

PAULA CRISTHINA NIZ XAVIER

**INFECCÃO POR CITOMEGALOVIRUS EM PACIENTES
INTERNADOS EM UNIDADES NEONATAIS DE CAMPO GRANDE –
MS, BRASIL**

CAMPO GRANDE-MS

- 2012 -

PAULA CRISTHINA NIZ XAVIER

**INFECÇÃO POR CITOMEGALOVIRUS EM PACIENTES
INTERNADOS EM UNIDADES NEONATAIS DE CAMPO GRANDE –
MS, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e a Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Durval Batista Palhares

CAMPO GRANDE-MS

- 2012 -

FOLHA DE APROVAÇÃO

PAULA CRISTHINA NIZ XAVIER

**INFECÇÃO POR CITOMEGALOVIRUS EM PACIENTES
INTERNADOS EM UNIDADES NEONATAIS DE CAMPO GRANDE –
MS, BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e a Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Resultado APROVADA

Campo Grande(MS), 07 de Dezembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^o Durval Batista Palhares

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-MS

Prof^a. Dr^a Doroty Mesquita Dourado

Universidade Anhanguera, Campo Grande-MS

BANCA EXAMINADORA (continuação)

Prof^a. Dr^a Débora Marchetti Chaves Thomaz
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-MS

Prof^ª. Dr^a Anna Maria Miglioli
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-MS

Prof^ª. Dr^a Carmem Silvia Martimbianco de Figueiredo
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-MS

Prof^ª. Dr^a Aby Janie da Cruz Montes Moura (Suplente)
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-MS

Dedico este trabalho

A **Deus** que é o Ser maior

A meus pais, **Paulo e Maria Cristina**
que sempre me incentivaram e me
deram a vida para que eu pudesse realizar
todos os meus sonhos.

A meus **avós, João e Maria**, pelo incentivo e
apoio que sempre me deram em toda a minha vida.

A minha família:

Ao meu esposo, **Jary**, que por muitos momentos teve que ser Pai e Mãe.
Ao **Felipe e Ana Carolina** que por muito tempo foram privados da atenção materna. Todos,
sempre, com muita paciência e amor me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

- Especial agradecimento ao **Prof. Dr. Durval Batista Palhares** e ao **Dr. Almir de Sousa Martins** pela orientação, apoio, consultoria e amizade.

- A **todos do Setor de Pós-graduação** em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

- Aos **técnicos de Laboratório do HU-UFMS** (Floriano Campoçano, Reynaldo Bueno Junqueira Reis e Camila Bolognes Couto), pelo apoio na coleta de amostras e preparo de reagentes).

- As **enfermeiras, técnicas e auxiliares de enfermagem dos hospitais**: Universitário-UFMS, Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, - “Rosa Pedrossian”, Maternidade Candido Mariano, Hospital Geral El Kadri e Sociedade Beneficente de Campo Grande Santa Casa pelo apoio durante as coletas (APÊNDICE I).

- À **Dr^a Aparecida Yulie Yamamoto** do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da USP de Ribeirão Preto pelos ensinamentos e treinamento.

- À **Prof^a Dr^a Doroty Mesquita Dourado** e a **técnica Maria Helena Ferminiano** pelo incentivo, apoio técnico e colaboração.

AGRADECIMENTOS (continuação)

- Aos acadêmicos do curso de Farmácia da Universidade Católica Dom Bosco **Patrícia. Gonçalves Vieira e Theocir de Souza Arantes** pela imensa colaboração.

- Aos colegas de equipe: **Isabela Furtado e Joanina Neves** pela dedicação, ajuda e amizade.

- A todos os responsáveis pela **Universidade Católica Dom Bosco** pela parceria e colaboração para que a pesquisa fosse realizada, cedendo espaço físico e equipamentos.

- A **CAPES e FUNDECT** pelo apoio financeiro.

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Resumos apresentados em Jornadas, Sites e Congressos.

XAVIER, P.C.N. & PALHARES, D.B. **CITOMEGALOVIROSE NEONATAL**

In: SBP. **Resumo expandido**. Rio De Janeiro - RJ: Sociedade Brasileira de Pediatria, 2012.
http://www.sbp.com.br/pdfs/Citomegalovirose_neonatal.pdf.

