de decisão em relação ao tratamento, a partir dos resultados da qPCR-CMV, uma vez que este exame está disponível e é frequentemente solicitado em pacientes com HIV/aids.

REFERÊNCIAS

ARRIBAS, J. R. et al. Level of cytomegalovirus (CMV) DNA in cerebrospinal fluid of subjects with AIDS and CMV infection of the central nervous system. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 2, p. 527–531, ago. 1995.

BLOOM, J. N. The Diagnosis of Cytomegalovirus Retinitis. **Annals of Internal Medicine**, v. 109, n. 12, p. 963, 15 dez. 1988.

BOECKH, M.; GEBALLE, A. P. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 5, p. 1673–1680, 2 maio 2011.

BOPPANA, S. B. et al. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 11, n. 2, p. 93–99, fev. 1992.

BOWEN, E. F. et al. Cytomegalovirus (CMV) viraemia detected by polymerase chain reaction identifies a group of HIV-positive patients at high risk of CMV disease. **AIDS (London, England)**, v. 11, n. 7, p. 889–893, jun. 1997.

BOWEN, E. F. Cytomegalovirus reactivation in patients infected with HIV: the use of polymerase chain reaction in prediction and management. **Drugs**, v. 57, n. 5, p. 735–741, maio 1999.

BOWER, M. et al. The significance of the detection of cytomegalovirus in the bronchoalveolar lavage fluid in AIDS patients with pneumonia. **AIDS (London, England)**, v. 4, n. 4, p. 317–320, abr. 1990.

BRANTSAETER, A. B. et al. CMV quantitative PCR in the diagnosis of CMV disease in patients with HIV-infection - a retrospective autopsy based study. **BMC infectious diseases**, v. 7, p. 127, 6 nov. 2007.

CANNON, M. J.; SCHMID, D. S.; HYDE, T. B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. **Reviews in Medical Virology**, v. 20, n. 4, p. 202–213, jul. 2010.

CDC. **Panel on Opportunistic Infections in Adults and Adolescents with HIV. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in adults and adolescents with HIV: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America**, 29 maio 2018. . Acesso em: 15 out. 2018

CHAKRABORTY, A. et al. Distribution and determinants of cytomegalovirus induced end organ disease/s among people living with HIV/AIDS in a poor resource setting: observation from India. **PloS One**, v. 10, n. 2, p. e0117466, 2015.

CHRISTENSEN-QUICK, A. et al. Cytomegalovirus and HIV Persistence: Pouring Gas on the Fire. **AIDS research and human retroviruses**, v. 33, n. S1, p. S23–S30, nov. 2017.

CINQUE, P. et al. Cytomegalovirus infection of the central nervous system in patients with AIDS: diagnosis by DNA amplification from cerebrospinal fluid. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, n. 6, p. 1408–1411, dez. 1992.

CLIFFORD, D. B. et al. Use of polymerase chain reaction to demonstrate cytomegalovirus DNA in CSF of patients with human immunodeficiency virus infection. **Neurology**, v. 43, n. 1, p. 75–79, jan. 1993.

DEAYTON, J. R. Is cytomegalovirus viraemia a useful tool in managing CMV disease? **Sexually Transmitted Infections**, v. 76, n. 5, p. 342–344, 1 out. 2000.

DEAYTON, J. R. et al. Importance of cytomegalovirus viraemia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. **Lancet (London, England)**, v. 363, n. 9427, p. 2116–2121, 26 jun. 2004.

DIOVERTI, M. V.; RAZONABLE, R. R. Cytomegalovirus. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 4, 2016.

DODT, K. K. et al. Development of cytomegalovirus (CMV) disease may be predicted in HIV-infected patients by CMV polymerase chain reaction and the antigenemia test. **AIDS (London, England)**, v. 11, n. 3, p. F21-28, mar. 1997.

DREW, W. L. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 14, n. 2, p. 608–615, fev. 1992.

DURIER, N. et al. Cytomegalovirus viremia in Thai HIV-infected patients on antiretroviral therapy: prevalence and associated mortality. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 57, n. 1, p. 147–155, jul. 2013.

