

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SUZANA CARSTENSEN

INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES HIV POSITIVOS
INTERNADOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ

CURITIBA
2015

SUZANA CARSTENSEN

INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES HIV POSITIVOS
INTERNADOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna e Ciências da Saúde, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Mara Raboni.

CURITIBA
2015

Carstensen, Suzana

Infecção por citomegalovírus em pacientes HIV positivos internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná / Suzana Carstensen. – Curitiba, 2015.
105 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Mara Raboni

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna.
Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. 2. Citomegalovírus. 3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. I. Raboni, Sonia Mara. II. Título.

NLM WC 500



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos dezenove do mês de junho do ano de dois mil e quinze, a banca examinadora constituída pelos Professores: Professor Dr. **Felipe Francisco B. Tuon**, Dra. **Meri Bordignon Nogueira**, Dra. **Sônia Mara Raboni** – Orientadora, exarou o presente parecer sobre a dissertação elaborada por **Suzana Carstensen**, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna nível Mestrado, da Universidade Federal do Paraná, intitulada: “**INFECCÃO POR CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES HIV POSITIVOS INTERNADOS NO HOSPITAL DE CLINICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**”. A Banca examinadora considerou que **Suzana Carstensen**, apresentou trabalho adequado para dissertação e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna** e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Curitiba, 19 de junho de 2015.

Felipe Tuon

Professor Dr. **Felipe Francisco B. Tuon**

Meri Bordignon Nogueira

Professora Dra. **Meri Bordignon Nogueira**

Sônia Mara Raboni

Professora Dra. **Sônia Mara Raboni**

Aos meus pais, Pedro e Silvanira
Ao "meu" Fernando

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Sonia Mara Raboni, pelas orientações, pelo apoio, por compartilhar seus conhecimentos no decorrer dos anos e por ajudar no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e a Unidade de Apoio Diagnóstico (UAD/HC-UFPR) pela excelente estrutura e oportunidade.

Aos residentes e médicos do setor de Infectologia do HC-UFPR, pela ajuda na análise dos prontuários e em especial ao Dr. João Cesar B. França, Dra. Cléa Elisa Lopes Ribeiro e Dra. Francine Teixeira.

Aos pacientes pela participação voluntária.

As colegas (o) e amigas do Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Luine Rosele Vidal, Meri Bordignon Nogueira, Sergio Monteiro de Almeida, Gislene de Almeida Takahashi, Luciane Aparecida Pereira, Clyete Santos da Silveira, Bárbara Maria Cavalli, Adelina Moraes, Ednéia Cavalcanti, Indianara Rotta e Juscélia Stadinicki dos Santos pelo apoio e ajuda direta ou indireta.

Aos meus colegas ou ex-colegas de outras instituições que estive no decorrer da minha prática profissional, em especial a Luana de Borba, Vanessa Stella, Camilla Costa Becker, Daisy Maria Strottmann, Marina de Araujo e Nayara Carvalho Polido Beloto, que mesmo distantes me apoiaram.

Aos meus pais e aos demais familiares que me apoiam sempre e incentivam.

Ao Fernando Cesar Yamamoto, que esteve comigo em mais este projeto e em tantos outros ao mesmo tempo.

RESUMO

Apesar da diminuição da prevalência de doença por citomegalovírus humano (HCMV) em indivíduos portadores do HIV após a introdução da terapia antirretroviral (TARV), casos graves de HCMV continuam sendo relatados em pacientes com AIDS, principalmente em indivíduos com contagem de linfócitos T CD4+ abaixo de 100 células/mm³. A doença por HCMV nestes indivíduos pode acelerar a progressão da AIDS e a morte. Apesar da terapia preemptiva não ser indicada para estes indivíduos, a mesma, pode melhorar seu estado imunológico, no entanto é necessária a evidência laboratorial e caracterização da infecção e/ou doença por HCMV. Apesar do impacto na qualidade de vida destes indivíduos não foi realizada a avaliação dos testes diagnósticos para detecção do HCMV em pacientes com HIV/AIDS no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Para isso objetivou-se a comparação e definição de um valor de corte dos testes para a detecção do antígeno pp65 e do DNA do HCMV em pacientes com HIV/AIDS, para definição de doença por HCMV. Realizou-se um estudo de Coorte, em que foram incluídos pacientes internados no serviço de infectologia, com solicitação de pesquisa de HCMV, no período de um ano. A detecção do DNA do HCMV foi realizada com a amplificação do gene MIEA por meio de qPCR e a pesquisa da pp65 pelo ensaio de antigenemia. Sessenta e oito pacientes foram monitorados quanto à infecção pelo HCMV com total de 97 amostras coletadas, que foram divididas em dois grupos, amostras de pacientes classificados com doença e sem doença por HCMV. Observou-se diferença significativa entre os grupos, na contagem de linfócitos T CD4+, carga viral, tempo de diagnóstico do HIV e utilização de TARV. A análise dos ensaios de antigenemia e qPCR, baseada na divisão dos grupos, apresentou diferenças estatísticas, tanto no resultado qualitativo como quantitativo. A avaliação do desempenho da pesquisa da pp65 e da qPCR apresentaram valores, respectivamente, de sensibilidade de 77% (IC95% 45 a 93%) e 100% (IC95% 71 a 100%) e especificidade de 80% (IC95% 70 a 88%) e 61,9% (IC95% 50 a 72%) com alto valor preditivo negativo em ambos os ensaios. O valor de corte encontrado da antigenemia foi de 1,5 células positivas/200.000 leucócitos e do qPCR 3,715 log/mL. Não foi encontrada diferença de sobrevida entre os pacientes com e sem doença por HCMV. Os resultados indicam que a antigenemia e o qPCR são adequados para o monitoramento da doença por HCMV nestes indivíduos. No entanto, apesar de não ser constatado o aumento de sobrevida dos pacientes com tratamento específico, mais estudos devem ser realizados, com maior número de amostras e validação do ponto de corte para confirmar os resultados.

Palavras-chave: AIDS, HCMV, qPCR, antigenemia para HCMV.

ABSTRACT

Despite the decrease in prevalence of disease by human cytomegalovirus (HCMV) in individuals with HIV, after the introduction of antiretroviral therapy (ART), severe cases of HCMV continue to be reported in AIDS patients, especially in individuals with CD4+ T lymphocyte count below 100 cells/mm³. The HCMV disease in these patients can accelerate the progression of AIDS and death. Although preemptive therapy is not indicated for these individuals, it can improve its immune status, however laboratory evidence and HCMV infection and/or disease characterization is necessary. Despite the impact on life quality of these individuals, the evaluation of diagnostic tests for HCMV detection in patients with HIV / AIDS at the Clinical Hospital of the Federal University of Parana was not carried out. To do this we aimed the comparison and the definition a cutoff value of the tests for the detection of the antigen pp65 and HCMV DNA in patients with HIV/AIDS, to define HCMV disease. We conducted a cohort study, in which were included patients admitted to the infectious diseases, with request to HCMV research, within one year. Detection of HCMV DNA was performed by amplification of the MIEA gene using qPCR and screening of the pp65 antigenemia assay. Sixty-eight patients were monitored for infection with HCMV with a total of 97 collected samples, which were divided in two groups, samples from patients classified with and without the HCMV disease. A significant difference in CD4+ T cell count, viral load, diagnosis time of HIV and use of HAART was observed between the groups. Analysis of antigenemia assays and qPCR, based on the division of the groups, presented statistical differences in both, qualitative and quantitative results. The evaluation of pp65 and qPCR performances gave values, respectively, a sensitivity of 77% (95% 45 to 93%) and 100% (95% CI 71-100%) and specificity of 80% (70 to 95% 88%) and 61.9% (95% CI 50 to 72%) with high negative predictive value in both assays. The cutoff value found for antigenemia was 1.5 positive cells/200,000 leukocytes and qPCR 3.715 log/ml. There was no difference in survival between patients with and without disease by HCMV. The results indicate that antigenemia and qPCR are suitable for monitoring HCMV disease in these individuals. However, despite not being observed increased survival of patients with specific treatment, more studies should be conducted, with more samples and cut-off validation to confirm the results.

Keywords: AIDS, HCMV, qPCR, antigenemia for HCMV.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CÉLULAS INFECTADAS PELO HCMV, VISUALIZADAS POR JESIONEK E KIOLEMENOGLOU.....	18
FIGURA 2 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DOS HERPESVÍRUS. HCMV - CITOMEGALOVÍRUS HUMANO; VZV - VÍRUS VARICELA ZOSTER; HSV- VÍRUS HERPES SIMPLES; EBV- VÍRUS EPSTEIN BAAR.	19
FIGURA 3 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DO HCMV.....	20
FIGURA 4 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA ORGANIZAÇÃO DO HCMV.	21
FIGURA 5 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA FUSÃO E ENTRADA DO HCMV.....	23
FIGURA 6 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO MECANISMO DE AÇÃO DA PP71 NA DEGRADAÇÃO DO REPRESSOR DA TRANSCRIÇÃO.	24
FIGURA 7 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO HIV.	28
FIGURA 8 - BIOPSIA GASTROINTESTINAL COM COLORAÇÃO H&E.	32
FIGURA 9 - IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA HCMV EM BIOPSIA GASTROINTESTINAL.....	33
FIGURA 10 - LEUCÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO DE PACIENTE COM INFECÇÃO ATIVA POR HCMV, CORADO COM O KIT CMV BRITE™ TURBO.....	38
FIGURA 11 - AMPLIFICAÇÃO POR MEIO DE QPCR UTILIZANDO SONDA TAQMAN®	40
FIGURA 12 - DADOS SOBRE O COMPORTAMENTO SEXUAL DOS PACIENTES	46
FIGURA 13 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE PARCEIROS POR ANO E TIPO DE COMPORTAMENTO SEXUAL.....	47
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS/PACIENTES.	48
FIGURA 15 - CONTAGEM DAS CÉLULAS TCD4+, PACIENTES HIV+ CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV....	49
FIGURA 16 - CARGA VIRAL HIV, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.....	49
FIGURA 17 - TEMPO DE DIAGNÓSTICO DO HIV, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.	50

FIGURA 18 - TEMPO DE UTILIZAÇÃO DA TARV PARA HIV ANTES DA INTERNAÇÃO, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.....	51
FIGURA 19 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS CONFORME RESULTADOS NOS TESTES DIAGNÓSTICOS.....	51
FIGURA 20 - COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DA ANTIGENEMIA PARA HCMV, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.....	53
FIGURA 21 - COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DOS RESULTADOS DO PCR EM TEMPO REAL PARA HCMV, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.....	53
FIGURA 22 - COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DOS RESULTADOS EM LOG DO PCR EM TEMPO REAL PARA HCMV, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.....	54
FIGURA 23 - COMPARAÇÃO QUALITATIVA DOS TESTES DE ANTIGENEMIA E PCR EM TEMPO REAL PARA HCMV.....	55
FIGURA 24 - CORRELAÇÃO DA ANTIGENEMIA E DO PCR EM TEMPO REAL (CÓPIAS/ML) PARA DIAGNÓSTICO DO HCMV.....	56
FIGURA 25 - CURVA ROC DOS RESULTADOS QUANTITATIVOS DA ANTIGENEMIA PARA HCMV.....	57
FIGURA 26 - CURVA ROC DOS RESULTADOS QUANTITATIVOS DA QPCR PARA HCMV.....	58
FIGURA 27 - CURVA ROC COM COMPARAÇÃO DAS ÁREAS ABAIXO DAS CURVAS COM OS RESULTADOS QUANTITATIVOS DA ANTIGENEMIA E DO QPCR PARA HCMV.....	59
FIGURA 28 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS POR GRUPO.....	60
FIGURA 29 - BIOPSIA PULMONAR COM INCLUSÃO CITOMEGÁLICA.....	63
FIGURA 30 - TOMOGRAFIA DE TÓRAX DA PACIENTE COM HCMV PULMONAR.....	63
FIGURA 31 - TEMPO DE INTERNAÇÃO (DIAS), PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.....	66
FIGURA 32 - ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA NO PERÍODO DA INTERNAÇÃO, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.....	67

FIGURA 33 - ANÁLISE DE SOBREVIDA APÓS SEIS MESES DO PERÍODO DA
INTERNAÇÃO, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO
DOENTES POR HCMV.....68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- ANÁLISE QUALITATIVA DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO.	42
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DA RAÇA E ESCOLARIDADE DOS PACIENTES HIV + HOSPITALIZADOS QUE INVESTIGARAM CITOMEGALOVÍRUS.	45
TABELA 3 - RESULTADOS QUALITATIVOS DOS TESTES DE ANTIGENEMIA E PCR EM TEMPO REAL PARA HCMV SEPARADOS EM PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.	52
TABELA 4 - AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS ENSAIOS DE ANTIGENEMIA E QPCR PARA HCMV.	54
TABELA 5 - AVALIAÇÃO DOS VALORES PREDITIVOS POSITIVOS E NEGATIVOS EM DIFERENTES PREVALÊNCIAS NOS ENSAIOS DE ANTIGENEMIA E QPCR PARA HCMV.	55
TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO COM BASE NO PONTO DE CORTE DA ANTIGENEMIA PARA HCMV.	57
TABELA 7 - COMPARAÇÃO RESULTADOS QUANTITAVOS QPCR – AMOSTRAS PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.	58
TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO COM BASE NO PONTO DE CORTE DA QPCR PARA HCMV.	58
TABELA 9 - DESCRIÇÃO DA SEPARAÇÃO DOS GRUPOS.	60
TABELA 10 - CARACTERÍSTICAS REFERENTES AOS PACIENTES/AMOSTRAS COLETADAS SEPARADAS POR GRUPOS.	65
TABELA 11 - PERÍODO E CAUSA DOS ÓBITOS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO.	67
TABELA 12 - TEMPO DE ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES APÓS ALTA, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
CDV – Cidofovir
CMV – Citomegalovírus
CRFs - Formas recombinantes circulantes
cT – ciclo *threshold*
DAXX – *Death-domain associated protein*)
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DP – Desvio padrão
E – Gene precoce (*early*)
EBV – Vírus Epstein baar
EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético
Ee – Inverso da eficiência da extração
EV – endovenosa
Fa – Relação entre o volume do DNA extraído e o volume utilizado na qPCR
FAM – 6-carboxifluoresceína
Fe – Relação entre unidade de referência e amostra utilizada na extração
FITC - Isotiocianato de fluoresceína
FOS – Foscarnet
GCV – Ganciclovir
gEq – Genomas equivalentes
gp – Glicoproteína
H&E - Hematoxilina e eosina
HCMV – Citomegalovírus humano
HC-UFPR – Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
HSH – Homens que fazem sexo com homens
HSV – Vírus herpes simples
IE – Gene imediato precoce (*immediate early*)
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IHC - imuno-histoquímica

IQR – Intervalo interquartil

IRL – Região de repetição interna longa (*internal repeat long*)

IRS - Região de repetição interna curta (*internal repeat short*)

L – Gene tardio (*late*)

LR – (*likelihood ratio*)

LTNP - Não progressores por longo tempo

mC-BP - *Minor capsid binding protein*

MCP – *Major capsid protein*

mCP - *Minor capsid protein*

MIE – Gene imediato precoce maior (*Major immediate early*)

MIEP – Promotor do gene imediato precoce (*Major immediate early promoter*)

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

ORFs - Regiões de fase de leitura aberta (*open reading frames*)

PBS – Tampão fosfato salino

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pp – fosfoproteína

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

R2 – Coeficiente de correlação

RNA – Ácido ribonucleico

ROC – Característica de operação do receptor (*Receiver Operating Characteristic*)

ROX – 6-carboxi-x-rodamina

RT - Transcriptase reversa

SI – Sem informação

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SPC – *Smallest capsid protein*

Taq – *Thermus aquaticus*

TARV – Terapia antirretroviral combinada

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TRIS - Tris-hidroximetil aminometano

TRL – Região de repetição terminal longa (*terminal repeat long*)

TRS - Região de repetição terminal curta (*terminal repeat short*)

UDI – Usuários de drogas injetáveis

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UL – Região única longa (*unique long*)

UNAIDS – Programa conjunto das nações unidas sobre HIV/AIDS (*Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*)

US – Região única curta (*unique short*)

Val-GCV – Vanganciclovir

VIC – 4,7,2'-triclóro-7'-fenil-6-carboxifluoresceína

VPN - Valor preditivo negativo

VPP – Valor preditivo positivo

VZV – Vírus varicela Zoster

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

Kb – Quilobase; em DNA, 1000 pares de nucleotídeos

mm³ – Milímetro cúbico

nm – nanômetro

°C – Grau Celsius

μl – Microlitro

™ - *Trademark*

mL – Mililitro

xg – Força centrífuga

® - Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 Objetivo Geral	16
1.1.2 Objetivos Específicos	16
1.2 JUSTIFICATIVA	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 CITOMEGALOVÍRUS HUMANO	18
2.1.1 Histórico	18
2.1.2 Genoma e estrutura viral	19
2.1.3 Replicação	23
2.1.4 Patogênese	25
2.1.5 Terapia antiviral	26
2.2 SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)	27
2.2.1 Infecção por HCMV em pacientes HIV positivos	30
2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO HCMV EM IMUNOCOMPROMETIDOS	31
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
3.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO	35
3.2 CASUÍSTICA	35
3.3 MÉTODOS	36
3.3.1 Detecção do antígeno viral - Antigenemia para citomegalovírus	36
3.3.2 Detecção do DNA do citomegalovírus	38
3.4 METODOLOGIA DE ANÁLISE DE DADOS	43
4 RESULTADOS	45
4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES	45
4.2 CARACTERÍSTICAS E COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS - PACIENTES CLASSIFICADOS COM DOENÇA E SEM DOENÇA POR HCMV	47
4.2.1 Antigenemia e PCR em tempo real para citomegalovírus	51
4.2.2 Amostras separadas por grupos	59
4.2.3 Tempo de internação, análise de sobrevida e mortalidade	65

5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICES	91
APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	91
APÊNDICE 2 - QUESTIONÁRIO UTILIZADO NA PESQUISA.....	93
APÊNDICE 3 – DIAGNÓSTICO DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO NO MOMENTO DA ALTA.....	96
ANEXOS	99
ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HC-UFPR	99

1 INTRODUÇÃO

Na população em geral, a infecção pelo citomegalovírus humano (HCMV) é comum e caracterizada por uma infecção assintomática (TOMTISHEN III, 2012). Após a infecção primária pelo HCMV, o vírus se torna latente e sua reativação pode ocorrer em decorrência de desregulação do sistema imunológico, causando doença grave, em particular, em pacientes transplantados e outros imunocomprometidos (DEBUR *et al.*, 2009; JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011).

Nos indivíduos portadores do HIV, o HCMV é um importante patógeno oportunista, principalmente em pessoas que apresentam contagem de linfócitos T CD4+ inferior a 100 células/mm³, apresentando manifestações como a retinite, pneumonia, complicações gastrointestinais e neurológicas (CROUGH; KHANNA, 2009). Além de sua patogenicidade direta causando o comprometimento do órgão-alvo e morte, infecções ativas por HCMV também estão relacionadas com a progressão do HIV (FIELDING *et al.*, 2011).

Antes da terapia antirretroviral combinada (TARV) a doença por HCMV ocorria em até 30% dos indivíduos portadores do HIV, porém, com o desenvolvimento e o aumento da utilização da TARV, as taxas de mortalidade e morbidade dos indivíduos com AIDS e as complicações causadas por HCMV diminuíram significativamente, sendo estimados seis novos casos a cada 100 pessoas/ano (DURIER *et al.*, 2013; MIZUSHIMA *et al.*, 2013). No entanto, existem muitos indivíduos portadores do HIV, que não têm acesso à TARV ou que apresentam resistência às drogas disponíveis, além daqueles que não investigam a infecção pelo HCMV (SILVA *et al.*, 2010; SHAO; WILLIAMSON, 2012). A identificação destes indivíduos na fase inicial da doença por HCMV e o monitoramento do tratamento antiviral são de grande importância, uma vez que a terapia profilática e preemptiva reduz as manifestações clínicas da doença (BLANK *et al.*, 2000; CROUGH; KHANNA, 2009).

O teste de antigenemia para HCMV é considerado o padrão ouro para detecção desta infecção (LUGERT *et al.*, 2009). A quantificação do número de células que expressam o antígeno pp65 (fosfoproteína 65) do vírus no teste de antigenemia em amostras de sangue, tem demonstrado correlação com as

manifestações clínicas da doença, porém, sua eficiência está relacionada ao número de leucócitos presentes no sangue periférico (DEBUR *et al.*, 2009).

Embora a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) seja uma técnica mais sensível, rápida e não dependente do número de leucócitos, a sua positividade para HCMV não está relacionada com doença ativa, já que o vírus em estado latente pode ser amplificado (TERRA *et al.*, 2000). No entanto, a utilização da quantificação da carga viral tem sido relatada como uma alternativa para identificar os pacientes com replicação viral e risco de apresentação da doença (MAYAPHI *et al.*, 2014), porém tal metodologia ainda necessita ser avaliada no contexto dos diferentes tipos de imunossupressão.

Estratégias para definir a recomendação de profilaxia e terapia preemptiva em pacientes portadores do vírus HIV e suspeita de doença por HCMV, com base nos resultados da PCR e antigenemia requerem maior investigação devido à alta toxicidade e custos do tratamento, é importante identificar os fatores de risco e delimitar um valor de corte que permita identificar pacientes com maior chance de desenvolvimento de doença pelo HCMV.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho dos testes de antigenemia e da carga viral de citomegalovírus em pacientes com HIV/AIDS internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

1.1.2 Objetivos Específicos

Comparar e definir um valor de corte da antigenemia e da carga viral de citomegalovírus em pacientes com HIV/AIDS estudados.

Analisar dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com HIV/AIDS e infecção por citomegalovírus atendidos no Hospital de Clínicas – UFPR.

Correlacionar os resultados qualitativos e quantitativos dos ensaios laboratoriais para diagnóstico do HCMV com a evolução clínica dos pacientes e início da terapia específica.

Verificar o impacto da infecção ativa por HCMV sobre a mortalidade em pacientes com HIV/AIDS.

1.2 JUSTIFICATIVA

A infecção por citomegalovírus é comum na população em geral, sendo a reativação desta infecção latente associada com apresentações clínicas graves em indivíduos imunocomprometidos.

O HIV é um importante problema de saúde pública global, principalmente devido à facilidade de transmissão, e a presença de infecção ativa pelo citomegalovírus causa impacto na evolução clínica e no prognóstico desses pacientes.

Apesar da relevância da infecção por HCMV em pacientes com doença por HIV são escassos os dados de literatura sobre o impacto desta infecção na população brasileira. Além disso, ainda não foi investigado e definido entre os pacientes atendidos no serviço de infectologia do HC-UFPR, um valor de corte para os testes quantitativos de antigenemia e PCR em tempo real que recomendem a instituição da terapêutica específica. A definição dos aspectos acima citados contribuirá de forma importante na qualidade de vida dos indivíduos portadores da infecção HIV/AIDS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

2.1.1 Histórico

O citomegalovírus humano foi primariamente descrito por Ribbert em 1904, quando visualizou o que ele denominou de grandes células, no rim e na glândula parótida em um feto natimorto, não conseguindo interpreta-las até o estudo de Jesionek e Kiolemenoglou (1904), que constatou a presença de células semelhantes às de protozoários, infectando células dos pulmões, rins e fígado de um feto. Estas células infectadas apresentavam um organismo nuclear central, separado por um halo claro (FIGURA 1) (HO, 2008).

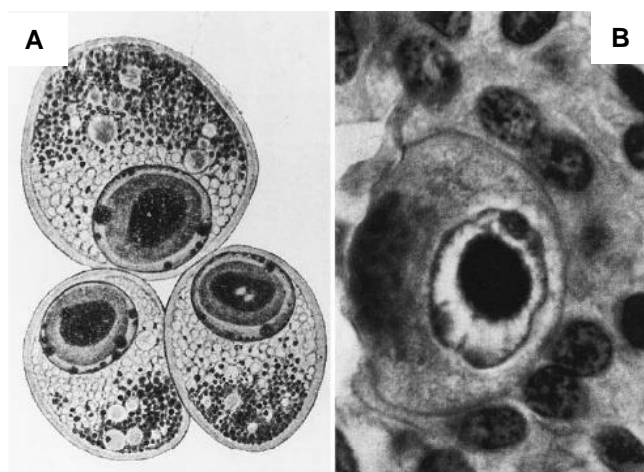


FIGURA 1 - CÉLULAS INFECTADAS PELO HCMV, VISUALIZADAS POR JESIONEK E KIOLEMENOGLOU.

FONTE: Adaptado de Ho (2008).

LEGENDA: A - célula apresentando inclusão e halo, levando os autores a considerarem infecção por protozoários. B - Presença de halo perinuclear, inclusão intranuclear e inclusão citoplasmática na parte esquerda da célula.

Logo após esta descoberta, em 1907, células infectadas por HCMV foram encontradas na glândula parótida de lactentes. Como as células apresentavam

inclusões intranucleares típicas, foi utilizado o termo inclusão citomegálica, que posteriormente, deu origem ao nome da doença, por Thomas H. Weller (HO, 2008).

Após o aparecimento de outros casos da doença, foi constatado que as alterações presentes nas células infectadas, eram compatíveis com infecção viral. E com o advento do cultivo celular foi possível à realização do primeiro isolamento do HCMV, por Smith, 1956, a partir de glândulas salivares de crianças infectadas em cultivo em células de fibroblastos humanos (HO, 2008; SMITH, 1956).

2.1.2 Genoma e estrutura viral

O HCMV pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae*, apresenta tamanho de 200nm a 300nm de diâmetro e em comparação com os outros herpesvírus humanos tem o maior genoma, com aproximadamente 235 pares de bases (FIGURA 2). O vírus consiste em DNA dupla fita linear, coberto por um nucleocapsídeo icosaédrico, rodeado por uma matriz proteica (tegumento) e um envelope lipídico contendo glicoproteínas (FIGURA 3) (CROUGH; KHANNA, 2009; TOMTISHEN III, 2012).