XAVIER, P.C.N.; MARTINS, A.S.; PALHARES, D.B. Infecção congênita por citomegalovírus em unidades neonatais de cinco hospitais In: **21º CONGRESSO BRASILEIRO DE PERINATOLOGIA, Resumos**. Curitiba – PR. 2012.

Trabalho enviado para publicação:

XAVIER, P. C. N.; VIEIRA, P. G.; ARANTES, T. S.; TAVARES, L. V. M.; MARTINS, A. S.; PALHARES, D. B. Identification of cytomegalovirus in blood and urine of newborns by a molecular biology method. **Rev Soc Bras Med Trop**, *in press*, 2012. (APENDICE II).

RESUMO

Xavier PCN. Infecção por citomegalovirus em pacientes internados em unidades neonatais de Campo Grande – MS, Brasil. Campo Grande; 2012. [Tese – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul].

Introdução: A infecção pelo citomegalovirus (CMV) é uma infecção intra-uterina considerada das mais frequentes infecções congênitas de transmissão transplacentária hematogênica. **Objetivo:** Estudar a frequência da infecção congênita por CMV em recém-nascidos internados no Setor de Neonatologia, por método de biologia molecular e, comparar a utilização de amostras de sangue e urina no diagnóstico. **Materiais e Métodos:** O Estudo foi desenvolvido no período de março de 2010 a agosto de 2012. Amostras de urina e sangue de recém-nascidos internados em cinco hospitais de Campo Grande-MS foram coletadas e analisadas através do método de reação em cadeia da polimerase (PCR *nested*). **Resultados:** Foram estudados 520 recém-nascidos, destes, 13 (2.5%) foram positivos para CMV na urina e 10 (2%) mostraram-se positivos para CMV no sangue. Em relação aos sintomas, 3 (23 %) foram assintomáticos e 10 (77%) sintomáticos, sendo 13 (100%) identificados como infecção congênita. Os principais achados clínicos dos pacientes sintomáticos foram: 10 (100%) eram pré-termos, 2 (20%) apresentaram petéquias, 5 (50%) insuficiência respiratória, 1 (10%) microcefalia, 1 (10%) hidrocefalia e 7 (70%) apresentaram icterícia. Em relação à sorologia feita para os pacientes positivos, apenas 1 (0.2%) apresentou IgG+ e IgM+. Quanto a evolução, do total de positivos, 1 (7,7%) evoluiu para óbito. **Conclusão:** A presença de DNA genômico na urina demonstrou maior número de achados positivos para CMV do que no sangue e maior sensibilidade do que a sorologia (p = 000,1).

Palavras chave: CMV, recém-nascido, infecção neonatal, PCR *nested*, urina.

ABSTRACT

Xavier PCN. Infecção por citomegalovirus em pacientes internados em unidades neonatais de Campo Grande – MS, Brasil. Campo Grande; 2012. [Tese – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul].

Introduction: Infection with cytomegalovirus (CMV) is an intrauterine infection considered the most frequent congenital infections of hematogenous transplacental transmission. **Objective:** To study the frequency of congenital CMV infection in newborns admitted to the Division of Neonatology by the method of molecular biology and compare the use of samples of blood and urine. **Materials and Methods:** The study was carried out from March 2010 to August 2012. Urine and blood of newborns hospitalized in five hospitals in Campo Grande-MS were analyzed by the method of polymerase chain reaction (nested PCR). Results: We studied 520 newborns, of these, 13 (2.5%) were positive for CMV in urine and 10 (2%) were positive for CMV in the blood. Regarding symptoms, 3 (23%) were asymptomatic and 10 (77%) symptomatic patients, 13 (100%) identified as congenital infection. The main clinical features of the patients were symptomatic: 10 (100%) were preterm, 2 (20%) had petechiae, 5 (50%), respiratory failure, 1 (10%) microcephaly, 1 (10%) and 7 hydrocephaly (70%) had jaundice. Regarding made for serology positive patients, only 1 (0.2%) showed IgG + and IgM +. As for evolution, the total positive, 1 (7.7%) resulted in death. **Conclusion:** The presence of genomic DNA in urine showed a higher number of CMV-positive than in blood and higher sensitivity than in serology ($p = 0.001$).