ERICE, A. et al. Cytomegalovirus (CMV) and human immunodeficiency virus (HIV) burden, CMV end-organ disease, and survival in subjects with advanced HIV infection (AIDS Clinical Trials Group Protocol 360). **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 37, n. 4, p. 567–578, 15 ago. 2003.

FREEMAN, M. L. et al. CD8 T-Cell Expansion and Inflammation Linked to CMV Coinfection in ART-treated HIV Infection. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 62, n. 3, p. 392–396, 1 fev. 2016.

FREEMAN, M. L.; LEDERMAN, M. M.; GIANELLA, S. Partners in Crime: The Role of CMV in Immune Dysregulation and Clinical Outcome During HIV Infection. **Current HIV/AIDS reports**, v. 13, n. 1, p. 10–19, fev. 2016.

GALLANT, J. E. et al. Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The Zidovudine Epidemiology Study Group. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, n. 6, p. 1223–1227, dez. 1992.

- GANDHI, M. K. et al. Human cytomegalovirus-specific immunity following haemopoietic stem cell transplantation. **Blood Reviews**, v. 17, n. 4, p. 259–264, dez. 2003.
- GIANELLA, S. et al. The Sordid Affair Between Human Herpesvirus and HIV. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 6, p. 845–852, 15 set. 2015.
- GOZLAN, J. et al. Rapid detection of cytomegalovirus DNA in cerebrospinal fluid of AIDS patients with neurologic disorders. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, n. 6, p. 1416–1421, dez. 1992.
- GRØNBORG, H. L. et al. Review of cytomegalovirus coinfection in HIV-infected individuals in Africa. **Reviews in Medical Virology**, v. 27, n. 1, 2017.
- HO, M. The history of cytomegalovirus and its diseases. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 197, n. 2, p. 65–73, jun. 2008.
- JABS, D. A. et al. Risk factors for mortality in patients with AIDS in the era of highly active antiretroviral therapy. **Ophthalmology**, v. 112, n. 5, p. 771–779, maio 2005a.
- JABS, D. A. et al. Cytomegalovirus (CMV) blood DNA load, CMV retinitis progression, and occurrence of resistant CMV in patients with CMV retinitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 4, p. 640–649, 15 ago. 2005b.
- JOUAN, M.; KATLAMA, C. Management of CMV retinitis in the era of highly active antiretroviral therapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, n. 1, p. 1–7, set. 1999.
- KOTTON, C. N. CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. **American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 13 Suppl 3, p. 24–40; quiz 40, fev. 2013.
- KOTTON, C. N. et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. **Transplantation**, v. 96, n. 4, p. 333–360, 27 ago. 2013.
- KRECH, U.; TOBIN, J. A collaborative study of cytomegalovirus antibodies in mothers and young children in 19 countries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 59, n. 4, p. 605–610, 1981.
- LANDAIS, I.; NELSON, J. A. Functional genomics approaches to understand cytomegalovirus replication, latency and pathogenesis. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 4, p. 408–415, ago. 2013.
- LICHTNER, M. et al. Cytomegalovirus coinfection is associated with an increased risk of severe non-AIDS-defining events in a large cohort of HIV-infected patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 2, p. 178–186, 15 jan. 2015.

LIESNARD, C. et al. Rapid diagnosis of cytomegalovirus lung infection by DNA amplification in bronchoalveolar lavages. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, n. 4, p. 273–283, ago. 1994.

LUCHSINGER, V. et al. Antigenemia y reacción de polimerasa en cadena en tiempo real en el diagnóstico de enfermedad por citomegalovirus en adultos con virus de inmunodeficiencia adquirida. **Revista chilena de infectología**, v. 32, n. 6, p. 664–671, dez. 2015.

MASCHKE, M.; KASTRUP, O.; DIENER, H.-C. CNS manifestations of cytomegalovirus infections: diagnosis and treatment. **CNS drugs**, v. 16, n. 5, p. 303–315, 2002.

MCCOY, M. H. et al. qPCR is a sensitive and rapid method for detection of cytomegaloviral DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded biopsy tissue. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 89, 9 jul. 2014.

