

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Biomedicina

Débora de Carvalho Sillo
Karen Yukari Iwagoe

**CITOMEGALOVÍRUS: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS
PRINCIPAIS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM PACIENTES
TRANSPLANTADOS RENAIIS**

São Paulo
2015

Débora de Carvalho Sillo
Karen Yukari Iwagoe

**CITOMEGALOVÍRUS: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS
PRINCIPAIS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM PACIENTES
TRANSPLANTADOS RENAIIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientadas pela Profa. Dra Luciana Pugliese da Silva, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo
2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Sillo, Débora de Carvalho

Citomegalovírus: estudo comparativo entre os principais métodos diagnósticos em pacientes transplantados renais / Débora de Carvalho Sillo, Karen Yukari Iwagoe. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2015.

55 p.

Orientação de Luciana Pugliese da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação),
Centro Universitário São Camilo, 2015.

1. Citomegalovírus 2. Métodos 3. Diagnóstico 4. Pacientes 5.
Transplante de rim I. Iwagoe, Karen Yukari II. Silva, Luciana Pugliese
da III. Centro Universitário São Camilo IV. Título

CDD: 617.461

Débora de Carvalho Sillo
Karen Yukari Iwagoe

**CITOMEGALOVÍRUS: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS
PRINCIPAIS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EM PACIENTES
TRANSPLANTADOS RENAIIS**

São Paulo, 30 de Outubro de 2015

Prof^a. Orientadora Dra. Luciana Pugliese da Silva

Prof. Dr. Fábio Mitsuo Lima

Me. Rafael Alves da Silva

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre comigo e fazendo com que eu possa realizar os meus sonhos.

Agradeço à minha mãe, Olga Sayuri Ibahara por estar ao meu lado acompanhando meu crescimento no tempo que foi possível. Tenho certeza que ficará feliz por sua filha concluindo a formação acadêmica.

Agradeço ao meu pai, Takaho Iwagoe pelo esforço e dedicação para que eu possa realizar meu sonho.

Agradeço à minha irmã, Natália Lumi Iwagoe por me ajudar sempre que precisava.

Agradeço a todos os tios (as) e primos (as) pela força e momentos maravilhosos e por sempre acreditarem na minha força de vontade.

Agradeço às minhas amigas, Natália Akemi da Silva, Bárbara Floriano e Tamyres Alves pelas muitas risadas e trabalhos compartilhados cumpridos com louvor. Especialmente para a minha grande amiga Débora de Carvalho Sillo, que me ajudou muito nos estudos, com grande esforço, durante todo esse tempo.

Agradeço à toda equipe de professores que ajudaram muito no meu aprendizado e principalmente à prof^a Dra. Luciana Pugliese da Silva pelo seu exemplo profissional, orientação e apoio em diversos aspectos, durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Karen Yukari Iwagoe

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me guiar até aqui e por ter me concedido tantas oportunidades, as quais espero ter dado o devido valor. No auxílio em cada vitória sobre os obstáculos encontrados na trajetória até o presente momento.

Agradeço à minha família pelo apoio e incentivo a sempre batalhar pelos meus sonhos. Aos meus pais pela assistência, o esforço despendido, e a educação dada desde o berço, a eles devo a pessoa que me tornei hoje, em especial à minha mãe, Neide Aparecida Lucas de Carvalho, que desde pequena priorizou meus estudos, com toda paciência e cuidado, impulsionando e tendo pulso firme nos momentos necessários, sem isso eu provavelmente não teria chegado onde estou hoje.

Aos meus tios e primos pelas palavras de força e ânimo sempre que necessário. À minha tia e madrinha querida Neiva Aparecida Sillo dos Santos por sempre estar ao meu lado, sempre. À minha avó Lidia Barbosa Sillo, com seu jeitinho mineiro de querer fazer algo para ajudar enquanto eu estudava e sempre com uma comidinha gostosa a minha espera.

Aos amigos de longa data, pela compreensão, pela amizade, apoio em todos os momentos, obrigada por estar sempre presente Ana Paula Moreto da Silva. E também aos amigos mais recentes, contribuindo com o meu aprendizado, na organização das ideias tantas vezes confusas. Aos companheiros de curso, por trilharem essa etapa tão importante junto comigo, pelas tardes de estudo e aprendizado, brincadeiras e risadas. À Karen Yukari Iwagoe pela maravilhosa parceria e amizade, encarando essa empreitada ao meu lado.

Aos meus professores, o meu muitíssimo obrigada. Os admiro muito, em especial aqueles que, com uma didática incrível, transmitem seu conhecimento aos alunos, e acreditam em nós. À Prof^a Dra. Luciana Pugliese da Silva por todo o auxílio e paciência e tornar este trabalho possível.

Débora de Carvalho Sillo

“Uma jornada de mil milhas começa com um simples passo”.

Lao-Tsé

“A verdade reside em todo coração humano e cada um deve procurar por ela lá, e ser guiado pela verdade assim que a veja. Mas ninguém tem o direito de forçar os outros a agirem de acordo com sua própria visão da verdade”.

Mahatma Gandhi

SILLO, D.C, IWAGOE, K.Y. Citomegalovírus: Estudo comparativo entre os principais métodos diagnósticos em pacientes transplantados renais. 2015. 56f. Monografia (Bacharel em Biomedicina) – Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2015.

RESUMO

A infecção pelo CMV é uma das principais complicações após o transplante renal que ocorre em todas as regiões do mundo, variando com as condições socioeconômicas locais. É considerado um dos mais importantes patógenos oportunistas do paciente imunossuprimido. Este vírus possui como característica peculiar sua capacidade de latência, podendo ser reativado em diferentes circunstâncias. A infecção pelo CMV ocorre por meio de contato com secreções corpóreas contaminadas, por exemplo, saliva, suor, urina entre outros. Em pacientes imunossuprimidos, a infecção é sintomática e pode resultar em sérias complicações, com o possível envolvimento de órgãos. O diagnóstico de doença é feito por meio de evidência laboratorial de infecção, associada a quadro clínico compatível. Os dois métodos mais utilizados são a PCR e a antigenemia, tanto para diagnóstico quanto para monitoramento de tratamento. O objetivo foi apresentar os aspectos clínicos e a comparação entre os principais métodos diagnósticos para detecção do CMV. O estudo foi composto a partir da revisão de livros e artigos relacionados à infecção por CMV em transplantados renais. Foram utilizados quatro estudos comparando os diferentes métodos diagnósticos para detecção do CMV, visto que as técnicas mais apropriadas são a antigenemia e a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), devido as suas características que proporcionam confiabilidade no resultado e ao tempo de execução reduzido, porém em alguns estudos a PCR possui maior vantagem sobre a antigenemia.

Palavras-chave: Citomegalovírus. Métodos. Diagnóstico. Pacientes. Transplante de rim.

SILLO, D.C, IWAGOE, K.Y. Cytomegalovirus: a comparative study between the main diagnostic methods in renal transplant patients. 2015. 56f. Monograph (Bachelor of Biomedicine) - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2015.

ABSTRACT

The CMV infection is one of most frequent infectious complications after renal transplantation that occurs in all regions of the world, varying with local socioeconomic conditions. It is considered one of the most important opportunistic pathogens of the immunosuppressed patient. This virus has as a peculiar characteristic its capacity of latency and can be reactivated in different circumstances. The CMV infection happens through contact with contaminated body secretions, for example, saliva, sweat, urine among others. In immunosuppressed patients, the infection is symptomatic and can result in important disorders, with possible organ involvement. The diagnosis of CMV disease is based on laboratory evidence of infection associated with a compatible clinical presentation. Two of the most useful methods are PCR and antigenemia assay, both for diagnosis and monitoring treatment. This review presents the clinical aspects, comparison between the main diagnostic methods for detection of CMV. The study was composed from the review of books and articles related to CMV infection in renal transplant. Four studies were used comparing different diagnostic methods for detecting CMV, since the most appropriate techniques are antigenemia and Polymerase Chain Reaction (PCR) due to its features that provide reliability in results and reduced execution time, but in some PCR studies have greater advantage over antigenemia.

Keywords: Cytomegalovirus. Methods. Diagnosis. Patients. Kidney transplantation.

Lista de abreviaturas

APC: Células Apresentadoras de Antígenos

ANS: Agência Nacional de Saúde Suplementar

CDV: Cidofovir

CMV: Citomegalovírus

CTE: corticoesteroides

DNA: Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

dGTP: Desoxiguanosina trifosfato

EBV: Vírus Epstein-Barr

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Enzimaimunoensaio)

FOS: Foscarnet

GCV: Ganciclovir

HCMV: Citomegalovírus Humano

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE: Hematoxilina-eosina

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HVV-4: Herpes Vírus Humano tipo 4

HVV-5: Herpes Vírus Humano tipo 5

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IV: Intravenosa

Kbp: pares de kilobases

MI: Mononucleose Infecciosa

MO: Medula Óssea

nm: nanômetros

OKT3: Anticorpos Monoclonais anti-CD3

PCR: Reação em Cadeia de Polimerase

PMN: Leucócitos Polimorfonucleares

pp65: fosfoproteína de 65 kD

qPCR: Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa

qRT-PCR: Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em tempo real

TX: Transplante

R- D+: Receptor negativo e doador positivo

R+ D-: Receptor positivo e doador negativo

vGCV: Valganciclovir

VPP: Valor Preditivo Positivo

VPN: Valor Preditivo Negativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO.....	14
2.1 Geral.....	14
2.2 Específico.....	14
3 METODOLOGIA.....	15
4 TRANSPLANTE E CITOMEGALOVÍRUS	16
4.1 Transplantes.....	16
4.2 Imunossupressão	19
4.3 Citomegalovírus	21
4.3.1 Estrutura viral	23
4.3.2 Ciclo Viral	26
4.3.3 Infecção.....	27
4.3.4 Epidemiologia.....	28
4.3.5 Transmissão e manifestação clínica do CMV.....	29
4.3.6 Métodos diagnósticos de infecção e doença ativa pelo CMV	30
4.3.6.1 Sorologia	31
4.3.6.2 Histopatologia.....	31
4.3.6.3 Cultivo em células – Método convencional.....	31
4.3.6.4 <i>Shell vial</i>	32
4.3.6.5 Antigenemia para CMV	32
4.3.6.6 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	35

4.3.6.7 PCR qualitativa.....	37
4.3.6.8 PCR quantitativa	37
4.3.6.9 PCR quantitativa em tempo real (“real time qPCR”).....	38
4.4 Estudo comparativo entre os principais métodos para o diagnóstico de CMV em transplantedos renais	39
4.5 Tratamentos para infecções por CMV	46
4.5.1 Fármacos antivirais	46
4.5.1.1 Ganciclovir (GCV).....	48
4.5.1.2 Valganciclovir (vGCV)	49
4.5.1.3 Foscarnete (FOS).....	49
4.5.1.4 Cidofovir (CDV)	50
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

Há séculos a humanidade se preocupa em substituir tecidos ou órgãos com funcionamento deficientes por outros sadios (BOSCHIROLI, 2003). Inúmeros são os relatos que compõem a história dos transplantes desde civilizações remotas até os dias atuais (PEREIRA, 2000, SILVA NETO, 2005).

Após muitos estudos e experimentos mal sucedidos, pouco a pouco descobertas importantes foram alcançadas. Os transplantes de órgãos e tecidos ganharam grande impulso a partir do início da década de 80, principalmente em decorrência de avanços nas técnicas cirúrgica e anestésica, dos melhores cuidados na condução pré e pós-operatória dos pacientes, bem como o desenvolvimento de novos agentes imunossupressores. Entretanto, apesar de todos esses progressos, a rejeição do enxerto e, principalmente, as infecções, persistem como problemas críticos entre os transplantados (RESENDE, OLIVEIRA, 2000).

De acordo com Resende e Oliveira (2000), grande parte dos pacientes transplantados desenvolve algum tipo de infecção pós-transplante. O quadro clínico, a incidência e o tipo de infecção pós-transplante variam de acordo com o órgão transplantado, com o tempo de transplante, com a duração do procedimento cirúrgico, com o esquema de imunossupressão empregado, com a procedência do órgão (doador vivo ou cadáver), com o agente etiológico envolvido no processo infeccioso, com a reserva nutricional, metabólica e imunológica do paciente no período pré-transplante e com ocorrência, ou não, de episódios de rejeição.

A prevenção da rejeição pode ser feita através de testes prévios comparando os antígenos de histocompatibilidade do doador com os do receptor, através da terapia imunossupressora fazendo o uso de medicamentos ou ambos (TOPPA, 2000).

Como as infecções continuam sendo a principal causa de mortalidade em qualquer período pós-transplante, é fundamental preveni-las e tratá-las de maneira efetiva. Os desafios envolvidos nessa proposta são inúmeros: a ampla variedade de agentes etiológicos (desde vírus latentes até patógenos adquiridos na comunidade ou no ambiente hospitalar), as alterações na resposta inflamatória induzidas pelos

imunossupressores, que atenuam os sinais e sintomas das infecções invasivas, e os efeitos adversos das drogas antimicrobianas usadas nas profilaxias e terapêuticas são apenas alguns exemplos. O CMV é o patógeno responsável por alguns dos quadros infecciosos mais importantes que acometem pacientes transplantados renais (RESENDE, OLIVEIRA, 2000).