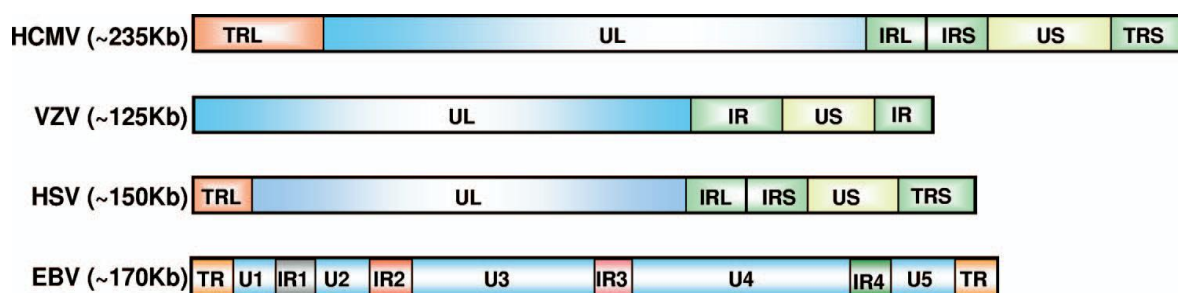


FIGURA 2 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DOS HERPESVÍRUS. HCMV - CITOMEGALOVÍRUS HUMANO; VZV - VÍRUS VARICELA ZOSTER; HSV- VÍRUS HERPES SIMPLES; EBV- VÍRUS EPSTEIN BAAR.

FONTE: CROUGH; KHANNA (2009).

NOTA: Tamanho do genoma de cada vírus em pares de bases (Kb) com separação das regiões TRL (*terminal repeat long*), UL (*unique long*), IRL (*internal repeat long*), IRS (*internal repeat short*), US (*unique short*), TRS (*terminal repeat short*).

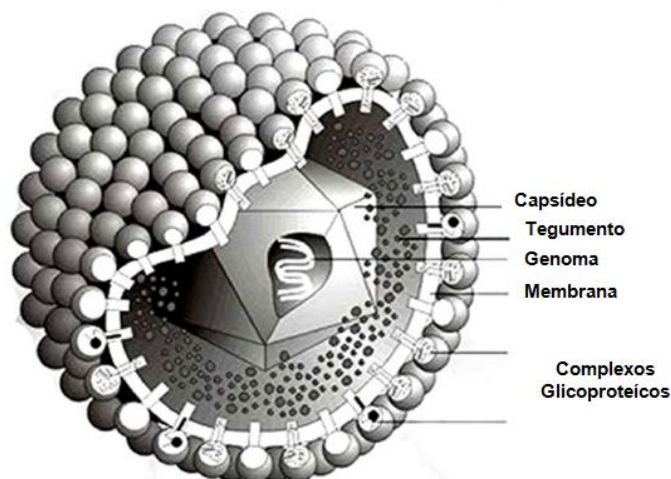


FIGURA 3 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DO HCMV.
 FONTE: Adaptado de Tomtishen III (2012).

Seu genoma é composto por dois segmentos únicos, o UL (*unique long*) e o US (*unique short*), cada um ladeado pela região de repetição terminal, TRL (*terminal repeat long*) e TRS (*terminal repeat short*) e pela sequência repetida interna, IRL (*internal repeat long*), IRS (*internal repeat short*) contendo aproximadamente 208 regiões de fase de leitura aberta - ORFs (*open reading frames*) (DAVISON, *et al.*, 2003; CASTILLO; KOWALIK, 2002). Os genes são nomeados com o prefixo da base do genoma, aos quais estão localizados e numerados sequencialmente. A presença das regiões de repetição conferem ao HCMV maior densidade genômica que os outros vírus herpes (MOCARSKI; COURCELLE, 2001).

O capsídeo do HCMV é composto por cinco proteínas virais codificadas pelas ORFs UL 86, UL85, UL80, UL 48-49 (UL48A) e UL 46 (VARNUM, *et al.*, 2004). Sendo composto pela proteína denominada MCP (*major capsid protein*) codificada pelo gene UL86 que é uma proteína altamente conservada em herpesvírus, pela proteína mCP (*minor capsid protein*) codificada pela região UL85, a proteína de ligação mC-BP (*minor capsid binding protein*) codificada pelo gene UL46 e a proteína SPC (*smallest capsid protein*) pelo gene UL48A. O capsídeo é montado com auxílio do gene UL80, que transloca a proteína MCP para o núcleo enquanto o capsídeo é clivado pela protease de maturação do vírus (DAI, 2013; TANDON; MOCARSKI, 2012).

A matriz proteica ou tegumento fica localizada entre o capsídeo e o envelope

(FIGURA 4), contendo proteínas virais, além de possuir proteínas e mRNA celular (SMITH; KOSURI; KERRY, 2014). Possui funções como a ativação e regulação da expressão viral, evasão imune, liberação do DNA viral para o núcleo e regulação dos processos celulares. Contribuindo para a replicação viral, pelo menos de três formas, fornecendo proteínas pré-formadas necessárias para o início da infecção, proporcionando estabilidade estrutural para o nucleocapsídeo e mediando as interações necessárias para montagem e liberação das partículas virais (SCHAUFLINGER, *et al.*, 2011; TANDON; MOCARSKI, 2012). Esta região contém a maioria das proteínas virais, algumas delas de grande importância devido a seu papel na replicação do HCMV, incluindo a pp65 (UL83), pp71 (UL82), pp150 (UL32) e pp28 (UL99), sendo a pp65 juntamente com pp71 as principais.

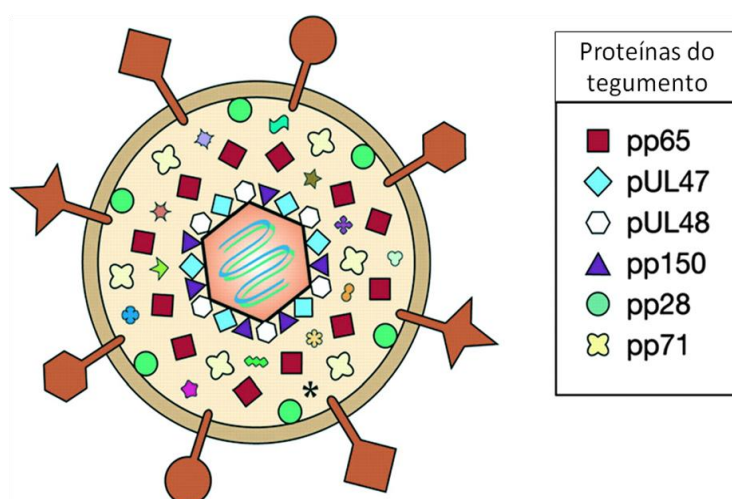


FIGURA 4 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA ORGANIZAÇÃO DO HCMV.

FONTE: Adaptado de Kalejta (2008).

NOTA: Representação do tegumento com suas principais proteínas. No envelope viral as formas grandes representam as glicoproteínas.

A proteína pp65 é a mais abundante do tegumento, sendo responsável pela modulação e escape da resposta imunitária e inata da célula do hospedeiro durante a infecção pelo HCMV, impedindo que as células infectadas sejam destruídas. Assim como a pp71, inicialmente migra para o núcleo das células infectadas permissivas no início da infecção lítica e nas fases posteriores da infecção se localiza no citoplasma. Foi demonstrado que esta proteína impede que o gene imediato precoce (IE – *immediate early*), que codifica proteínas que participam da

replicação viral, possa ser reconhecido pelo sistema imune do hospedeiro (KALEJTA, 2008; TOMTISHEN III, 2012).

A pp65 é associada ao gene UL97, também presente no tegumento, que tem atividade quinase e função de estimulação da replicação do DNA, montagem e saída da partícula viral (KALEJTA, 2008). A atividade quinase deste gene está implicada em muitas etapas durante a infecção por HCMV, sendo que deleções ou substituições de aminoácidos em regiões conservadas das proteínas expressas pelo gene podem ser um dos mecanismos implicados na resistência aos antivirais (ERICE *et al.*, 1997). Outro gene presente no tegumento que é apresentado como responsável pela resistência antiviral é o UL54, responsável pela expressão da DNA polimerase (KALEJTA, 2008).

A fosfoproteína pp71 realiza a ativação da expressão do gene IE no início da infecção lítica. Um dos mecanismos utilizados é por meio de degradação ou de realocização de repressores da transcrição presentes na célula do hospedeiro, tal como o Daxx (*death-domain associated protein*) durante a fase lítica de replicação. Apesar de não ser uma proteína essencial, sua presença é necessária para o aumento da replicação viral (SMITH; KOSURI; KERRY, 2014; TOMTISHEN III, 2012).

As proteínas pp150 e pp28 participam da montagem e liberação da partícula viral da célula do hospedeiro e são altamente imunogênicas. A proteína pp150 é essencial na interação com os capsídeos pré-formados. Enquanto a pp28 é responsável pelo envoltório citoplasmático das proteínas do tegumento e do capsídeo durante sua montagem e liberação (KALEJTA, 2008; TOMTISHEN III, 2012).

O envelope lipídico do HCMV possui glicoproteínas codificadas pelo vírus, com função de reconhecimento, ligação e entrada na célula do hospedeiro. Dentre elas estão as glicoproteínas, gB, gH, gL, gM, gN e gO (CROUGH; KHANNA, 2009). A glicoproteína gB (UL55) é considerada altamente imunogênica, sendo encontrada na membrana das células infectadas, estando envolvida na entrada, transmissão e fusão do vírus às células. As proteínas gH (UL75), gL (UL115) e gO (UL74) formam um complexo que influencia o tropismo celular, estas proteínas juntamente com a gB são essenciais para a entrada do vírus na célula (MOCARSKI; COURCELLE, 2001). A proteína mais abundante do envelope viral é a gM (UL100) que junto com a gN (UL73) formam outro complexo, que é essencial para replicação do vírus, sendo

que, estudos também sugerem seu papel na montagem da partícula viral (VARNUM, *et al.*, 2004; VANARSDALL; JOHNSON, 2012).

2.1.3 Replicação

O HCMV pode infectar uma variedade de células, como fibroblastos, células epiteliais, endoteliais, linhagem mieloide, entre outras. Dependendo da célula, a entrada ocorre por meio da fusão da membrana ou endocitose, o primeiro mediado pelo complexo gH/gL/gO e o segundo pelo gH/gL e outras proteínas associadas (DAMME; LOOCK, 2014).

Após a interação do vírus com a célula, o capsídeo e as proteínas do tegumento são liberadas para dentro da célula, nesse momento algumas destas proteínas permanecem no citoplasma, algumas continuam associadas ao capsídeo, que juntamente se ligam aos microtúbulos da célula, para translocação ao núcleo, outras como a pp65 e pp71, migram independentemente para o núcleo (FIGURA 5) (KALEJTA, 2008; TOMTISHEN III, 2012).

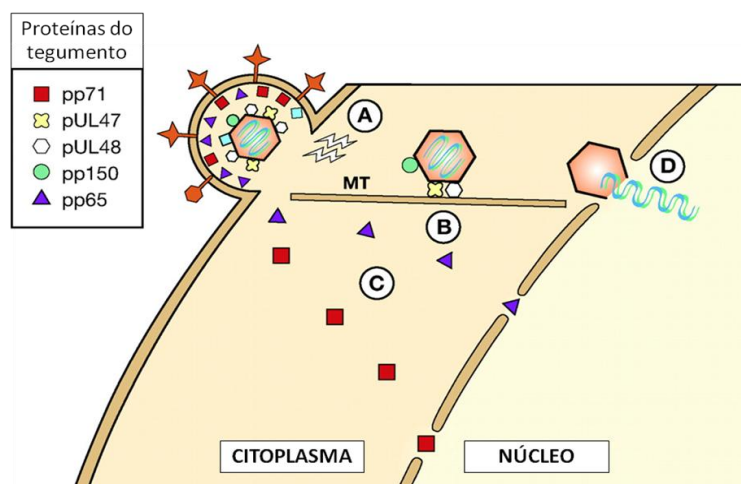


FIGURA 5 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA FUSÃO E ENTRADA DO HCMV.

FONTE: Adaptado de Kalejta (2008).

NOTA: A) Sinalização celular para indução de resposta antiviral. B) Proteínas do tegumento associadas ao capsídeo e ligadas ao microtúbulo. C) Proteínas do tegumento sendo transportadas para o núcleo. D) Liberação do DNA viral no núcleo.

A infecção leva à expressão dos genes do HCMV de forma coordenada, em fases com base na síntese pós-infecção, o primeiro conjunto de genes expressos, são classificados como precoce imediato (IE - *immediate early*) (0-2 horas), seguido do precoce (E – *early*) (<24 horas) e o tardio (L – *late*) (>24 horas) (CASTILLO; KOWALIK, 2002; CROUGH; KHANNA, 2009).

O gene principal MIE (*Major immediate early*) UL123 é um dos primeiros expressos durante a infecção por HCMV, sendo o mais abundante no estágio IE e dá origem a várias fosfoproteínas nucleares que são críticas para a regulação da expressão de outros genes celulares e virais e replicação do DNA viral. Sua expressão está condicionada pelo promotor MIE (MIEP - *Major immediate early promoter*) (MARTÍNEZ, *et al.*, 2014). Os genes IE são expressos para iniciar o ciclo lítico ou reprimidos para estabelecer latência. Nesta regulação da expressão gênica, realizada pelo vírus, a atividade do MIEP é mediada principalmente pela pp71, como descrito anteriormente, por meio da degradação ou de realocização de repressores da transcrição (FIGURA 6) (DAMME; LOOCK, 2014; KALEJTA, 2008).

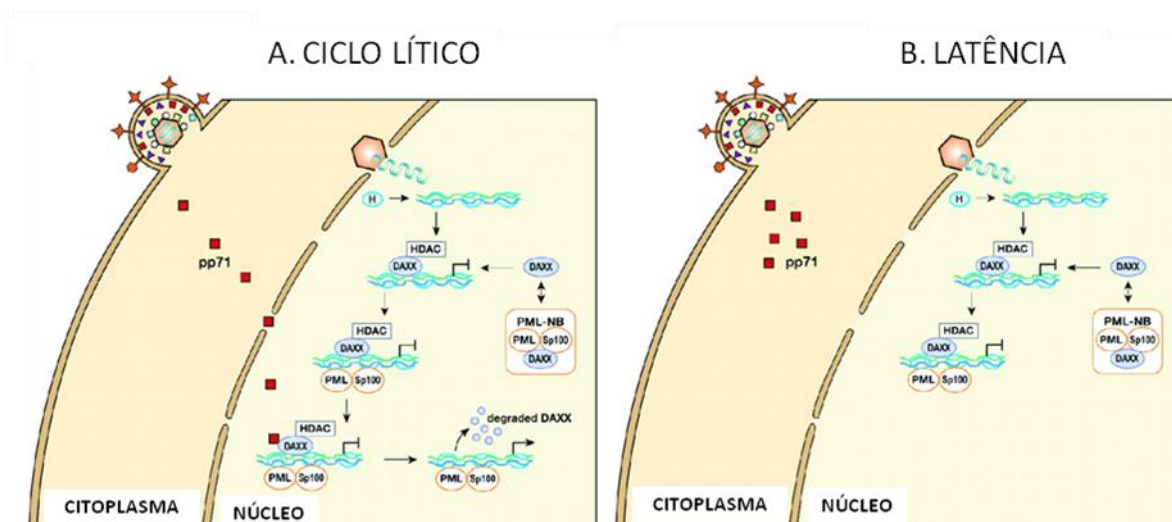


FIGURA 6 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO MECANISMO DE AÇÃO DA pp71 NA DEGRADAÇÃO DO REPRESSOR DA TRANSCRIÇÃO.

FONTE: Adaptado de Kalejta (2008).

NOTA: A localização da pp71 determina o início do ciclo lítico e da fase de latência. A) Início do ciclo lítico, com a proteína acessando o núcleo. DNA do capsídeo sendo liberado para o interior da célula, a proteína DAXX se associa com outras proteínas e silencia a expressão de IE. A pp71 induz a degradação de DAXX e ocorre a expressão do IE dando início ao ciclo lítico. B) Na latência, pp71 esta localizada no citoplasma e DAXX silencia a expressão de IE.

No ciclo lítico as proteínas IE, vão estimular a expressão de genes precoces dando início à replicação do DNA genômico do vírus, e após este processo os genes tardios são expressos, permitindo a montagem e saída das partículas virais recém-formadas. Durante a latência os genes IE são silenciados (KALEJTA, 2008).

Depois do processo de replicação, empacotamento e da formação do nucleocapsídeo ocorrerem no núcleo. Após a encapsidação a partícula é transportada para o citoplasma da célula, contido em um envelope primário, que é perdido após a passagem pela membrana nuclear. No citoplasma irá passar pelo processo de maturação, adquirindo seu envelope final, neste processo o capsídeo e o tegumento migram para o local de montagem, nas vesículas derivadas do complexo de Golgi, onde adquirem seu envelope final. Esta fusão das vesículas com a membrana da célula libera a partícula viral madura (DAMME; LOOCK, 2014; KALEJTA, 2008).

2.1.4 Patogênese

A infecção humana pelo HCMV é comum na população mundial em idade adulta, com soroprevalência que varia geograficamente entre 30-100% (JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011; TOMTISHEN III, 2012). Sendo que a presença de anticorpos da classe IgG, que representam infecção anterior, em adultos chega a 60% em países desenvolvidos e 100% em países em desenvolvimento (GRIFFITHS; BARANIAK; REEVES, 2015).

A transmissão com conseqüente infecção primária pode ocorrer por meio de saliva, contato sexual, pela placenta, amamentação, transfusão de sangue e transplantes de células-tronco hematopoiéticas e de órgãos sólidos (CROUGH; KHANNA, 2009, BREDA *et al.*, 2013). Após a infecção primária, geralmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, o vírus persiste ao longo da vida em estado latente e sua reativação não resulta em morbidade (DAMME; LOOCK, 2014).

Já em imunocomprometidos, como pacientes transplantados, portadores do HIV ou com infecção congênita, tanto a infecção primária como a reativação de infecções latentes, podem causar doença por HCMV, apresentando alta morbidade

e mortalidade (KALEJTA, 2008).

O HCMV tem capacidade de estabelecer latência em vários tipos de células, tais como os monócitos CD14+ e células progenitoras hematopoiéticas CD34+. Sendo que durante a infecção latente é estimada a presença de 2 a 13 cópias do genoma viral por célula infectada (BLANK *et al.*, 2000; JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011, DAMME; LOOCK, 2014).

A latência do vírus não é bem compreendida, mas sabe-se que a replicação do DNA viral está condicionada a células permissivas e a expressão do gene precoce imediato (IE), após a replicação, estes genes preconizam a expressão das proteínas tardias que têm função estrutural, auxiliando a montagem das partículas virais, entre elas o antígeno pp65 (CROUGH; KHANNA, 2009; TOMTISHEN III, 2012; JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011). O antígeno pp65 tem função de inibição do reconhecimento das proteínas IE pela célula hospedeira e sua detecção é um alvo para o diagnóstico do HCMV (TOMTISHEN III, 2012).

2.1.5 Terapia antiviral

A utilização de antivirais, para o tratamento do citomegalovírus humano, pode ser realizada de duas maneiras, por profilaxia, onde os pacientes com risco de doença recebem o tratamento por um período de tempo determinado e de maneira preemptiva pacientes que apresentam replicação viral em teste laboratorial de detecção precoce, porém, sem evidência de doença por HCMV (AVERY, 2008).

Não existem drogas eficazes para o HCMV em estado latente, as drogas disponíveis atuam sobre a DNA polimerase inibindo a replicação do vírus, entre elas estão o Ganciclovir (GCV), que é o mais utilizado, o Valganciclovir (Val-GCV), Foscarnet (FOS) e Cidofovir (CDV) (HO, 2008; LURAIN; CHOU, 2010). Todas possuem como alvo a inibição da síntese do DNA do HCMV, a partir do gene UL54 (DNA polimerase), sendo que GCV e o Val-GCV, requerem ainda, sua fosforilação mediada pelo gene UL97, para ativação antiviral (ÁNGELES, 2011; SAHOO, *et al.*, 2013).

Porém, mesmo com a disponibilidade de antivirais eficazes para inibição do HCMV, seu uso pode contribuir para o aparecimento e aumento de vírus resistentes.

Sendo a resistência associada a mutações na região do gene UL54 que podem conferir resistência a CDV e FOS e em conjunto com mutações no gene UL97, resistência a GCV e Val-GCV (SAHOO, *et al.*, 2013).

Um dos principais fatores que favorece o aparecimento de resistência é o uso da terapia por tempo prolongado, realizado principalmente por pacientes com imunossupressão severa e doença por HCMV (ERICE *et al.*, 1997). Sendo a resistência ao GCV relatada com frequência em pacientes com AIDS e retinite por HCMV, após um período de utilização de três meses. Já a resistência por FOS e CDV pode aparecer após longos períodos de utilização (ECKLE *et al.*, 2000).

Além da terapia prolongada, fatores como imunossupressão intensa, reativação frequente do HCMV, carga viral elevada e concentração do antiviral inadequada, por baixa absorção ou má adesão, podem contribuir para o aparecimento de resistência do HCMV aos antivirais (SAHOO *et al.*, 2013).

Outros dois pontos impactantes no tratamento antiviral são a elevada toxicidade, que pode levar a mielossupressão, insuficiência renal e hepática, distúrbios eletrolíticos, entre outras manifestações e o alto custo da medicação, principalmente para aqueles que necessitam de um tempo maior de utilização. Tendo em vista a toxicidade, o aparecimento de cepas com resistência, o alto custo do tratamento para todos os pacientes imunossuprimidos é importante identificar os fatores de risco de doença por HCMV para indicação do tratamento (BLANK *et al.*, 2000).

2.2 SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um problema global de saúde pública. Segundo dados da UNAIDS, estima-se que em 2012 havia 35,3 milhões de pessoas vivendo com HIV, destes 1,5 milhões de pessoas viviam na América do Sul e Central (UNAIDS, 2013).

No Brasil a infecção pelo HIV, foi descrita pela primeira vez no início da década de 1980, primariamente associada ao homossexualismo (Homens que fazem sexo com homens - HSH), usuários de drogas injetáveis (UDI) e hemofílicos. No entanto seu perfil de transmissão tem se alterado com o decorrer dos anos,

sendo observado um aumento da infecção pelo vírus em heterossexuais, e a razão entre os sexos aumentado, apresentando em 2012, 1,7 casos de homens infectados para cada caso em mulheres e, além disso, uma interiorização da epidemia, com um aumento progressivo de casos em pequenos municípios. (BRITO; CASTILHO; SZWARCOWALD, 2000; BRASIL, 2013).

O Brasil apresentou 757.042 casos de AIDS notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no período de 1980 a Junho de 2014, sendo o Paraná, responsável por 36.900 casos (BRASIL, 2014).

Já na cidade de Curitiba, após o início da epidemia até dezembro de 2013, notificou 10.081 casos de AIDS, sendo 6.992 indivíduos do gênero masculino e 3.089 feminino (CURITIBA, 2014).

O HIV pertence à sub-família *Lentiviridae*, é um retrovírus composto por uma estrutura esférica formada pelo núcleo proteico, contendo duas cópias idênticas de RNA associado a enzimas, além da cobertura de um envelope lipoproteico, no qual estão aderidas as proteínas gp120 e gp41 (FIGURA 7). Por ser um retrovírus, para se multiplicar o HIV necessita da enzima transcriptase reversa (RT), que sintetiza um DNA de cadeia simples a partir do RNA genômico, este DNA serve de molde para a síntese da cadeia complementar positiva, que é integrada no genoma da célula hospedeira. Dois tipos de vírus são conhecidos, o HIV-1 e HIV-2, sendo ambos derivados de infecção cruzada entre os símios e o homem, sendo o primeiro distribuído mundialmente e o segundo mais restrito geograficamente e menos agressivo (LORIERE-SIMON; ROSSOLILLO; NEGRONI, 2011).

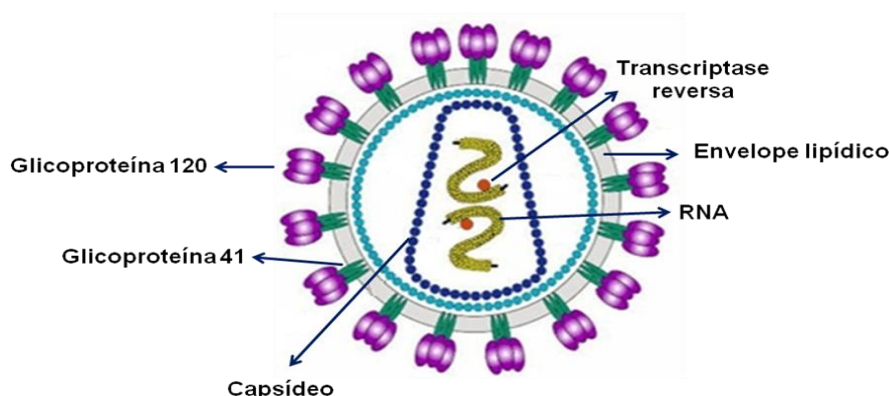


FIGURA 7 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO HIV.
FONTE: Adaptado de NIAD (2013).

Em decorrência do elevado grau de variabilidade genética e da própria evolução viral, o HIV-1 é subdividido em grupos, subtipos e sub-subtipos. Podendo ser filogeneticamente agrupado em quatro grupos: M (Major), O (Outlier), N (Non-M/Non-O) e P (PLANTIER *et al.*, 2009). O grupo M é responsável pela epidemia da doença e divide-se em 9 subtipos (A-D, F-H, J e K) (RABONI, *et al.*, 2010). Os subtipos A e F apresentam sub-subtipos (A1, A2 e F1, F2), além destes algumas linhagens são derivadas de recombinação genética entre os diferentes subtipos, sendo denominados formas recombinantes circulantes ou CRFs, existem atualmente 48 formas recombinantes (CRF01-CRF48) (SHAO; WILLIAMSON, 2012).

A transmissão do vírus HIV se dá via contato sexual, contato direto com sangue, por exemplo, agulha compartilhada por usuários de drogas e transmissão vertical (ARIËN; VANHAM; ARTS, 2007).

Após a infecção pelo HIV-1, ocorre a interação do vírus com a célula do hospedeiro e, posteriormente, integração do DNA viral no genoma do hospedeiro. O vírus passa então a produzir vírions ou permanecer em estado latente. As citocinas e proteínas virais são tóxicas para os linfócitos T CD4+, que são essenciais para o desenvolvimento de resposta imune, e a depleção destas células faz com que o indivíduo fique susceptível as infecções oportunistas (COHEN *et al.*, 2008).