Keywords: CMV, newborn, neonatal infection, *nested* PCR, urine.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas dos recém-nascidos positivos para CMV, MS, 2010/12....	43
Tabela 2 - Variáveis analisadas a partir de dados de pacientes obtidos dos prontuários.....	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura do citomegalovirus.....25
- Figura 2. Quantidade e percentuais de pacientes analisados nos hospitais de estudo, Campo Grande-MS, 2010/2012.....40
- Figura 3. Gel de agarose 1.8% corado com SYBR SAFE. Amostra 500 gerou duvida, demais amostras foram positivas para CMV na urina. M = marcador de peso molecular. (C+) = Controle positivo (amostra biológica sabidamente positiva); Controle negativo (C-) água ultrapura autoclavada.....41
- Figura 4. Gel de agarose 1.8% corado com SYBR SAFE. (B) Resultados de PCR *nested* de CMV em amostras de sangue. Amostras 06 (excluída do estudo), 113 e 251 foram negativas para DNA CMV, as demais amostras foram positivas. M = marcador de peso molecular. (C+) = Controle positivo (amostra biológica sabidamente positiva); Controle negativo (C-) água ultrapura autoclavada.....41

Figura 5. Gel de agarose 1.8% corado com gel red, confirmando amostras 500 e 509 no sangue e na urina. Amostras feitas em duplicatas 06S (excluída do estudo), 113S e 251S processadas a partir de DNA de sangue de recém-nascidos confirmaram negatividade para CMV. Amostras 509U e 500U processadas a partir da urina de recém-nascidos confirmaram positividade para CMV.....42

Figura 6. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. Amostra 113 positiva para CMV na urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.....45

Figura 7. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.....45

Figura 8. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. Amostra 96 e 368 foram positiva para CMV na urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.....46

Figura 9. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.....46

Figura 10. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. Amostra 248 positiva para CMV na urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.....47

Figura 11. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.....47

Figura 12. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. Amostra 427 positiva para CMV na urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.....48

Figura 13. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. Amostra 248 positiva para CMV na urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.....48

LISTA DE ANEXOS

Anexo I – Fórmulas das reações utilizadas na pesquisa.....	72
Anexo II – Apêndice VII – Fórmulas do gel de poliacrilamida e fórmulas dos reagentes utilizados nas fases de coloração, fixação e revelação.....	74
Anexo III – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com seres humanos da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.....	77

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice I – Banner de agradecimento ao setor de neonatologia dos Hospitais de estudo.....	79
Apêndice II – Artigo enviando para a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (<i>in press</i>).....	80
Apêndice III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	87
Apêndice IV – Laudo para resultados de exames.....	88
Apêndice V – Ficha para análise de prontuários.....	89

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcento
AIDS	Síndrome da imunodeficiéncia adquirida
ALT	Alanina aminotransferase
Anti-CMV	Anticorpos contra citomegalovírus
AST	Aspartato aminotransferase
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
CMV	Citomegalovirus
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
EK	Hospital Geral El Kadri

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS (Continuação)

<i>et al.</i> ,	Colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
EV	Endovenoso
FAL	Fosfatase alcalina
g	Grama
GGT	Gama glutamil transpeptidase
HHV	Herpesvirus humano
HHV-5	Herpesvirus humano tipo 5 (citomegalovirus)
HIV	Virus da Imunodeficiência humana
HU-UFMS	Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
IG	Idade gestacional
IgG	Imunoglobulina que representa exposição
IgM	Imunoglobulina que representa infecção aguda
Kg	Kilograma
M	Marcador de peso molecular (Ladder)
MC	Maternidade Candido Mariano