O CMV apresenta-se amplamente disseminado na população mundial, com taxas de soroprevalência podendo variar entre 30% a 97% dependendo da região analisada. No Brasil, estudos indicam uma taxa de soropositividade de quase 90% entre a população adulta. A distribuição do vírus é inversamente proporcional ao desenvolvimento socioeconômico (SLONGO, 2013).

Diferentes metodologias podem ser empregadas no diagnóstico laboratorial da infecção por CMV. Essas metodologias podem ser classificadas em técnicas que pesquisam anticorpos (sorologia: IgG/IgM específicas para CMV), técnicas que detectam proteínas virais, presentes na célula infectada como resultado da replicação viral (técnica de antigenemia, imunohistoquímica) e técnicas que empregam a biologia molecular na pesquisa do genoma ou do RNA mensageiro viral (PCR, Hibridização, captura híbrida, dentre outras) (GUIMARÃES; GUIMARÃES, 2002).

Pacientes imunossuprimidos que desenvolvem doença pelo HCMV após o transplante renal, necessitam da terapia antiviral de modo a prevenir as manifestações graves da doença e definir estratégias para a monitorização dos pacientes em relação à presença de viremia (CARRARO, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Abordar características gerais do citomegalovírus;

Descrever os métodos existentes para a detecção do CMV e respectiva adequação no uso para diagnóstico e monitoramento de tratamento em transplantados renais.

2.2 Específicos

Apresentar mecanismos e tipos de infecção do vírus;

Verificar dados epidemiológicos e sua importância clínica para pacientes imunossuprimidos, em especial para transplantados renais;

Comparar os métodos de antigenemia para CMV e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em Tempo Real, através de dados de experimentos realizados por outros autores.

3 METODOLOGIA

Foi realizado levantamento bibliográfico e digital em plataformas e revistas eletrônicas, como Lilacs, PubMed, Scielo e acervo disponível na Biblioteca Central Prof. Dr. Antônio Rubino de Azevedo – BIREME e Sistema Integrado de Bibliotecas Pe. Inocente Radrizzani.

Os descritores mais utilizados na pesquisa dos artigos e livros foram “citomegalovírus”, “infecção por CMV”, “transplante renal”, “PCR”, “Antigenemia para CMV”, “HHV-5”, “métodos diagnósticos para CMV”, entre outros. Os materiais estudados são datados de um período compreendido entre 1991 e 2015.

4 TRANSPLANTE E CITOMEGALOVÍRUS

4.1 Transplantes

Embora a literatura médica contemporânea limite a história dos transplantes aos últimos cem anos e credite ao cirurgião genovês Jacques-Louis Reverdin (1842 – 1928) o primeiro transplante com sucesso, em humanos, ao realizar, em Genebra, um autotransplante de pele em 1869, existem contos mitológicos que, em várias culturas religiosas, incluindo a hindu, chinesa, grega e egípcia, sugerem que a ideia do transplante pode ser muito mais antiga e relacionada aos anseios de longevidade (GARCIA, 2006).

O termo transplante foi utilizado pela primeira vez por John Hunter, em 1778, que descreveu seus experimentos com enxertos ovarianos e testiculares em animais não relacionados (PEREIRA, 2000).

No início da história, os primeiros experimentos e tentativas realizadas se baseavam na ideia de que os transplantes humanos poderiam ser controlados pelas mesmas leis dos enxertos no reino vegetal e que tecidos de diferentes origens poderiam unir-se quando submetidos à firme adesão. A disponibilidade e a ampliação do uso de enxertos livres levaram ao emprego de aloenxertos ou enxerto homólogo (transplante entre indivíduos geneticamente diferentes de uma mesma espécie) e xenoenxertos ou enxerto heterólogo (transplante entre indivíduos de diferentes espécies), dos mais diversos tecidos e órgãos. Entretanto, alguns investigadores observaram que autotransplantes sobreviviam melhor, e as frequentes falhas com alo e xenoenxertos levantaram a questão sobre a compatibilidade entre diferentes espécies ou mesmo entre diferentes indivíduos. Outros avanços também foram observados, como o desenvolvimento da assepsia, reduzindo a taxa de infecção. Porém, o problema básico que permanecia para a revascularização direta dos órgãos era a necessidade do desenvolvimento de uma técnica efetiva de anastomose vascular, sem trombose, hemorragia ou estenose (GARCIA, 2006).

Entretanto, os trabalhos pioneiros de Carrel e Guthrie, na primeira década deste século, desenvolvendo as técnicas de suturas vasculares com fios e agulhas finas, impulsionaram as pesquisas experimentais e a aplicação clínica dos transplantes de órgãos (PEREIRA, 2000, SILVA NETO, 2005).

Em 1902, Ullmann, da Escola de Medicina de Viena, realizou o primeiro autotransplante de rim nos vasos do pescoço de um cão (PEREIRA, 2000).

Garcia (2006), conta que, em 1920, Dederer realizou um transplante renal entre dois cães de mesma raça, tendo o rim funcionando por 26 dias. Como ocorreu nos experimentos em animais, o rim foi o primeiro órgão transplantado em humanos, utilizando a experiência adquirida na anastomose em animais, e impulsionado pela dramática situação letal do paciente em anúria.

Com a Segunda Guerra Mundial, houve uma série de avanços na antibioticoterapia, na obtenção de frações de plasma, nas técnicas de transfusões sanguíneas, na anestesia endotraqueal com pressão positiva, nas anastomoses vasculares primárias para lesões arteriais, na diálise e nos estudos dos enxertos cutâneos, que contribuíram para estimular o desenvolvimento dos transplantes (LAMB, 2000).

De acordo com Garcia (2006), os primeiros conceitos explicando as reações do hospedeiro aos tecidos transplantados vêm de investigadores, trabalhando em transplantes de tumores. Primeiramente foi atribuído ao processo de destruição dos transplantes de tumores de mama de rato o nome de imunidade ativa. Foi visto que um tumor transplantado que levava oito ou nove dias para ser destruído, quando transplantado pela segunda vez era destruído em três a quatro dias, concluindo que era desenvolvida imunidade ao tecido do primeiro transplante, assim destruída mais rapidamente o segundo.

Em 1952, Dausset, em Paris, descobre os antígenos de histocompatibilidade e, em 1954, a equipe de Murray, em Boston, inicia o programa de transplante renal com gêmeos HLA idêntico, com retumbante sucesso (PEREIRA, 2000).

Os esforços foram no sentido de superar o problema da rejeição através do desenvolvimento de novos imunossupressores. Nas décadas de 60 e 70 desenvolveram-se fármacos com uma melhor ação imunossupressora e expressivos

efeitos adversos, tais como a nefrotoxicidade, hipertensão arterial, neurotoxicidade, hiperglicemia, neoplasias, infecções, hiperlipidemia e hiperpotassemia. Em 1983, foi desenvolvida uma nova droga com características mais seletiva e com menor efeito adverso, a ciclosporina, a qual transformou os transplantes de uma simples curiosidade, para uma terapia efetiva (SILVA NETO, 2005).

De acordo com Silva Neto (2005), a década de 80 foi marcada pelo surgimento de vários eventos tais como novas drogas imunossupressoras, a ciclosporina e o tacrolimus, a padronização nas retiradas múltiplas dos órgãos dos doadores cadáveres e o desenvolvimento de uma nova solução de conservação dos órgãos. Estes avanços permitiram obter resultados encorajadores nos transplantes do rim, coração e fígado proporcionando uma sobrevida de até 80% em dois anos aos pacientes transplantados.

A obtenção de órgãos de doadores cadáveres aumentou em decorrência do maior envolvimento do público e dos profissionais de saúde, embora o número de pacientes em lista de espera, persistentemente, excedesse o número de rins disponíveis (GARCIA, 2006).

O transplante renal foi o primeiro dos procedimentos de transplante de órgãos largamente utilizados no tratamento de falência terminal de órgãos. As técnicas cirúrgicas básicas, usadas no transplante renal foram desenvolvidas no princípio do século XX por Alexis Carrel ganhador do prêmio Nobel de 1912, e que ainda hoje são adotadas (SILVA NETO, 2005).

O primeiro alotransplante renal no homem foi realizado em 1933 por Voronoy, um cirurgião ucraniano, para tratar uma insuficiência renal aguda causada por envenenamento com mercúrio. Infelizmente, o rim não funcionou, já que foi retirado do doador seis horas após parada cardíaca, e o receptor morreu 48 horas após (PEREIRA, 2000).

Pereira (2000) afirma que, no início da década de 50, uma série de transplantes renais em humanos foi realizada em Paris e Boston, porém, nenhuma droga imunossupressora foi usada para prevenir rejeição, e somente um paciente sobreviveu, por aproximadamente seis meses após a cirurgia.

Segundo Lamb (2000), com os avanços obtidos, passou a haver melhor avaliação e pareamento dos antígenos além da evolução da terapêutica imunossupressora e o primeiro transplante renal cadavérico bem sucedido aconteceu em 1962.

Apesar de todos os progressos, a rejeição do enxerto e, principalmente, as infecções, persistem como problemas críticos entre os transplantados. A grande maioria dos receptores de transplante (70 a 80%) apresenta pelo menos um episódio de infecção pós-transplante. Destes, 50% são acometidos em algum momento das suas vidas por infecções sistêmicas consideradas graves, as chamadas “infecções maiores”. Essas infecções são, na maioria das vezes, causadas por bactérias (55%), podendo ser também devidas a fungos (22%) ou a vírus (22%) (RESENDE, OLIVEIRA, 2000).

Segundo Resende e Oliveira (2000), o risco de infecção pós-transplante depende basicamente da interação entre a exposição do receptor aos patógenos potenciais (fator epidemiológico) e seu estado de imunossupressão. Os processos infecciosos que acometem os transplantados podem ser secundários à transmissão do agente etiológico pelos hemoderivados ou pelo próprio enxerto, podendo ainda originar-se de complicações pós-operatórias. Podem decorrer também de infecções oportunistas com a participação de microrganismos procedentes da flora endógena tecidual latente (*P. carinii*, citomegalovírus, *T. gondii*, *M. tuberculosis*, vírus do herpes simples e outros).

4.2 Imunossupressão

A imunossupressão é o fator que, isoladamente, exerce maior influência na ocorrência das infecções nos transplantados, especialmente após os avanços obtidos na técnica cirúrgica dos transplantes. Os principais imunossupressores (Quadro 1) utilizados na prática médica são a ciclosporina, os corticoesteroides (CTE), o tacrolimo, a azatioprina e os derivados do ácido micofenólico, que são empregados isoladamente ou, com maior frequência, associados em esquemas já estabelecidos. O OKT3 (anticorpo monoclonal murino contra o antígeno CD3 de

células T humanas) está reservado para os casos de rejeição de enxerto (LIMA, COSTA, 2000).

A ciclosporina atua principalmente sobre as células T, não interferindo diretamente sobre a medula óssea. Os níveis plasmáticos devem ser acompanhados para a adequação da melhor ação terapêutica, com o menor número possível de efeitos colaterais. Os CTE são utilizados em quase todos os esquemas terapêuticos. Estes fármacos quando administrados em altas doses, diminuem a produção de anticorpos e a imunidade celular, além de inibir a resposta inflamatória, o que aumenta significativamente o risco de infecções em geral e das infecções fúngicas. O uso prolongado dos CTE pode levar à supressão de função das suprarrenais, osteoporose, diabetes melito e distúrbio hidroeletrólítico (RESENDE, OLIVEIRA, 2000).

O tacrolimo é usado como imunossupressor primário pós-transplante de órgãos sólidos, como medicamento para resgate em episódios agudos de rejeição. A droga é usada em esquema único ou em associação com outros imunossupressores, contudo o medicamento não é isento de toxicidade, principalmente nefrotoxicidade necessitando de monitorização de seus níveis circulantes (LIMA, COSTA, 2000).

A azatioprina e o ácido micofenólico atuam diretamente sobre a imunidade celular, com risco significativo de leucopenia e supressão medular. Por isso, deve-se sempre considerar a suspensão desses medicamentos quando há presença de infecções sistêmicas graves. Quando utilizamos no tratamento da rejeição, o OKT-3 está relacionado com o aumento considerável dos índices de infecção em geral e das infecções por fungos, CMV entre outros (RESENDE, OLIVEIRA, 2000).

O citomegalovírus é o patógeno responsável por alguns dos quadros infecciosos mais importantes que acometem pacientes transplantados. Pode causar efeitos diretos, como lesão tecidual e doença clínica, além de uma variedade de efeitos indiretos, como rejeição aguda e crônica do enxerto, risco aumentado de doença linfoproliferativa pós-transplante e superinfecção bacteriana. A citomegalovirose constitui a causa mais comum de infecção a partir do primeiro mês pós-transplante. É sintomática em 25 a 30% dos casos, sendo responsabilizada por cerca de 20% dos óbitos ocorridos nesse período (SALOMÃO FILHO et al., 2000).