Na fase de infecção aguda podem ocorrer sintomas similares à mononucleose infecciosa entre outros, passando posteriormente a uma fase assintomática ou de latência clínica. Nos anos que se seguem, em pacientes sem tratamento, a doença evolui, apresentando constante replicação viral e depleção dos linfócitos T CD4+, cuja intensidade depende da variabilidade genética dos vírus, fatores imunes e características do hospedeiro (SANDONÍS *et al.*, 2009; DEEKS; WALKER, 2007). A evolução do estágio assintomático ao dano grave do sistema imunológico, onde ocorre à redução dos linfócitos T CD4+, culmina com a doença denominada AIDS (ANISH; VIJAYKUMAR; SIMI, 2011).

O tempo de evolução da infecção pelo HIV permitiu a classificação dos pacientes em não progressores por longo tempo (LTNP), progressores típicos e rápidos (SANDONÍS *et al.*, 2009). Os LTNP mantêm as contagens de T CD4+ normal e baixa carga viral, por mais de 10 anos, mesmo sem tratamento. As células T CD8+ mostram atividade anti-HIV-1 sem lisar a célula infectada (COHEN *et al.*, 2008). A maioria dos pacientes infectados (70-80%) tem progressão típica da doença onde ocorre a diminuição progressiva dos linfócitos T CD4+ e

desenvolvimento da AIDS em um período de 6-10 anos após a infecção. Os progressores rápidos são os indivíduos que apresentam redução rápida dos linfócitos T CD4+ e desenvolvem AIDS poucos anos após a infecção, habitualmente em um período inferior a 2 anos. (LANGFORD; ANANWORANICH, COOPER, 2007).

Na progressão da infecção pelo HIV para a AIDS, os principais alvos são o sistema neurológico e o imune. Tendo como manifestações mais comuns a perda de peso, doença muco-cutânea, infecção bacteriana grave, diarreia, febre persistente, candidíases, infecções fúngicas disseminadas, sarcoma de Kaposi e tuberculose, entre outros (JAFFAR *et al.*, 2004).

2.2.1 Infecção por HCMV em pacientes HIV positivos

O HCMV é uma infecção oportunista grave nos imunocomprometidos, sendo que atualmente os casos mais graves de doença por HCMV tem sido em pacientes com AIDS, ocorrendo geralmente quando a contagem de linfócitos T CD4+ é inferior a 100 células/ μ l (BREDA *et al.*, 2013; HO, 2008).

Anteriormente à introdução da terapia antirretroviral, a doença por HCMV ocorria em 21% a 44% dos pacientes com AIDS. A TARV tem sido efetiva para manter a normalidade da contagem de linfócitos T CD4+ e portanto na prevenção do aparecimento de doença por HCMV. Apesar do declínio do HCMV nestes pacientes, quando presente esta infecção pode acelerar a progressão da doença e a morte (CROUGH; KHANNA, 2009; FOCÀ, *et al.*, 2004; HO, 2008). Desta forma, a detecção da replicação do HCMV nestes pacientes e a instituição do tratamento pré-emptivo, podem reduzir o risco do aparecimento dos sintomas e aumentar a sobrevida do paciente.

Nos pacientes com AIDS, a retinite corresponde a aproximadamente 85% das manifestações da doença por HCMV, desenvolvendo-se em 25 a 30% dos pacientes com baixa contagem de linfócito T CD4+, sendo o seu diagnóstico geralmente clínico (BLANK *et al.*, 2000; CROUGH; KHANNA, 2009; SILVA *et al.*, 2010). Mesmo após a introdução da TARV de alta eficácia, e por consequência redução na incidência de doença por HCMV e retinite, estima-se que ocorram em torno de seis novos casos a

cada 100 pessoas/ano, dois estudos recentes ainda destacam a alta frequência do comprometimento ocular nos pacientes com AIDS, 20 a 30% nos Estados Unidos e 28,5% na Coreia do Sul (KIM *et al.* 2012; MIZUSHIMA *et al.*, 2013).

Outras manifestações comuns do HCMV em pacientes com HIV são a enterocolite, gastrite, esofagite, hepatite, encefalite e pneumonia (CROUGH; KHANNA, 2009). Sendo que 30-90% dos pacientes podem desenvolver diarreia crônica (HO, 2008). Além disso, o envolvimento do sistema nervoso central tem sido uma das características de doença por HCMV em pacientes com AIDS, sendo que a encefalite por HCMV, apresenta distúrbios cognitivos e motor, tendo similaridade com a demência causada pelo HIV (HO, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

Em pacientes com utilização de terapia antirretroviral, a replicação do HCMV sem doença, tem sido associada como um fator que contribui para o aumento da ativação imune persistente, tendo resposta elevada das células T específicas para HCMV, do que os pacientes sem utilização de TARV, esta apresentação de resposta imunitária mais elevada é associada a maior risco de aterosclerose. Sendo que, a infecção assintomática pelo HCMV também tem sido relatada como um indutor de imunossenescência e envelhecimento acelerado em indivíduos infectados pelo HIV (HUNT *et al.*, 2011).

2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO HCMV EM IMUNOCOMPROMETIDOS

O diagnóstico do HCMV em pacientes imunocomprometidos é feito de acordo com os sinais clínicos em conjunto com os ensaios laboratoriais. Um dos desafios do diagnóstico é a utilização de testes que diferenciem infecção pelo vírus HCMV e doença ativa, além da possibilidade da detecção precoce e utilização no acompanhamento da doença. A predição da doença baseado em dados clínicos é difícil, sendo o diagnóstico laboratorial crítico para a correta intervenção terapêutica (CROUGH; KHANNA, 2009; JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011).

Além dos achados clínicos, do teste histológico, de imuno-histoquímica ou hibridização *in situ*, os métodos convencionais de diagnóstico do HCMV são o isolamento viral, sorologia com detecção de anticorpos ou do antígeno e detecção do DNA viral (JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011).

Na avaliação histológica de biópsia de tecido, com coloração de hematoxilina e eosina (H&E), a presença do HCMV é confirmada pela visualização de inclusões citomegálicas, ou seja, grandes células contendo inclusões intranucleares de basófilos rodeadas por um halo claro e inclusões intracitoplasmáticas (FIGURA 8). A imuno-histoquímica (IHC) utiliza anticorpos monoclonais e é considerada o padrão ouro para identificação do HCMV em biópsia de tecidos (FIGURA 9). Já a técnica de hibridização *in situ* baseia-se na detecção do DNA no tecido da biópsia, por meio de sondas, que são sequências complementares ao DNA alvo, associadas a moléculas radioativas ou fluorescentes. Tanto a IHC como a hibridização aumentam a sensibilidade do diagnóstico histológico (JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011; MILLS *et al.*, 2013).

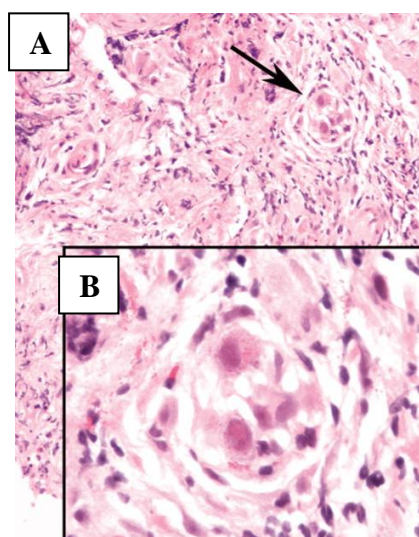


FIGURA 8 - BIÓPSIA GASTROINTESTINAL COM COLORAÇÃO H&E.

FONTE: Adaptado de Remotti *et al.* (2012).

LEGENDA: A – Na seta um conjunto de células contendo inclusão intranuclear e inclusão citoplasmática. B – Campo ampliado.

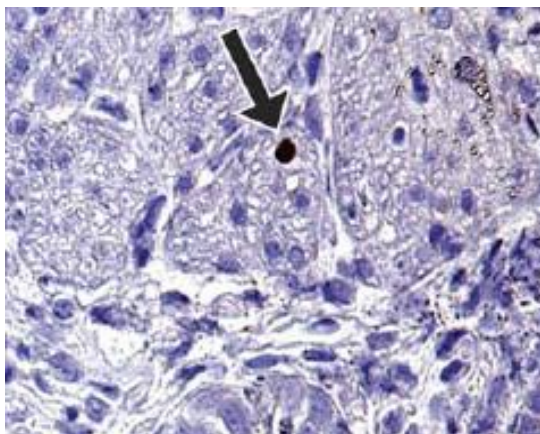


FIGURA 9 - IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA HCMV EM BIOPSIA GASTROINTESTINAL.

FONTE: Adaptado de Mills *et al.* (2013).

LEGENDA: Na seta, uma célula positiva na imuno-histoquímica para HCMV.

O isolamento viral é o teste mais específico, sendo anteriormente considerado o padrão ouro no diagnóstico do HCMV, porém é uma técnica muito trabalhosa, demorada e de baixa sensibilidade, por estas razões é pouco aplicável na prática clínica (JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011).

Outro método convencional de diagnóstico é a sorologia. Sendo que a evidência sorológica de infecção por HCMV em imunocompetentes é a presença de anticorpos da classe IgM, ou soroconversão do IgG, bem como o aumento de quatro vezes ou mais de anticorpos da classe IgG, tituladas em amostras emparelhadas. Deve-se ressaltar que a detecção de IgM, não é específica para infecção primária, pois indivíduos com infecção anterior podem apresentar esta sorologia positiva. A maior limitação desta metodologia é que testes baseados em pesquisa de anticorpos não são úteis para o diagnóstico de doença ativa por HCMV em pacientes imunocomprometidos (JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011; PASS, 2001).

Para imunocomprometidos são comumente utilizados outros métodos rápidos de detecção, como os testes de pesquisa do antígeno (antigenemia), que ainda diferencia infecção de doença ativa por HCMV e a detecção do DNA viral.

O HCMV geralmente é encontrado em leucócitos do sangue periférico, o que pode ser demonstrado pelo teste de detecção do antígeno (antigenemia pp65) do HCMV (DODT *et al.*, 1997). Esta metodologia detecta a replicação precoce do vírus, permitindo o tratamento preemptivo dos pacientes imunocomprometidos, reduzindo o risco do aparecimento dos sintomas da doença. No entanto, o teste apresenta limitações tais como, trabalho intensivo, a necessidade de processamento imediato

das amostras (6-8 horas após a coleta), o resultado é dependente do número de leucócitos e são necessárias habilidades técnicas para interpretação dos resultados da microscopia com precisão (BREDA *et al.*, 2013; JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011).

Já os métodos moleculares, são capazes de detectar o DNA do HCMV, em diferentes amostras clínicas, sendo um método sensível e de rápida execução (JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011).

A detecção por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), tem se mostrado altamente sensível, podendo detectar pequenas quantidades de ácido nucleico viral em diferentes amostras clínicas, apresenta-se como alternativa para o diagnóstico precoce e tratamento preemptivo para HCMV em imunossuprimidos, além disso, a técnica não é afetada pela leucopenia, é uma metodologia rápida, minimiza contaminações, e pode ser realizado o processamento de um maior número de amostras (BREDA *et al.*, 2013; JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011). A técnica de qPCR é utilizada para determinação da carga viral, porém sua positividade não caracteriza doença ativa por HCMV, sendo necessário estabelecer um valor de corte da carga viral que indique o risco de evolução para doença e, assim, permita o rápido tratamento (CROUGH; KHANNA, 2009). Além disso, a carga viral deve ser realizada antes do início terapia e posteriormente, permitindo monitorar a progressão da doença (JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011).

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Esta pesquisa foi de caráter observacional, analítico, comparativo entre os resultados dos métodos realizados, para verificação da presença do citomegalovírus nas amostras dos pacientes, seguido de coorte prospectiva, com associação dos achados laboratoriais com demais dados clínicos que foram utilizados para definir a presença ou ausência de doença causada pelo HCMV.

Os procedimentos que envolveram a busca de dados clínico-epidemiológicos em prontuários e utilização das amostras clínicas têm a aprovação do Comitê de Ética em pesquisa em seres humanos do HC-UFPR, sob número de registro: CAAE: 07283012.6.0000.0096 (ANEXO 1). Todos os pacientes incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE 1).

3.2 CASUÍSTICA

O presente estudo foi conduzido com pacientes hospitalizados no Serviço de Infectologia e a realização das análises das amostras, no Setor de Virologia, ambos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Como critérios de inclusão, pacientes portadores do HIV, com suspeita de doença associada ao HCMV, quando solicitado pelo médico assistente a realização do ensaio de antígenemia para citomegalovírus. Foi considerado cada episódio de doença por HCMV e quando o paciente foi internado mais de uma vez durante o período do estudo uma nova amostra foi incluída.

Estas amostras foram selecionadas durante o período de Janeiro de 2013 a Janeiro de 2014. Portanto tratou-se de uma amostragem de conveniência (não probabilística). Os dados demográficos, epidemiológicos, laboratoriais e evolução clínica dos pacientes foram pesquisados por meio de revisão de prontuário e entrevista. Todas as informações foram registradas em questionário específico

(APÊNDICE 2).

Os pacientes foram classificados como deontes e não doentes por HCMV, para isso, foi utilizado como critério de definição de doença por HCMV, pacientes que apresentaram infecção por órgão alvo e/ou uso de ganciclovir. E a terapia com ganciclovir foi administrada com base no monitoramento dos pacientes quanto à infecção pela presença do antígeno pp-65 e achados anatomopatológicos, com acompanhamento da melhora dos pacientes. Sendo que o clínico não teve acesso aos resultados da carga viral do HCMV.

Critérios de exclusão: Pacientes não portadores do HIV e aqueles que se recusaram a participar da pesquisa.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Detecção do antígeno viral - Antigenemia para citomegalovírus

O ensaio de antigenemia para citomegalovírus foi realizado por meio da detecção do antígeno pp65 do vírus em leucócitos totais isolados de sangue periférico, coletados com anticoagulante EDTA, por meio de imunofluorescência indireta, utilizando o kit CMV *Brite™ Turbo*, marca *IQ Products*.

Para a separação dos leucócitos foi realizada lise de hemácias por meio da mistura de 1mL do sangue do paciente com 8mL de solução de lise, diluída 1:10 e resfriada, a mistura foi então incubada por 10 minutos em temperatura de 2-8°C. Após a incubação foi realizada a centrifugação do lisado durante 2 minutos a 1000 xg com posterior eliminação do sobrenadante. O sedimento foi suspenso em 5mL de tampão fosfato salino (PBS) e realizada a centrifugação nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso novamente em 1mL de PBS. Foi realizada a contagem dos leucócitos em hemocítômetro e feito o ajuste da concentração para 200.000 células/mL, por meio de diluição em PBS ou concentração por centrifugação. A suspensão foi depositada na lâmina de microscopia (100µl) e centrifugada durante 4 minutos a 540 xg, após sua secagem em temperatura ambiente a mesma foi mergulhada em solução fixadora por 5

minutos, ao abrigo de luz, após este tempo a mesma foi lavada por três vezes com PBS e deixada na solução por mais 3 minutos, depois deste procedimento a lâmina foi mergulhada por 1 minuto em solução de permeabilização, precedida de três lavagens e incubação de 5 minutos, ambas em tampão PBS. Sobre a amostra fixada na lâmina, foi então aplicado 35µl de solução de anticorpos monoclonais C10/C11, para detecção da fosfoproteína pp65 do HCMV e incubado a 37°C por 20 minutos em câmara úmida. Após este período a lâmina passou por três lavagens com incubação final de 3 minutos em PBS. Foi então aplicado 35µl do anticorpo secundário conjugado (imunoglobulinas de ovelha anti-rato com isotiocianato de fluoresceína- FITC e Azul de Evans) e incubado a 37°C por 20 minutos, lavado duas vezes com PBS, sendo então realizada a colocação de glicerina tamponada na lâmina e coberta com lamínula.

A avaliação microscópica foi realizada em microscópio de epifluorescência, com ampliação de 400x, sendo feita a análise de toda a superfície do citocentrifugado. As células consideradas positivas foram aquelas que apresentaram coloração no núcleo polilobulado de cor amarelo-esverdeada. Já as células negativas são contrastadas de vermelho (FIGURA 10). Antes da avaliação das amostras foi verificada a lâmina de controle positivo, que foi incubada juntamente com as amostras testadas, para verificar se o procedimento de coloração foi adequado, após esta análise, as amostras dos pacientes são avaliadas. As amostras dos pacientes foram consideradas positivas quando apresentaram uma ou mais células com núcleos fluorescentes, sendo realizada a contagem das células positivas presentes em cada amostra.

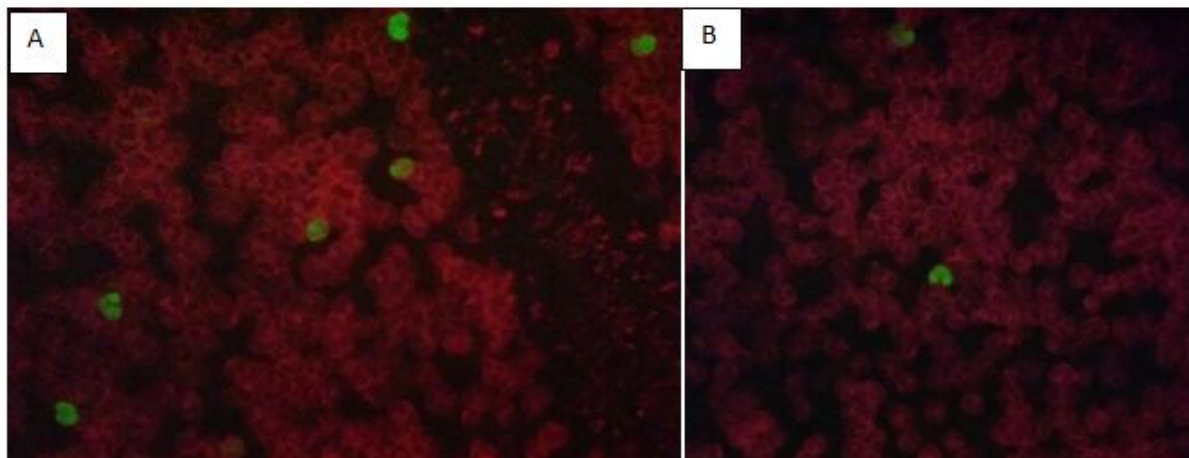


FIGURA 10 - LEUCÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO DE PACIENTE COM INFECÇÃO ATIVA POR HCMV, CORADO COM O KIT CMV BRITE™ TURBO.

FONTE: O autor, 2015.

LEGENDA: A e B - Células negativas são contrastadas de vermelho. Células positivas, coloração no núcleo polilobulado, amarelo-esverdeadas.

3.3.2 Detecção do DNA do citomegalovírus

3.3.2.1 Extração do DNA viral

A extração do DNA viral foi realizada utilizando o *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Marca Roche), de acordo com as instruções do fabricante.

Foi transferido 200µl de sangue total coletado com EDTA, para um tubo de 1,5mL, juntamente com 400µl do tampão de ligação. Seguido da adição de 10µl de solução de plasmídeo contendo o gene beta-globina, diluído em RNA de levedura (CPE-DNA® - *Nanogen Advanced Diagnostics*), que funciona como controle interno da reação. Após a homogeneização da mistura, a mesma foi transferida para o suporte com filtro (coluna), disponibilizado pelo kit, onde os ácidos nucleicos se ligam a fibra de vidro do filtro, na presença do agente caotrópico do tampão de lise. Realizada a centrifugação por 15 segundos a 8000 xg e descartado o sobrenadante. Depois foi adicionado 500µl do reagente de eliminação de inibidores e realizada a centrifugação por 1 minuto a 8000 xg, após o descarte do sobrenadante, os contaminantes foram removidos por meio de lavagens da coluna, com adição de 450µl de tampão de lavagem e centrifugação por 1 minuto a 8000 xg, foi retirado o sobrenadante e repetido o processo de lavagem. A coluna foi então colocada em

novo tubo e foi realizada uma centrifugação na velocidade máxima por 10 segundos. Após este procedimento, o suporte com filtro, foi novamente colocado em novo tubo de 1,5mL, já identificado, adicionado 50µl de tampão de eluição e centrifugado por 1 minuto a 8000 xg.

3.3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

A detecção e quantificação do DNA viral foram realizadas utilizando o *KIT CMV Q-PCR Alert (Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.)* de acordo com as instruções do fabricante.

Neste procedimento foi realizada a amplificação em tempo real, com iniciadores específicos, para a região do gene que codifica o antígeno imediato precoce (*Major immediate early antigen - MIEA*) do HCMV e da beta-globina humana, como controle de extração da amostra. Também foram utilizadas sondas *TaqMan®*.

No sistema *TaqMan®* cada sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo e em outra extremidade uma molécula que captura a energia luminosa do fluoróforo e dissipa na forma de calor ou luz (*quencher*). Durante a reação em cadeia da polimerase a sonda *TaqMan®* hibridiza com a fita simples de DNA complementar e, no momento que a fita é amplificada, a sonda é degradada pela enzima *TaqDNA* polimerase, separando o *quencher* do fluoróforo o que aumenta a fluorescência de maneira exponencial (FIGURA 11).

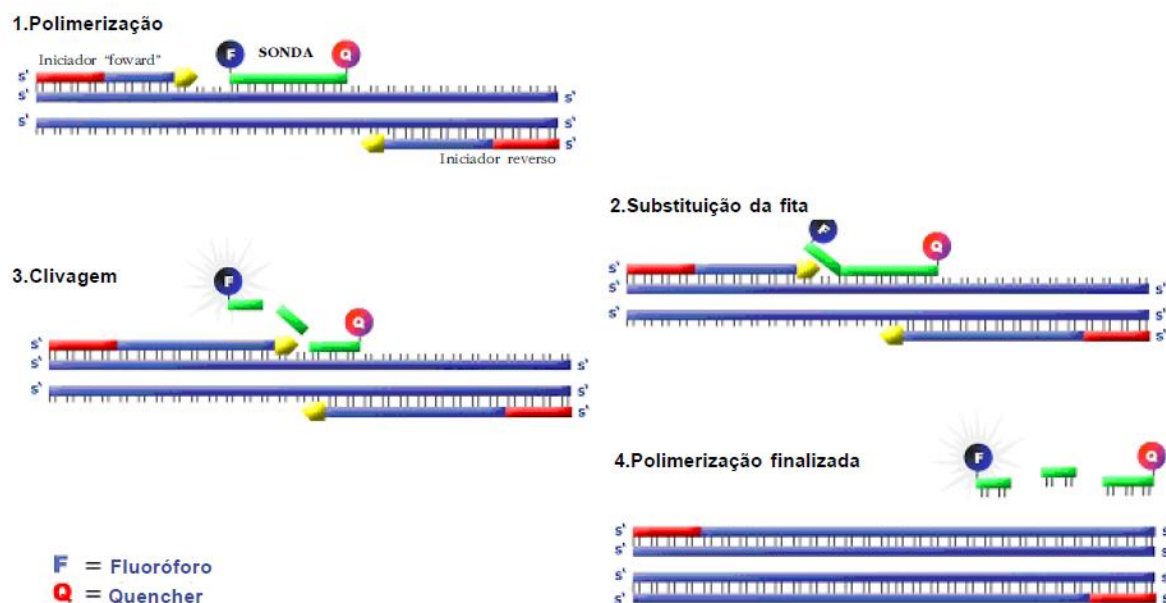


FIGURA 11 - AMPLIFICAÇÃO POR MEIO DE qPCR UTILIZANDO SONDA TAQMAN®
 FONTE: Novais *et al.*, 2004.

As sondas *TaqMan*® utilizadas tinham capacidade de hibridização no MIEA do HCMV marcada com fluoróforo FAM (Sonda FAM) e outra no gene da beta-globina humana, marcada com VIC (Sonda VIC). A partir do momento que as sondas marcadas com os fluoróforos, se hibridizaram na sequência específica da fita molde de DNA e ocorreu à amplificação, as mesmas foram hidrolisadas, e foi emitida a fluorescência, que automaticamente foi medida e quantificada pelo equipamento. A análise quantitativa foi realizada em comparação com os padrões (plasmídeos de concentração conhecida), adicionados na mesma placa que as amostras em cada reação de amplificação.

Para a preparação da reação, foi transferido 100µl do *AmpliMIX* (solução de oligonucleotídeos, TRIS, Glicerol e Triton X-100) e volume igual do *AmpliPROBE* (solução de oligonucleotídeos fluorescentes, TRIS, Glicerol e Triton X-100) no tubo contendo *AmpliMASTER* (solução de TRIS, Glicerol, MgCl₂, Desoriboxinucleotídeos trifosfatos, ROX, Uracil-N-glicosilase e *Taq* DNA polimerase *hot-start*), após a homogeneização foi transferido 20µl desta mistura em cada poço da placa de reação. Em cada poço correspondente foi transferido 5µl de cada amostra, controle negativo (água ultrapura) e os *Standards* (soluções de plasmídeos contendo genes específicos do HCMV com concentração conhecida de 10⁵ a 10²), a placa foi selada e colocada no equipamento com ciclo térmico para amplificação com fase inicial de

descontaminação a 50°C por 2 minutos, desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

A análise dos valores registrados da fluorescência emitidos pela sonda específica para citomegalovírus (fluorescência FAM) e da sonda específica da beta globina-controle interno (fluorescência VIC) nas reações de amplificação foram realizadas utilizando o *software* do aparelho (7300 *Applied Biosystems*® *Real-Time PCR System*).

Para a realização da análise, foi programado manualmente a faixa de cálculo do *Baseline*, do ciclo 6 ao 15 e *Thereshold* para a fluorescência FAM a 0,2 e para a fluorescência VIC a 0,1. Após estes ajustes foi permitido determinar o pico em que a fluorescência atingiu o valor de *Thereshold* (*cT - ciclo Thereshold*), com este valor foi calculado pelo equipamento a *Curva Standard* (por meio dos plasmídeos com valores conhecidos que foram adicionados a placa) da sessão que foi utilizada para validação da amplificação. As reações de amplificação consideradas válidas foram aquelas em que o *Standard* 10^5 apresentou valor de $cT \leq 25$, Controle negativo *cT* indeterminado e coeficiente de correlação (R^2) entre $0,990 \leq R^2 \leq 1,000$.

Após o processo de validação da reação as amostras foram avaliadas quanto à presença do DNA do HCMV qualitativamente, utilizando o valor do *cT* da sonda específica para o gene MIEA do HCMV e para o controle interno *Beta*-globina humana (que foi adicionada no momento da extração das amostras) para validação das etapas de extração, amplificação e detecção. Os padrões que foram utilizados para a análise qualitativa das amostras são demonstrados na tabela 1.