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

min.	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milimolar
NC	Não consta
nm	Nanômetros
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação de polimerase em cadeia)
<i>Primer</i>	Iniciador
RN	Recém-nascido
RP	Hospital Regional “ Rosa Pedrossian”
SC	Santa Casa
SNC	Sistema nervoso central
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
USP	Universidade de São Paulo
µg	Microgrma
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	22
1.1 REVISÃO GERAL DA LITERATURA.....	25
1.1.1 Etiologia.....	25
1.1.2 Transmissão.....	26
1.1.3 Epidemiologia.....	26
1.1.4 Infecção Congênita.....	28
1.1.5 Diagnóstico.....	28
1.1.6 Manifestações clínicas.....	29
1.1.7 Tratamento.....	31
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAL E MÉTODO.....	35
3.1 Delineamento da Pesquisa.....	35
3.2 População.....	35
3.3 Amostra.....	35
3.3.1 Critérios e Inclusão.....	36
3.3.1 Critérios de Exclusão.....	36
3.4 Logística.....	36
3.5 Análise Estatística.....	38
3.6 Considerações Éticas.....	38
5. RESULTADOS.....	40
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
8. RECURSOS FINANCEIROS.....	58
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS	
APÊNDICE	

1. INTRODUÇÃO

Os Citomegalovirus (CMV) pertencem à família Herpesviridae, subfamília β -Herpesvirinae. Seu genoma é constituído por ácido desoxirribonucléico de fita dupla com distribuição universal e pode causar infecções congênicas e perinatais, tanto na infância como na vida adulta, acometendo principalmente indivíduos imunodeprimidos, especialmente transplantados e pacientes HIV (*Human immunodeficiency virus*) positivos com doença avançada (GRANATO, 2001; MELLO *et al.*, 2008).

Representa atualmente o agente etiológico mais comum de infecções congênita e perinatal em diversas partes do mundo (SCHLEISS, 2008; SCHROEDER *et al.*, 2006; SYRIDOU *et al.*, 2008; ZALEL *et al.*, 2008).

A infecção intra-uterina pelo CMV é uma das mais frequentes infecções congênicas de transmissão transplacentária hematogênica, podendo ocorrer em 0,2 a 2,2% de todos os nascidos vivos sendo, observada principalmente em populações de classe sócioeconômica baixa (KENNESON, 2007). Pode –se dizer que a incidência de infecção congênita por CMV é elevada porque a transmissão materno-fetal pode ocorrer após a infecção primária ou recorrente (ORNOY & DIAV-CITRIM, 2006; PECKHAM *et al.*, 1983; SYRIDOU *et al.*, 2008).

Quanto a transmissão pode acontecer durante o parto, o aleitamento materno ou por transfusão sanguínea e transplacentária (MARGOTTO, 2005; ZANCONETA *et al.*, 2006).

O grande problema é que a maioria dos infectados permanecem assintomáticos no período neonatal, persistindo um risco de 10-15% de manifestações tardias da doença, podendo resultar em surdez neuro-sensorial (MORTON & NANCE, 2006; MORZARIA *et al.*, 2004; PASS, 2005; OGAWA *et al.*, 2007), corio retinite, défices neurológicos, atraso no desenvolvimento psico-motor, convulsões e atrofia do nervo óptico (VAZ & DINIZ, 2002).

Cerca de 10% dos recém-nascidos (RN) infectados desenvolvem a doença sintomática no período neonatal, e nestes a mortalidade pode chegar aos 30% (GRAÇA *et al.*, 2004; WEIRICH, 1998).

Em relação aos sinais clínicos, os mais frequentes são: petéquias (76%), icterícia e hepatomegalia (60%) (ORNOY & DIAV-CITRIM, 2006). Os sinais neurológicos não são específicos em 53% dos casos, observa-se microcefalia, podendo os RN apresentarem também quadro de hipotonia com sonolência (27%), dificuldade de sucção (19%), espasticidade, hemiparésia ou convulsões (7%). Estudos relatam a surdez neuro-sensorial como a seqüela mais frequente, atingindo 57% dos lactentes infectados (HARRIS *et al.*, 1994; OGAWA *et al.*, 2007; OHLMS *et al.*, 1999; PECHHAM *et al.*, 1987; ROSS *et al.*, 2006). Esta alteração torna-se clinicamente aparente nos três primeiros anos de vida. Por esse

motivo, devem ser efetuados exames audiométricos e avaliações do desenvolvimento periódico, independente da infecção ser ou não sintomática. ENGMAN *et al.*, 2008; MADDEN *et al.*, 2005; STEHEL *et al.*, 2008). Em exames de imagem podem-se observar calcificações cerebrais (77%), ou alterações, tais como dilatação ventricular, atrofia cortical ou anomalias da substância branca (ORNOY & DIAV-CITRIM, 2006).