Quadro 1: Classificação das drogas imunossupressoras

Droga	Mecanismo	Indicação	Nível terapêutico	Efeito colateral
Ciclosporina	Bloqueio da calcineurina	Indução e manutenção	5-10 mg/kg/dia níveis de 100-300 mcg/l	Nefrotoxicidade e hipertensão
Corticoide	Bloqueia APC ¹ + expressão de citocinas	Indução, manutenção e rejeição aguda	5 mg/dia	Osteoporose, catarata, diabetes, obesidade
Tacrolimo	Bloqueio da calcineurina	Indução, rejeição aguda e manutenção	0,1-0,2 mg/kg/dia	Neuro e nefrotoxicidade, diabetes
azatioprina	Bloqueio da conversão de ² IMP para ³ AMP e ⁴ GMP	Indução, manutenção, terapia tripla	1-2,6 mg/kg/dia	Mielo e hepatotoxicidade
Micofenolato mofetil	Bloqueia a mitose	Indução, manutenção	1-5 mg/kg/dia	Leucopenia, cistite, cardiotoxicidade
OKT-3	Anticorpo anti-CD3 (murino)	Indução e rejeição aguda	5 mg/dia	Febre e doenças linfoproliferativas

Nota: ¹Células Apresentadoras de Antígenos, ²IMP: inosina trifosfato, ³AMP: adenosina monofosfato, ⁴GMP: guanosina monofosfato

Fonte: (adaptada de LIMA, COSTA, 2000).

4.3 Citomegalovírus

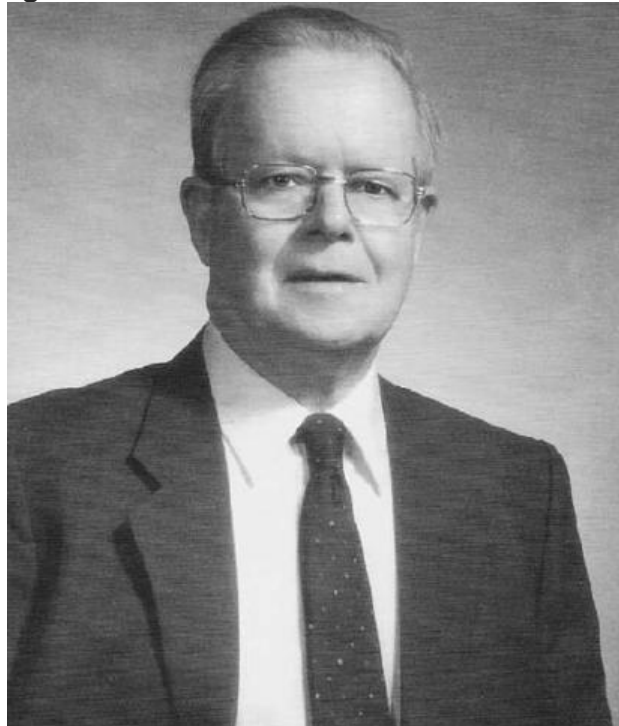
No ano de 1955, Margaret Smith isolou um vírus originado das glândulas salivares de pacientes, esse vírus cresceu apenas em cultura de célula de rato e não em humanos. O artigo descrito com essa história foi rejeitado porque Smith trabalhava com vírus de glândulas salivares de ratos e o editor pensou que ela poderia ter tido um rato que contaminou a amostra. Hoje sabemos que isso não é possível já que o citomegalovírus é espécie-específica, ou seja, o CMV de outros

animais não infecta ou compromete o organismo humano. (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002).

Rowe e colaboradores estavam interessados em estudar viroses respiratórias isoladas a partir de tecidos de adenoides suspeitando ser um vírus da varicela, já que as células continham inclusões intracelulares, como descritos por Weller (Figura 1) em 1953 nos casos de varicela. Rowe encaminhou a amostra para o laboratório onde Weller se encontrava para obter mais informações e ter a confirmação do vírus, porém Weller confirmou que não era o vírus que Rowe pensou que era, mas um tipo similar que Weller tinha isolado a partir de uma paciente com suspeita de toxoplasmose (HO, 2008).

Um ano depois Weller e colaboradores localizaram o mesmo tipo de partículas do agente presente no fígado e urina de crianças com infecção congênita. Em seguida, os três autores juntaram as informações e em 1960 foi sugerida a definição do nome citomegalovírus (CMV), devido à alteração da forma da célula citomegálica (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002).

Figura 1: Thomas H. Weller

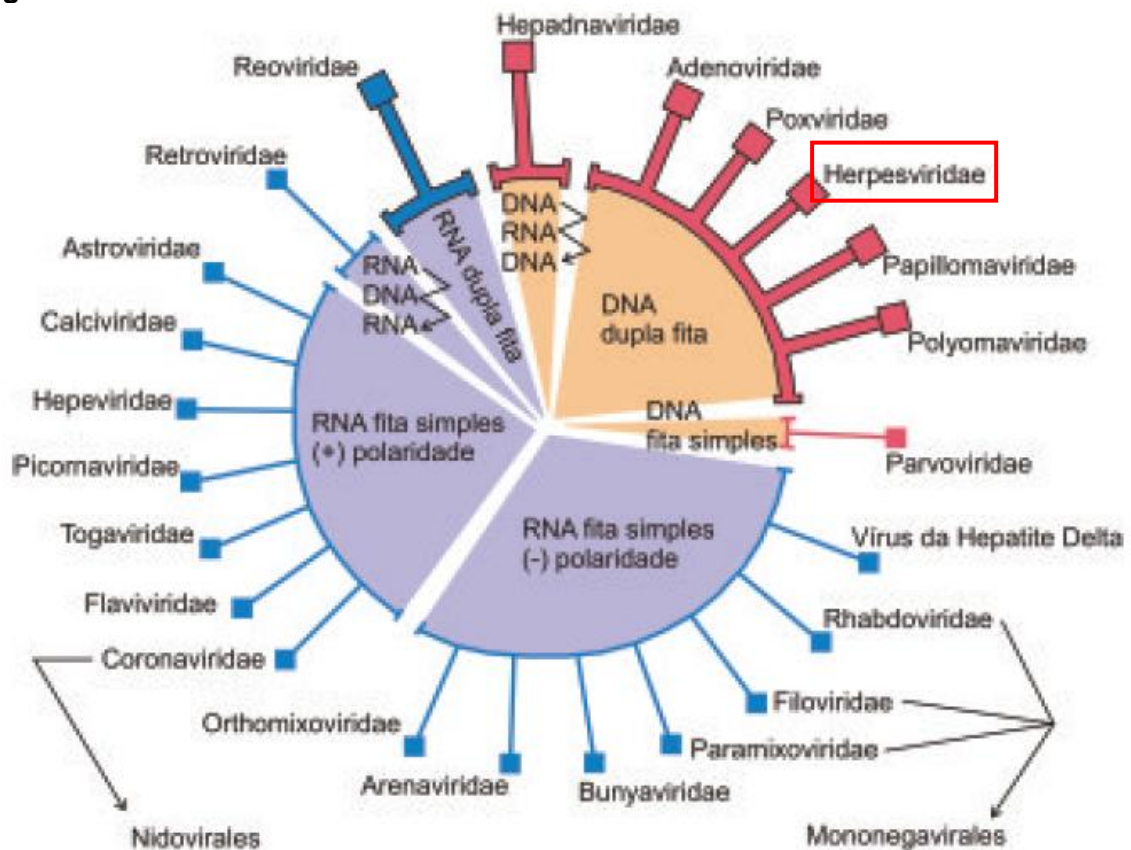


Nota: pediatra, virologista, parasitologista e descobridor do CMV
Fonte: (Ho Monto, 2008)

Originalmente, o nome citomegalovírus (CMV) deve-se a uma das mais importantes características observadas durante os estudos sobre o agente. O nome citomegalovírus é descrito como, *cito* (célula) e *megalo* (grande), devido à aparência das células (TRABULSI, ALTERTHUM 2008).

O CMV pertence à família dos *Herpesviridae* (Figura 2), subfamília β -*Herpesvirinae*, ao grupo de vírus da espécie *Human herpesvirus 5* (HHV-5) do gênero *Citomegalovirus* (ICTV, 2012).

Figura 2: Taxonomia viral



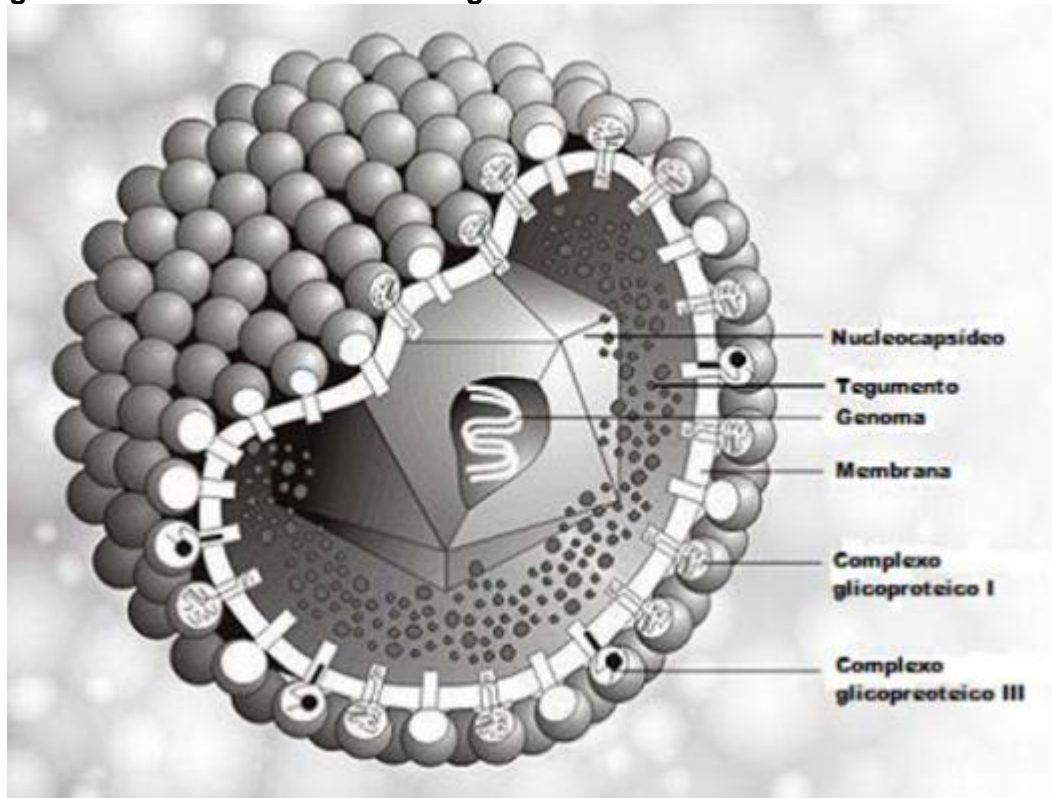
Nota: destaque para *Herpesviridae*
 Fonte: (STEPHENS, 2009)

4.3.1 A estrutura viral

A estrutura viral do CMV é constituída por DNA (Ácido Desoxirribonucleico) de duplo filamento, que está localizado dentro de um capsídeo proteico de simetria icosaédrica (20 faces), essa camada está envolta pelo tegumento e revestida por

outra camada lipídica, onde estão presentes as glicoproteínas (Figura 3) (JUNQUEIRA; SANCHO; SANTOS, 2015; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Figura 3: Estrutura viral do Citomegalovírus



Fonte: (TOMTISHEN, 2012)

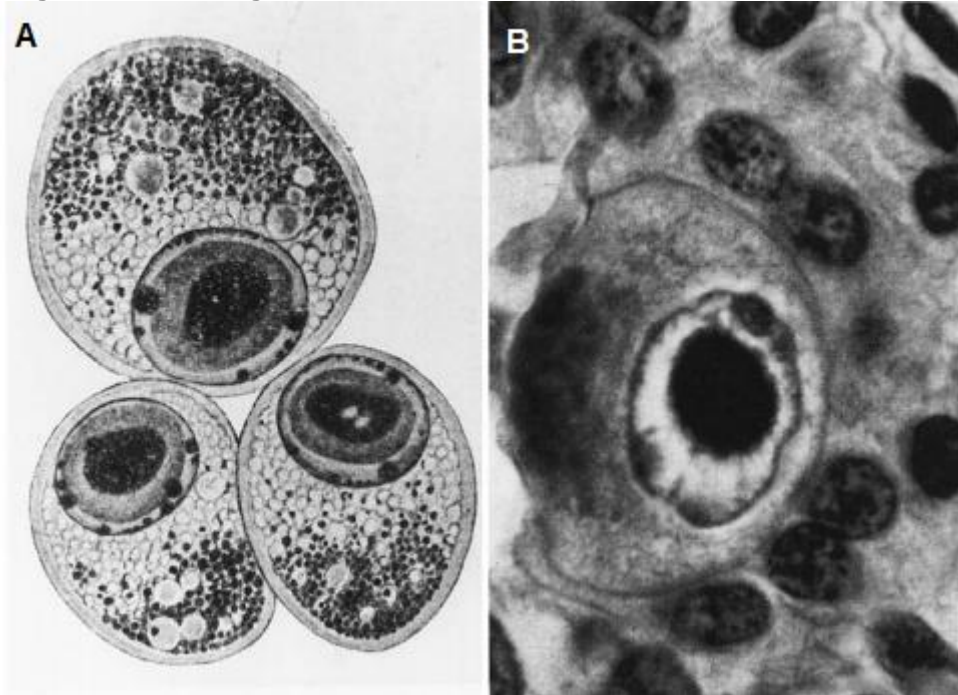
Comparado aos outros da mesma família, possui o maior conteúdo genético, tendo em seu genoma 241kbp, permitindo codificar aproximadamente 166 a 230 proteínas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O tempo médio de vida desse agente é de aproximadamente 45 minutos a 37°C. Sendo que o CMV é encontrado em muitos mamíferos como camundongos, cobaias entre outros, porém as cepas do agente são espécies-específicas (PANNUTI et al., 2013).