TABELA 1- ANÁLISE QUALITATIVA DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO.

cT gene MIEA HCMV (Sonda FAM)	cT Beta-globina humana (Sonda VIC)	Adequação da amostra	Resultado do teste	DNA do HCMV
Indeterminado	cT > 35 ou indeterminado	Inadequada	Inválido	-
	cT ≤ 35	Adequada	Válido, negativo	Não detectado
Determinado	cT > 35 ou indeterminado	Adequada*	Válido, positivo	Detectado
	cT ≤ 35	Adequada	Válido, positivo	Detectado

FONTE: Adaptado de Biometrix (2013).

* Quando na reação de amplificação de uma amostra for detectado DNA de HCMV, a amplificação do gene da Beta-globina pode resultar em um cT>35 ou indeterminado. A reação de amplificação com baixa eficiência do gene Beta-globina pode ser anulada pela reação de alta eficiência do HCMV. Neste caso a amostra ainda é adequada e o resultado do teste é válido.

Depois de realizada a análise qualitativa, as amostras que apresentaram detecção do DNA do HCMV foram avaliadas quantitativamente. Para isso, o *software* do equipamento, utilizou o valor do cT para as sondas específicas do HCMV nas reações de amplificação de cada amostra e a curva padrão formada pelos *Standards* para calcular a quantidade (*Quantity*) do DNA alvo (HCMV) nas amplificações.

Foram utilizados os valores quantitativos (*Quantity*) relativos a cada amostra para calcular o número de genomas equivalentes (gEq = cópias/mL) de HCMV presentes na amostra de partida segundo a fórmula abaixo.

$$\text{gEq/mL} = \text{Fe} \times \text{Ee} \times \text{Fa} \times \text{Quantity de cada amostra} \quad (1)$$

Onde Fe é a relação entre a unidade de medida de referência (1mL) e a quantidade de amostra utilizada na extração (o volume inicial de amostra extraído em cada kit/metodologia pode variar, por isso o calculo é realizado) neste caso foi utilizado 0,2 mL de sangue total para a extração. Ee é o calculo do valor inverso à eficiência da extração (cada kit/metodologia apresenta um valor de eficiência comprovada, este valor é utilizado para realização do cálculo), o valor de eficiência com o kit que utilizamos foi 100%, ou seja, 1,0. O valor de Fa é calculado com base

na relação entre o volume do DNA extraído e o volume utilizado na reação de qPCR (cada kit/metodologia utiliza um volume final de eluição), foi utilizado 50 µl do eluente e na qPCR foi utilizado 5 µl do DNA eluído. Seguem fórmulas abaixo, já com os valores utilizados.

$$F_e = 1\text{ mL} / 0,2\text{ mL} = 5 \quad (2)$$

$$E_e = 1 / 1,0 = 1 \quad (3)$$

$$F_a = 50\ \mu\text{l} / 5\ \mu\text{l} = 10 \quad (4)$$

A partir do cálculo destes valores foi possível chegar ao resultado abaixo.

$$\text{gEq/mL} = 5 \times 1 \times 10 \times \text{Quantity de cada amostra} \quad (5)$$

Sendo então utilizado o cálculo abaixo para a análise quantitativa dos resultados.

$$\text{gEq/mL} = 50 \times \text{Quantity de cada amostra} \quad (6)$$

3.4 METODOLOGIA DE ANÁLISE DE DADOS

Os dados laboratoriais e clínicos obtidos foram digitados em tabela ExcelTM, compilados utilizando o *software* JMP versão 5.2.1 e foi realizada análise estatística descritiva e analítica de todas as variáveis, utilizando o *software* GraphPad Prism[®] version 5.03 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA) e R-version 3.1.2 (31/10/2014). Para a análise de sobrevida e curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi utilizado o IBM SPSS *Statistics* v.20.0.

Em todas as análises de comparação entre pacientes com e sem doença por HCMV foi utilizado como critério de definição de doença por HCMV, pacientes que apresentaram infecção por órgão alvo e/ou uso de ganciclovir.

Para a realização da análise dos dados quantitativos foram utilizados os

testes de Mann-Whitney e Wilcoxon e para as variáveis nominais foi utilizado o teste exato de Fisher, considerando para ambos os testes $p < 0,05$ significativa.

Foi realizada a análise do desempenho dos testes diagnósticos, antigenemia e qPCR para HCMV, realizando o cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e validade do teste, considerando pacientes doentes e não doentes por HCMV.

Para determinação de ponto de corte ideal para a antigenemia e o qPCR para HCMV, foi ajustada a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) onde o $p < 0,05$ foi considerado significativo, sendo analisada também a área sobre a curva e a sensibilidade e especificidade de cada teste no ponto de corte estimado.

A análise de reprodutibilidade dos resultados entre os testes laboratoriais foi analisada utilizando o índice de concordância *kappa* sendo realizada a interpretação de acordo com Cruz (2009), valores $< 0,41$ considerada concordância inexistente, 0,41 a 0,60 moderada, 0,61 a 0,80 boa, 0,81 a 0,99 ótima e 1,00 perfeita.

A razão de correlação (r), entre os métodos, foi realizada por meio do coeficiente de *Pearson*, onde valores de $r = 0,0$ foram considerados sem correlação, $r = + 1,0$ correlação positiva perfeita, $r = - 1,0$ correlação negativa perfeita, $r = 0,15$ correlação positiva fraca e $r = -0,72$ correlação negativa forte (CRUZ, 2009).

Para a comparação dos grupos sem doença e com doença por HCMV, separados de acordo com os critérios apresentados acima, com relação à sobrevida, foram apresentadas as curvas de Kaplan-Meier, considerando o teste Log-rank, com $p < 0,05$ significativa.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES

Foram incluídos no estudo 68 pacientes, acompanhados durante o internamento no setor de infectologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, dos quais foram coletadas um total de 97 amostras (média 1,4 amostras/paciente). A pesquisa semi-quantitativa e quantitativa de citomegalovírus foi realizada por meio dos testes de antigenemia e pela metodologia de PCR em tempo real no sangue periférico, respectivamente.

A média de idade encontrada foi de 37,77 (± 13) anos, e a distribuição por gênero foi 50% (n = 34) de pacientes masculinos.

Observou-se que 67% (n = 46) desses pacientes eram procedentes da cidade de Curitiba, sendo que os outros casos foram encaminhados de cidades da região metropolitana e demais cidades do Estado do Paraná.

Na tabela 2, estão compilados os dados coletados correspondentes à raça e ao grau de escolaridade dos pacientes.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DA RAÇA E ESCOLARIDADE DOS PACIENTES HIV + HOSPITALIZADOS QUE INVESTIGARAM CITOMEGALOVÍRUS.

CATEGORIA		QUANTIDADE (%)
Raça	Branca	39 (57)
	Indígena	2 (3)
	Negra	3 (5)
	Parda	17 (25)
	Amarela	0 (0)
	SI	7 (10)
Escolaridade (Tempo de estudo)	1 a 3 anos	2 (3)
	4 a 7 anos	27 (40)
	8 a 11 anos	26 (38,2)
	≥ 12 anos	6 (8,8)
	SI	7 (10)

FONTE: O autor, 2015.

NOTA: SI= Sem informação.

Quanto ao comportamento de risco para infecção pelo HIV-1, dos 68 pacientes entrevistados, a maioria, 50 (73,5%) negou o uso de drogas. Sendo que 11 indivíduos (16,2%) relataram o uso de drogas (cocaína, cola, crack, maconha e álcool) por via endovenosa (EV), inalação ou aspiração. Dos sete (10,3%) pacientes restantes não foi obtida a informação.

Com relação ao comportamento sexual, relatado pelos pacientes, a maioria deles se classificou como heterossexual, 48 (70,5%), sendo que os homossexuais corresponderam a nove indivíduos (13,2%) e destes sete do gênero masculino e dois feminino (FIGURA 12). Quanto ao número de parceiros por ano, 40 (59%) relataram número de parceiros igual ou inferior a dois no período de um ano, quatro (5,9%) de dois a cinco parceiros, nove (13,2%) mais de cinco parceiros por ano, 14 (20,5%) não foi obtida nenhuma informação e um (1,4%) relatou não ter iniciado a vida sexual. Na figura 13 é demonstrada a distribuição do número de parceiros por ano e comportamento sexual.

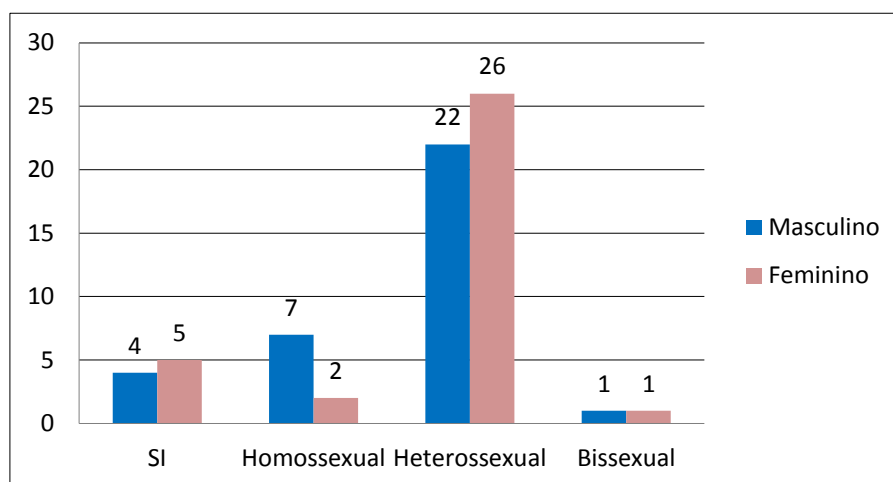


FIGURA 12 - DADOS SOBRE O COMPORTAMENTO SEXUAL DOS PACIENTES.

FONTE: O autor, 2015.

Nota: SI= Sem informação.

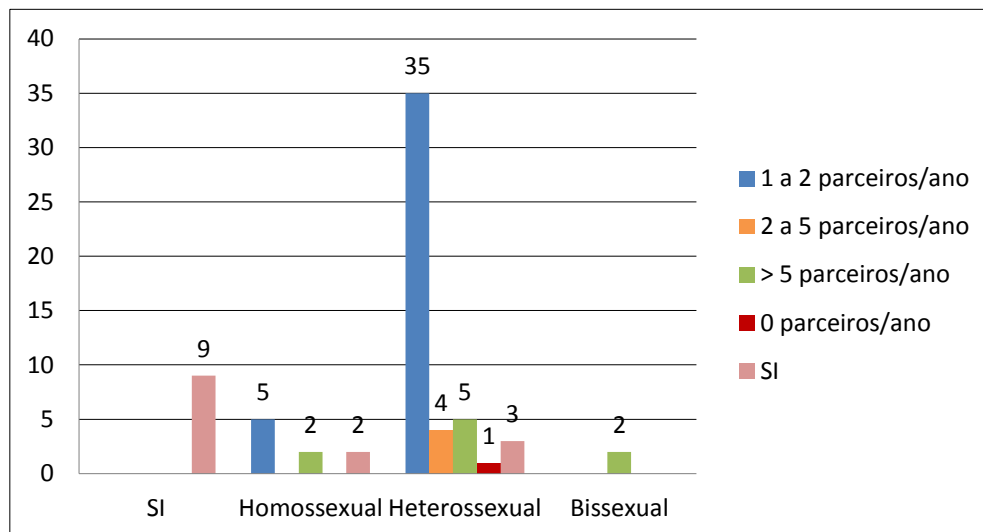


FIGURA 13 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE PARCEIROS POR ANO E TIPO DE COMPORTAMENTO SEXUAL.

FONTE: O autor, 2015.

Nota: SI= Sem informação.

Referente ao histórico da infecção pelo HIV-1 observou-se que, no momento desta avaliação, os pacientes apresentavam mediana de tempo de diagnóstico do HIV de 1.539 dias (IQR 47-5.548 dias), aproximadamente 4,2 anos (IQR 0-15,2 anos). Quanto à quantificação dos linfócitos T CD4+, no momento da avaliação, a mediana foi de 95 células/mm³ (IQR 36-226) e a carga viral do HIV apresentou média de 4,16 log/mL ($\pm 1,76$).

A média do tempo de internação dos pacientes foi de 16,6 dias ($\pm 13,9$). Os diagnósticos diferentes e múltiplos que os pacientes apresentavam no momento da alta, são apresentados no apêndice 3.

4.2 CARACTERÍSTICAS E COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS - PACIENTES CLASSIFICADOS COM DOENÇA E SEM DOENÇA POR HCMV

Primeiramente, as 97 amostras coletadas dos 68 pacientes, foram divididas em dois grupos, amostras coletadas de pacientes classificados com doença por HCMV e amostras de pacientes classificados como não doentes por HCMV.

Os critérios de definição de doença utilizados foram aqueles pacientes que

apresentaram infecção por órgão alvo confirmada e/ou uso de ganciclovir por decisão médica.

Foram coletadas 13 (13,4%) amostras de pacientes classificados como doentes por HCMV e 84 (86,6%) amostras de pacientes não doentes por HCMV. Porém, nesta divisão, como foram coletadas mais de uma amostra por paciente, seis destes acabaram ficando nos dois grupos, pois foram internados mais de uma vez ou por serem classificados doentes ou não doentes em momentos diferentes no período da internação (FIGURA 14).

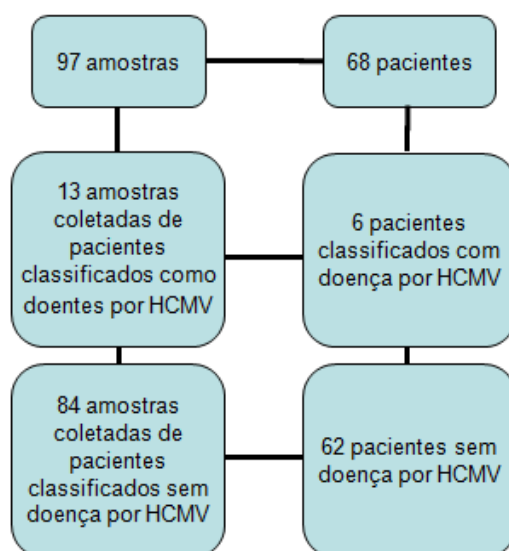


FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS/PACIENTES.
 FONTE: O autor, 2015.

Com relação à infecção pelo HIV, foram avaliadas a contagem de linfócitos T CD4+, carga viral e tempo de diagnóstico do HIV, nos pacientes de acordo com cada amostra coletada, sendo assim, os dados apresentados foram referentes ao momento de cada coleta de amostra no paciente (FIGURA 15; FIGURA 16; FIGURA 17). Quanto ao tempo de diagnóstico do HIV e aparecimento da doença por HCMV, foi observada a mediana em dias de 47 (IQR 9-1.509).

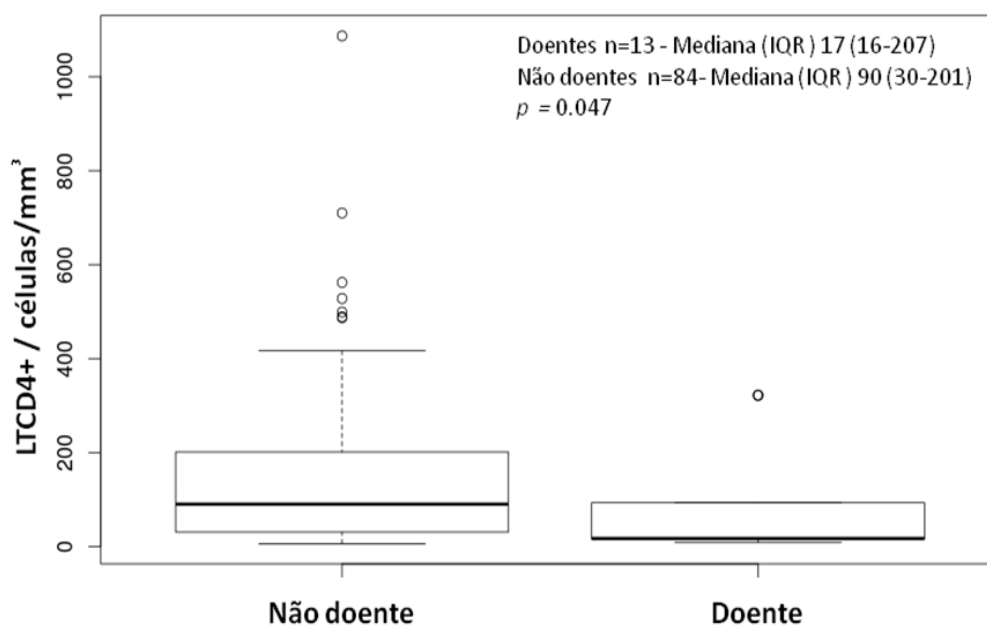


FIGURA 15 - CONTAGEM DOS LINFÓCITOS TCD4+, PACIENTES HIV+ CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.
 FONTE: O autor, 2015.

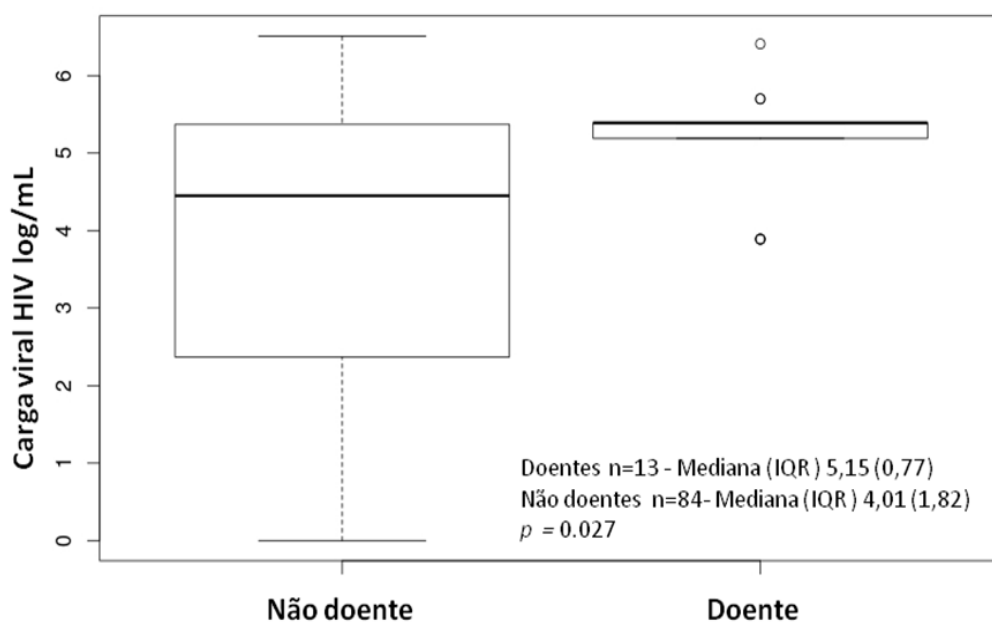


FIGURA 16 - CARGA VIRAL HIV, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.
 FONTE: O autor, 2015.

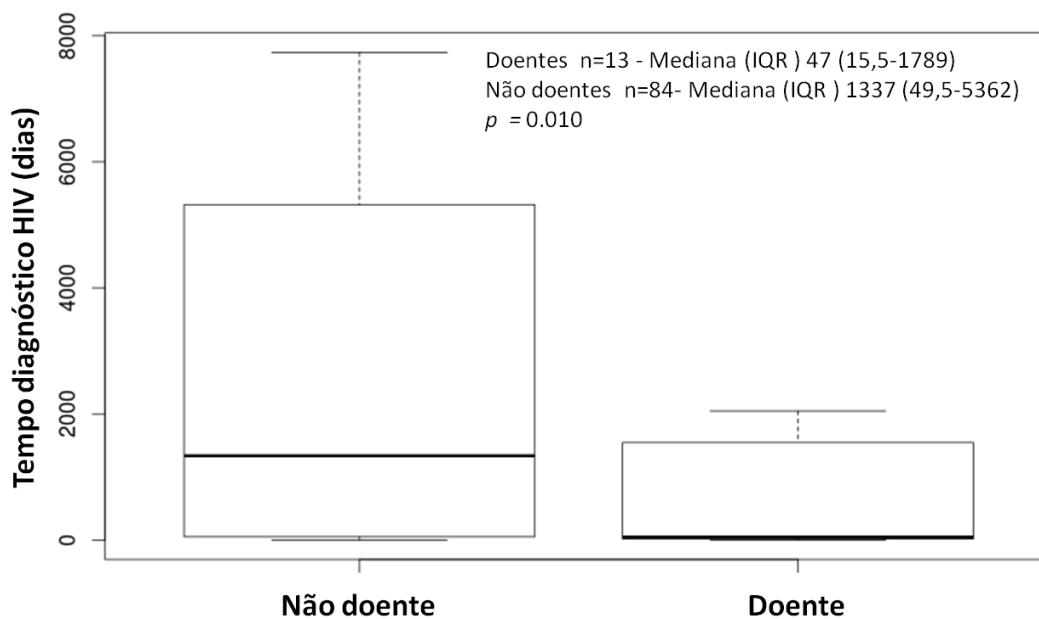


FIGURA 17 - TEMPO DE DIAGNÓSTICO DO HIV, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.
FONTE: O autor, 2015.

Outro ponto analisado foi o tempo de utilização da TARV antes da internação. Dos pacientes classificados com doença por HCMV, com exceção de uma, todos começaram a utilizar terapia antirretroviral para o HIV, no período de internação (FIGURA 18).

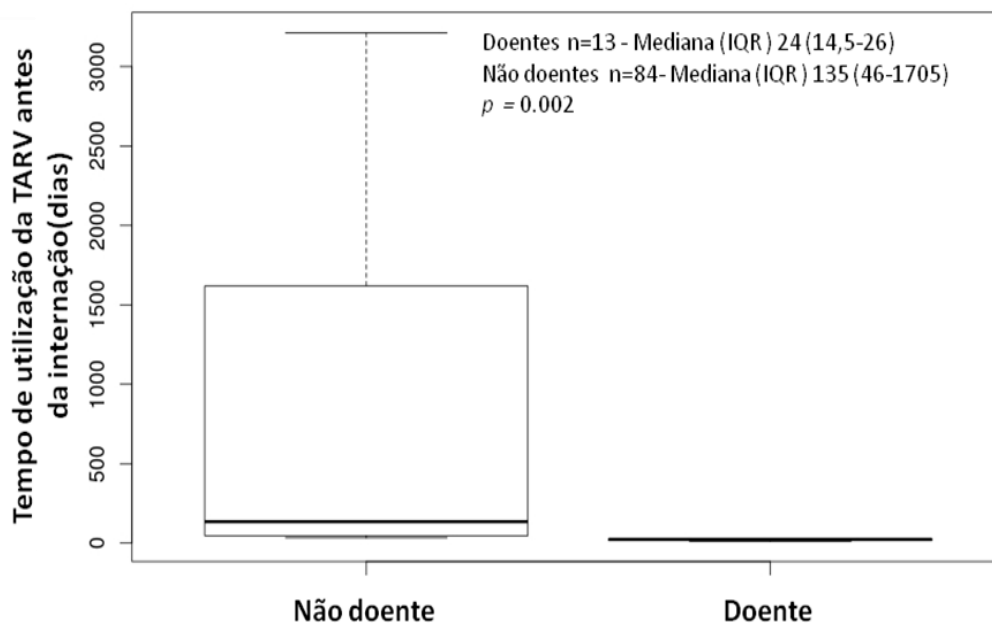


FIGURA 18 - TEMPO DE UTILIZAÇÃO DA TARV PARA HIV ANTES DA INTERNAÇÃO, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.
 FONTE: O autor, 2015.

4.2.1 Antigenemia e PCR em tempo real para citomegalovírus

Das 97 amostras coletadas, 26 (26,8%) apresentaram células positivas no ensaio de antigenemia e 45 (46,3%) foram detectadas na qPCR. A distribuição das amostras conforme a positividade nos testes é demonstrada na figura 19.

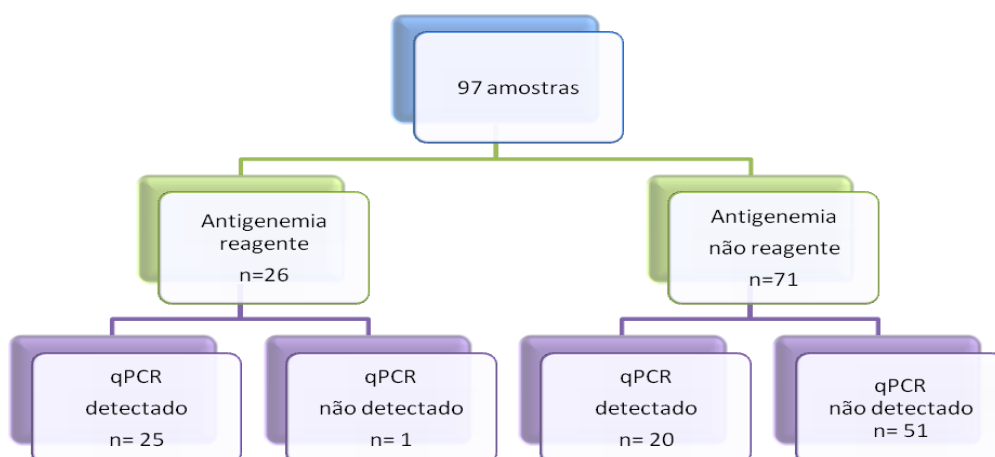


FIGURA 19 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS CONFORME RESULTADOS NOS TESTES DIAGNÓSTICOS.
 FONTE: O autor, 2015.

Na tabela 4, são apresentados os dados de distribuição das amostras positivas e negativas entre os pacientes classificados como doentes e não doentes e a comparação qualitativa entre os grupos, em ambos os grupos observa-se uma diferença significativa entre os resultados obtidos tanto por antigenemia quanto por PCR em tempo real.

TABELA 3 - RESULTADOS QUALITATIVOS DOS TESTES DE ANTIGENEMIA E PCR EM TEMPO REAL PARA HCMV SEPARADOS EM PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.

CATEGORIA	DOENTES n=13 (%)	NÃO DOENTES n=84 (%)	VALOR DE p
Antigenemia			
Reagente	10 (76,9)	16 (19,1)	<0.0001
Não Reagente	3 (23,1)	68 (80,9)	
qPCR			
Detectado	13 (100)	32 (38,1)	<0.0001
Não detectado	0 (0)	52 (61,9)	

FONTE: O autor, 2015.