MCCUTCHAN, J. A. Cytomegalovirus infections of the nervous system in patients with AIDS. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 20, n. 4, p. 747–754, abr. 1995.

MICOL, R. et al. Prevalence, risk factors, and impact on outcome of cytomegalovirus replication in serum of Cambodian HIV-infected patients (2004-2007). **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 51, n. 4, p. 486–491, 1 ago. 2009.

MILES, P. R.; BAUGHMAN, R. P.; LINNEMANN, C. C. Cytomegalovirus in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with AIDS. **Chest**, v. 97, n. 5, p. 1072–1076, maio 1990.

MIZUSHIMA, D. et al. Diagnostic utility of quantitative plasma cytomegalovirus DNA PCR for cytomegalovirus end-organ diseases in patients with HIV-1 infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 68, n. 2, p. 140–146, 1 fev. 2015.

PASS, R. F. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 152, n. 2, p. 243–248, ago. 1985.

PELLEGRIN, I. et al. Evaluation of new quantitative assays for diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease in human immunodeficiency virus-positive patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3124–3132, out. 1999.

RAZONABLE, R. R.; HUMAR, A. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. **American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 13 Supl 4, p. 93–106, mar. 2013.

REICHERT, C. M. et al. Autopsy pathology in the acquired immune deficiency syndrome. **The American Journal of Pathology**, v. 112, n. 3, p. 357–382, set. 1983.

SHINKAI, M. et al. Utility of urine and leukocyte cultures and plasma DNA polymerase chain reaction for identification of AIDS patients at risk for developing human cytomegalovirus disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 175, n. 2, p. 302–308, 1997.

SHINKAI, M.; SPECTOR, S. A. Quantitation of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in cerebrospinal fluid by competitive PCR in AIDS patients with different HCMV central nervous system diseases. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 559–561, 1995.

SIQUEIRA, R. C. et al. PCR with the aqueous humor, blood leukocytes and vitreous of patients affected by cytomegalovirus retinitis and immune recovery uveitis. **Ophthalmologica. Journal International D'ophtalmologie. International Journal of Ophthalmology. Zeitschrift Fur Augenheilkunde**, v. 218, n. 1, p. 43–48, fev. 2004.

SKOLNIK, P. R.; KOSLOFF, B. R.; HIRSCH, M. S. Bidirectional Interactions Between Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Cytomegalovirus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 157, n. 3, p. 508–514, 1 mar. 1988.

SMITH, I. L. et al. Cytomegalovirus (CMV) retinitis activity is accurately reflected by the presence and level of CMV DNA in aqueous humor and vitreous. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 5, p. 1249–1253, maio 1999.

SPECTOR, S. A. et al. Oral ganciclovir for the prevention of cytomegalovirus disease in persons with AIDS. Roche Cooperative Oral Ganciclovir Study Group. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 23, p. 1491–1497, 6 jun. 1996.

SPECTOR, S. A. et al. Plasma cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts CMV disease and survival in AIDS patients. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 2, p. 497–502, 15 jan. 1998.

STEININGER, C.; PUCHHAMMER-STÖCKL, E.; POPOW-KRAUPP, T. Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 37, n. 1, p. 1–9, set. 2006.

UBERTI-FOPPA, C. et al. Cytomegalovirus pneumonia in AIDS patients: value of cytomegalovirus culture from BAL fluid and correlation with lung disease. **Chest**, v. 113, n. 4, p. 919–923, abr. 1998.

WOHL, D. A. et al. Cytomegalovirus viremia, mortality, and end-organ disease among patients with AIDS receiving potent antiretroviral therapies. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 38, n. 5, p. 538–544, 15 abr. 2005.

WOHL, D. A. et al. Low Rate of CMV End-Organ Disease in HIV-Infected Patients Despite Low CD4+ Cell Counts and CMV Viremia: Results of ACTG Protocol A5030. **HIV clinical trials**, v. 10, n. 3, p. 143–152, 2009.