Uma das características que definem a infecção por HCMV (Citomegalovírus Humano) é a célula bem grande, que alguns autores chamam de “célula armada” medindo por volta de 25 a 35 µm em diâmetro e próximo ao centro contém um corpo de inclusão intracelular basofílico, conhecido como “olho de coruja”. Para visualizá-los é preciso realizar uma coloração específica como de Papanicolaou ou Hematoxilina-eosina (HE) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Outros pesquisadores detectaram a presença em células de fígado, rins e pulmão de natimortos com características típicas de CMV como halo mais claro, células gigantes com núcleo excêntrico e inclusões intracelulares como mostrado na figura 4 (HO, 2008).

Figura 4: Morfologia da célula infectada por CMV



Nota: (A) células com halo, inclusões intracelulares e citoplasmáticas; (B) célula citomegálica com núcleo excêntrico, halo e inclusões.

Fonte: Adaptada de HO, 2008

Uma das especificidades do CMV é a capacidade do tempo de latência, pois esse agente não é eliminado do organismo facilmente, ou seja, quando uma pessoa é infectada, o CMV permanece em seu organismo na forma latente e só é reativado através de um estímulo que modifica o sistema imunológico do hospedeiro, como, por exemplo, a imunodeficiência. A duplicação do DNA viral é intracelular, não permitindo a ação dos anticorpos neutralizantes, porém o CMV pode ser facilmente inativado por fatores físico-químicos, como por exemplo, alta temperatura (56°C por 30 minutos), baixo pH, luz ultravioleta, solventes lipídicos, ciclos de congelamento e/ou descongelamento entre outros (JUNQUEIRA; SANCHO; SANTOS, 2008).

4.3.2 Ciclo Viral

A duplicação do DNA viral depende dos produtos genéticos da célula hospedeira trabalhando juntamente com as funções virais levando a uma alta desregulação da expressão do ciclo genético da célula. O ciclo de replicação depende tanto das funções celulares quanto da célula do hospedeiro (JUNQUEIRA; SANCHO; SANTOS, 2008).

A biossíntese viral tem início com a penetração do vírus na célula hospedeira através da adsorção das glicoproteínas de seu envelope com receptores específicos da membrana plasmática. Após a fusão, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma celular e levado pelo citoesqueleto, através dos poros nucleares, até o interior do núcleo, onde o DNA é replicado. As proteínas do tegumento são carregadas para o núcleo, juntamente com o nucleocapsídeo, e são responsáveis pela ativação da síntese de uma nova progênie viral. Dentre essas proteínas, algumas são importantes para induzir o início da síntese proteica e outras interrompem a síntese macromolecular da célula. A replicação do genoma viral obedece a uma ativação chamada em cascata, em que as proteínas regulatórias ou proteínas α são produzidas nas duas primeiras horas pós-infecção e ativam/reprimem as proteínas β (responsáveis pela replicação do DNA viral e de enzimas correlatas) que por sua vez ativam/reprimem as proteínas γ (proteínas estruturais) que irão regular a síntese de mais proteínas α (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002).

De acordo com Santos, Romanos e Wigg (2002 p. 102), as proteínas que formam as espículas virais são glicosiladas no retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi. As glicoproteínas são inseridas na membrana nuclear, que formará o envelope viral na montagem final de novos vírus no núcleo da célula. A liberação da partícula completa, no meio extracelular, provavelmente, se dá por fusão de vesículas intracitoplasmáticas carregando o vírus envelopado no núcleo, com a membrana citoplasmática.

Quando o vírus penetra no organismo humano, este inicia um processo de replicação de DNA viral, dentro de um período entre 14 e 24 horas após a infecção e, conseqüentemente, há a liberação do vírus nos fluidos corporais e também na corrente sanguínea. De acordo com Junqueira e colaboradores (2008), a replicação

viral é dividida em três fases dentro de 24 horas. Na primeira fase, nas 4 primeiras horas seguidas à infecção, ocorre a produção de proteínas regulatórias, já na segunda fase, que está compreendida entre 4 e 8 horas, há a produção da DNA polimerase viral, e na terceira fase, 8 à 12 horas após o contágio, são sintetizadas proteínas estruturais e ocorre a montagem de novos vírus.

4.3.3 Infecção

Existem algumas formas clínicas do CMV quando ocorre a infecção, devido à presença de anticorpos específicos circulando na corrente sanguínea do indivíduo. A infecção pelo CMV pode ser primária ou por reativação. De acordo com Deboni e colaboradores (2002), quando o receptor com sorologia negativa é transplantado com doador com sorologia positiva para CMV (R- D+) é definida como infecção primária; já o receptor com sorologia positiva para CMV transplantado com doador com sorologia positiva ou negativa (R+ D+/-), é conhecida como reativação (DEBONI et al., 2002).

A infecção por CMV é importante em pacientes que realizaram transplante renal devido a sua alta prevalência na população, podendo resultar na morbidade e mortalidade do indivíduo. É importante conhecer a sorologia tanto do doador quanto do receptor, já que o risco de doença na situação D+/R- é muito mais grave do que D-/R- (SIA, 2000).

Grande parte dos pacientes soronegativos que recebem o rim de doadores soropositivos (D+/R-) soroconvertem, ou seja, o indivíduo adquire a infecção nos primeiros seis meses depois do transplante e assim pode desenvolver a doença pelo CMV (DUNN et al., 1991).

Os pacientes imunocompetentes, quando infectados pela primeira vez pelo CMV, podem não apresentar nenhum sintoma, ou seja, progredir assintomaticamente ou podem ser observados sintomas como febre, linfocitose atípica entre outros (MELLO et al., 2008).

4.3.4 Epidemiologia

O CMV é um patógeno humano distribuído frequentemente entre as populações do mundo, podendo chegar a 85% de indivíduos adultos já infectados, variando de acordo com o nível socioeconômico dos indivíduos, sendo que a prevalência é maior nas pessoas que moram em países subdesenvolvidos, facilitando a contaminação em outros lugares. Já em países desenvolvidos o número de infecções é mais alto em habitantes de baixa renda e em imigrantes de países em desenvolvimento. Outros autores através de estudos soropidemiológicos notaram a possibilidade de existir uma relação entre a prevalência de anticorpos em uma população adulta e seu nível socioeconômico (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008, MELLO et al., 2008).

Segundo Santos, Romanos e Wigg (2002), a infecção por CMV possui alta prevalência em indivíduos transplantados, variando entre 46 a 100% nos diferentes grupos e cerca de 85% dos transplantados com infecção primária tornam-se assintomáticos e 20-40% tem infecções recorrentes clinicamente aparentes. Pessoas com alto grau de risco, como homossexuais ou bissexuais portadores de HIV, possuem alta soropositividade. Nestes pacientes, a infecção por CMV apresenta elevada morbidade e mortalidade devido ao agravamento da imunossupressão, manifestada pelo decréscimo da quantidade de linfócitos T CD4 + e a presença de viremia. Assim como, os profissionais da área da saúde, médicos e enfermeiros, estão predispostos ao contato com indivíduos com alto risco de infecção.

A infecção pelo CMV pode acometer ainda mais os organismos dos pacientes imunossuprimidos, principalmente os transplantados, tanto de órgãos sólidos como transplante de células. Alguns autores como Deboni e colaboradores (2001), relataram que a infecção por CMV é a complicação infecciosa mais vista em pacientes receptores de transplante renal com a incidência variando de 30 a 60%, chegando até 90% dos casos, dependendo da carga viral e da imunossupressão utilizada, e Guimarães (2002) mostra que a incidência chega aos 70%, principalmente nos primeiros meses após o transplante, demonstrando alto índice de novos casos.

4.3.5 Transmissão e manifestação clínica

Após a infecção inicial, o vírus pode estar presente em vários locais do corpo do indivíduo. A transmissão do CMV pode acontecer através da saliva, secreções respiratórias, urina, sangue, secreções da cérvix uterina, transmissão sexual via sêmen, transfusão sanguínea, transplantes de órgãos, leite materno, medula óssea entre outros órgãos. O primeiro contato desse agente é caracterizado pela resposta humoral, ou seja, pela produção de anticorpos específicos IgM e IgG. A presença de IgG positiva indica o contato prévio com o vírus, porém não exatamente o CMV ativo (JUNQUEIRA; SANCHO; SANTOS, 2008).

As contaminações mais frequentes são o contato com as crianças, a atividade sexual e os indivíduos transplantados renais. De acordo com alguns autores, o vírus é o principal agente causador de doença que compromete o homem; segundo Mercatelli (1998) aproximadamente 85% da população já é afetada, levando em conta que a primeira infecção pode ser por via uterina ou no período perinatal (MELLO et al., 2008).

A maioria dos pacientes HIV positivos que possui o vírus apresenta retinite, 85% dos casos de pacientes de acordo com Junqueira e colaboradores (2008), pois o vírus pode infectar a retina. Já a segunda manifestação clínica mais frequente ocorre no sistema gastrointestinal, podendo causar gastrite, esofagite entre outros.

A incidência de pacientes infectados ativos pelo CMV varia de acordo com o tipo de órgão para transplante em imunocomprometidos além do estado sorológico tanto do receptor quanto do doador, sendo aproximadamente 54 a 92% após o transplante de pulmão, 30 a 70% em transplantados com células progenitoras hematopoiéticas e principalmente chegando 60 a 100% em pessoas transplantadas de órgãos como rim ou fígado (MATOS; MEYER; LIMA, 2011).

De acordo com Guimarães (2002), os mecanismos responsáveis por uma infecção por CMV são pelo enxerto do doador ou por transfusão sanguínea e derivados, doador com sorologia positiva relacionada a um receptor CMV negativo,

reativação de uma infecção pelo CMV latente em paciente sob imunossupressão e transmissão de uma cepa diferente de vírus a um receptor positivo.

O caso menos frequente, porém passível de acontecer, é em transfusões de hemoderivados de doadores soropositivos para pacientes transplantados soronegativos que elevam também o risco, o que pode ser amenizado pela irradiação de bolsas na pré-transfusão (TONG et al., 1998).

4.3.6 Métodos diagnósticos de infecção e doença ativa pelo CMV

Segundo Fonseca (2015), na prática clínica existem alguns conceitos básicos essenciais que auxiliam na avaliação correta de testes diagnósticos como, acurácia do teste, sensibilidade, especificidade e valores preditivos. A acurácia do teste é a proporção de testes verdadeiramente positivos e verdadeiramente negativos em relação ao número total dos resultados ($a+d/a+b+c+d$), como visto no modelo de tabela 2x2 (Tabela 1). Maior sensibilidade, quer dizer que a maior proporção de pacientes doentes tem o teste diagnóstico positivo ($a/a+c$). Já a especificidade é definida como a relevância de indivíduos saudáveis que apresentam teste negativo ($d/b+d$). Os valores preditivos também são calculados nas linhas horizontais da tabela 2x2 e estão relacionados com a estimativa da presença ou não da enfermidade, com base no resultado positivo ($a/a + b \times 100$) ou negativo ($d/d + c \times 100$) do teste.

Tabela 1: Tabela no formato 2x2

Teste	Enfermidade	
	Presente	Ausente
Positivo	Verdadeiro-positivos (a)	Falso-positivos (b)
Negativo	Falso-negativos (c)	Verdadeiro-negativos (d)

Nota: mostra o cálculo de acurácia, sensibilidade e especificidade de um teste diagnóstico.

Fonte: (FONSECA, 2015)

Embora tenha havido progressos na profilaxia da infecção pelo CMV, ainda causa muita mortalidade nos pacientes transplantados, necessitando encontrar maneiras de detectar o agente causador através de testes diagnósticos sensíveis e específicos, precoces e de rápida execução (GONZALEZ et al., 1999).

Os métodos diagnósticos para o CMV muito utilizados eram os sorológicos, histopatológicos e a cultura de células, porém devido à baixa sensibilidade e dificuldades nas técnicas esses procedimentos não são tão preferíveis devido as suas desvantagens (KOTTON, 2013).

4.3.6.1 Sorologia

Os testes sorológicos são utilizados para determinar se o paciente teve no passado a infecção pelo CMV, determinando a presença ou ausência de IgG no organismo. A detecção de títulos de IgM não deve ser utilizada para diagnóstico na infecção ativa no transplante, pois a quantidade de IgM não é detectada precocemente, tendo assim relação com início tardio do tratamento no paciente (KOTTON, 2005).