Em decorrência da complicação para o crescimento e desenvolvimento adequado da criança, a infecção por CMV vem sendo estudada a mais de três décadas com o intuito descobrir meios para reduzir os números dramáticos da infecção congênita pelo CMV (ROSS *et al.*, 2006; ZANCONETA *et al.*, 2006).

Nos últimos 30 anos nos EUA cerca de 1,2 milhões de fetos foram infectados *in útero* pelo CMV, destes, 75.000 tiveram infecção sintomática, dos quais muitos (10%) teriam morrido e praticamente todos os sobreviventes ficaram com sequelas graves (GRAÇA *et al.*, 2004).

Em estudo feito por Santos *et al.* (2000) dos 292 recém-nascidos avaliados, 20 (6,8%) foram positivos para CMV-DNA na urina durante a primeira semana de vida, indicando infecção congênita.

No Mato Grosso do Sul, o estudo feito por Figueiró-Filho *et al.*, (2007) mostrou 0,05% de casos IgM reagentes para CMV, sendo 17,9% das gestantes susceptíveis e 82% previamente expostas.

A alta incidência de complicação grave, provocou traumas que se instalam em inúmeras famílias, os custos financeiros associados ao apoio a todas as crianças ultrapassam seguramente os dois bilhões de dólares anuais (SCHROEDER *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2001).

A primeira palavra de ordem que emana destes números é a prevenção, mas o diagnóstico precoce pode ajudar a esclarecer inúmeras trilhas a serem seguidas, no intuito de instituir uma intervenção com recursos terapêuticos que podem minimizar a morbidade, mortalidade e possíveis sequelas (SCHLEISS, 2008).

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo CMV pode ser feito por diferentes métodos, que incluem: exame direto de amostras (por microscopia eletrônica, demonstração de células com corpúsculos característicos e detecção de antígenos ou DNA viral), isolamento viral em culturas celulares e testes sorológicos. O fato é que a sorologia pode resultar em diagnósticos falhos (falso negativo priva o RN de tratamento e o falso positivo leva a tratamento com fármacos hepatotóxicos que na verdade não deveriam ser utilizados naquele momento) durante o período da infecção aguda (ZANCONETA *et al.*, 2006). Assim, a

utilização de técnicas de biologia molecular, dentre elas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando sangue, urina ou saliva pode vir a se tornar “padrão ouro” no diagnóstico tardio da infecção congênita por CMV, dadas as suas vantagens em relação aos métodos clássicos de diagnóstico desta situação (LINARI *et al.*, 2005; THEILER *et al.*, 2006).

A detecção de ácido nucléico viral pela reação em cadeia da polimerase (amplificação do DNA viral) em amostras de sangue e urina tem permitido definir diferentes diagnósticos (YAMAMOTO *et al.*, 1998; YAMAMOTO *et al.*, 1999; VAZ & DINIZ, 2002).

Nos últimos anos, a PCR vem sendo amplamente utilizada na detecção genômica de CMV, demonstrando sensibilidade superior quando comparada a outros métodos usualmente utilizados. Tal metodologia pode oferecer resultados qualitativos e quantitativos, apresentando maior flexibilidade com os materiais em teste, permitindo armazená-los a -20°C até o processamento, e a possibilidade de repetir os testes em casos de resultados duvidosos, devido a utilização de pequenos volumes do material biológico (MELLO *et al.*, 2008).

Em estudos feitos por Santos *et al.* (2000) o autor relata que a técnica mostrou-se útil e efetiva no diagnóstico de infecção congênita por CMV.