WOLF, D. G.; SPECTOR, S. A. Diagnosis of human cytomegalovirus central nervous system disease in AIDS patients by DNA amplification from cerebrospinal fluid. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, n. 6, p. 1412–1415, dez. 1992.

YAMAMOTO, A. Y. et al. Early high CMV seroprevalence in pregnant women from a population with a high rate of congenital infection. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 10, p. 2187–2191, out. 2013.

YAMAMOTO, A. Y.; FIGUEIREDO, L. T. M.; MUSSI-PINHATA, M. M. Prevalence and clinical aspects of congenital cytomegalovirus infection. **Jornal de Pediatria**, v. 75, n. 1, p. 23–8, 15 jan. 1999.

YOSHIDA, A. et al. Diagnosis and Monitoring of Human Cytomegalovirus Diseases in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection by Use of a Real-Time PCR Assay. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 10, p. 1756–1761, 15 nov. 2001.

YUST, I. et al. Retinal and extraocular cytomegalovirus end-organ disease in HIV-infected patients in Europe: a EuroSIDA study, 1994-2001. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 7, p. 550–559, jul. 2004.

ZURLO, J. J. et al. Lack of clinical utility of cytomegalovirus blood and urine cultures in patients with HIV infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 118, n. 1, p. 12–17, 1 jan. 1993.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Formulário utilizado para coleta de dados

Número paciente: _____ Registro

HC: _____ Número evento: _____

Idade (anos): _____ Sexo: ____ M ____ F

Contato prévio com CMV (IgG para CMV positivo)? () Sim () Não

Tempo de diagnóstico entre HIV até a coleta da qPCR-CMV (anos): _____

Contagem de linfócitos TCD4 mais próxima da coleta da qPCR-CMV (CD4/ml):

Carga Viral do HIV mais próxima da coleta da qPCR-CMV (cópias/ml):

Carga Viral do HIV mais próxima da coleta da qPCR-CMV (log/ml): _____

Data de solicitação de qPCR-CMV: _____

Material onde solicitada qPCR-CMV: _____

Resultado de qPCR-CMV (cópias/ml e log/ml): _____//_____

Motivo que solicitou a solicitação da qPCR-CMV: () Diagnóstico () Prognóstico

Em caso de qPCR-CMV solicitada para diagnóstico, qual sintoma apresentado

pelo paciente? () Febre de etiologia a/e () Alteração em hemograma ()

Linfonodomegalia a/e () Queixa neurológica () Suspeita de hepatite ou lesão em

via biliar () Disfagia ou odinofagia (úlceras esofágica ou gástrica) de etiologia a/e

() Diarréia ou úlcera retal ou colônica () Quadro respiratório () Queixa

oftalmológica () Outra suspeita clínica

Em caso de qPCR solicitada para diagnóstico, houve início de tratamento para

doença invasiva por CMV antes do resultado deste exame? () Sim () Não

Em caso de qPCR solicitada para diagnóstico, houve início de tratamento para

doença invasiva por CMV antes do resultado deste exame? () Sim () Não

Em caso de qPCR solicitada para diagnóstico, houve início de tratamento para

doença invasiva por CMV após o resultado deste exame? () Sim () Não

Posteriormente, houve confirmação de doença invasiva por CMV? () Sim ()

Não

Em caso de doença invasiva por CMV confirmada, qual o sítio? () Retinite ()

TGI: _____ () SNC () Pneumonite ()

Outros: _____

Valor de TGP coletado em data mais próxima à realização da qPCR-CMV (U/L):__

Valor de TGO coletado em data mais próxima à realização da qPCR-CMV (U/L):__

Valor de Hb coletado em data mais próxima à realização da qPCR-CMV (g/dL):__

Valor de leucócitos coletado em data mais próxima à realização da qPCR-CMV (células/ml):_____

Valor de plaquetas coletado em data mais próxima à realização da qPCR-CMV (unidade/ml):_____