4.3.6.2 Histopatologia

Na histopatologia, o processo requer biópsia tecidual, o método é pouco sensível e só permite o diagnóstico de doença invasiva, apesar de que mostra certeza da doença quando as inclusões virais são encontradas (HUMAR, 2009).

4.3.6.3 Cultivo em células – Método convencional

A cultura viral, ainda é utilizada em áreas como a pesquisa como um método padrão para comparar com as novas técnicas de diagnósticos. A cultura convencional consiste na inoculação de espécimes clínicos em fibroblastos humanos e a observação do efeito citopático, porém o tempo necessário para obter o

resultado é muito demorado, aproximadamente de 28 ou mais dias. Sendo assim, para obter o diagnóstico precoce fica claramente inviável (BRITT, 1996).

4.3.6.4 Shell vial

Na técnica de cultivo de células com adição de anticorpos monoclonais, mais conhecido como “Shell vial assay”, uma variante da cultura convencional, são adicionados ao meio de cultura celular inoculado com a amostra clínica anticorpos monoclonais dirigidos às proteínas imediatamente precoces do CMV. A interpretação não é feita através do efeito citopático e sim por imunofluorescência ou ELISA, diferenciando-a da cultura clássica. Este método possui vantagem como rápida execução podendo obter resultado em até 24 horas (TANABE et al., 1997).

Um estudo avaliou transplantados renais infectados pelo CMV em que esse método obtinha sensibilidade de 71% e a especificidade de 74% em sangue. Já o VPP foi de 50% e o VPN de 88%. Outros autores mostraram que há grande desvantagem nesse método, pois a positividade se dá tardiamente no curso da doença, em torno de 25 dias após o começo do quadro clínico (AITKEN et al., 1999; ABU-NADER; PATEL, 2000).

Em busca de metodologias mais sensíveis, a antigenemia e a Reação em Cadeia de Polimerase são os mais recomendáveis para realizar a pesquisa viral do CMV.

4.3.6.5 Antigenemia

A pesquisa da antigenemia pp65 (proteína da matriz do CMV) vem sendo utilizada em transplantes de órgãos e tecidos desde o final da década de 80, e apesar de os métodos baseados em amplificação de ácido nucleico (PCR) terem revolucionado a aplicabilidade clínica do laboratório de virologia na última década (SCHROEDER et al., 2009).

Relatos apontam que a técnica foi desenvolvida e descrita pela primeira vez por Van Der Bij, em 1986, na Holanda. E na década de 90 começou a ser utilizada no Brasil (DEBONI, 2001).

Segundo a ANS (Agência Nacional de Saúde Suplementar) – Brasil (2014), este exame não faz parte do chamado Rol de Procedimentos e Eventos em saúde, no qual estão contidos aqueles procedimentos e exames que os planos de saúde privados devem, obrigatoriamente, oferecer cobertura aos seus clientes. Embora existam outros exames direcionados ao diagnóstico do CMV nesse Rol, a Antigenemia para Citomegalovírus não pôde ser incluída devido a falta de padronização da técnica, entre outros problemas.

Segundo Schroeder (2009), essa metodologia ainda é amplamente utilizada nos dias atuais em centros de transplantes e diagnóstico em todo o mundo, com considerável sucesso em estratégias de terapia preventiva, por permitir o diagnóstico de infecção ativa e/ou replicação viral incipiente, evitando com isso o desenvolvimento de doença no órgão-alvo.

O exame se baseia na utilização de um anticorpo monoclonal primário contra a proteína pp65 da matriz viral e informa indiretamente a carga viral em células do sangue. Utilizam-se para o teste leucócitos polimorfonucleares (PMN) extraídos de sangue periférico, com base no conhecimento que eles são as principais células na expressão de antígenos virais durante a infecção ativa pelo CMV (BOSCHIROLI, 2003). Contra a proteína é dirigido um “pool” de anticorpos monoclonais, sendo feita reação com imunoperoxidase ou imunofluorescência indireta e leitura através de microscopia óptica com aumento de 400 vezes ou microscopia de fluorescência, com contagem das células pp65-positivas. A maior parte dos pacientes transplantados com doença pelo CMV (89%) tem antigenemia positiva precedendo o quadro clínico. A positividade ocorre precocemente, em média sete, até nove dias, antes dos sintomas. As altas sensibilidade e precocidade do método permitem que seja feita vigilância de infecção pelo CMV em pacientes de maior risco, orientando o tratamento pré-sintomático. Porém, já foi demonstrado que nem sempre o antígeno pp65 é detectado em pacientes com doença pelo CMV, o que representa uma limitação no método (BOSCHIROLI, 2003).

A identificação de antígenos de replicação viral por antigenemia em sangue periférico consiste em quatro etapas: (I) Isolamento de leucócitos do sangue periférico e confecção das lâminas, (II) fixação das amostras, (III) imunocoloração em lâminas de microscopia, utilizando um anticorpo monoclonal primário e um anticorpo secundário conjugado com peroxidase, fosfatase alcalina ou fluoresceína e (IV) leitura através de microscopia óptica (imunoistoquímica) ou de fluorescência (imunofluorescência) e quantificação (SCHROEDER et al., 2009; BOECKH; BOIVIN, 1998).

Em resumo, a detecção do antígeno pp65 por imunoistoquímica através da revelação pela fosfatase alcalina necessita seis horas para sua execução e utiliza a sedimentação por dextran (fração enriquecida de polimorfonucleares) para separação de leucócitos polimorfonucleares e hemácias a partir de 3mL de sangue (amostra inicial). O emprego da fluoresceína visualizada através de microscópio de imunofluorescência utiliza a lise de hemácias a partir de uma amostra de 1mL de sangue, obtendo os leucócitos totais para a análise final, com resultado em até duas horas. O resultado final é expresso em número de células positivas (com replicação viral ativa) em 100.000 granulócitos na técnica de imunoistoquímica e em 200.000 leucócitos na imunofluorescência (SCHROEDER et al., 2009).

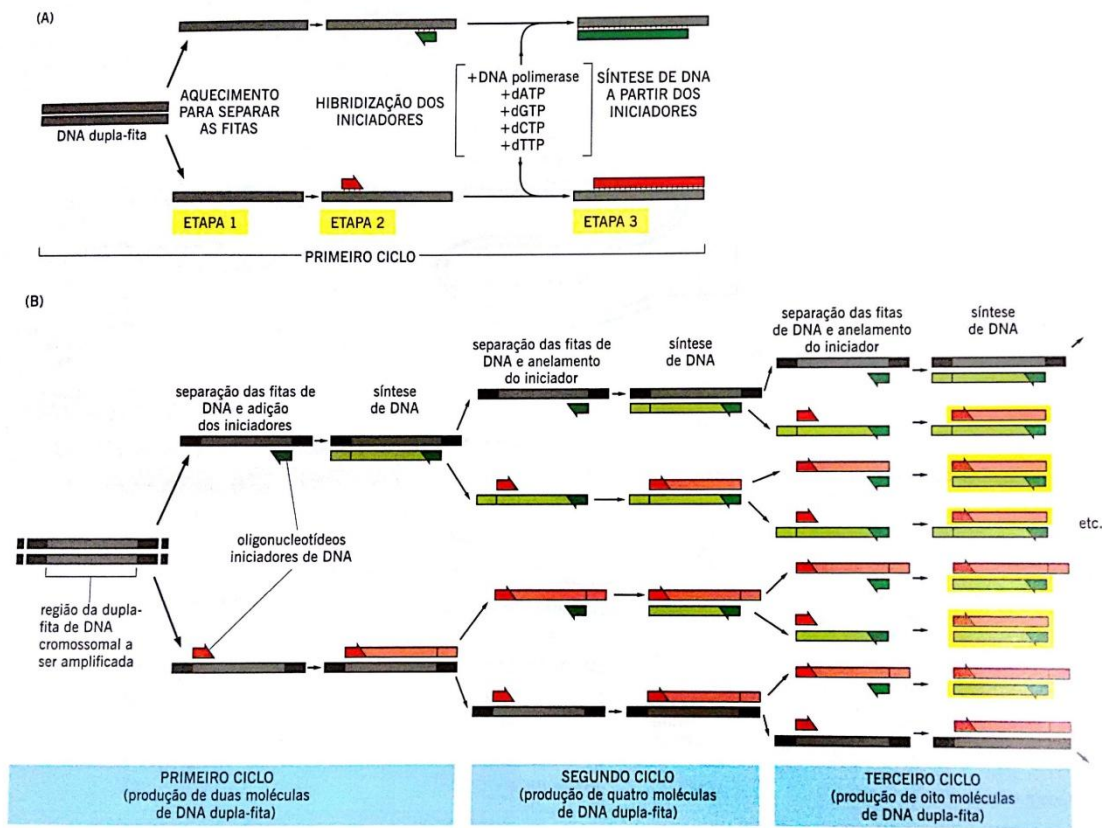
O método possui algumas limitações como possíveis variações na execução da técnica entre os diferentes locais onde é realizada, devido à dificuldade de padronização da mesma, subjetividade do analista para a quantificação dos resultados, pois depende da interpretação das características que evidenciam a positividade da célula ou não, diferentes origens dos anticorpos monoclonais, o que muitas vezes impossibilita uma comparação interlaboratorial, perda de rendimento quando a amostra é estocada em razão do seu curto período de viabilidade (6 horas), limitação diagnóstica em casos de amostras de pacientes neutropênicos, necessidade de equipe treinada entre outros (BOSCHIROLI, 2003).

4.3.6.6 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A PCR é o método molecular mais empregado tanto para detecção como para quantificação do DNA viral, é bastante utilizada em nível de pesquisa e vem sendo cada vez mais empregada para diagnóstico na prática clínica (BOSCHIROLI, 2003).

De acordo com Alberts (2006), a sequência de DNA a ser amplificada é utilizada para projetar dois oligonucleotídeos de DNA sintéticos, cada um complementar à sequência de uma fita do DNA dupla hélice em extremidades opostas da região a ser amplificada. Esses oligonucleotídeos servem como indicadores para síntese do DNA *in vitro*, que é realizada por uma DNA polimerase e determinam o segmento do DNA a ser amplificado. Na figura 5 mostra em (A) a PCR inicia com DNA dupla-fita, e cada ciclo da reação começa com tratamento breve de aquecimento para separar as duas fitas (etapa 1). Após há o resfriamento do DNA na presença de um excesso de dois oligonucleotídeos de DNA iniciadores permite que esses iniciadores hibridizem com sequência complementares nas duas fitas de DNA (etapa 2). Essa mistura é, então, incubada com DNA polimerase e os quatro deoxirribonucleosídeos trifosfatos (etapa 3). O ciclo é iniciado através do aquecimento para separar as fitas de DNA recém-sintetizadas. Já em (B) os fragmentos recém-sintetizados servem como moldes, e dentro de poucos ciclos o DNA predominante é idêntico à sequência delimitada pelos dois iniciadores no molde original. Na prática, 20-30 ciclos são necessários para uma amplificação útil de DNA. Cada ciclo duplica a quantidade de DNA sintetizado no ciclo anterior. Cada ciclo leva cerca de 5 minutos. Do DNA adicionado na reação original, apenas a sequência delimitada pelos dois iniciadores é amplificada. Na figura 5 (B) quatro ciclos de reação produzem 16 cadeias de DNA, 8 das quais (*em amarelo*) são do mesmo comprimento e correspondem exatamente a uma ou outra fita da sequência original mostrada no extremo esquerdo; as outras fitas contêm DNA extra que está além da sequência original, replicado nos primeiros ciclos. Depois de mais 3 ciclos, 240 das 256 cadeias corresponderão exatamente à sequência original e, depois de mais alguns ciclos, essencialmente todas as fitas de DNA terão esse único comprimento.

Figura 5: Amplificação de DNA pela técnica de PCR



Fonte: (ALBERTS, 2006)

A possibilidade de estocar o material sem perda de rendimento na execução é uma vantagem da PCR em relação à antigenemia, cujo resultado pode ser subestimado, quando a amostra é estocada (GUIVER et al., 2001).

As limitações da PCR são o custo relativamente elevado, a técnica mais trabalhosa, a facilidade com que ocorre contaminação do ambiente laboratorial, e consequentemente, de amostras e a capacidade de detecção de DNA latente, inerente à alta sensibilidade do método, contribuindo para o aumento do número de resultados falsos positivos (THE et al., 1995).

Diversos estudos já foram feitos com PCR para DNA de CMV em pacientes imunossuprimidos utilizando-se sangue total, leucócitos periféricos totais ou subpopulações de leucócitos e plasma ou soro, com técnicas qualitativas ou quantitativas de detecção. Estabelecer a metodologia mais adequada em cada situação ainda é motivo de estudos (BOSCHIROLI, 2003).

4.3.6.7 PCR qualitativa

De acordo com Boschioli (2003), a PCR qualitativa pode ser realizada a partir de diversos materiais como em leucócitos isolados de sangue periférico e plasma. A PCR em leucócitos é feita a partir da extração de DNA isolado de leucócitos de sangue periférico. Já em plasma dispensa a extração de DNA a partir de leucócitos, o que torna tecnicamente mais fácil e rápida a sua execução, essa técnica foi desenvolvida a partir de estudos realizados na tentativa de aumentar a especificidade e o VPP das técnicas qualitativas, na qual se basearam na detecção de DNA a partir do plasma, tendo em vista que a presença do CMV no plasma decorre da replicação e transferência do vírus de dentro dos leucócitos para a fração plasmática.