Assim como os dados qualitativos, as análises dos dados quantitativos das amostras, nos ensaios de antigenemia e qPCR para HCMV, demonstraram diferença estatística significativa, se comparados os dados dos pacientes classificados como doentes e não doentes por HCMV (FIGURA 20, FIGURA 21, FIGURA 22).

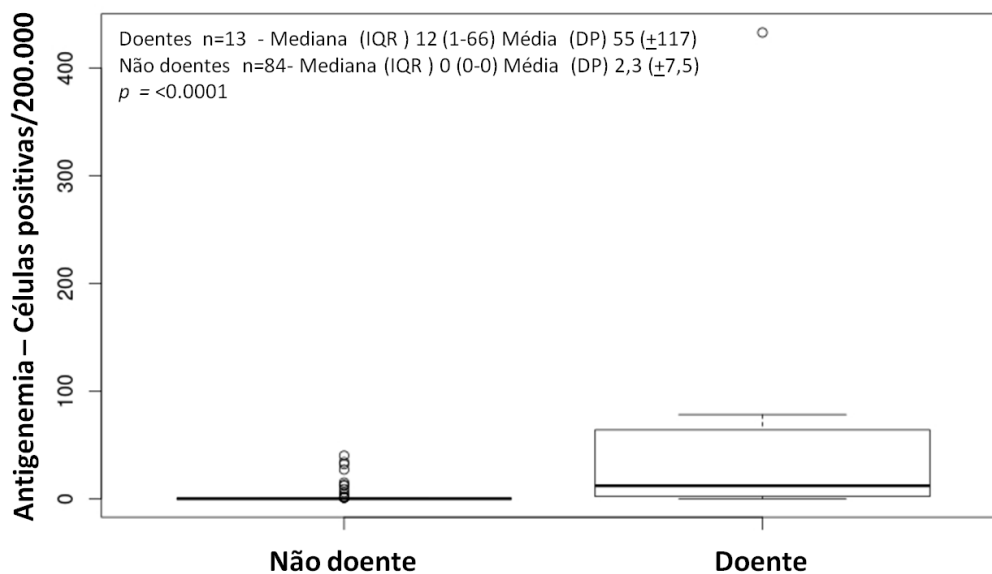


FIGURA 20 - COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DA ANTIGENEMIA PARA HCMV, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.
 FONTE: O autor, 2015.

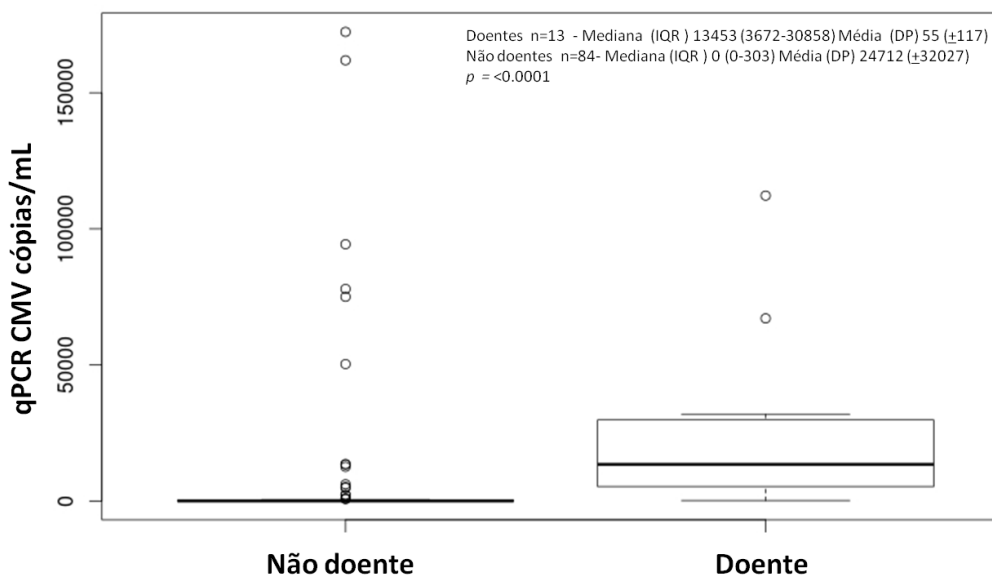


FIGURA 21 - COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DOS RESULTADOS DO PCR EM TEMPO REAL PARA HCMV, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.
 FONTE: O autor, 2015.

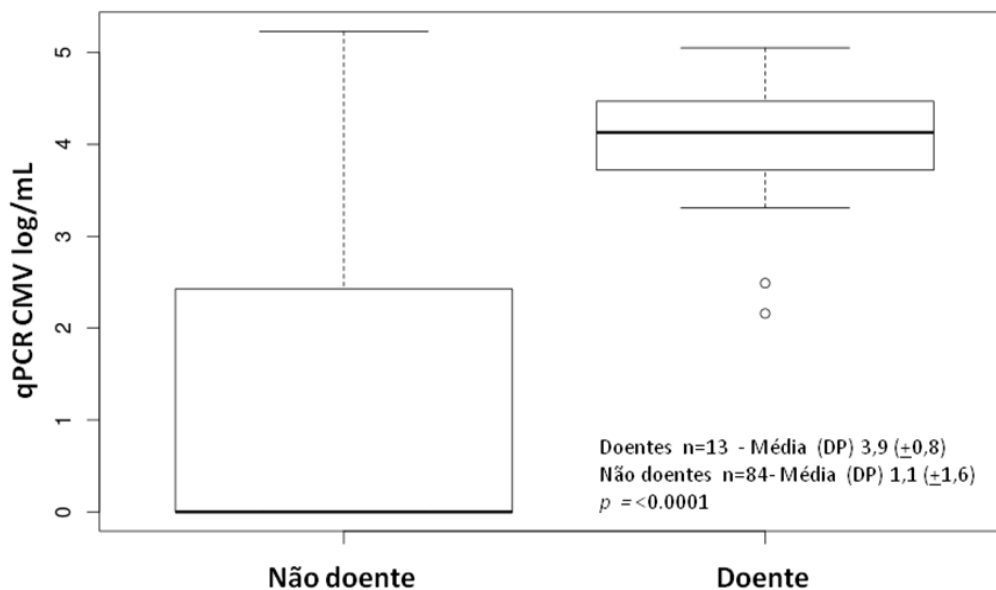


FIGURA 22 - COMPARAÇÃO QUANTITATIVA DOS RESULTADOS EM LOG DO PCR EM TEMPO REAL PARA HCMV, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.

FONTE: O autor, 2015.

Com base nos parâmetros anteriores e considerando como padrão-ouro a presença ou não de doença de acordo com critérios clínicos (introdução de terapia específica e resposta ao tratamento) foi realizada a avaliação do desempenho dos testes diagnósticos quanto aos critérios listados na tabela 5. Nesta avaliação a prevalência encontrada foi de 13% (IC95% 7 a 22%).

TABELA 4 - AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS ENSAIOS DE ANTIGENEMIA E qPCR PARA HCMV.

	Antigenemia	qPCR
Sensibilidade	77% (IC95% 45 a 93%)	100% (IC95% 71 a 100%)
Especificidade	80% (IC95% 70 a 88%)	61,9% (IC95% 50 a 72%)
Valor preditivo positivo	38% (IC95% 20 a 59%)	28% (IC95% 16 a 44%)
Valor preditivo negativo	95% (IC95% 87 a 98%)	100% (IC95% 91 a 100%)
Likelihood Ratio (LR+)	4 (IC95% 2,3 a 6,8)	2,62 (IC95% 1,99 a 3,44)
Likelihood Ratio (LR-)	0,28 (0,1 a 0,77)	0

FONTE: O autor, 2015.

Porém, considerando diferentes prevalências de indivíduos HIV positivos

com doença por HCMV, os valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN), podem apresentar valores diferentes, conforme os dados apresentados na tabela 6.

TABELA 5 - AVALIAÇÃO DOS VALORES PREDITIVOS POSITIVOS E NEGATIVOS EM DIFERENTES PREVALÊNCIAS NOS ENSAIOS DE ANTIGENEMIA E qPCR PARA HCMV.

Prevalência	Antigenemia VPP (%)	qPCR VPP (%)
2%	7	5
5%	17	12
10%	30	22
15%	41	31
Prevalência	Antigenemia VPN (%)	qPCR VPN (%)
2%	99	
5%	98	
10%	96	100
15%	95	

FONTE: O autor, 2015.

A análise de concordância e discordância entre os dois testes diagnósticos, utilizando o índice *kappa*, foi moderada $k=0,552$ com intervalo de confiança de 95% (IC 95% 0,397-0,707), sendo que a comparação qualitativa dos testes, demonstrou diferença estatística significativa (FIGURA 23).

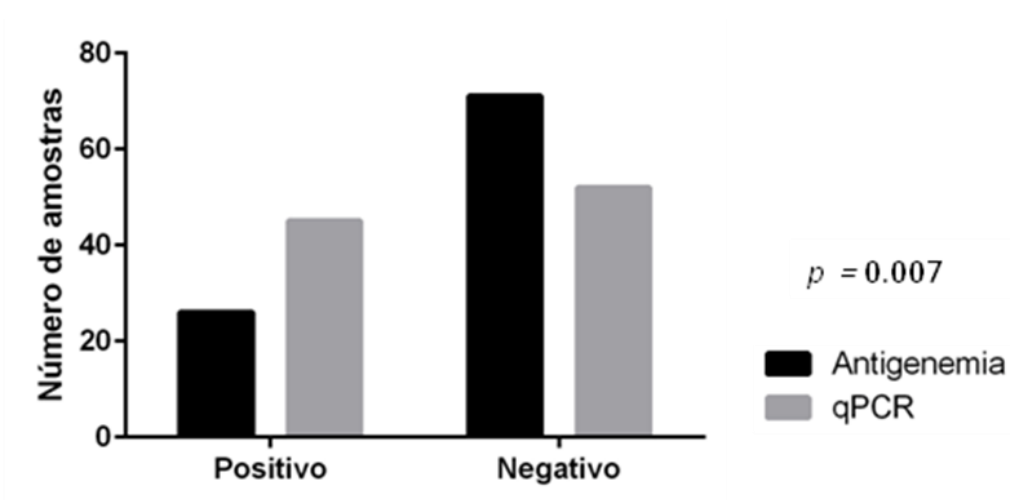


FIGURA 23 - COMPARAÇÃO QUALITATIVA DOS TESTES DE ANTIGENEMIA E PCR EM TEMPO REAL PARA HCMV.

FONTE: O autor, 2015.

A avaliação quantitativa da interferência ou relação da antigenemia e do qPCR para HCMV foi realizada pela análise da correlação. Para o qPCR foram analisados os resultados em cópias/mL que apresentou correlação moderada (FIGURA 24).

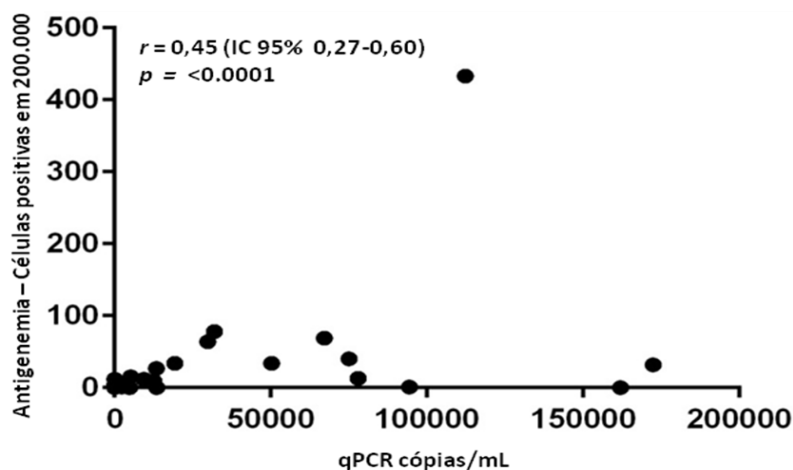


FIGURA 24 - CORRELAÇÃO DA ANTIGENEMIA E DO PCR EM TEMPO REAL (CÓPIAS/ML) PARA DIAGNÓSTICO DO HCMV
 FONTE: O autor, 2015.

Com o intuito de determinar um ponto de corte para o teste de antigenemia e carga viral do HCMV foram construídas curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC). Para a construção das mesmas foi utilizado o critério anterior, pacientes com e sem doença por HCMV e positividade nos testes antigenemia e qPCR.

Baseada na área abaixo da curva foi possível verificar que a antigenemia é um teste confiável para a determinação da presença ou ausência de doença por HCMV. O ponto de corte ajustado foi de 1,5 células em 200.000 leucócitos, sendo assim, valores acima deste ponto, estão associados à doença por HCMV. A sensibilidade apresentada neste ponto de corte é de 76,9% (IC 95% 54 a 99,8%) e especificidade de 86,9% (IC 95% 79,7 a 94,1%), com uma área abaixo da curva de 0,82 (FIGURA 25) (TABELA 7).

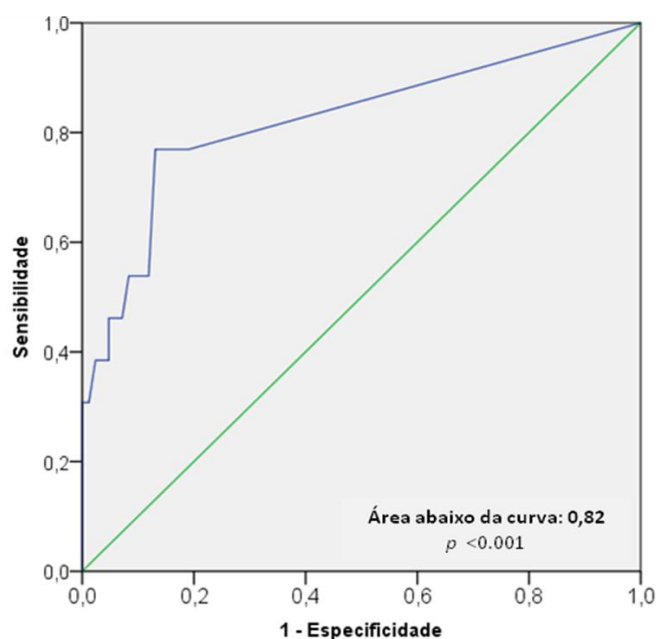


FIGURA 25 - CURVA ROC DOS RESULTADOS QUANTITATIVOS DA ANTIGENEMIA PARA HCMV.
 FONTE: O autor, 2015.

TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO COM BASE NO PONTO DE CORTE DA ANTIGENEMIA PARA HCMV.

Antigenemia (células positivas em 200.000 leucócitos)	Sem doença por HCMV Número de amostras (especificidade)	Com doença por HCMV Número de amostras (sensibilidade)
≤ 1,5	73 (86,9%)	3 (23,1%)
> 1,5	11 (13,1%)	10 (76,9%)
Total	84	13

FONTE: O autor, 2015.

Para a realização da curva ROC da qPCR para HCMV, foram incluídas somente amostras que obtiveram valores de detecção viral maiores do que zero, totalizando 45 amostras, destas 13 (28,9%) foram coletadas de pacientes com doença por HCMV e 32 (71,1%) amostras de pacientes sem doença (TABELA 8). Foi possível, por meio do ajuste da curva ROC, determinar o ponto de corte de 3,715 log/mL, com valores iguais ou acima deste ponto associados com doença por HCMV, com uma área abaixo da curva de 0,7 (FIGURA 26). A sensibilidade apresentada neste ponto é de 76,9% (IC 95% 54 a 99,8%) e especificidade de 68,8% (IC 95% 52,7 a 84,8%) (TABELA 9).

TABELA 7 - COMPARAÇÃO RESULTADOS QUANTITAVOS qPCR – AMOSTRAS PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.

Doença por HCMV	qPCR HCMV (log/mL)						Valor de p
	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	
Não	32	3,12	2,90	1,56	5,23	1,19	0,035
Sim	13	3,93	4,13	2,16	5,05	0,85	

FONTE: O autor, 2015.

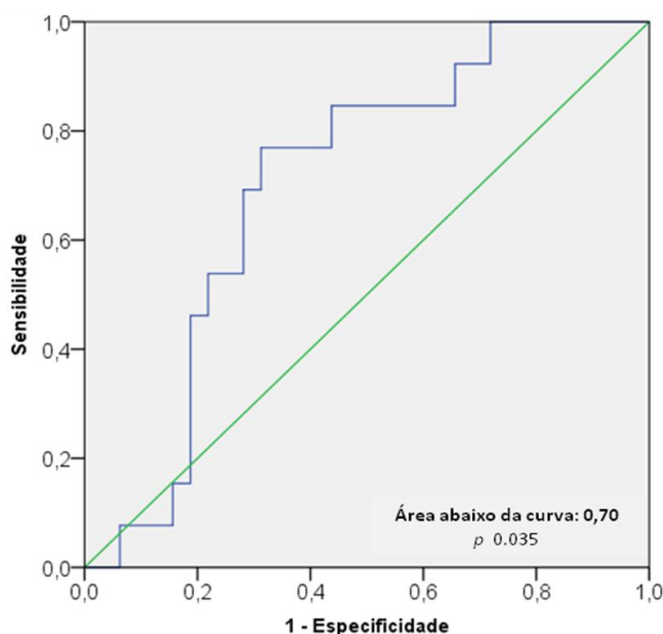


FIGURA 26 - CURVA ROC DOS RESULTADOS QUANTITATIVOS DA qPCR PARA HCMV.
FONTE: O autor, 2015.

TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO COM BASE NO PONTO DE CORTE DA qPCR PARA HCMV.

qPCR HCMV (log/mL)	Sem doença por HCMV Número de amostras (especificidade)	Com doença por HCMV Número de amostras (sensibilidade)
$\leq 3,715$	22 (68,8%)	3 (23,1%)
$> 3,715$	10 (31,2%)	10 (76,9%)
Total	32	13

FONTE: O autor, 2015.

Porém, quando realizamos a comparação das metodologias, plotando uma nova curva ROC, ambas apresentam áreas abaixo das curvas similares (FIGURA 27). Para a confecção da mesma foram utilizados somente casos de pacientes que apresentavam resultados nas duas variáveis: antigenemia e qPCR. Testou-se a hipótese nula de que as áreas abaixo das curvas (antigenemia e qPCR) são iguais,

versus a hipótese alternativa de áreas diferentes, apresentando não rejeição da hipótese nula $p = 0,710$.

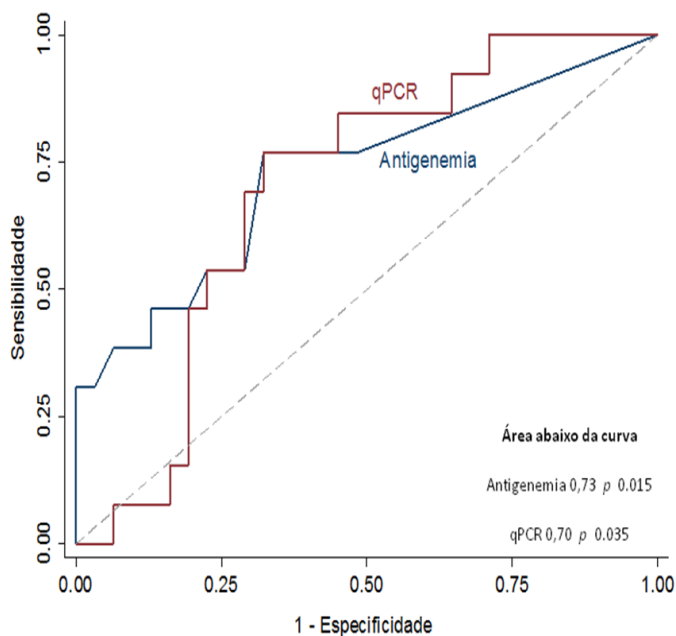


FIGURA 27 - CURVA ROC COM COMPARAÇÃO DAS ÁREAS ABAIXO DAS CURVAS COM OS RESULTADOS QUANTITATIVOS DA ANTIGENEMIA E DO qPCR PARA HCMV.
 FONTE: O autor, 2015.

4.2.2 Amostras separadas por grupos

As amostras foram separadas em seis grupos em função da positividade nos testes de antigenemia e qPCR e doença por citomegalovírus (TABELA 10). Os critérios de definição de doença utilizados foram aqueles anteriormente descritos, pacientes que apresentaram infecção por órgão alvo e/ou uso de ganciclovir.

A distribuição do número de amostras por grupo pode ser visualizada na figura 28.

TABELA 9 - DESCRIÇÃO DA SEPARAÇÃO DOS GRUPOS.

GRUPO	ANTIGENEMIA	qPCR	DOENÇA POR HCMV
1	Não reagente	Não detectado	Não
2	Não reagente	Detectado	Não
3	Não reagente	Detectado	Sim
4	Reagente	Detectado	Não
5	Reagente	Detectado	Sim
6	Reagente	Não detectado	Não

FONTE: O autor, 2015.

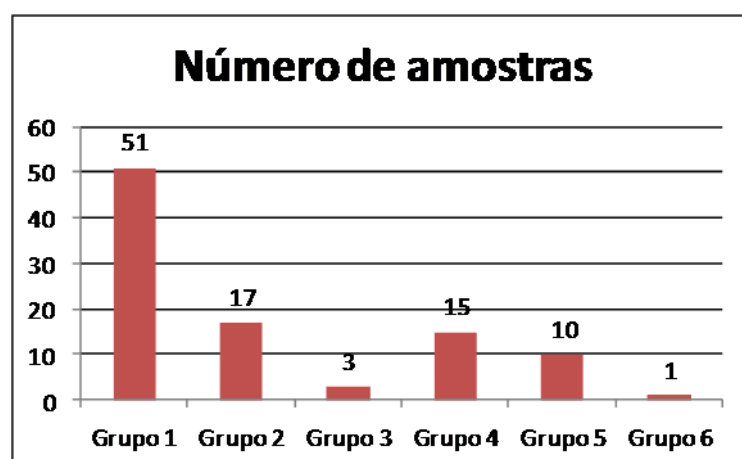


FIGURA 28 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS POR GRUPO.

FONTE: O autor, 2015.

Como a divisão dos grupos foi baseada nas amostras utilizadas nos testes diagnósticos e doença por HCMV nos pacientes, os mesmos podem ter mais de uma amostra por grupo ou ainda amostras representadas em grupos diferentes.

4.2.2.1 Grupo 1 – Amostras negativas (pacientes sem doença)

Neste grupo foram incluídas 51 amostras (52,5%) que não apresentaram células reagentes na antigenemia e resultado não detectado na qPCR para HCMV.

As amostras foram coletadas de 47 pacientes, quatro tiveram duas coletas cada. Do total de pacientes, dois (3,9%) evoluíram para o óbito. Sendo um por meningite criptocócica e outro por caquexia e insuficiência respiratória aguda.

4.2.2.2 Grupo 2 – Amostras não reagentes na antigenemia e detectadas na qPCR (pacientes sem doença)

Dezessete amostras (17,5%) foram não reagentes no teste da antigenemia e apresentaram presença de DNA viral, porém os pacientes não apresentaram evidência de doença por HCMV.

Neste grupo a média dos valores do qPCR encontrados foi 2,56 log/mL (DP \pm 1,02).

4.2.2.3 Grupo 3 – Amostras não reagentes na antigenemia e detectadas na qPCR (pacientes com doença).

Neste grupo encontram-se três amostras (3%), com média de carga viral de 3,31 (DP \pm 0,82).

Um dos pacientes incluídos neste grupo realizou duas coletas no mesmo período de internação, sendo que em ambas o paciente apresentava baixa contagem no número de leucócitos $1,390 \times 10^3 \mu\text{l}$ e $0,830 \times 10^3 \mu\text{l}$ respectivamente. O paciente apresentava meningite criptocócica e evoluiu para piora dos seus sintomas, sendo encaminhado para UTI e foi a óbito. O diagnóstico de HCMV foi constatado após a morte. Este paciente já havia sido internado anteriormente, 12 dias antes (Grupo 1).

Já a outra amostra incluída neste grupo, foi coletada de uma paciente que foi internada duas vezes no período do estudo, sendo que na primeira internação já havia apresentado doença por HCMV (grupo 5). Nesta segunda internação apresentou uma possível reativação pelo vírus com uma amostra incluída neste grupo 3, como ela também apresentava doença por herpes simples, foi administrado na internação o ganciclovir juntamente com o aciclovir. Como nesta internação, a paciente apresentou uma possível reativação do HCMV, foi indicada posteriormente a utilização de terapia profilática com ganciclovir pelo período de seis meses.

4.2.2.4 Grupo 4 – Amostras reagentes na antigenemia e detectadas na qPCR (pacientes sem doença)

Quinze amostras (15,4%) foram reagentes e detectadas nos testes de antigenemia e qPCR, respectivamente, porém os pacientes apresentaram somente a reativação, sem evidência de doença pelo HCMV.

Este grupo apresentou mediana do resultado da antigenemia de 9 células em 200.000 (IQR 1-27) e média de carga viral 3,75 log/mL (\pm 1,06).

4.2.2.5 Grupo 5 – Amostras reagentes na antigenemia e detectadas na qPCR (pacientes com doença)

Neste grupo foram incluídas dez amostras, representando 10,3% do total das amostras coletadas, apresentando média do resultado da antigenemia de 27 células em 200.000 (IQR 2-71) e média da carga viral de HCMV de 4,12 log/mL (\pm 0,80).

Um dos pacientes deste grupo apresentou uma primeira amostra no período de internação que foi não reagente na antigenemia e não detectada na qPCR com diagnóstico de síndrome de Zollinger Ellison e úlceras gástricas, porém, após a segunda coleta, ambos os testes apresentaram positividade, sendo que, houve melhora dos sintomas após o uso de ganciclovir por 14 dias.

Outra paciente apresentou uma alta contagem de células positivas na antigenemia e apesar de não ter doença por órgão-alvo, após a utilização do ganciclovir por 14 dias, obteve uma melhora do quadro geral com alta hospitalar.

Três outras amostras do grupo foram coletadas de uma paciente que apresentou HCMV pulmonar (paciente 34) com biopsia indicando a inclusão citomegálica (FIGURA 29) e pneumonia diagnosticada pela tomografia de tórax (FIGURA 30), posteriormente evoluiu com retinite, que melhorou após a utilização do ganciclovir por 14 dias.