Desfecho ao final da internação: (☐) Óbito (☐) Vivo (☐) Desconhecido

Desfecho após 3 meses de coletado qPCR-CMV: (☐) Óbito (☐) Vivo (☐) Desconhecido

Desfecho após 6 meses de coletado qPCR-CMV: (☐) Óbito (☐) Vivo (☐) Desconhecido

Desfecho após 12 meses de coletado qPCR-CMV: (☐) Óbito (☐) Vivo (☐) Desconhecido

Responsável pelo preenchimento:_____

APÊNDICE B – Critérios para definição de doença invasiva por CMV em pacientes com HIV/aids utilizados neste estudo

Orgão alvo acometido	Definição
Colite	Presença de dor abdominal ou diarreia E biópsia tecidual demonstrando a presença do CMV, por identificação de antígeno ou por acido nucleico viral ou por mudanças citopáticas.
Encefalite	Alteração do estado mental progressiva, delirium, perda de função cognitiva rapidamente progressiva ou outros sintomas de injúria cerebral E identificação de acido nucleico viral em líquido ou cultura de líquido positiva para CMV ou biópsia tecidual demonstrando mudanças citopáticas induzidas pelo CMV.
Esofagite	Dor retroesternal ou odinofagia E biópsia tecidual demonstrando a presença do CMV, por identificação de antígeno ou por acido nucleico viral ou por mudanças citopáticas.
Gastroenterite	Dor abdominal E biópsia tecidual demonstrando a presença do CMV, por identificação de antígeno ou por acido nucleico viral ou por mudanças citopáticas.
Hepatite ou colangite	Alanina aminotransferase ou fosfatase alcalina com valores superiores aos basais do paciente E biópsia tecidual demonstrando a presença do CMV, por identificação de antígeno ou por acido nucleico viral ou por mudanças citopáticas.
Pneumonite	Hipoxemia e infiltrado visto em radiografia de tórax, ou tomografia ou ressonância nuclear magnética E biópsia tecidual ou células obtidas por lavado broncoalveolar demonstrando a presença do CMV, por identificação de antígeno ou por acido nucleico viral E ausência de outros patógenos identificados ou sinais e sintomas que persistem ou recorrem após tratamento de outros patógenos.
Proctite	Dor retar, habitualmente associada a tenesmo e evacuação de muco e sangue E biópsia tecidual demonstrando a presença do CMV, por identificação de antígeno ou por acido nucleico viral ou por mudanças citopáticas.
Úlceras cutâneas	Presença de úlceras E biópsia positiva para CMV em culturas ou que demonstrem alterações típicas induzidas pelo CMV.
Radiculomielopatia	Paresia ou hiporreflexia de membros inferiores ou síndrome compatível com lesão de cordão medular de evolução subaguda (dias a semanas) E RNM evidenciando ausência de lesões de massa e espessamento de raízes nervosas E presença de líquido celafolorraquidiano com cultura positiva ou PCR positiva para CMV.
Retinite	Lesões típicas a fundoscopia incluindo áreas brancas com ou sem hemorragia ou áreas branca-acizentadas de necrose retiniana com ou sem hemorragia. As lesões são irregulares, com aparência seca e bordas granulares com pouca ou nenhuma inflamação vítrea sobreposta. O diagnóstico deve ser feito por um oftalmologista experiente.

Foram considerados lesões de órgão alvo por CMV possíveis aqueles cuja sintomatologia fosse compatível com doença invasiva por CMV e cujo tratamento antiviral específico fosse instituído com melhora clínica dos sinais e sintomas apresentados pelo paciente.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovações do comitê de ética do Hospital das Clínicas de Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O papel da PCR quantitativa para citomegalovírus no diagnóstico e manejo de pessoas vivendo com HIV/aids no Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto.