Outros autores citados por Boschioli (2003) apresentaram resultados discordantes em relação a estudos comparativos envolvendo técnicas para detecção do CMV, demonstrando que ocorrem variações de acordo com as situações que são empregadas, como o tipo de transplante.

4.3.6.8 PCR quantitativa

A PCR quantitativa (qPCR) consiste em outro recurso diagnóstico elaborado na tentativa de aumentar a especificidade e o VPP da PCR para doença pelo CMV. Os métodos de qPCR permitem estabelecer correlação em carga viral no sangue e infecção sintomática presente ou futura em receptores soropositivos previamente ao transplante, nos quais a PCR qualitativa se mostrou muito inespecífica (BOSCHIOLI, 2003).

Vários métodos de PCR são atualmente disponíveis para a amplificação do DNA, entre eles: 1) métodos semiquantitativos, que se baseiam em diluições das amostras previamente à execução da PCR; 2) os métodos competitivos que se baseiam na co-amplificação do alvo do DNA pesquisado e de sequências modificadas do mesmo DNA, com alvo semelhante como controle, sendo quantificadas simultaneamente e avaliadas pela proporção da amplificação obtida de

cada uma das duas sequências; 3) métodos não competitivos. Para a leitura, várias técnicas diferentes de detecção foram também desenvolvidas, entre elas: 1) gel de agarose; 2) uso de marcadores de PCR fluorescentes e detecção com fluorescência induzida por laser utilizando eletroforese em capilar; 3) captura em placa e hibridação com sonda “sanduíche”. Todos estes métodos são considerados eficazes na quantificação do DNA, mais requerem manipulação pós-PCR que demanda trabalho e tempo adicionais e risco de contaminação do ambiente laboratorial. Outra limitação destes métodos é a impossibilidade de processamento de grande número de amostras por reação, exceto a captura em placa, sendo inadequados para situações de alta demanda como, por exemplo, em rotina diagnóstica ou em estudos clínicos (HEID et al., 1996).

A qPCR também pode ser realizada tanto em leucócitos quanto em plasma, porém parece existir diferença na capacidade que um método tem de avaliar a carga viral de acordo com o material utilizado. Schafer e colaboradores (1998 apud BOSCHIROLI, 2003, p.30) verificaram que, quando comparada à carga viral em leucócitos totais com subpopulações (PMN e monócitos) podem ser encontrados diferentes resultados em testes pré e pós-tratamento, sendo em monócitos pouco significativa na variação da carga viral do CMV. Tal dado é refutado por Boivin e colaboradores (1998 apud BOSCHIROLI 2003, p.30) ao defender o uso da qPCR em monócitos circulantes, tanto para o diagnóstico como para monitoração do tratamento.

Ambos os testes realizados utilizando leucócitos ou plasma apresentam sensibilidade e especificidade muito elevadas (BOSCHIROLI, 2003).

4.3.6.9 PCR quantitativa em tempo real (“real time qPCR”)

O método da qPCR em tempo real foi descrito pela primeira vez por Heid e colaboradores (1996), o qual tem como principal característica a leitura da quantidade de DNA amplificado a cada ciclo de amplificação.

O método permite com grande precisão quantificar o DNA, com uma ampla variação da carga viral detectável, podendo detectar cargas virais tão baixas como 10 cópias virais até muito elevadas (GAULT et al., 2001).

As variabilidades inter e intra-ensaios são baixas e a reprodutibilidade elevada (HEID et al., 1996).

O uso da qPCR em tempo real já foi demonstrado em diversos tipos de amostras, incluindo sangue total, leucócitos periféricos, plasma, urina e líquido amniótico (BOSCHIROLI, 2003).

A tecnologia de PCR em tempo real oferece algumas vantagens em relação aos métodos de PCR anteriormente descritos: 1) todo o processamento (a amplificação e a quantificação do DNA) ocorre num sistema de frascos fechados, dispensando qualquer manipulação pós-PCR como ocorre na eletroforese, reduzindo o risco de contaminação; 2) o método é menos trabalhoso e é menor o tempo de execução; 3) maior número de amostras pode ser analisada simultaneamente, atendendo grandes demandas (HEID et al., 1996).

4.4 Estudo comparativo entre os principais métodos para o diagnóstico de CMV em transplantados renais

O diagnóstico da doença por CMV continua controverso devido à dificuldade de separar os pacientes que têm apenas a infecção assintomática da minoria de pacientes que apresentam a doença pelo CMV (RESENDE, OLIVEIRA, 2000).

Os primeiros métodos diagnósticos a serem desenvolvidos para o diagnóstico de infecção por CMV foram cultura viral e os testes sorológicos. Estes exames, porém, apresentam positividade tardia, o que não contribui para um diagnóstico precoce da infecção pelo CMV (SÃO PAULO, 2011).

O impacto causado pelo CMV na morbidade, mortalidade e risco de perda do enxerto em transplantados renais exigiu métodos diagnósticos rápidos, eficazes, e de alta sensibilidade e especificidade. Grandes avanços no diagnóstico precoce de CMV foram obtidos através de exames tais como antígenemia e métodos de

detecção de ácido nucleico (PCR), os quais possuem essas características reunidas (HOSPITAL DO RIM E HIPERTENSÃO - SÃO PAULO, 2011).

A partir destes fatos alguns autores foram reunidos a seguir a fim de analisar comparativamente os métodos em questão em estudos envolvendo transplantados renais.

No estudo de BHATIA et al (2004), 73 pacientes transplantados renais, com suspeita clínica da doença pelo CMV ativa, entre janeiro de 2000 e março de 2002, foram incluídos. A maior parte dos pacientes foi submetido à combinação tripla de drogas imunossupressoras. Outros 22 voluntários saudáveis formaram o grupo de controle. As amostras foram coletadas todas ao mesmo tempo e submetidas aos testes de sorologia, PCR qualitativa e antigenemia para citomegalovírus por imunofluorescência. Dos 73 pacientes com suspeita de doença por CMV, 37 tiveram a confirmação. Em 36 casos, a febre e a leucopenia podem ser explicadas por outras causas (por exemplo, infecção bacteriana/pneumonia fúngica, septicemia). A tabela 2 mostra os resultados dos três métodos utilizados nos pacientes com e sem doença pelo CMV e em indivíduos controle. Em três dos casos de doença pelo CMV, a antigenemia pode ter sido negativa devido ao atraso no processamento (amostras vieram de outras cidades; e em outro caso, devido à leucopenia. A tabela 3 mostra a sensibilidade, a especificidade, valor preditivo negativo e o valor preditivo positivo dos três métodos utilizados.

Tabela 2: Sensibilidade/Especificidade dos três métodos usados para o diagnóstico de doença ativa pelo CMV

	IgM anti-CMV		Antigenemia		PCR (soro)	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Pacientes com doença pelo CMV (37)	27	10	33	04	37	0
Pacientes sem doença pelo CMV (36)	22	14	0	36	16	20
Controles (22)	0	22	0	22	0	22

Fonte: Adaptado de BHATIA et al., 2004.

Tabela 3: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos três métodos

Métodos	CMV IgM	Antigenemia	PCR
Sensibilidade	72,97%	89,18%	100%
Especificidade	62,06%	100%	72,41%
VPP	55,10%	100%	69,81%
VPN	78,26%	93,54%	100%

Fonte: Adaptado de BHATIA et al., 2004.

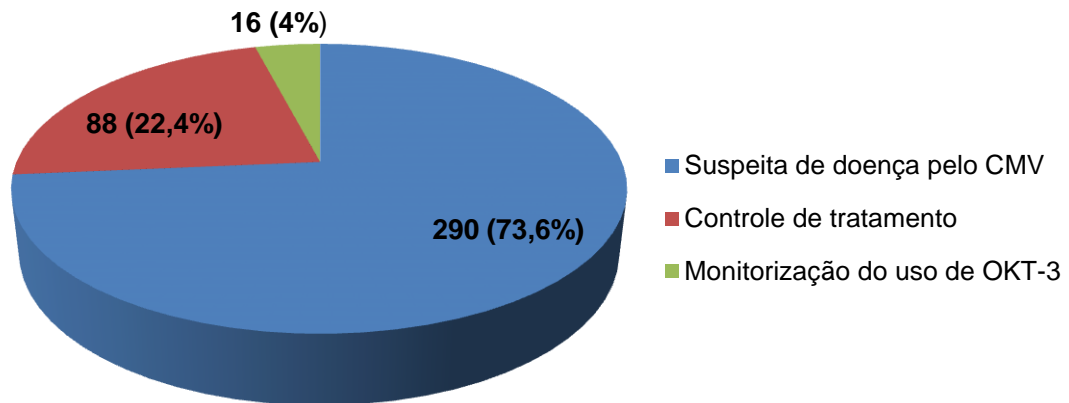
Os resultados obtidos por Bhatia et al. (2004) evidenciam que os ensaios sorológicos não têm utilidade no diagnóstico de reativação de infecção pelo CMV em pacientes transplantados devido as possíveis modificações na produção de anticorpos por diversos fatores, o que leva a resultados não aplicáveis para a correlação clínica, devido a soroconversão tardia e seu VPP baixo. A antigenemia demonstrou-se bem útil para a detecção de infecção por CMV precoce ou ativa, com bons resultados de sensibilidade e especificidade. A PCR, embora seja extremamente sensível, muitas vezes não possui especificidade clínica, pois devido à alta sensibilidade na amplificação de DNA, o resultado qualitativo positivo pode levar o paciente a tratamento desnecessariamente.

O estudo feito por Boschioli (2003) teve como principal objetivo avaliar as características clínicas e comportamento da antigenemia e da qPCR em tempo real na doença pelo CMV. No estudo foram incluídas 394 amostras de sangue periférico de 182 pacientes submetidos a transplante de rim/rim-pâncreas, para os quais tenha sido solicitada antigenemia para CMV enquanto internados, no período de 24 de abril de 2001 e 18 de março de 2002.

As amostras para ambos os testes foram coletadas concomitantemente, em geral, semanalmente. As amostras de antigenemia foram processadas no Laboratório de Virologia do Instituto de Doenças Infecciosas e Parasitárias – Universidade Federal de São Paulo (IDIPA-UNIFESP), utilizando a imunistoquímica. Quanto às amostras para PCR em tempo real, a extração do DNA foi realizada no IDIPA – UNFESP e posteriormente enviadas ao Laboratório de Genética do Câncer do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (São Paulo) para quantificação da carga viral (BOSCHIOLI, 2003).

Segundo a análise de Boschioli (2003), a indicação mais frequente de solicitação de antigenemia foi a suspeita de doença por CMV (73,6%), seguida de controle de tratamento (22,4%) e monitorização do uso de OKT3 (4%) (Gráfico 1)

Gráfico 1 – Indicação de coleta de antigenemia das 394 amostras de 182 pacientes envolvidos nos estudo



Fonte: (BOSCHIROLI, 2003)

Do total de 394 amostras coletadas, 79 (20%) foram positivas para a antigenemia e 218 (55,3%) para a qPCR. (BOSCHIROLI, 2003). Os dados obtidos neste estudo demonstraram que a porcentagem global de concordância entre a qPCR e antigenemia foi de 60,9%. Do total de 394 amostras, 154 (39,1%) foram discordantes. Dentre as amostras discordantes, 147 (95,4%) foram positivas para a qPCR e negativas para a antigenemia (Tabela 4).

Tabela 4: Resultados de qPCR e antigenemia para CMV processadas concomitantemente nas 394 amostras incluídas

Métodos diagnósticos	Número de amostras
PCR+, Antigenemia +	161 (41%)
PCR-, Antigenemia -	79 (20%)
PCR+, Antigenemia -	147 (37,3)
PCR-, Antigenemia +	7 (1,7%)

Fonte: (BOSCHIROLI, 2003)

Das 147 amostras com qPCR positiva e antigenemia negativa, em 132 (89,8%) a carga viral foi menor que 5.000 cópias/10⁶ leucócitos. E 91 destas 147 amostras eram de pacientes assintomáticos. Na ausência de tratamento a concordância entre a qPCR e a antigenemia em amostras coletadas na ausência de tratamento foi razoável (63,1%). Do total de 325 amostras nesta situação, 120 (36,9%) foram discordantes, e dentre estas, 115 (95,8%) foram positivas para a qPCR e negativas para a antigenemia, sugerindo maior sensibilidade da qPCR para infecção ativa do que a antigenemia (BOSCHIROLI, 2003).