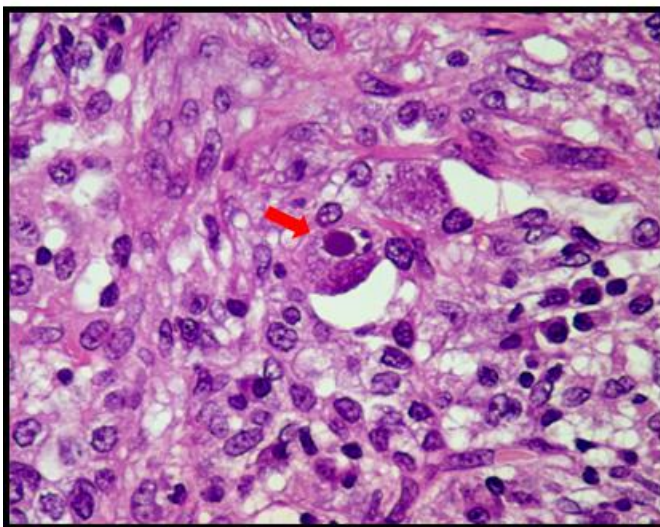


FIGURA 29 - BIOPSIA PULMONAR COM INCLUSÃO CITOMEGÁLICA.

FONTE: O autor, 2015.

NOTA: Na seta vermelha está indicada a inclusão citomegálica.

LEGENDA: Exame realizado no setor de anatomia patológica do HC-UFPR.



FIGURA 30 - TOMOGRAFIA DE TÓRAX DA PACIENTE COM HCMV PULMONAR.

FONTE: O autor, 2015.

LEGENDA: Exame realizado na seção de tomografia do HC-UFPR.

Outra amostra foi coletada de um paciente que no momento da internação apresentou retinite com necrose de retina, sendo medicado por via endovenosa pelo período de 15 dias com ganciclovir.

A última amostra do grupo foi coletada de um paciente, que na internação foi

diagnosticado com infecção pelo HIV além de doença neurológica em decorrência desta infecção, apesar da paciente não apresentar doença por órgão-alvo no momento da coleta da amostra, foi considerado com doença por HCMV, após a utilização do ganciclovir por dez dias ela obteve melhora e recebeu alta. Porém a paciente foi novamente internada treze dias após alta, com possível reativação da infecção pelo HCMV, descrita anteriormente no grupo 3.

4.2.2.6 Grupo 6 – Amostra reagente na antigenemia e não detectado na qPCR (paciente sem doença)

Neste grupo há um paciente com uma amostra, representando 1% do total das amostras coletadas.

4.2.2.7 Comparação entre os grupos

Na tabela 11, são apresentados os dados relativos à média e mediana dos valores encontrados entre os grupos, com relação à infecção pelo HIV e monitoramento da infecção pelo HCMV.

TABELA 10 - CARACTERÍSTICAS REFERENTES AOS PACIENTES/AMOSTRAS COLETADAS SEPARADAS POR GRUPOS

CATEGORIA	Grupo 1 n=51	Grupo 2 n=17	Grupo 3 n=3	Grupo 4 n=15	Grupo 5 n=10	Grupo 6 n=1	Valor de p
Contagem de LTCD4+ em células/mm³	129 (53-299)	67 (28-159)	17 (9-17)	28 (20-87)	40 (16-322)	109	> 0,999
Mediana (IQR)							
Carga viral para HIV (log/mL)	3,74 (1,91)	4,75 (1,38)	5,59 (0,19)	3,75 (1,06)	5,02 (0,84)	2,77	0,154
Média (±DP)							
Tempo de diagnóstico de HIV (dias)	1820 (364-5964)	1287 (24-3029)	117 (27-160)	260 (32-5137)	35 (11-2035)	96	0,211
Mediana (IQR)							
Eritrócitos x10⁶µl	3,77 (0,81)	4,4 (0,65)	3,04 (0,79)	3,73 (0,61)	3,95 (0,47)	2,97	0,147
Média (±DP)							
Leucócitos x10³µl	5390 (3410-6820)	3870 (2915-6085)	1390 (830-14269)	4380 (3320-7560)	4540 (3150-7888)	3660	> 0,999
Mediana (IQR)							
Antigenemia*							
Mediana (IQR)	0	0	0	9 (1-27)	27 (2-71)	4	0,05
qPCR HCMV (log/mL)	0	2,56 (1,02)	3,31 (0,82)	3,75 (1,06)	4,12 (0,80)	0	0,45
Média (±DP)							

FONTE: O autor, 2015.

NOTA: * Número de células reagentes presentes em 200.000 leucócitos.

4.2.3 Tempo de internação, análise de sobrevida e mortalidade

Para estas análises foram classificados como os dados dos 68 pacientes, destes seis (8,8%) tiveram doença por HCMV e 62 (91,2%) não tiveram doença por HCMV.

Com relação ao tempo de internação, a média encontrada para os pacientes doentes foi de 30 (±22,4) dias, já para os pacientes classificados como não doentes

a média foi 15,4 ($\pm 11,8$) dias, sendo que a distribuição entre os dois apresentou $p < 0.0001$ (FIGURA 31).

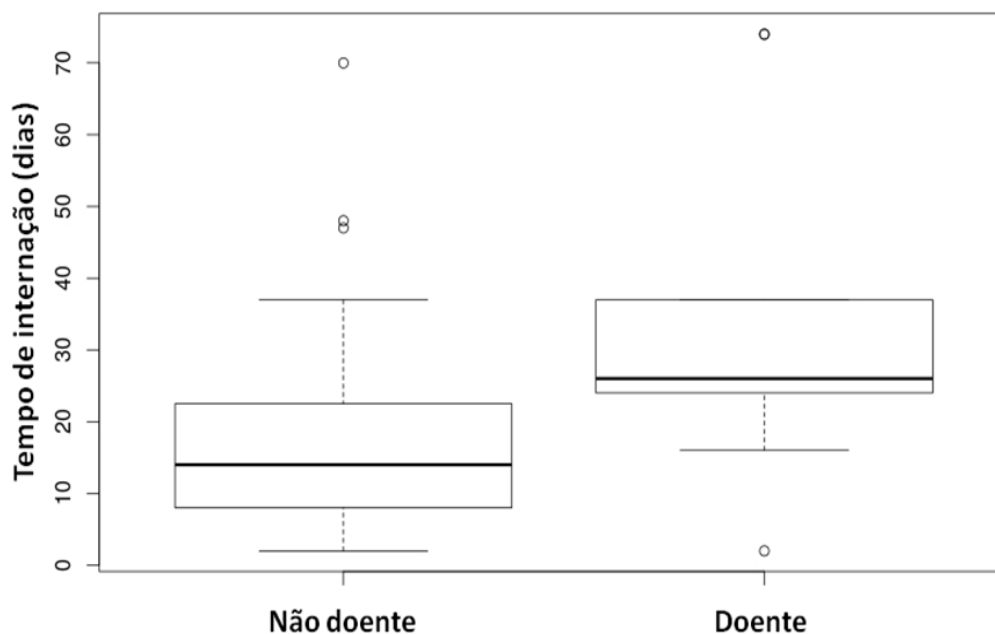


FIGURA 31 - TEMPO DE INTERNAÇÃO (DIAS), PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.
 FONTE: O autor, 2015.

Para a análise da sobrevida, foi comparado o tempo em dias, desde a internação até o óbito ou censura (alta do paciente) entre os pacientes doentes e não doentes. Como alguns pacientes foram internados mais de uma vez ou por serem classificados como doentes ou não doentes em momentos diferentes no período da internação, optou-se por contar o tempo a partir do diagnóstico do HCMV (pacientes doentes), excluindo-se as outras datas. Já para os pacientes classificados como não doentes por HCMV, foram feitas duas análises uma contando a partir da primeira amostra coletada e outra na última, porém como ambas ficaram similares optou-se por utilizar a que se usou como critério de contagem de tempo a partir da data da coleta da primeira amostra.

Dos 62 pacientes classificados como sem doença por HCMV, dois (3,2%) evoluíram para o óbito na internação (dias 4 e 14) pacientes 5 e 7 da tabela 12. Dos seis pacientes classificados com doença por HCMV, um (16,7%) evoluiu para o óbito na internação (dia 74) paciente 15 da tabela 12 (FIGURA 32).

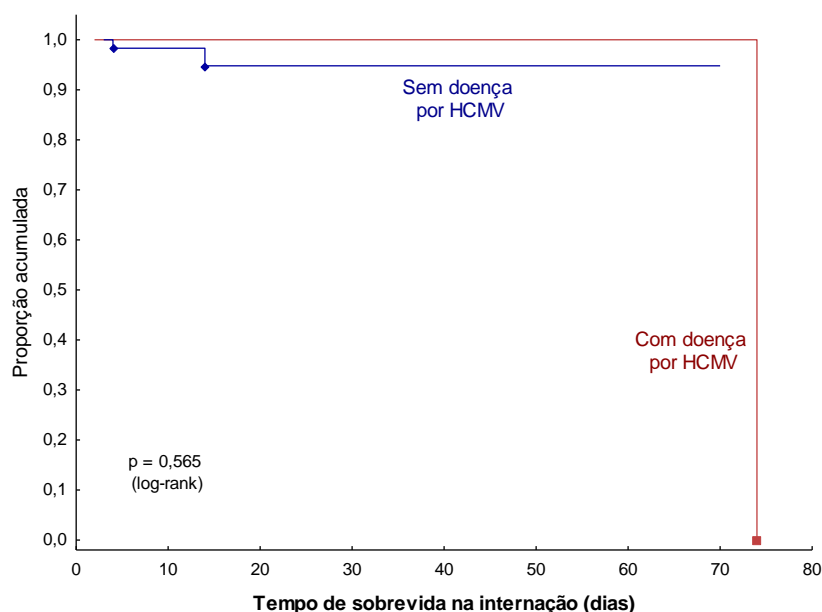


FIGURA 32 - ANÁLISE DE SOBREVIDA NO PERÍODO DA INTERNAÇÃO, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.
FONTE: O autor, 2015.

TABELA 11 - PERÍODO E CAUSA DOS ÓBITOS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO.

Período do óbito	Paciente (identificação conforme apêndice 2)	Causa óbito
Internação	5	Meningite criptocócica
	7	Caquexia e insuficiência respiratória aguda
	15	Meningite criptocócica e infecção ativa por HCMV
6 meses após a alta	3	Micobacteriose atípica e com hepatite aguda
	14	Insuficiência respiratória aguda e tuberculose pulmonar
	36	Neurotoxoplasmose
	56	Pneumonia e meningite não especificada
	57	Septicemia, aspergilose não especificada e meningoencefalite por Toxoplasma
	61	Septicemia e insuficiência respiratória aguda

FONTE: O autor, 2015.

Foi também verificada a mortalidade após seis meses de internação, utilizando o critério anterior. Sendo que dos 65 pacientes que tiveram alta após a internação, foi constatado o óbito em seis (9,2%). O tempo de acompanhamento em

dias de acordo com os grupos é demonstrado na tabela 13.

TABELA 12 - TEMPO DE ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES APÓS ALTA, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.

Doença por HCMV	Tempo de acompanhamento (dias)					
	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Não	60	171,7	182	8	184	37,7
Sim	5	162,2	181	81	184	45,4

FONTE: O autor, 2015.

Dos 60 pacientes classificados como sem doença por HCMV, cinco (8,3%) (pacientes 3, 14, 36, 57 e 61 da tabela 12) foram a óbito após a internação (dias 8, 28, 54, 56 e 121). Entre os cinco pacientes classificados com doença por HCMV, um (20%), paciente 56 da tabela 12, foi a óbito após a internação (dia 81) (FIGURA 33).

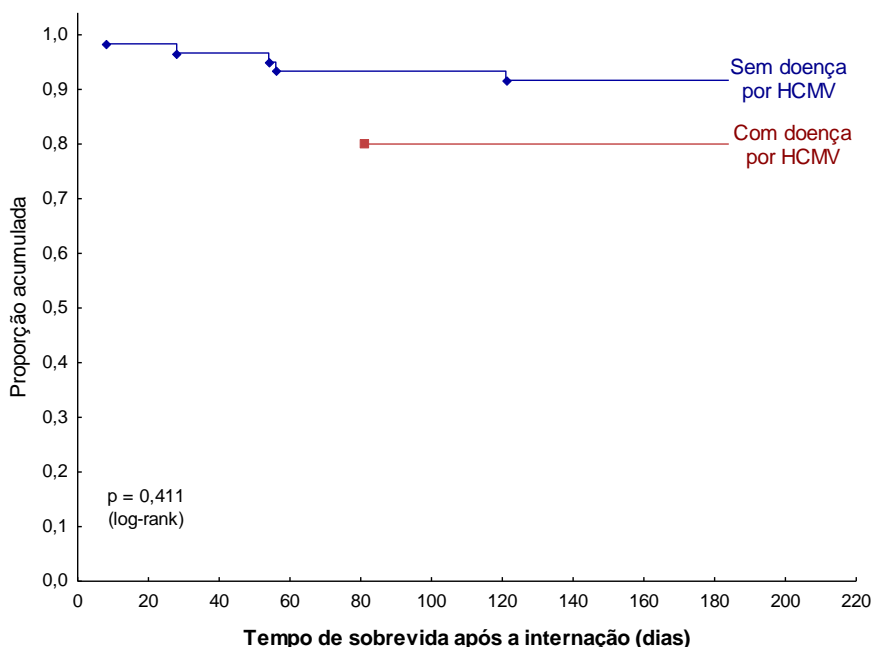


FIGURA 33 - ANÁLISE DE SOBREVIDA APÓS SEIS MESES DO PERÍODO DA INTERNAÇÃO, PACIENTES CLASSIFICADOS COMO DOENTES E NÃO DOENTES POR HCMV.

FONTE: O autor, 2015.

5 DISCUSSÃO

A doença por HCMV em indivíduos imunocomprometidos, transplantados, portadores do HIV ou com infecção congênita é frequentemente descrita, pois apresenta alta morbidade e mortalidade. Sendo que os casos mais graves de doença por HCMV têm sido descritos em indivíduos portadores do HIV. Mesmo ocorrendo o declínio do aparecimento de doença por HCMV, após utilização da TARV, nestes indivíduos, ainda é possível verificar uma maior progressão da AIDS e morte (BREDA *et al.*, 2013; HO, 2008).

Outro fator importante da infecção do HCMV, em portadores do HIV é que além de sua patogenicidade direta, em infecções ativas que causam comprometimento de órgãos-alvos e morte, o vírus possui a característica de se manter em estado latente no indivíduo, podendo apresentar replicação sem doença, sendo este fato relacionado com a progressão da AIDS, contribuindo para o aumento da ativação imune persistente, sendo relatada como indutor de aterosclerose, imunossenescência e envelhecimento (FIELDING *et al.*, 2011; HUNT *et al.*, 2011).

Neste contexto, a co-infecção HCMV/HIV é um desafio para os clínicos que atendem estes pacientes, necessitando diferenciar replicação ou doença por HCMV. Sendo o diagnóstico baseado em sintomas clínicos em conjunto com os ensaios laboratoriais, que possam ser utilizados para a detecção precoce do HCMV, bem como diferenciar doença ativa de infecção e possam ser utilizados no acompanhamento destes pacientes. A investigação laboratorial busca auxiliar o clínico na decisão de intervenção terapêutica, profilática ou preemptiva visando a redução das manifestações clínicas da doença por HCMV e, conseqüente, progressão da AIDS (CROUGH; KHANNA, 2009; JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011).

Observou-se que, entre os pacientes internados no setor de infectologia do HC-UFPR, portadores do HIV, que fizeram pesquisa para HCMV durante o período da pesquisa, foram 68, sendo que destes foram coletadas 97 amostras, com média de 1,4 amostras por paciente, sendo que os pacientes classificados com doença por HCMV coletaram mais amostras do que os classificados como não doentes por HCMV. Em um estudo semelhante, também realizado em hospital escola, foram coletadas 2,3 amostras, por paciente internado, com AIDS e sem suspeita de HCMV

(TERRA *et al.*, 2000). Demonstrando o perfil dos pacientes internados, que acabam realizando mais de uma coleta durante o período de internação, para confirmação do diagnóstico ou mesmo monitoramento da terapia. Também, como neste estudo, alguns pacientes foram internados mais de uma vez durante o período de coleta de dados/amostras. Sendo que, uma das limitações encontradas na inclusão dos pacientes no estudo foi à baixa rotatividade no setor, visto que os pacientes internados acabam ficando por muito tempo ou em quartos isolados o que diminui o número de leitos disponíveis para outras internações.

Quanto à idade dos participantes do estudo, observa-se a presença de um grupo jovem, com média de 37,7 anos. Em um artigo de colaboração, que incluiu estudos prospectivos de coorte, realizado em seis países europeus e nos Estados Unidos, de indivíduos HIV positivos, que foram diagnosticados com doenças oportunistas, como criptococose, tuberculose, HCMV entre outros, foi encontrada a mediana de 36 anos (Colaboração HIV-CAUSAL, 2014). Também em outro estudo de Coorte, realizado por Chevret *et al.*, 1999, na França, com indivíduos portadores do HIV que realizaram o ensaio de antigenemia para HCMV, apresentou indivíduos com mediana de idade de 37,5 anos. Porém em ambos os estudos ocorreu prevalência maior pelo gênero masculino, sendo que, nos dados encontrados pelo nosso grupo, a distribuição por gênero não demonstrou diferença. Conflitando, também, com dados levantados pelo boletim epidemiológico HIV/AIDS (CURITIBA, 2014), onde a proporção relatada de AIDS é três casos em homens para cada um em mulheres, porém, esta diferença é justificada, pelo fato de em todos os estudos ser verificada a doença por HCMV em indivíduos com HIV e não a prevalência da HIV/AIDS, como relatado por Curitiba, 2014.

Entre os indivíduos incluídos neste estudo, pode-se observar que a maioria era procedente da cidade de Curitiba e da raça/cor branca. Quanto ao nível de escolaridade (tempo de estudo) os pacientes relataram com mais frequência o tempo de estudo de 4 a 7 anos (40%) e 8 a 11 anos (38,5%). O que corrobora com os dados encontrados, de 2007 até 2013, nas fichas de Notificação/Investigação de AIDS, que apresentaram distribuição maior dos casos em pessoas brancas e quanto ao tempo de estudo apresentaram até oito anos (Curitiba, 2014).

Referente ao comportamento de risco para a infecção pelo HIV, a maioria negou o uso de drogas injetáveis (UDI), dados de Curitiba, 2014, reforçam que a transmissão por UDI tem diminuído no decorrer dos anos, decorrente do aumento da

utilização de crack. Com relação ao comportamento sexual, foi encontrada prevalência maior de heterossexuais, sendo que dentre os pacientes que se relataram homossexuais, sete eram do gênero masculino e dois feminino. Já o número de parceiros sexuais relatado com maior frequência foi de um a dois por ano. Dos casos de AIDS registrados desde 1984, nas mulheres, 80,4% decorreram de relações heterossexuais com pessoas infectadas pelo HIV, entre os homens 28,8% em relações heterossexuais, 26,3% homossexuais e o 10,8% bissexuais (CURITIBA, 2014).

Após a infecção pelo HIV, integração do vírus com a célula e do DNA viral no genoma do hospedeiro, são produzidas citocinas e proteínas virais que são tóxicas para os linfócitos T CD4+ do hospedeiro. Quando ocorre a evolução do estágio assintomático ao dano no sistema imunológico, com redução dos linfócitos T CD4+, culmina com a AIDS (COHEN *et al.*, 2008). Os casos mais graves de doença por HCMV têm sido descritos em pacientes com AIDS, ocorrendo quando a contagem de linfócitos T CD4+ é inferior a 100 células/ μ l (HO, 2008). No momento da avaliação, dos pacientes incluídos no estudo, a quantificação dos linfócitos T CD4+, apresentou mediana de 95 células/ mm^3 e carga viral do HIV com média de 4,16 log/mL, sendo então, pacientes mais susceptíveis a infecções oportunistas.

Dentro deste contexto, os pacientes internados no setor de infectologia do HC-UFPR, apresentaram diagnósticos diferentes e múltiplos, como pode ser observado no apêndice 2, ocorrendo manifestações como a tuberculose, infecções fúngicas disseminadas, doença muco-cutânea, infecções no sistema nervoso central, entre outros, conforme Jaffar *et al.*, 2004, manifestações que são comuns em pacientes com AIDS, o que torna a correlação da presença de replicação do citomegalovírus com a doença por este patógeno bastante complexa.

Após a análise dos dados demográficos gerais da população estudada, um dos desafios foi realizar o diagnóstico e separação dos amostras/pacientes que apresentaram doença ativa por HCMV, por se tratarem de pacientes graves, com múltiplos diagnósticos. Foram utilizados como critério de definição de doença por HCMV, excluindo os que tinham somente replicação, os pacientes que apresentaram doença por órgão alvo confirmada e/ou uso de ganciclovir com melhora dos sintomas, por decisão clínica. Sendo que a terapia antiviral foi administrada com base no monitoramento dos pacientes quanto à infecção pelo HCMV, por meio da antigenemia, do qPCR, dos achados anatomopatológicos

aliados a melhora dos pacientes. Ainda, foi realizada a separação por amostras de pacientes que apresentavam doença por HCMV, pelo fato dos pacientes terem apresentado doença em momentos diferentes no período da internação e/ou também por terem sido internados mais de uma vez durante o período do estudo e terem sido classificados com doença por HCMV em momentos diferentes no período da internação. Este foi um dos desafios encontrados, pois como já citado anteriormente, os pacientes apresentaram várias manifestações clínicas no decorrer do período de internamento, aliado ao fato da não realização da imuno-histoquímica para HCMV, teste não disponível no hospital, que poderia auxiliar no diagnóstico do HCMV com mais precisão nestes pacientes. Deste modo encontrou-se uma prevalência de doença por HCMV, de 13,4%. Em estudo similar, de 270 pacientes com AIDS sem suspeita de doença por HCMV, encontrou-se 7,4% dos pacientes com manifestações relacionadas ao HCMV, sendo o diagnóstico realizado clínica e/ou histologicamente (TERRA *et al.*, 2000).

Com relação ao histórico de infecção pelo HIV, sendo divididos em amostras de pacientes classificados com e sem doença por HCMV, no momento da coleta das amostras, foram avaliadas, a contagem de linfócitos T CD4+, carga viral e tempo de diagnóstico do HIV. Em todas as análises os resultados apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Na contagem dos linfócitos T CD4+ os pacientes classificados com doença por HCMV apresentaram mediana de 17 células/mm³ (IQR 16-207) sendo que os considerados não doentes apresentaram mediana de 90 células/mm³ (IQR 30-201), como já relatado anteriormente os pacientes incluídos no estudo foram os portadores do HIV que estiveram internados no setor de infectologia do Hospital de Clínicas da UFPR, uma das características do serviço é o atendimento a pacientes graves, normalmente encaminhados de unidades básicas de saúde e com abertura recente do diagnóstico de AIDS, por isso encontrou-se baixa contagem de CD4+, se o mesmo estudo fosse realizado com pacientes atendidos no ambulatório do hospital, provavelmente seria observada contagem superior, por se tratarem de pacientes em melhor estado imunológico. Em um estudo similar realizado com pacientes internados em UTI, onde os critérios de inclusão foram presença de carga viral para HCMV no plasma e AIDS, a mediana da contagem de linfócitos T CD4+ foi 29 células/ μ L (IQR 5-55) assemelhando-se a mediana encontrada nos pacientes definidos como doentes neste estudo, sendo que todos os pacientes incluídos, definidos como doentes por HCMV, também,

similarmente, apresentaram carga viral para HCMV (MAYAPHI *et al.*, 2014). De acordo com Crough; Khanna, 2009, a contagem de linfócitos T CD4+ inferior a 100 células/mm³ é um importante fator de risco para aparecimento de doença por HCMV em pacientes com HIV e ainda, segundo, Terra *et al.*, 2000, pacientes que apresentam contagem de T CD4+ <50 células/mm³ a doença por HCMV, pode ocorrer em 40% dos casos. Já com relação à carga viral para o HIV os pacientes classificados com doença por HCMV apresentaram mediana de 5,15 log/mL com diferença aproximada de um log dos classificados como não doentes por HCMV. Em um estudo realizado por Durier *et al.*, 2013, com pacientes ambulatoriais tailandeses, onde foi realizada a análise da presença de DNA de HCMV, o grupo encontrou uma carga viral para HIV de 4,9 log/mL (IQR 4,6-5,4), nos pacientes ambulatoriais, com contagem de TCD4+ inferior a 200 células/mL, porém este valor encontrado foi relatado em todo o grupo de pesquisa, sem relato dos valores separando em pacientes que apresentaram presença de DNA do HCMV dos que não apresentaram como foi realizado no presente estudo.

Quanto ao tempo do diagnóstico do HIV, podemos verificar que os pacientes classificados com doença por HCMV foram aqueles que apresentaram mediana mais baixa e com diferença estatística significativa frente aos não doentes. Fato que, também, pode ser verificado com relação à utilização de TARV, sendo que os pacientes classificados como doentes por HCMV, com exceção de uma, começaram a utilização de TARV no período do internamento, apresentando mediana de 24 dias (IQR 14,5-26) de utilização da TARV antes do internamento e os considerados não doentes por HCMV apresentaram mediana de 135 dias (IQR 46-1705). Como foi observado nesta pesquisa os pacientes classificados com doença por HCMV, foram aqueles que não utilizavam ou que tinham poucos dias de utilização de TARV antes da internação, frente os pacientes classificados sem doença por HCMV. Esse achado é compatível com a literatura, que relata incidência maior de doença por HCMV, antes da introdução da TARV, sendo a detecção do DNA do HCMV no sangue dos pacientes, associada com o desenvolvimento de doença por órgão-alvo apresentando alta mortalidade. E mesmo após a introdução da TARV, a doença por órgão-alvo e a detecção de viremia pelo HCMV, continuam apresentando importância preditiva sendo considerada uma doença debilitante associada à mortalidade, mesmo quando não relacionada com doença por órgão-alvo entre os pacientes com HIV/AIDS (CROUGH; KHANNA, 2009; WOHL *et al.*, 2009). Sendo

assim, com este resultado, propõem-se o monitoramento da infecção pelo HCMV, destes pacientes no momento da internação, por se tratarem de pacientes bem debilitados e com AIDS, onde o tratamento para a replicação do HCMV pode contribuir para melhorar o estado imunológico dos pacientes, mesmo se ele apresentar outra doença, pois a replicação do HCMV sem doença tem sido relatada como agravante para o aumento da ativação da resposta imune persistente, indutora de imunossenescência e envelhecimento acelerado em indivíduos com HIV (HUNT *et al.*, 2011).