Pesquisador: JOSE LIDIO DE SOUZA JUNIOR

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 63709316.6.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.910.018

Apresentação do Projeto:

O vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) é responsável pela síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), definida por uma profunda imunodeficiência que resulta no aparecimento de doenças oportunistas e neoplasias. Dentre as infecções oportunistas, as causadas pelo citomegalovírus (CMV) são uma das mais importantes e fatais. O CMV é contraído predominantemente na por via oral, na infância, ou através da via sexual na idade adulta. Uma das principais características do CMV é a capacidade de manter uma infecção latente. Em situações de imunossupressão severa, como a que ocorre em pacientes com aids, pode ocorrer a reativação do vírus levando a manifestações clínicas severas. O diagnóstico da infecção por CMV é feito através de testes sorológicos, da cultura de vírus, de estudo histopatológico, de antigenemia, da detecção genômica (método de PCR) de CMV quantitativo ou qualitativo em vários fluidos corporais e de testes imunológicos, que refletem a resposta imune celular ao CMV. Em pacientes infectados pelo HIV a utilização de PCR é controversa, devido ao baixo valor preditivo positivo desses exames. No Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto, há dois anos este teste em sido realizado e em muitas situações valorizado para o diagnóstico da doença disseminada causada pelo CMV ou de lesões em órgãos alvo em pacientes com aids. Este trabalho se trata de um estudo descritivo e transversal que pretende avaliar o papel da PCR para CMV no diagnóstico e manejo clínico destes pacientes,

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

analisando a sua efetividade para esta finalidade. As informações serão obtidas a partir da revisão de prontuário de pacientes com diagnóstico de HIV/aids que tenha colhido pelo menos um exame de PCR para CMV em qualquer material biológico no período compreendido entre 01 de Janeiro de 2015 e 30 de Junho de 2016. Os resultados obtidos serão apresentados de forma descritiva e comparados a dados disponíveis na literatura. Espera-se, com este trabalho, concluir que a PCR para CMV é útil para o diagnóstico de CMV em pessoas vivendo com HIV/aids, a partir da correlação entre a positividade deste exame com quadros clínicos compatíveis com a doença causada por esse agente.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar o papel da PCR quantitativa para CMV no manejo de pacientes com HIV/aids, retrospectivamente, analisando o resultado do exame e o desfecho clínico destes pacientes.

Objetivo Secundário: Caracterizar os sinais e sintomas de pacientes com HIV/aids que tiveram uma PCR quantitativa para CMV solicitada; Avaliar se a determinação da carga viral para CMV contribui para o diagnóstico da doença por este vírus em pacientes com aids; Avaliar o papel da PCR quantitativa para CMV na decisão sobre a terapêutica e desfecho dos pacientes com HIV/aids do HC-RP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo será descritivo e transversal. Os dados serão obtidos por meio da análise dos prontuários dos pacientes. O risco esperado seria a quebra do sigilo dos dados dos pacientes, fator que será controlado pelos pesquisadores. O benefício esperado será descobrir se é válido ou não o uso do PCR para diagnóstico do citomegalovírus nos pacientes com diagnóstico de HIV/aids.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os prontuários dos pacientes incluídos serão revisados para obtenção de informações sobre sinais e sintomas da doença investigada, tratamento, reposta terapêutica, quando esta for instituída, e o desfecho (melhora ou piora clínica-laboratorial ou óbito). Análise estatística: Os parâmetros clínicos e laboratoriais obtidos através da revisão de prontuários serão apresentados de forma descritiva e comparados a dados disponíveis na literatura. A curva ROC será utilizada como ferramenta para descrever quantitativamente o desempenho da associação entre o valor da carga viral de CMV e o desfecho clínico do paciente, avaliando assim a

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.910.018

sensibilidade e especificidade deste exame de acordo com valores de carga viral específicos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto contém todos os termos obrigatórios, incluindo cronograma e orçamento. Os pesquisadores solicitam a dispensa do TCLE.

Recomendações:

Considerando a documentação apresentada, estou de acordo com a dispensa do TCLE e considero o projeto aprovado para execução.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_832206.pdf	13/01/2017 06:41:33		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP.docx	13/01/2017 06:40:59	JOSE LIDIO DE SOUZA JUNIOR	Aceito
Orçamento	folhaUPC.pdf	13/01/2017 06:40:10	JOSE LIDIO DE SOUZA JUNIOR	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	13/01/2017 06:39:26	JOSE LIDIO DE SOUZA JUNIOR	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Solicitacao_dispenza.pdf	24/11/2016 23:25:11	JOSE LIDIO DE SOUZA JUNIOR	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.910.018

Não

RIBEIRAO PRETO, 07 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br