Boschioli (2003) relata que em 7 amostras de 6 pacientes de qPCR foi negativa na presença de antigenemia positiva. Em 5 destes casos a maior antigenemia foi de 2 células positivas/10⁵ leucócitos, o que poderia ser explicado pela presença da peroxidase endógena, embora um dos casos tenha sido dado o diagnóstico da Síndrome viral pelo CMV. Uma das amostras, com 4 células positivas foi coletada de paciente com doença em tratamento com Ganciclovir e poderia ter havido negatividade mais precoce da qPCR neste caso, embora não tenha sido este o padrão de resposta ao tratamento observado no estudo. Em um caso de doença invasiva a antigenemia foi positiva (5 células) concomitante à qPCR negativa, o que se repetiu em amostra subsequente, já em vigência de tratamento com Ganciclovir por 5 dias, o que torna possível tratar-se de um falso-negativo da qPCR. Em relação ao controle de tratamento a antigenemia passou a ser negativa antes da qPCR em 21 de 29 casos, o que sugere que a qPCR provavelmente é mais fidedigna na orientação de resposta ao tratamento (BOSCHIROLI, 2003).

A técnica utilizada no estudo (SYBR Green) de Boschioli (2003) proporciona certa redução no custo do exame. Além disso, essa metodologia é de execução bastante rápida, obtendo resultado entre 3 e 4 horas, sendo este tempo pouco menor do que para execução das antigenemias, realizadas em aproximadamente 5 horas. Embora em ambas haja simplicidade de execução e o tempo de execução seja semelhante, a antigenemia é mais trabalhosa, necessitando a presença constante do profissional que executa o exame, ao contrário do processamento da qPCR em tempo real, o que torna o método bastante prático para a rotina laboratorial. A avaliação subjetiva do examinador, com possibilidade de ocorrer variações nos resultados entre examinadores diferentes é outra desvantagem da antigenemia. O atraso de 6 horas até a execução do exame leva a significativa

redução na detecção do antígeno pp65, o que não ocorre com amostras de DNA para a PCR.

O estudo de Madhavan et al. (2010) foi realizado para determinar a taxa de prevalência de infecção por CMV entre doadores e receptores de transplante renal, através dos métodos de detecção PCR em tempo real e antigenemia pp65 por imunofluorescência, pois a presença do CMV latente nos doadores poderia ser a fonte da infecção do CMV em receptores transplantados renais.

As amostras clínicas foram analisadas no L & T Microbiology Research Centre, Vision Research Foundation, na Índia, de setembro de 2007 até agosto de 2009. No estudo foi utilizado um total de 230 amostras de sangue periférico de 57 pares de doadores-receptores relacionados (compatíveis) e 18 doadores e receptores não relacionados. As amostras foram processadas e separadas em 3 pares de grupos (A, B e C) de doadores-receptores (MADHAVAN et al., 2010).

O grupo "A" incluiu 39 pacientes transplantados renais e seus respectivos doadores. Foram coletadas 156 amostras de sangue as quais incluíam 117 amostras de 39 pacientes transplantados renais antes e um mês após o transplante, e amostras de seus respectivos doadores no pré-transplante. As demais 39 amostras de sangue foram coletadas dos receptores dois meses após o transplante. Este grupo foi posteriormente classificado em cinco subgrupos, de I à V, com base nos valores obtidos na antigenemia pp65 e na PCR em tempo real. Já o grupo "B" compreendia 18 doadores e seus respectivos receptores, os quais não poderiam ser acompanhados após um mês do transplante. Deste grupo foram coletadas 36 amostras de sangue dos doadores no pré-transplante e de seus respectivos receptores antes e um mês após o transplante. E o grupo "C" foi composto por 19 doadores e 19 pacientes não relacionados. Foram coletadas 38 amostras de sangue, um mês após o transplante dos pacientes e dos doadores foram coletadas no pré-transplante (MADHAVAN et al., 2010).

Madhavan et al. (2010) obteve que, entre os 76 doadores de rim, 58 (73,68%) foram positivos para CMV no método de PCR em tempo real e 56,39 (51,0%) positivos pela antigenemia pp65, com uma variação de 3-86 células/ 2×10^5 leucócitos. Nenhum deles foi somente positivo para antigenemia pp65. Uma

correlação positiva foi observada entre os valores de antigenemia pp65 e qRT-PCR, segundo o autor.

Como conclusão do estudo, Madhavan et al. (2010) observou a presença de DNA do HCMV entre os doadores. Os receptores desenvolveram a infecção do HCMV mesmo que os doadores apresentassem resultados negativos para HCMV. As técnicas de antigenemia pp65 e o PCR em tempo real podem ser aplicadas como uma medida qualitativa para avaliar a infecção do HCMV entre pacientes transplantados renais e para monitorar o prognóstico.

O estudo elaborado por Deboni (2001) teve como principal objetivo determinar a incidência de infecção por CMV em uma coorte de pacientes transplantados renais usando a antigenemia por imunoperoxidase como ferramenta diagnóstica. Foram inclusos 74 pacientes transplantados renais, no período de janeiro de 1994 à fevereiro de 1995, e que foram acompanhados até janeiro de 2001, na Santa Casa de Porto Alegre – RS, dos quais as amostras foram coletadas semanalmente durante a internação hospitalar e posteriormente, sempre que houvesse suspeita clínica de infecção por citomegalovírus.

Das 229 amostras analisadas, 51 (22,3%) foram positivas, em 24 pacientes, dos quais 41,6% (10/24) evoluíram de forma assintomática, 33,3% (8/24) apresentaram sintomas leves, e 25% (6/24) desenvolveram sintomas compatíveis com doença citomegálica. Desta coorte estudada, a incidência de infecção e doença por CMV foram de 33,3% e 8,4%, respectivamente. Nos transplantes realizados com doadores vivos, a incidência de infecção por CMV nos receptores de rins de doadores com sorologia positiva foi 61,9% e nos receptores de doadores com sorologia negativa foi de 14,3%. Os transplantes com receptores com sorologia negativa transplantados com rins de doadores soropositivos apresentaram incidência significativamente maior de infecção (75%) e doença (75%) por CMV do que receptores com sorologia positiva transplantados com órgãos de doadores soronegativos, 13,3% e 0% respectivamente. A sensibilidade da antigenemia em detectar os pacientes que desenvolveram doença citomegálica foi de 100% e a especificidade foi 72,7%, com VPP de 25% e VPN de 100% (DEBONI,2001).

4.5 Tratamento para infecções por CMV

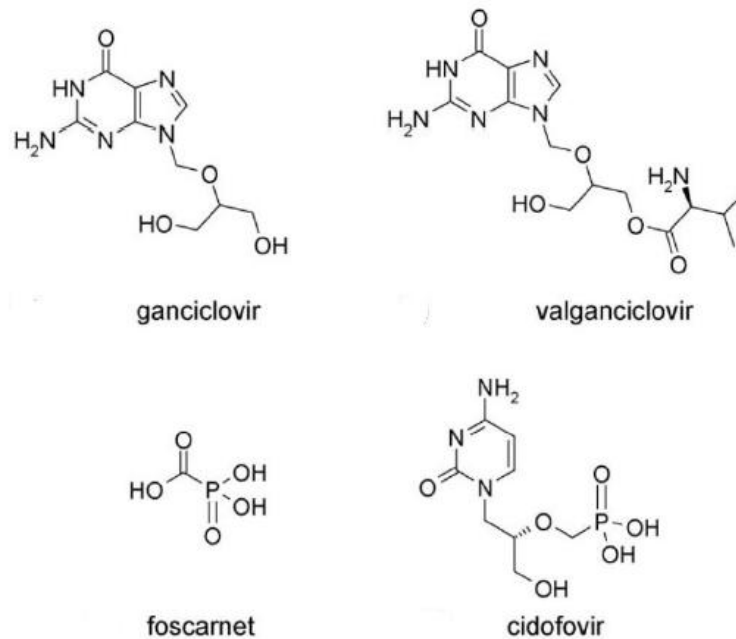
Segundo Biron (2006), o tratamento para a infecção pelo HCMV requer uma combinação de imunomodulação e os fármacos antivirais. Existem duas estratégias para redução de riscos de doenças pelo CMV ativo após o transplante renal: a profilaxia universal e a terapia preemptiva.

Na profilaxia universal utilizam-se doses mais baixas de supressores e podem ser usados antivirais menos potentes do que aqueles usados no tratamento da doença ativa. Esse método é iniciado imediatamente após o transplante e dura por um tempo determinado. Na terapia preemptiva é direcionada para testes laboratoriais de monitoramento da viremia de pacientes, ou seja, é realizado através da pesquisa periódica de viremia para o CMV. Se o paciente é virêmico, pode iniciar o tratamento com a terapia antiviral e/ou a redução da imunossupressão, sendo indicado para pacientes com viremia independente de sintomatologia clínica. Porém não há relatos que relacionam o custo-benefício dos dois métodos já que existem informações discordantes na literatura (BIRON, 2006).

4.5.1 Fármacos antivirais

Existem alguns fármacos antivirais atualmente licenciados que são utilizados para o tratamento de infecções sistêmicas pelo HCMV. As principais drogas contra o CMV são: Ganciclovir (GCV), Valganciclovir (vGCV), Foscarnet (FOS) e Cidofovir (CDV) (Figura 6). Estes fármacos pertencem ao grupo dos inibidores da DNA polimerase viral, tendo como principais efeitos adversos a nefrotoxicidade, alterações sanguíneas e problemas oculares (RANG, 2011).

Figura 6: Estruturas químicas dos principais fármacos utilizados no tratamento da infecção pelo CMV



Fonte: Adaptado de BIRON, 2006

A terapia anti-CMV é constituída de duas fases, a primeira é a fase de indução e a segunda de manutenção (Quadro 2). Durante a fase de indução, são administradas grandes doses da droga, com o intuito de induzir a remissão da infecção ativa do CMV. Na fase de manutenção, utiliza-se a dosagem padrão do antiviral. Dependendo do protocolo, da resposta à doença, efeito colateral e os fatores de riscos do paciente o período dessas fases podem variar (HEREDIA et al., 2014).

Quadro 2: Agentes utilizados no tratamento da infecção por CMV

Agente	Via de administração	Uso	Dose recomendada para adultos
Valganciclovir	Oral	Tratamento para retinite por CMV	Indução: 900 mg, 2 vezes/dia Manutenção: 900 mg/dia
	Oral	Profilaxia do CMV (pacientes	900 mg/dia

		submetidos à transplante)	
Ganciclovir	Intravenosa	Tratamento para retinite por CMV	Indução: 5 mg/kg, a cada 12 h Manutenção: 5 mg/kg/dia ou 6mg/kg, 5 vezes/semana
	Oral	Profilaxia do CMV	1g, 3 vezes/dia
	Oral	Tratamento da retinite por CMV	1g, 3 vezes/dia
	Implante intra-ocular	Tratamento da retinite por CMV	4,5mg, a cada 5 a 8 meses
Foscarnete	Intravenosa	Tratamento da retinite por CMV	Indução: 60mg/kg, a cada 8h, ou 90mg/kg, a cada 12h Manutenção: 90 a 120mg/kg/dia
Cidofovir	Intravenosa	Tratamento da retinite por CMV	Indução: 5mg/kg, a cada 7 dias Manutenção: 5mg/kg, a cada 14 dias

Fonte: (KATZUNG, 2010)

4.5.1.1 Ganciclovir (GCV)

O Ganciclovir foi o principal fármaco antiviral aprovado para o tratamento da infecção pelo CMV, e ainda continua sendo a droga de escolha em casos de infecção órgão invasiva (KATZUNG, 2010).

O GCV é um análogo do aciclovir, ativo contra os herpesvírus principalmente o CMV, competindo pelo sítio da DNA polimerase, inibindo a síntese do DNA viral. A concentração do inibidor ativo, o trifosfato de ganciclovir, é muito maior no interior

das células infectadas pelo CMV, pois o tempo de meia vida plasmática do GCV é aproximadamente de duas a quatro horas, e a do trifosfato no interior das células infectadas pelo CMV é maior que 24 horas, sendo responsável pela alta atividade contra o CMV. Porém, as reações adversas também são elevadas podendo gerar toxicidade sistêmica comprometendo a medula óssea, febre, vômitos, entre outros. (TRIPATHI, 2006).

4.5.1.2 Valganciclovir (vGCV)

O vGCV é um pró-fármaco éster L-valil do ganciclovir. É indicado para o tratamento da retinite causada por CMV e para prevenção da doença por CMV em pacientes submetidos a transplantes de rim, coração e rim-pâncreas (KATZUNG, 2010).

O fármaco é administrado por via oral, é bem absorvido e rapidamente metabolizado, a droga é convertida em aciclovir, pela valaciclovir hidrolase, no trato gastrointestinal e fígado. A principal via de eliminação é renal, através da filtração glomerular e secreção tubular ativa (PENILDON, 2010).

4.5.1.3 Foscarnete (FOS)

O foscarnete (ácido fosfonofórmico) é um análogo do pirofosfato inorgânico. Este fármaco inibe diretamente a DNA polimerase viral, ou seja, inibe de forma reversível e não competitiva a atividade da DNA polimerase viral (ERICE, 1999; KATZUNG, 2010).

Em 1991 tornou-se a segunda droga utilizada para o tratamento da retinite causada pelo CMV em pacientes com AIDS. A absorção normalmente é por via intravenosa, pois o tempo de meia vida é de quatro a oito horas, não sendo metabolizado levando a uma elevada toxicidade do fármaco (TRIPATHI, 2006).

O principal fator limitante do uso da FOS é a neurotoxicidade e a nefrotoxicidade, podendo causar lesão renal e até insuficiência renal aguda (ERICE, 1999).