Como a técnica de antigenemia é dependente do número dos leucócitos, sendo a leucopenia uma das limitações do mesmo, foi realizada a análise da contagem dos eritrócitos e leucócitos, com base em cada coleta dos pacientes, que acabou não demonstrando diferença estatística entre os grupos classificados com e sem doença por HCMV, portanto este fator não parece ter contribuído para as diferenças observadas entre as duas metodologias.

Com relação à positividade qualitativa nos testes diagnósticos, das 97 amostras testadas em paralelo nos dois testes, 26 amostras foram reagentes na pesquisa do antígeno pp65 e destas 25 foram detectadas na qPCR e uma não detectada, sendo que este paciente foi considerado sem doença por HCMV. Das 71 amostras não reagentes na antigenemia, 20 foram detectadas na qPCR e 51 não detectadas (FIGURA 19). Pode ser observado um número significativo de amostras positivas na análise da amplificação do gene MIE do HCMV por qPCR, o que é justificado devido a maior sensibilidade da técnica, porém sua detecção não está relacionada com doença ativa (BLANK *et al.*, 2000; JAIN; DUGGAL; CHUGH, 2011). Durante a latência do HCMV, a expressão do gene MIE (UL123) é silenciada (presumivelmente para evitar a detecção pelo sistema imune) acarretando na não produção de descendência viral, quando ocorre a expressão dos genes (IE) observa-se uma replicação lítica; a proteína pp65 é produzida de forma abundante durante a replicação viral, migrando para o núcleo da célula infectada, onde tem a função de impedir o reconhecimento do gene IE pelo sistema imune do hospedeiro, além disso, estimula a replicação do DNA, montagem, saída da partícula viral e juntamente com a pp71 age como imunomoduladores do gene MIE (BLANK *et al.*, 2000; DAMME; LOOCK, 2014; KALEJTA, 2008).

Analisando os resultados qualitativos dos dois testes, separando os pacientes classificados como doentes e não doentes por HCMV, foi evidenciada

diferença significativa entre os grupos nas duas metodologias. Sendo, que das amostras dos pacientes considerados doentes, 100% apresentaram presença de DNA viral e 76,9% presença de pp65 (TABELA 4). Este achado demonstra que as metodologias, como a pesquisa do antígeno pp65 e detecção por qPCR, podem ser utilizadas no monitoramento e detecção da infecção pelo HCMV, porém apesar da diferença entre os grupos, o resultado quantitativo pode otimizar o diagnóstico da infecção, uma vez que pacientes classificados sem doença por HCMV também apresentaram testes positivos. É também necessário resaltar que a detecção do DNA viral não caracteriza doença ativa por HCMV, sendo necessária a sua avaliação quantitativa (CROUGH; KHANNA, 2009).

Com os dados quantitativos foi possível verificar que os resultados da antigenemia apresentados pelos pacientes classificados com doença por HCMV, variavam de uma a 66 células positivas/200.000 leucócitos com média de 55 e detecção do DNA do HCMV com média de 3,9 log/mL, já os classificados como não doentes por HCMV, não apresentaram variação e a média encontrada foi 2,3 na pesquisa de antígeno e média de detecção viral de 1,1 log/mL. Com estes valores, foi também, assim como nos dados qualitativos, possível evidenciar diferença significativa entre os grupos. Segundo Chevret *et al.* 1999, a quantificação antigênica do HCMV, no sangue, pode identificar pacientes com HIV com alto risco de desenvolvimento de doença por HCMV.

Para a avaliação do desempenho dos testes diagnósticos, foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) e *likelihood ratio* (LR). Com relação à antigenemia o teste apresentou valores de especificidade e sensibilidade similares 80% e 77% respectivamente, já o qPCR apresentou alta sensibilidade (100%), porém a antigenemia apresentou maior valor preditivo positivo e de *likelihood ratio* com relação ao qPCR. Em um estudo similar foi encontrada maior sensibilidade na detecção do DNA do HCMV e valores maiores de especificidade, VPP e LR na pesquisa de antígeno (BLANK *et al.*, 2000). Porém, cabe a ressalva, de que valores preditivos positivos e negativos, sofrem diferença com relação à prevalência da doença na população avaliada, de acordo com esta informação foi avaliado o desempenho destes testes considerando prevalências variando de 2 a 15%. Ainda assim, foi possível verificar um VPP maior na pesquisa do antígeno (de 7 a 41%) em relação à pesquisa do DNA do HCMV (de 5 a 31%), com relação ao VPN ambos obtiveram valores similares, de 99 a 95% e 100%,

respectivamente, sendo que, em relação à pesquisa do antígeno, foi observado um decaimento do valor de VPN com o aumento da prevalência.

Com relação à concordância dos resultados qualitativos dos testes diagnósticos, verificou-se uma diferença significativa entre as técnicas que foram positivas nas duas metodologias em comparação àquelas negativas. Mostrando boa similaridade qualitativa entre os dois testes, sendo observado um maior número de amostras positivas na qPCR. Com relação ao índice kappa a concordância encontrada foi moderada em relação aos dois testes diagnósticos.

Com relação à comparação entre os resultados quantitativos de ambos os testes, observou-se que, em geral, pacientes com antigenemia reagente apresentaram maiores cargas virais, sendo que a chance desta correlação entre os testes ter ocorrido ao acaso é pequena. Essa diferença foi estatisticamente significativa e permitiu a procura de um valor de corte para a carga viral e para a antigenemia.

Como já constatado o diagnóstico precoce da infecção pelo HCMV, pode otimizar a terapia preemptiva dos pacientes e, é de consenso dos clínicos, que devem ser estabelecidos os valores-limites para o início do tratamento, e estes estudos devem ser realizados de acordo com as características clínicas de grupos específicos de pacientes, ou seja, valores diferentes dependendo da doença de base deste paciente.

Apesar da carga viral sistêmica do HCMV ter sido relatada apresentar alta sensibilidade, ocorrer mais cedo do que a antigenemia e poder prever o diagnóstico precoce da infecção por HCMV (CHEVRET *et al.*, 1999; MAYAPHI *et al.*, 2014), a antigenemia tem sido o teste de rotina utilizado neste hospital para pacientes transplantados, sendo que valores de corte já foram descritos para estes pacientes, com relação às duas metodologias em estudos prévios (BREDA *et al.*, 2013). A substituição de uma metodologia por outra ainda impacta em diversos fatores, entre estes a aceitabilidade do clínico ao resultado do teste molecular, custos, disponibilidade de infraestrutura adequada, além de pessoal treinado e da necessidade de validação dos valores de corte para o grupo específico de pacientes (BREDA *et al.*, 2013; FARFÁN *et al.*, 2011; MAYAPHI *et al.*, 2014).

Considerando como critérios de presença de doença aqueles pacientes que apresentaram comprometimento em órgão alvo e/ou uso de ganciclovir, foram construídas curvas ROC para a antigenemia e o qPCR. Baseada na área da curva

(0,82) foi possível verificar que a antigenemia é um teste confiável para determinação de doença por HCMV em pacientes portadores do HIV. O ponto de corte apresentado foi de 1,5 células/200.000 leucócitos, sendo que valores acima deste ponto são preditores de doença por HCMV, indicando que os pacientes necessitam de terapia preventiva. Quando realizou-se a análise dos valores de antigenemia encontrados nos grupos classificados com e sem doença por HCMV, verificou-se uma maior sensibilidade e especificidade do teste sendo considerado este ponto de corte. O ajuste do ponto de corte da qPCR foi de 3,715 log/mL com área abaixo da curva de 0,7. Quando foram comparados os valores de qPCR, considerando o ponto de corte demonstrado pela curva ROC, em relação aos grupos classificados com e sem doença por HCMV, verificou-se uma diferença significativa. Porém, ao contrário do que pode ser evidenciado na antigenemia, se for aplicado este ponto de corte, obtém-se valores mais baixos de especificidade e sensibilidade. Desta forma, o valor de corte obtido a partir dos resultados do teste molecular teve maior correlação com risco para desenvolvimento de doença por CMV. Porém, vale ressaltar que os valores observados deveriam ser validados com análise de um número maior de amostras, pois não foi possível relacionar o resultado do valor de corte para antigenemia com a evolução clínica dos pacientes. Os valores obtidos na avaliação do desempenho dos testes diagnósticos (sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e LR) também deverão ser validados com uma amostragem maior de pacientes, além disso, é necessário uma discussão mais ampla sobre os critérios para classificação da presença ou ausência de doença, onde considerar apenas a detecção do vírus no órgão alvo limita de forma substancial a comprovação da doença, principalmente considerando a ampla gama de manifestações clínicas da doença for HCMV no paciente com HIV, que pode acometer locais de difícil avaliação por biópsia, com a retina e o sistema nervoso central, entre outros.

Mesmo assim, as áreas apresentadas sob as curvas demonstraram, que a utilização dos testes antigenemia e qPCR para o diagnóstico do HCMV, apresentaram diferença estatisticamente significativa, demonstrando que há uma correlação entre o resultado do teste e a probabilidade de doença. E ainda, comparando ambas e suas respectivas áreas abaixo da curva, pode-se afirmar que a antigenemia apresenta maior acurácia do que a qPCR para detecção de pacientes com doença por HCMV. No entanto, quando consideramos somente amostras positivas nos dois testes e plotamos uma curva para comparação dos dois testes, as

áreas abaixo da curva apresentadas, foram similares. Nesta avaliação, pode ser observado que estas metodologias podem ser utilizadas como complementares, optando-se por realizar uma ou outra técnica de acordo com as características do paciente. Por exemplo, em pacientes com leucopenia, ocorre o aumento de sensibilidade do qPCR em relação à antigenemia.

Ainda com relação ao ponto de corte do qPCR, que sugere que valores iguais ou superiores 3, 715 log/mL (em torno de 5.000 cópias/mL) é sugestivo de doença por HCMV em pacientes com HIV. Mayaphi *et al.*, 2014, sugere que valores de carga viral de 1.000 cópias/mL (3 log/mL) pode ser apropriado para o início do tratamento pré-emptivo em pacientes com HIV/AIDS em UTI. Já Mizushima *et al.* 2013, sugere que em pacientes que apresentam carga viral de HCMV de 5.000 cópias/mL (3,69 log/mL) com utilização de terapia preemptiva ajuda a impedir o aparecimento de doença por órgão alvo em pacientes com imunossupressão avançada pelo HIV. Deve-se ressaltar que tais valores devem ser validados para a população em estudo.

A infecção pelo CMV humano, como já destacado, representa uma importante complicação em pacientes com AIDS e a utilização de métodos para identificar os pacientes com risco de desenvolvimento de doença por HCMV ainda é um desafio na prática clínica (CHEVRET *et al.*, 1999; FÓCA *et al.*, 2012; HUNT *et al.*, 2011; BLANK *et al.*, 2000). Para identificar esses pacientes, como demonstrado anteriormente, a pesquisa do antígeno e do DNA do vírus, tem sido consideradas metodologias valiosas para determinação de terapia preemptiva. Porém, apesar dos benefícios do tratamento preemptivo já ser descrito em pacientes transplantados, ele geralmente não é recomendado para pacientes com HIV, por conta do custo, dúvidas sobre o benefício, risco do desenvolvimento de resistência e mesmo a falta de comprovação do aumento da sobrevida (MIZUSHIMA *et al.* 2013). Porém mais recentemente, alguns estudos demonstraram que a utilização de Vanganciclovir em pacientes HIV+ tem sido associada com a redução da hiperativação das células T, ocasionada pela replicação do HCMV, que pode levar a imunossenescência e recuperação imunitária incompleta, desta maneira a utilização do antiviral facilitaria a recuperação imune dos pacientes, uma vez que os mesmos apresentam imunossupressão grave (DURIER *et al.*, 2013; FÓCA *et al.*, 2012).

Foi também realizada a análise com divisão das amostras de acordo com os resultados nos testes e grupos com ou sem doença por HCMV, definida pelos

critérios já apresentados. Esta divisão foi realizada com o objetivo de compreender as diferenças entre os pacientes que apresentaram doença por HCMV dos que não apresentaram e evidenciar as características dos mesmos dentro dos grupos.

Os dois primeiros grupos foram os mais representativos em número de amostras, sendo que os pacientes destes grupos foram classificados como sem doença por HCMV e não apresentavam células positivas na antigenemia, porém no segundo grupo encontramos amostras com detecção do DNA viral, com média de carga viral de 2,56 log/mL, este grupo foi considerado assintomático. Em contrapartida o próximo grupo, onde foram incluídas amostras de pacientes classificados com doença por HCMV, apresentou antigenemia não reagente e amostras detectadas na qPCR, com 3,31 log/mL de carga viral, não sendo, portanto, compatível com o valor de corte proposto por este estudo. No entanto, duas das amostras coletadas, foram de um paciente que apresentava baixa contagem no número de leucócitos e como o ensaio de antigenemia é dependente do número de leucócitos este pode ter sido o fator limitante para este ensaio apresentar positividade. O diagnóstico do HCMV foi constatado após o óbito do paciente, que também apresentava meningite criptocócica. Este mesmo paciente havia sido internado anteriormente e a primeira amostra não apresentou positividade em nenhum dos testes, como ele era um paciente com imunossupressão grave, suspeitou-se que a investigação com utilização de ambos os testes e a utilização de antiviral para HCMV poderia ter auxiliado na recuperação imunológica do paciente como descrito na literatura (DURIER *et al.*, 2013). A outra amostra foi incluída neste grupo pelo fato da paciente ter apresentado possível reativação do HCMV. Esta foi uma das limitações do estudo, como os pacientes foram internados mais de uma vez durante o período e com diagnósticos diferentes eles foram incluídos em grupos diferentes de acordo com os sintomas e testes diagnósticos. Para eliminar este viés sugerimos uma ampliação da coorte e também a inclusão das amostras dos pacientes somente uma vez durante o estudo, porém como se tratou de uma amostragem de conveniência não foi realizada à exclusão destas amostras.

Apesar das amostras incluídas no grupo quatro apresentarem carga viral de 3,75 log/mL e antigenemia com resultado de nove células em 200.000 leucócitos, estes pacientes apresentaram somente reativação sem evidência de doença pelo HCMV, de acordo com os critérios utilizados na pesquisa. Como os valores dos testes, ficaram acima do valor de corte encontrado, para definição de doença por

HCMV, neste estudo, sugerimos um novo estudo com intervenção medicamentosa, para testar estes valores de corte, sendo possível então, a melhor avaliação das amostras deste grupo.

No grupo cinco, foram incluídos pacientes com doença por HCMV, que apresentaram amostras com média de 27 células reagentes em 200.000 leucócitos e média de carga viral de 4,12 log/mL. Neste grupo dois pacientes apresentaram alta contagem de células na antigenemia e apesar de não apresentarem doença por órgão-alvo, após a utilização do ganciclovir por 14 dias ambos obtiveram melhora clínica significativa. Estes dados reforçam a utilização da terapia preemptiva a fim de evitar a morbidade e mortalidade dos pacientes.

Outra paciente com amostras incluídas neste grupo apresentou HCMV pulmonar e evolução para retinite. Sendo que, a paciente não apresentava nenhuma demonstração clínica da doença, a contagem de linfócitos T CD4+ durante a internação se manteve em 322 células/mm³, carga viral para HIV 3,89 log/mL sendo a mais baixa encontrada no grupo e o tempo de diagnóstico do HIV em dias o mais alto, com utilização de TARV prévia de 12 dias, ela apresentou células reagentes na antigenemia e carga viral acima de 3,9 log/mL o que levou a decisão de realizar a pesquisa do HCMV, pois a mesma estava em bom estado imunológico. O diagnóstico foi confirmado pela biópsia pulmonar, onde foi possível encontrar células com inclusão citomegálica, após este achado também foi possível verificar a retinite por HCMV, sem queixa da paciente. Este fato é contrário ao relatado na literatura, que sugere, que os casos mais graves de doença por HCMV são associados a pacientes com AIDS, ocorrendo geralmente quando a contagem de linfócitos T CD4+ é inferior a 100 células/ μ l (BLANK *et al.*, 2000; CROUGH; KHANNA, 2009; HO, 2008). Reforçando a importância de se realizar a investigação do HCMV em pacientes com infecção pelo HIV.

O outro paciente incluído neste grupo apresentou somente uma célula positiva na pesquisa do antígeno pp65, com carga viral de 3,72 log/mL, porém, como o paciente apresentava necrose de retina, o diagnóstico do HCMV, foi a hipótese principal. A última amostra deste grupo foi de um paciente com doença neurológica pelo HIV e mesmo não apresentando doença por órgão alvo, mas com carga viral para HCMV elevada, foi considerado com doença por HCMV e apresentou melhora clínica após o tratamento com ganciclovir.

No último grupo foi incluída uma amostra com uma célula reagente na

antigenemia e carga viral não detectada. Apesar de a qPCR ser altamente sensível, esta diferença pode ser explicada por alguma falha técnica na realização do ensaio ou mesmo pela diferença na detecção precoce do vírus pela antigenemia.

Comparando os dados de contagem de linfócitos T CD4+, carga viral para o HIV e HCMV, tempo do diagnóstico do HIV em dias, eritrócitos, leucócitos e antigenemia para HCMV, somente este último apresentou diferença estatística significativa entre os grupos. Assim como demonstrado na divisão dos pacientes classificados com e sem doença por HCMV.

Pacientes classificados como doentes por HCMV tiveram um tempo de internamento significativamente maior do que os não doentes. Porém, com relação aos óbitos, dois pacientes (2/62, 3,2%) classificados como sem doença por HCMV e um (1/6, 16,7%) classificado com doença por HCMV evoluíram para óbito no período da internação. Para o cálculo do valor de p foi utilizado o teste *logrank*, que demonstrou valores de $p = 0,565$, desta maneira a diferença de sobrevida não pode ser atribuída à doença por HCMV, este resultado foi similar ao encontrado depois de passado seis meses após a internação, com $p = 0,411$. Entre os pacientes classificados sem doença por HCMV, cinco (5/60, 8,3%) e dos doentes um (1/5, 20%) foram a óbito após a internação. Este achado é semelhante ao de Mizushima *et al.*, 2013, que não demonstrou diferença significativa na taxa de mortalidade entre os grupos com e sem terapia antiviral. Apesar de não haver comprovação do aumento da sobrevida dos pacientes, com a utilização de antiviral para HCMV, estudos de pacientes portadores do HIV, mostraram a relação entre a viremia do HCMV e maior mortalidade (DURIER *et al.*, 2013; FIELDING *et al.*, 2013).

Com relação aos óbitos, somente um paciente (15) foi relatado com óbito por meningite criptocócica e HCMV, sendo que a constatação de doença por citomegalovírus ocorreu após a morte. Em um estudo de análise da mortalidade de pacientes com HIV e utilização de TARV, embora o HCMV não tenha sido relatado como causa da morte dos pacientes ele foi associado com o aumento da intensidade da imunossupressão, sendo que autores relatam que talvez fosse subestimada a contribuição desta infecção para o óbito, pois com frequência do reconhecimento da doença ocorre pós-morte (DURIER *et al.*, 2013).

Não existe um teste padrão-ouro para diagnóstico da infecção ativa por HCMV em pacientes com HIV/AIDS. Apesar da antigenemia ser um teste popular no monitoramento do HCMV, apresenta algumas limitações, como a menor

sensibilidade em pacientes leucopênicos e a dificuldade de execução técnica. Já a PCR apesar de apresentar sensibilidade elevada, não é um preditor de doença. Sendo assim é necessário que cada serviço determine os valores de corte preditores de doença por HCMV em pacientes com HIV, pois mesmo após a TARV, a reativação da infecção pelo HCMV é frequente nesta população, o qual pode estar associado com uma acentuação da imunossupressão do paciente. Neste estudo os resultados indicam que tanto a antigenemia como o qPCR são úteis para a identificação dos pacientes com risco para desenvolvimento de doença por HCMV ao longo do tempo. Sendo encontrado número de amostras positivas no qPCR maior do que na antigenemia, apesar da discrepância observada na comparação entre as metodologias, com a utilização dos resultados quantitativos bem como os dois testes em paralelo, a doença por HCMV pode ser identificada com maior precisão nos pacientes com HIV/AIDS internados sendo útil para definir a introdução de terapia específica para o citomegalovírus humano, assim como discutir a relevância que a terapia preemptiva pode ter nestes pacientes.

6 CONCLUSÕES

Na avaliação do desempenho da antigenemia foram encontrados valores de sensibilidade de 77% (IC95% 45 a 93%) e especificidade de 80% (IC95% 70 a 88%), com alto valor preditivo negativo (95% IC95% 87 a 98%) e na avaliação da qPCR sensibilidade de 100% (IC95% 71 a 100%), especificidade de 61,9% (IC95% 50 a 72%) e também, alto valor preditivo negativo 100% (IC95% 91 a 100%).

Os testes apresentaram concordância qualitativa e correlação entre os resultados quantitativos da qPCR e antigenemia moderadas. Com base nestes resultados foi possível definir um ponto de corte da antigenemia de 1,5 células positivas em 200.000 leucócitos e na qPCR de 3,715 log/mL, como definição de doença por HCMV em pacientes com HIV/AIDS internados no setor de infectologia do HC/UFPR, sendo necessária a validação destes valores.

No presente estudo observou-se uma frequência de doença por HCMV em 13% dos pacientes, os quais eram em sua maioria adultos jovens e sem prevalência de gênero apresentavam mediana de contagem de T CD4+, tempo de diagnóstico e de utilização de TARV para HIV em dias menor em relação aos não doentes por HCMV e carga viral para HIV mais elevada.

Os dados qualitativos e quantitativos da antigenemia e da qPCR constataam uma diferença significativa entre os resultados dos pacientes classificados como doentes dos não doentes por HCMV. Das 13 amostras, coletadas dos pacientes doentes, somente três apresentaram amostras não reagentes na antigenemia com média de 55 (± 117) células reagentes/200.000 e todas foram detectadas na qPCR com média de 3,9 ($\pm 0,8$) log/mL.

Com relação à sobrevida na internação e após seis meses da alta não foi observada diferença entre os grupos classificados como doentes e não doentes por HCMV.

REFERÊNCIAS

ÁNGELES, M.M. **Estudios de resistencia. ¿Cuándo están indicados?** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 29(Supl 6):24-27, 2011.

ANISH, T. S.; VIJAYKUMAR, K.; SIMI, S. M. **Determinants of rapid progression to immunodeficiency syndrome among people infected with Human Immunodeficiency Virus, Kerala, India.** Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS: 32(1):23-29, 2011.

ARIËN, K. K.; VANHAM, G.; ARTS, E. J. **Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans?** Nature Reviews I Microbiology; Volume 5, 2007.

AVERY, R. K. **Update in management of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection. Infections of the immunocompromised host.** Current opinion in infectious diseases, 21:433-437, 2008.

BIOMETRIX DIAGNÓSTICA Ltda. Aprovado por Maurício Cichon. **RTK015 CMV Q-PCR Alert Kit, Nanogen.** Revisão 4, 2013.

BLANK, B. S. N.; MEENHORST, P.L.; MULDER, J.W.; WEVERLING, G. J.; PUTTER, H.; WOUTER, P.; WILLEMIEN C. Van DIJK; SMITS, P.; LIE-A-LING, S.; REISS, P.; LANGE, J. M. A. **Value of different assays for detection of Human Cytomegalovirus (HCMV) in predicting the development of HCMV disease in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients.** Journal of Clinical Microbiology; p.563-569, 2000.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de DST/AIDS. Boletim Epidemiológico- HIV/AIDS.** Brasília, 2014.

BREDA, G.; ALMEIDA, B.; CARSTENSEN, S.; BONFIM, C.M.; NOGUEIRA, M. B.; VIDAL, L. R. R.; ALMEIDA, S. M.; RABONI, S.M. **Human cytomegalovirus detection by real-time PCR and pp65-antigen test in hematopoietic stem cell transplant recipients: a challenge in low and middle-income countries.** Pathogens and Global Health; 7.51, 2013.

BRITO, A. M; CASTILHO, E. A.; SZWARCOWALD, C. L. **AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifaceada.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 34, n. 2; p. 207-217, 2000.

CASTILLO, J.P.; KOWALIK, T. F. **Human cytomegalovirus immediate early**

proteins and cell growth control. Gene 290 – an international journal on genes and genomes; 19-34, 2002.

CHEVRET, S.; SCIEUX, C.; GARRAIT, V.; DAHEL, L.; MORINET, F.; MODAÏ, J.; DECAZES, J-M.; MOLINA, J-M. **Usefulness of the Cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay for predicting the occurrence of CMV disease and death in patients with AIDS.** Clinical Infectious Diseases: 28:758-63, 1999.

COHEN, M. S.; HELLMANN, N.; LEVY, J.A.; DeCock, K.; LANGE, J. **The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic.** The Journal of Clinical Investigation; 118:1244-1254, 2008.

Colaboração HIV-CAUSAL. **Opportunistic infections and AIDS malignancies early after initiating combination antiretroviral therapy in high-income countries.** AIDS: 28:2461-2473, 2014.

CROUGH,T.; KHANNA, R. **Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside.** Clinical Microbiology Reviews; p.76-98, 2009.

CRUZ, A. S. **Como interpretar a análise estatística em publicações da área de saúde.** 60p.:il, 2009.

CURITIBA, SECRETÁRIA MUNICIPAL DA SÚDE DE CURITIBA. Centro de epidemiologia. Coordenação de vigilância epidemiológica. Coordenação municipal de DST/HIV/AIDS/Hepatites virais. **Boletim epidemiológico HIV/AIDS.** Curitiba, 2014.

DAI, X.; YU, X.; GONG, H.; JIANG, X.; ABENES, G.; LIU, H.; SHIVAKOTI, S.; BRITT, W. J.; ZHU, H.; LIU, F.; ZHOU, Z.H. **The smallest capsid protein mediates binding of the essential tegument protein pp150 to stabilize DNA-containing capsids in human cytomegalovirus.** PLOS Pathogens; 9(8): e1003525, 2013.

DAMME, E. V.; LOOCK, M. V. **Functional annotation of human cytomegalovirus gene products: an update.** Frontiers in Microbiology; 5:218, 2014

DAVISON, A. J.; DOLAN, A.; AKTER, P.; ADDISON, C.; DARGAN, D. J.; ALCENDOR, D. J.; McGEOCH, D. J.; HAYWARD, G. S. **The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome.** Journal of General Virology; 84, 17-28, 2003.

DEBUR, M. do C.; VIDAL, L. R. R.; NOGUEIRA, M. B.; PEREIRA, L. A.;

TAKAHASHI, G. R. A.; ROTTA, I.; ALMEIDA, S. M.; RABONI, S. M. **Comparison of Immunoperoxidase and Immunofluorescence Assays for pp65 Cytomegalovirus Antigen in Immunocompromised Patients.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases and Contexto; 13(2):142-146, 2009.

DEEKS, S.G. & WALKER, B.D. **Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy.** *Immunity*; 27: p.406-416, 2007.

DODT, K.K.; JACOBSEN, P. H.; HOFMANN, B.; MEYER, C.; KOLMOS, H. J.; SKINHOJ, P.; NORRILD, B.; MATHIESEN, L. **Development of cytomegalovirus (CMV) disease may be predicted in HIV-infected patients by CMV polymerase chain reaction and the antigenemia test.** *AIDS*, 11: F21-F28, 1997.

DURIER, N.; ANANWORANICH, J.; APORNPONG, T.; UBOLYAM, S.; KERR, S. J.; MAHANONTHARIT, A.; FERRADINI, L.; RUXRUNGTHAM, K.; AVIHINGSANON, A. **Cytomegalovirus viremia in Thai HIV-infected patients on antiretroviral therapy: Prevalence and associated mortality.** *Clinical Infectious Diseases Advance*, 2013.

ERICE, A.; GIL-RODA, C.; PÉREZ, J-L.; BALFOUR, H.H.Jr; SANNERUD, K.J.; HANSON, M. N.; BOIVIN, G.; CHOU, S. **Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients.** *The Journal of Infectious Diseases*:175:1087-92, 1997.

FARFÁN, M. J.; TORRES, P.T.; VERGARA, A. A.; DONOSO, G. W.; ALBA, A. G.; PARIS, C. D.; SANTOLAYA, E. de P. **Comparación de las técnicas de reacción de polimerasa en cadena en tiempo real y antigenemia para la detección de citomegalovirus en sangre de niños sometidos a trasplantes.** *Revista da Sociedade Chilena de Infectologia*: 28(2):113-117, 2011.

FIELDING, K.; KOBAYASHI, A.; GRANT, A.D.; CHARALAMBOUS, S.; DAY, J.; SPAK, C.; WALD.; HUANG, M-L.; COREY, L.; CHURCHYRD, G. J. **Cytomegalovirus viremia as a risk factor for mortality prior to antiretroviral therapy among HIV-infected gold miners in South Africa.** *PLOS ONE*:6(10)e25571, 2011.

FOCÀ, E.; MOTTA, D.; POLLARA, C.; BRIANESE, N.; GOTTI, D.; ALBINI, L.; QUIROS-ROLDAN, E.; TORTI, C.; MANCA. **Impact of detectable human cytomegalovirus DNAemia on viro-immunological effectiveness of HAART in HIV-infected patients naïve to antiretroviral therapy.** *New Microbiologica*, 35, 227-231, 2012.

GRIFFITHS, P.; BARANIAK, I.; REEVES, M. **The pathogenesis of human**

cytomegalovirus. J. Pathol; 235(2):288-97, 2015.

HO, M. **The history of cytomegalovirus and its diseases.** Medical Microbiology and Immunology; 197:65-73, 2008.

HUNT, P.W.; MARTIN, J.N.; SINCLAIR, E.; EPLING, L.; TEAGUE, J.; JACOBSON, M.A.; TRACY, R.P.; COREY, L.; DEEKS, S.G. **Vanganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD4+ T cell recovery on antiretroviral therapy.** The Journal of Infectious Diseases. 203:1474-83, 2011.

JAFFAR, S.; GRANT, A. D.; WHITWORTH, J.; SMITH, P. G.; WHITTLE, H. **The natural history of HIV-1 and HIV-2 infections in adults in Africa: a literature review.** Bulletin of the World Health Organization: 82 (6), 2004.

JAIN, M.; DUGGAL, S.; CHUGH, T. D. **Cytomegalovirus infection in non-immunosuppressed critically ill patients.** J. Infect Dev Ctries; 5(8):571-579, 2011.

JESIONEK, A.; KIOLEMENOGLOU, B. **Ueber einen befund von protozoenartigen gebilden in der organen eines hereditary-luetis-chen foetus.** Muenchner Medizinische Wochenschrift; 51:1905-1907, 1904.

KALEJTA, R. F. **Tegument proteins of human cytomegalovirus.** Microbiology and molecular biology reviews; 72(2), 249-265, 2008.

KIM, S. J.; PARK, S. J.; YU, H. G.; KIM, N. J.; JANG, H-C.; OH, M-d. **Ocular manifestations of acquired Immunodeficiency Syndrome in Korea.** The Korean Academy of Medical Sciences; 27:542-546, 2012.

LANGFORD, S. E.; ANANWORANICH, J.; COOPER, D. A. **Predictors of disease progression in HIV infection: a review.** AIDS Research and Therapy 4:11, 2007.

LORIERE-SIMON, E.; ROSSOLILLO, P.; NEGRONI, M. **RNA structures, genomic organization and selection of recombinant HIV.** RNA Biology; 8:2, 280-286, 2011.

LUGERT, R.; REICHARD, U.; HUFERT, F. T.; GROß, U. **Comparison between pp65 antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction for detection of active cytomegalovirus infection in routine diagnostics.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 65; p. 192-195, 2009.

LURAIN, N. S.; CHOU, S. **Antiviral drug resistance of Human Cytomegalovirus.**

Clinical Microbiology Reviews; p. 689-712, 2010.

MARTÍNEZ, F. P.; CRUZ, R.; PLASSCHAERT, R.; DENG, Z.; RIVERA-MOLINA, Y. A.; BARTOLOMEI, M.S.; LIEBERMAN, P.M.; TANG, Q. **CTCF binding to the first intron of the major immediate early (MIE) gene of the human cytomegalovirus (HCMV) negatively regulates MIE gene expression and HCMV replication.** Journal of Virology; 88(13), 7389-7401, 2014.

MAYAPHI, S.H.; BRAUER, M.; MOROBADI, D.M.; MAZANDERANI, A.H.; MAFUYEKA, R.T.; OLORUNJU, S.A.S; TINTINGER, G.R.; STOLTZ, A. **Cytomegalovirus viral load kinetics in patients with HIV/AIDS admitted to a medical intensive care unit: A case for pre-emptive therapy.** PLOS One: 9(4):e93702, 2014.

MILLS, A.M.; GUO, F. P.; COPLAND, A. P.; PAI, R. K.; PINSKY, B.A. **A comparison of CMV detection in gastrointestinal mucosal biopsies using immunohistochemistry and PCR performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue.** The american journal of surgical pathology: 37:995-1000, 2013.

MIZUSHIMA, D.; NISHIJIMA, T.; GATANAGA, H.; TSUKADA, K.; TERUYA, K.; KIKUCHI, Y.; OKA, S. **Preemptive therapy prevents cytomegalovirus end-organ disease in treatment-naive patients with advanced HIV-1 infection in the HAART era.** PLOS One: 8(5):e65348, 2013.

MOCARSKI, E.S. JR; COURCELLE, C.T. Capítulo 76 - Cytomegaloviruses and their replication. In. FIELDS, B.N.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E.; KNIPE, D. M. (Eds). **Fields virology.** Philadelphia, New York: By Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001. 4th ed, volume 1, p.2127-2161.

NIAD – NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES (NIAD). Disponível em: <<http://www.niaid.nih.gov/topics/hiv aids/multimediaspubs/multimedia/Pages/default.aspx>>. Acesso em 09/06/2013.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; Col. SILVA, F.F. **PCR em tempo real.** Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Ed. n°33:10-13, Julho/Dezembro 2004.

PASS, R. Capítulo 77 - Cytomegaloviruses. In. FIELDS, B.N.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E.; KNIPE, D. M. (Eds). **Fields virology.** Philadelphia, New York: By Lippincott Williams &

Wilkins Publishers, 2001. 4th ed, volume 1, p.2162-2188.

PLANTIER, J. C., LEOZ, M., DICKERSON, J. E., DE OLIVEIRA, F., CORDONNIER, F., LEMEE, V., DAMOND, F., ROBERTSON, D. L., SIMON, F. **A new human immunodeficiency virus derived from gorillas.** *Nature medicine*; 15(8), p.871-872, 2009.

RABONI, S. M.; ALMEIDA, S.M.; ROTTA, I.; RIBEIRO, C.E.; ROSARIO, D., VIDAL; L. R., NOGUEIRA, M.B.; RIEDEL, M.; WINHESCKI, M.G.; FERREIRA, K.A.; ELLIS, R. **Molecular epidemiology of HIV-1 clades in Southern Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 105(8):1044-49, 2010.

REMOTTI, H.; SUBRAMANIAN, S.; MARTINEZ, M.; KATO, T.; MAGID, M. **Small-bowel allograft biopsies in the management of small-intestinal and multivisceral transplant recipients.** Histopathologic review and clinical correlations. *Archives of pathology & laboratory medicine*: 136:761-771, 2012.

RIBBERT, H. **Ueber protozoenartige zellen in der niere eines syphilitischen neugeborenen und in der parotis von kinder.** Aus Derm Pathologischen Institut des Universität Zürich; 15:945-948, 1904.

SAHOO, M. K.; LEFTEROVA, M.I.; YAMAMOTO, F.; WAGGONER, J,J; CHOU, S.; HOLMES, S.P.; ANDERSON, M.W.; PINSKY, B.A. **Detection of cytomegalovirus drug resistance mutations by next-generation sequencing.** *Journal of Clinical Microbiology*: 51(11):3700-3710, 2013.

SANDONÍS, V.; CASADO, C.; ALVARO, T.; PERNAS, M.; OLIVARES, I.; GARCÍA, S.; RODRÍGUEZ, C.; ROMERO, J. del.; LÓPEZ-GALÍNDEZ, C. **A combination of defective DNA and protective host factors ar found in a set of HIV-1 ancestral LTNPs.** *Virology* 391(73-82), 2009.

SCHAUFLINGER, M.; FISCHER, D.; SCHREIBER, A.; CHEVILLOTTE, M.; WALTHER, P.; MERTENS, T.; EINEM, J. von. **The tegument protein UL71 of human cytomegalovirus is involved in late envelopment and effects multivesicular bodies.** *Journal of Virology*; (85) 8, 3821-3832, 2011.

SHAO, Y.; WILLIAMSON, C. **The HIV-1 epidemic: Low-to Midle-Income Countries.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*; 2:a007187, 2012.

SILVA, C. A.; OLIVEIRA, A. C. P. de; VILAS-BOAS, L.; FINK, M. C. D. S.; PANNUTI, C.S.; VIDAL J.E. **Neurologic Cytomegalovirus complications in patients with**

AIDS: Retrospective review of 13 cases and review of the literature. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; 52 (6): 305-10, 2010.

SMITH, M. G. **Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SVG) disease.** Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine; 92:424-430, 1956.

SMITH, R.M; KOSURI, S.; KERRY, J. A. **Role of human cytomegalovirus tegument proteins in virion assembly.** Viruses; 6, 582-605, 2014.

TANDON, R.; MOCARSKI, E. S. **Viral and host control of cytomegalovirus maturation.** Trends in Microbiology; 20(8):392-401, 2012.

TERRA, A. P. S.; SILVA-VERGARA, M. L.; GOMES, R. A. S.; PEREIRA, C. L. L.; SIMPSON, A. J. G.; CABALLERO, O. L. **Monitoramento de pacientes com AIDS para o desenvolvimento de doença por citomegalovírus (CMV) usando-se PCR multiplex.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 33(6):583-589, 2000.

TOMTISHEN III, J, P. **Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28).** Virology Journal; 9:22, 2012.

UNAIDS - JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS (UNAIDS). **Global Report UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013.** 2013.

VANARSDALL, A. L; JOHNSON, D. C. **Human cytomegalovirus entry into cells.** Current Opinion in Virology; 2:37-42, 2012.

VARNUM, S. M.; STREBLOW, D. N.; MONROE, M. E.; SMITH, .; AUBERRY, K.J.; PASA-TOLIC, L.; WANG, D.; CAMP II, D, G.; RODLAND, K.; WILEY, S.; BRITT, W.; SHENK, T.; SMITH, R. D.; NELSON, J. A. **Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome.** Journal of Virology; 78:10960–10966, 2004.

WOHL, D. A.; KENDALL, M. A.; ANDERSEN, J.; CRUMPACKER, C.; SPECTOR, S.A.; FEINBERG, J.; ALSTON-SMITH, B.; OWENS, S.; CHAFEY, S.; MARCO, M.; MAXWELL, S.; LURAIN, N.; JABS, D.; BENSON, C.; KEISER, P.; JACOBSON, M. A. para a equipe de estudo A5030. **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:10(3):143-152, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Infecção por citomegalovírus em pacientes HIV positivos internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná: Diagnóstico e monitoramento
Investigador principal: Sonia Mara Raboni

Objetivos:

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Sua participação neste trabalho é voluntária. Isto significa que você pode se recusar a participar dele, ou deixar de fazer parte dele a qualquer momento. Se você desejar participar desta pesquisa pediremos que assine duas vias deste documento, uma delas ficará em nossos arquivos e outra com você.

Introdução/Objetivos:

Na população em geral, a infecção pelo Citomegalovírus (CMV) é comum e caracterizada por uma infecção sem sintomas. Nos pacientes portadores do vírus HIV, o CMV é uma das doenças oportunistas mais comuns, apresentando manifestações, oculares, pulmonares, gastrointestinais e neurológicas. Você foi chamado para participar deste estudo, que consiste em detectar a infecção pelo citomegalovírus por dois métodos diferentes: a antigenemia e a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), ambos realizados no sangue. O resultado destes testes, que constam do protocolo da pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, será transmitido a você. Também daremos informações sobre se você deve ou não se tratar, e se você quiser se tratar, nos responsabilizaremos pelo tratamento e o acompanhamento do tratamento.

Métodos:

Será realizada a coleta de cerca 5 ml de sangue que será retirado de sua veia com seringas plásticas e agulhas descartáveis. Este material já será coletado durante seu atendimento por solicitação do médico que está te atendendo para a realização do teste antigenemia para citomegalovírus, nós iremos utilizar uma parte deste sangue. Não será necessário uma nova coleta de sangue. Além disso, nós pediremos que você responda a algumas perguntas. Dependendo dos resultados dos exames, poderemos solicitar que os repita.

Riscos e desconfortos:

A coleta da amostra de sangue por meio de punção venosa, na maioria dos casos não é verificada intercorrências devido ao procedimento. Porém, podem ocorrer inchaço, vermelhidão e dor local, resultantes do extravasamento de sangue para o tecido abaixo da pele, que pode ser diminuído mantendo pressão firme no local após a realização da coleta.

Benefícios potenciais:

Sua participação nesta pesquisa pode nos ajudar a determinar a importância dos testes de laboratório para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes com HIV e infecção pelo citomegalovírus. A partir destes resultados, também poderemos propor a implantação de medidas de tratamento mais

cedo desta doença, melhorando a sobrevida dos pacientes.

Custos e/ou pagamento por participar do estudo:

Não há custos para você participar do estudo. Você também não receberá nada por participar.

Confidencialidade (privacidade dos dados):

Seus dados poderão ser revistos por mais de 15 anos pela equipe envolvida no estudo, apenas com o objetivo de recuperar informações relativas à pesquisa. Os resultados do estudo serão publicados, mas seu nome não será revelado em nenhuma publicação. As amostras coletadas serão destruídas após o final do estudo. Todas as informações são confidenciais.

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo é voluntária. Se você não quiser participar, não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento ou acompanhamento médico. Você também poderá se recusar a responder algumas perguntas, e poderá desistir de participar a qualquer momento do estudo, sem nenhum prejuízo.

Pessoas que podem ser contatadas:

Se você tiver qualquer dúvida a respeito desta pesquisa pode contatar a Dra. Sonia Mara Raboni pelo telefone 3360-1800, ramal 6171 ou a Bióloga Suzana Carstensen no telefone 3360-7974.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Eu compreendi que este é um trabalho de pesquisa.
2. Eu li todas as páginas deste termo de consentimento. A equipe envolvida na pesquisa me deu todas as informações a respeito dos procedimentos do trabalho. Tive a oportunidade de fazer perguntas, e minhas perguntas foram respondidas de forma satisfatória. Foi-me dado tempo suficiente para considerar com atenção as informações recebidas e decidir participar ou não do estudo.
3. Fui devidamente informado que minha participação neste estudo é inteiramente voluntária e que eu posso me recusar a participar ou desistir do estudo a qualquer momento, sem qualquer tipo de prejuízo
4. Eu autorizo que meus dados sejam revelados à equipe envolvida na pesquisa e ao comitê de ética responsável pela aprovação deste projeto, apenas para finalidades relativas ao estudo. Esta autorização é válida por um período de 15 anos.
5. Eu compreendi que vou receber um a cópia deste termo para guardar comigo depois de assinada.
6. Minha assinatura abaixo indica que, por minha escolha, concordo em participar deste estudo.

Participante:

_____ Ctba, _____
 (Assinatura) (Nome)

Pesquisador:

_____ Ctba, _____
 (Assinatura) (Nome)

Pesquisador responsável pela solicitação do TCLE: Suzana Carstensen

APÊNDICE 2 - QUESTIONÁRIO UTILIZADO NA PESQUISA

I – IDENTIFICAÇÃO:

Local: _____ Data: _____

Nome: _____ Sexo: ()M ()F

Registro: _____

Local de residência: _____

Procedência: _____

Data de nascimento: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

Raça: ()Branca ()Parda ()Negra ()Amarela ()Indígena ()Sem informação

Escolaridade: ()Nenhuma ()1 a 3 anos ()4 a 7 anos ()8 a 11 anos ()≥12 anos
()Sem informação

II - TIPO DE EXPOSIÇÃO HIV:

Uso de Droga: ()Não

()Sim Qual: _____

()EV ()Inalação ()Outra _____

()Sem informação

Atividade Sexual: ()Sexo com homens

()Sexo com mulheres

()Sexo com homens e mulheres

()Número de parceiros: () 1 a 2 /ano () 2 a 5/ano () > 5/ano

()Sem informação

Transfusão Sanguínea: ()Não

()Sim Quando: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

()Sem informação

III – DADOS DO HIV

Data do diagnóstico do HIV: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

Classificação do CDC: _____

Linfócito T CD4+ nadir: _____

Linfócito T CD4+ atual: _____

Carga viral HIV atual: _____

Antirretroviral em uso: _____

Hemograma atual: _____

Manifestação clínica: _____

Febre: _____

Alteração pulmonar: _____

Alteração GI: _____

Alteração hepática: _____

Alteração neurológica: _____

Diagnóstico atual: _____

IV – INVESTIGAÇÃO DE CMV

Anti-CMV: ()Positivo ()Negativo ()Sem informação ()Não realizado

Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| ()Sem informação

Antigenemia para CMV: ()Positivo ()Negativo ()Sem informação ()Não realizado

Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

PCR qualitativo CMV: ()Positivo ()Negativo ()Sem informação ()Não realizado

Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

V – INVESTIGAÇÃO DE HIV

Anti-HIV triagem: ()Positivo ()Negativo ()Sem informação ()Não realizado

Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

Anti-HIV confirmatório: ()Positivo ()Negativo ()Sem informação ()Não realizado

Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

CD4 nadir (+ baixo): _____ células/ml Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

Último CD4: _____ células/ml Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

Carga viral nadir (+baixa após início tto): _____ cópias/ml log_____

Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

Última carga viral: _____ cópias/ml log. _____

Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

Subtipo de HIV: _____

Tratamento antirretroviral:

()Não ()Sim Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

Terapia antirretroviral atual:

()AZT (Zidovudina) ()3TC (lamivudina) ()AZT+3TC (Biovir)

()D4T (Estavudina) ()DDI (Didanosina) ()ABV (Abacavir) ()TFV (Tenofovir)

()FTC (entricitabina) () RTV (Ritonavir) () LPV/RTV (Lopinavir/Ritonavir)

()ATV (Atazanavir) ()APV (Amprenavir) ()FAPV (Fosamprenavir)

()DRV (Darunavir) ()TPV (Tipranavir) EFV (Efavirenz) ()NVP (Nevirapina)

() DLV (Delavirdina) () T20 (Inibidor de Fusão/Enfuvirtida)

()Ral (Raltegravir/Inibidor da Integrase) ()CCR5 (Inibidor receptor/Maraviroc)

VI - TRATAMENTO DE CMV

Data início: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

Droga: () Ganciclovir

() Vanciclovir

() Foscarnet

() Cidofovir

() Outro. Qual: _____

Resposta ao tratamento CMV

() Não () Sim

Última PCR quantitativa Data: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_| Valor: _____

APÊNDICE 3 – DIAGNÓSTICO DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO NO MOMENTO DA ALTA

	Óbito	Diagnóstico do paciente
1	Não	Síndrome de Zollinger Ellison e doença gástrica por HCMV
2	Não	Síndrome inflamatória da reconstituição imune
3	Não	Infecção por Micobactéria atípica
4	Não	Tuberculose miliar e síndrome inflamatória da reconstituição imune
5	Sim	Meningite criptocócica
6	Não	Pneumocistose
7	Sim	Candidíase oral, caquexia e insuficiência respiratória aguda
8	Não	Linfoma
9	Não	Neurotoxoplasmose
10	Não	Úlcera esofágica e histoplasmose
11	Não	Tuberculose pulmonar
12	Não	Pangastrite enantematosa
13	Não	Meningite linfocitária, neurosífilis e doença de Parkinson
14	Não	Pneumocistose
15	Sim	Meningite criptocócica e infecção por HCMV
16	Não	Doença policística renal e hepática, anemia e dermatite de face
17	Não	Púrpura trombocitopênica idiopática secundária ao HIV
18	Não	Meningite criptocócica
19	Não	Neurotoxoplasmose e candidíase oral
20	Não	Candidíase oral e tricomoníase vaginal
21	Não	Neurotoxoplasmose
22	Não	Encefalite herpética e varicela zoster
23	Não	Sífilis e tuberculose pleural
24	Não	Neurotoxoplasmose e candidíase
25	Não	Pielonefrite
26	Não	Sífilis latente e neurotoxoplasmose
27	Não	Infecção por HCMV assintomática
28	Não	Cefaleia persistente

Continua

Continuação

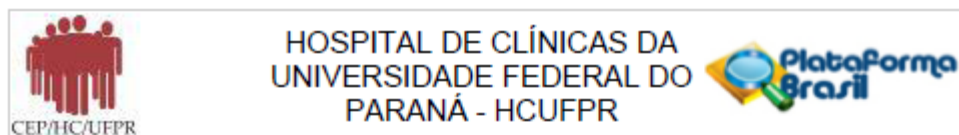
29	Não	Sífilis secundária, pneumonia e vaginose bacteriana
30	Não	Candidiase esofágica e sarcoma de Kaposi
31	Não	Neurotoxoplasmose
32	Não	Leucoencefalopatia multifocal progressiva
33	Não	Pancreatite crônica
34	Não	Infecção pulmonar por HCMV e retinite
35	Não	Gastroenterite
36	Não	Neurotoxoplasmose, candidiase esofágica e herpes simples
37	Não	Enteropatia pelo HIV
38	Não	Pneumocistose e sífilis latente
39	Não	Hepatite tóxica
40	Não	Tuberculose
41	Não	Retinite por HCMV com evolução para necrose de retina
42	Não	Hepatite B e sífilis latente
43	Não	Lesão de gengiva por herpes simples
44	Não	Candidiase oral, tuberculose, lesões herpéticas e linfoma de Hodgkin
45	Não	Encefalopatia pelo HIV e tuberculose
46	Não	Encefalopatia pelo HIV
47	Não	Tuberculose miliar
48	Não	Neurocriptocose e síndrome inflamatória da reconstituição imune
49	Não	Diarreia sem causa conhecida da etiologia
50	Não	Cistite e hepatoesplenomegalia
51	Não	Neurocisticercose e candidiase oral
52	Não	Demência pelo HIV
53	Não	Supressão medular pelo HIV
54	Não	Úlcera intestinal
55	Não	Desmielinização pelo HIV
56	Não	Neuropatia pelo HIV e reativação do HCMV
57	Não	Candidiase e neurotoxoplasmose
58	Não	Neurotoxoplasmose, condilomatose perineal, perivaginal e anal
59	Não	Lesões mucocutâneas por herpes simples
60	Não	Meningite linfocitária
Continua		

Continuação

61	Não	Doença pulmonar obstrutiva crônica
62	Não	Pneumocistose e giardíase
63	Não	Candidíase esofágica
64	Não	Neurotoxoplasmose e traqueobronquite infecciosa
65	Não	Neurocriptocose e hepatite B crônica
66	Não	Infecção respiratória e seqüela de tuberculose
67	Não	Sífilis
68	Não	Tromboembolismo pulmonar

ANEXOS

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HC-UFPR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES HIV POSITIVOS INTERNADOS NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ: Diagnóstico e monitoramento

Pesquisador: Sonia Mara Raboni

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 07283012.6.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 127.108

Data da Relatoria: 09/10/2012

Apresentação do Projeto:

Conforme já relatado no Parecer CEP nº 108.129 de 25/09/2012.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme já relatado no Parecer CEP nº 108.129 de 25/09/2012.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme já relatado no Parecer CEP nº 108.129 de 25/09/2012.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme já relatado no Parecer CEP nº 108.129 de 25/09/2012.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme já relatado no Parecer CEP nº 108.129 de 25/09/2012.

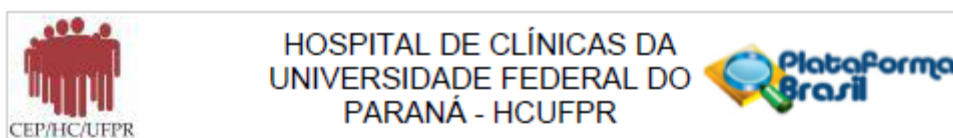
Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Pesquisador anexou os documentos solicitados, pendência atendida, projeto pode ser considerado aprovado.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
 Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

CURITIBA, 21 de Outubro de 2012

Assinador por:
Renato Tambara Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Camello, 181
Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br