4.5.1.4 Cidofovir (CDV)

O CDV é um análogo do nucleotídeo de citosina. A fosforilação do CDV ao difosfato ativo não depende de enzimas virais, após a fosforilação, este fármaco atua como um potente inibidor e como substrato alternativo da DNA polimerase viral, inibindo assim a síntese de DNA e incorporando-se à cadeia de DNA viral (KATZUNG, 2010; PENILDON, 2010).

O CDV é administrado por via intravenosa é efetivo no tratamento da retinite por CMV. O CDV intravenosa deve ser administrado juntamente com probenecida (fármaco que provoca eliminação do ácido úrico) que bloqueia a secreção tubular, ativa e diminui a nefrotoxicidade. A dose do CVD deve ser regulada para alterações na depuração calculada da creatinina ou na presença de proteína urinária antes de cada infusão sendo necessária uma grande hidratação, sendo contra indicado em pacientes com insuficiência renal. O efeito adverso mais grave é a nefrotoxicidade dependente da dose, sendo reduzida mediante a pré-hidratação com soro fisiológico. (KATZUNG, 2010).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O CMV é realmente um dos mais importantes patógenos responsáveis pela perda de enxertos e complicações severas no pós-transplante de pacientes transplantados renais.

Os testes sorológicos não são uma boa escolha para a detecção de infecção ativa pelo CMV, especialmente em pacientes imunossuprimidos, restringindo seu uso ao pré-transplante.

Os exames de cultura viral e histológicos, embora apresentem boa correlação clínica, não são métodos de escolha pela positividade tardia.

A PCR em tempo real, na grande maioria dos casos, é superior à antigenemia na detecção precoce do CMV em transplantados renais e permite melhor acompanhamento do tratamento.

Os pacientes soronegativos para CMV no pré-transplante apresentam maior chance de desenvolver doença ativa pelo CMV, na primoinfecção, do que os soropositivos.

A alta sensibilidade da PCR pode gerar falsos-positivos quando tem seu resultado liberado qualitativo.

A antigenemia possui valores de especificidade e sensibilidade muito variáveis na literatura, sugerindo que a padronização do teste talvez suprisse este problema.

Ambos os testes constituem excelentes métodos de diagnóstico precoce de doença ativa pelo CMV, apenas requerem boa interpretação de seus resultados e correlação com a clínica.

REFERÊNCIAS

ABU-NADER, Rima; PATEL, Robin. Current management strategies for the treatment and prevention of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. **Biodrugs**. v.2, p. 159-175. mar. 2000.

AITKEN, Celia et al. Use of Molecular Assays in Diagnosis and Monitoring of Cytomegalovirus Disease following Renal Transplantation. **Journal of Clinical Microbiology**.v.9, Washington, p. 2804-7. 1999.

ALBERTS, Bruce et al. Manipulação de genes e células. In: _____. **Fundamentos da Biologia Celular**. Traduzido por Ana Leonor Chies Santiago-Santos et al. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. Cap. 10, p.349.

BHATIA, Jigna et al. Comparing Serology, Antigenemia Assay and Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Cytomegalovirus Infection in Renal Transplant Patients. **Journal Of The Association Of Physicians Of India**. India, p. 297-300. abr. 2004.

BIRON, Karen K. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. **Antiviral Research**, Estados Unidos, v. 3, n. 2, p.154-163, set. 2006.

BOECKH, Michael; BOIVIN, Guy. Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic aspects and clinical applications. **Clinical Microbiology Reviews**, Quebec, v. 11, n. 3, p.533-554, jul. 1998.

BOSCHIROLI, Alexandre Márcio. **Estudo comparativo entre as técnicas de reação em cadeia de polimerase (quantitativa) e antigenemia para citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante renal**. 2003. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Saúde Suplementar – ANS. **Cobertura – Antigenemia para Citomegalovírus**. 2012.

BRITT, W.J., Alford, C.A. Cytomegalovirus. **Fields Virology**, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996; 3. ed., p. 2493-2512.

CARRARO, Emerson. **Caracterização genotípica do citomegalovírus humano em transplantados renais**. 2001. 120 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Básicas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2001.

CUKURANOVIC, Jovana et al. Viral Infection in Renal Transplant Recipients. **Scientific World Journal**. Estados Unidos, p. 820621-820639. maio 2012.

CUNHA, A.A.; MARIN, L.J.; AQUINO, V.H. et al. Diagnosis of cytomegalovirus infections by qualitative and quantitative PCR in HIV infected patients. **Rev. Inst. Med.Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v.44, n.3, p.127-132, 2002.

DEBONI, Luciane et al. Incidência e impacto da infecção e doença citomegálica diagnosticada pela antigenemia na sobrevida em longo prazo de transplantados renais. **J. Bras. Nefrol.** Porto Alegre, p.115-126, 13 ago. 2002.

DUNN, David L et al. Treatment of invasive cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients with ganciclovir. **Transplantation.** v. 1, p. 98-106. jan. 1991.

ERICE, Alejo. Resistance of Human Cytomegalovirus to Antiviral Drugs. **Clinical Microbiology Reviews.** Washington, p. 286-297. abr. 1999.

GAULT, Elyanne et al. Quantification of Human Cytomegalovirus DNA by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology.** Paris, v.39, p. 772-775. fev. 2001.

GONZALEZ, A. Ferreira. et al. Clinical utility of a quantitative polymerase chain reaction for diagnosis of cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients. **Transplantation.** v. 7, p. 991-6. out. 1999.

GUIMARÃES, Maam; GUIMARÃES, Acc. Diagnóstico laboratorial da Citomegalovirose em pacientes transplantados. **SOCERJ**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p.187-188, set. 2002.

GUIVER, M. et al. Evaluation of CMV viral load using TaqMan CMV quantitative PCR and comparison with CMV antigenemia in heart and lung transplant recipients. **Transplantation.** v.11, p. 1609-15. jun. 2001.

HEID, Christian A. et al. Real Time Quantitative PCR. **Genome Research**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 1, p.986-994, jan. 1996.

HEREDIA, Ariza et al. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: a mini-review. **Cancer Letter**, Irlanda, v. 342, n. 1, p.1-8, jan. 2014.

HIRSCH, Martin S. Cytomegalovirus and Human Herpesvírus Types 6,7 and 8. In: KASPER, Dennis L.; FAUCI, Anthony S. **Harrison's: Infectious Diseases.** New York: Medical, 2010. Cap. 83, p. 751-6.

HO, Monto. The history of cytomegalovirus and its diseases. **Med. Microbiol. Immunol.** Pittsburgh, v.2 p. 65-73. 18 dez. 2008.

HUMAR A, Snyderman D; AST Infectious Diseases Community of Practice. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. **Am. J. Transplant.** 2009; 9 Suppl 4:S78-86.

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <http://www.ictvonline.org>. Acesso em: 12 de agosto de 2015.

JUNQUEIRA, Jader Joel Machado; SANCHO, Talita Marçal; SANTOS, Vera Aparecida dos. Citomegalovírus: Revisão dos Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Diagnósticos e de Tratamento. **NewsLab**, São Paulo, p.88-104, 2008.

KOTTON, Camille N.; FISHMAN, Jay A.. Viral Infection in the Renal Transplant Recipient. **J. Am. Soc. Nephrol.** Boston,v.6 p. 1758-1774. Jun. 2005.

KOTTON CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A; Transplantation Society International CMV Consensus Group. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. **Transplantation.** 2013; 96 (4):333-60.

LIMA, Manoel Jacy Vilela; COSTA, Guilherme. Imunossupressão. In: PEREIRA, Walter Antônio et al. **Manual de Transplantes de Órgãos e Tecidos.** 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. Cap. 5, p. 71-94.

LIPAY, Monica V. N.; BIANCO, Bianca. **Biologia Molecular: Métodos e interpretação.** Rio de Janeiro: Roca, 2015. 239 p.

LAMB, David. Transplante de órgãos e ética. Traduzido por Jorge Curbelo. São Paulo: Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos/Editora Hucitec, 2000. 260p.

MADHAVAN, Hajib N et al. pp65 antigenemia and real time polymerase chain reaction (PCR) based-study to determine the prevalence of human cytomegalovirus (HCMV) in kidney donors and recipients with follow-up studies. **Virology Journal.** Chennai, p. 1-7. nov. 2010.

MATOS, Sócrates Bezerra de; MEYER, Roberto; LIMA, Fernanda Washington de Mendonça. Citomegalovírus: Uma revisão da patogenia, epidemiologia e diagnóstico da infecção. **Revista da Saúde,** Salvador, v. 1, n. 7, p.44-57, maio 2011.

MELLO, Ricardo Obalski de et al. Comparação dos métodos de reação em Cadeia da Polimerase Qualitativo e antigenemia pp65 para o diagnóstico de infecção por citomegalovírus em pacientes imunossuprimidos. **HCPA,** Rio Grande do Sul, v. 1, n. 28, p.16-20, fev. 2008.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

OLIVEIRA, L. H. S. **Virologia Humana.** Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994.

PANNUTI, Cláudio Sérgio. Citomegalia. In: FERREIRA, Antonio Walter; MORAES, Sandra do Lago. **Diagnóstico Laboratorial: das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. Cap.4, p.61-8.

RANG, H.P. **Farmacologia.** 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. Cap.51, p.638-48.

RESENDE, Alexandre Prado de; OLIVEIRA, Jaqueline das Graças Ferreira de. Infectologia. In: PEREIRA, Walter Antônio et al. **Manual de Transplantes de Órgãos e Tecidos.** 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. Cap. 6, p. 95-116.

SAFRIN Sharon. Agentes antivirais. In: KATZUNG, Bertram G. **Farmacologia Básica e Clínica.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. Cap. 49, p. 715-41.

SALOMÃO FILHO, Abrahão et al. Transplante Renal. In: PEREIRA, Walter Antônio et al. **Manual de Transplantes de Órgãos e Tecidos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. Cap. 10, p. 177-202.

SALOMÃO, Reinaldo; PIGNATARI, Antônio Carlos Campos. **Infectologia**. São Paulo: Manole, 2004. 580 p.

SANTOS, Norma Suely de Oliveira et al. Viroses congênitas. In: SANTOS, Norma Suely de Oliveira; ROMANOS, Maria Teresa Villela; WIGG, Márcia Dutra. **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap. 8. p. 101-117.

SÃO PAULO. Hospital do Rim e Hipertensão. – Fundação Oswaldo Ramos. **Abordagem das infecções por citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante renal**. 2011. Disponível em: <http://xa.yimg.com/kq/groups/16781130/649428814/name/ABORDAGEM_DAS_INFEC_ES_POR_CITOMEGALOV_RUS_EM_PACIENTES_SUBMETIDOS_A_TRANSPLANTE_RENAL.doc>. Acesso em: 13 ago. 2015.

SCHROEDER, Regina Barbosa e colaboradores. Comparação entre técnicas de imunoistoquímica e de imunofluorescência para antigenemia pp65 para citomegalovírus (CMV) em receptores de transplante. **Jornal Brasileiro de Transplantes**. Porto Alegre, p. 1101-1004. Abr-Jun. 2009.

SIA, Irene G. et al. Cytomegalovirus (CMV) DNA Load Predicts Relapsing CMV Infection after Solid Organ Transplantation. **J. Infect. Dis.** Oxford, v.2, p. 717-720. fev. 2000.

SILVA NETO, Manoel Lemes da. História dos transplantes. 19p. Disponível em: <www.pucgoias.edu.br/ucg/institutos/nepss/.../monografia_02.pdf>. Acesso em: 3 ago. 2015.

SILVA, Penildon. Drogas Antivirais: Farmacoterapia da AIDS. In: _____. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. Cap. 108, p.1084-1102.

SLONGO, Josiane. **Pesquisa de mutações associadas à resistência antivirais no gene UL54 de citomegalovírus humano detectados em amostras de urina de pacientes transplantados renais**. 2013. 29 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

STEPHENS, Paulo Roberto Soares et al. Virologia. In: TEVA, Antônio et al. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. 4. ed. Rio de Janeiro, 2009. Cap. 2. p. 125-220.

TANABE, K e colaboradores. Comparative study of cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay, polymerase chain reaction, serology, and shell vial assay in the

early diagnosis and monitoring of CMV infection after renal transplantation. **Transplantation**. v.12, p. 1721-1725. dez. 1997.

THE, T. H. e colaboradores. The cytomegalovirus Antigenemia Assay: A Plea for standardization. **Scand. J. Infect. Dis. Suppl.** p. 25-29. 1995.

TOMTISHEN, John Paul. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). **Virology Journal**. Lewisburg, v.2 .p. 1-8. 17 jan. 2012.

TONG, Cheuk Yan William et al. Use of Laboratory Assays To Predict Cytomegalovirus Disease in Renal Transplant Recipients. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v.9, p. 2681-86. set. 1998.

TOPPA, Nivaldo Hartung. Anatomia de patológica da rejeição de transplantes. In: PEREIRA, Walter Antônio et al. **Manual de Transplantes de Órgãos e Tecidos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. Cap. 4, p. 59.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.948.

TRIPATHI, K.D. **Farmacologia Médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap.56. Agentes antivirais.