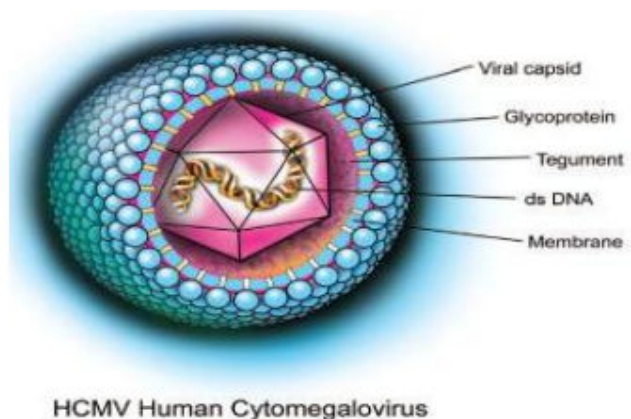
Apesar de vários estudos demonstrarem resultados comparativos entre diversas técnicas de diagnóstico de infecção aguda por CMV, no Brasil, estudos aplicando reação em cadeia da polimerase no diagnóstico da infecção congênita ocasionada por CMV ainda são necessários especialmente aqueles delineando prevalência em um significativo número de neonatos internados em unidade de terapia intensiva neonatal e o mais importante, triar o recém-nascido e a mãe logo após o nascimento, bem como a gestante durante o pré-natal.

Em decorrência da escassez de dados na região Centro-Oeste do Brasil a respeito dessa importante infecção, este trabalho se propõe a estudar a frequência do CMV em recém-nascidos internados em Unidades neonatais de cinco hospitais de Campo Grande - Mato Grosso do Sul, Brasil por meio de análises genotípicas do vírus em questão e comparar a utilização de dois espécimes biológicos.

1.1 REVISÃO GERAL DA LITERATURA

1.1.1 Etiologia

O herpesvirus humano (HHV) Citomegalovírus (CMV), também denominado HHV-5 é um vírus DNA, pertencente à família Herpesviridae, subfamília *Betaherpesvirinae* e gênero *Citomegalovirus*. Mede 200nm de tamanho, seu genoma contem cerca de 230.000 pares bases alojado internamente a um capsídeo proteico de forma icosaédrica ladeado por uma camada de proteína amorfa, o tegumento; todos envoltos por uma camada bilipídica onde estão afixadas as glicoproteínas virais (TERRA *et al.*, 2000) (Figura 1).



Fonte: <http://antonio-milaboratorioblogspot.com/citomegalovirus>

Figura 1. Estrutura do citomegalovírus.

Dentre os possíveis locais para seu alojamento, parecem ser as células mononucleares do sangue periférico seus maiores sítios de latência. Possui vida média a 37°C de 45min (JUNQUEIRA, SANCHO, SANTOS, 2008; PANNUTI, 2009).

A despeito dos outros herpesvírus que geralmente são eliminados após a infecção primária, o CMV tem a latência como uma de suas particularidades mais marcantes. Após o contato inicial com um hospedeiro, essencialmente humano, geralmente passando-se despercebido e com aspecto pouco significativo, o CMV não será eliminado do organismo, permanecendo em estado de latência por vários períodos, aguardando redução da imunidade celular para que se manifestar através de uma reativação, em contrapartida à reinfecção por diferentes cepas, porém, tanto a infecção primária em recém-nascidos quanto a reativação do vírus em pacientes imunocomprometidos pode levar a doenças severas (GRANATO, 2001; YAMAMOTO *et al.*, 2001).

A infecção pelo CMV possui envolvimento multisistêmico, o vírus, possui tropismo por diferentes tecidos como: tecidos pulmonares, retículo-endotelial e sistema nervoso central. Em especial o vírus demonstra uma preferência pelas células das glândulas salivares e dos túbulos renais onde há uma maior proliferação e quantidade de partículas virais (MEDEIROS *et al.*, 2007).

1.1.2 Transmissão

Dentre os fatores que favorecem a proliferação do CMV, a gestação pode ser considerada um deles, juntamente com o uso de drogas imunossupressoras, presença de Síndrome da Deficiência de Imunidade Adquirida (AIDS) (GRANATO, 2001; FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2007).

Alguns fatores também podem interferir no modo de transmissão como os altos índices de infecção assintomática, a excreção viral por tempo prolongado e a infecção recorrente com excreção viral recorrente. Esses fatores tornam difícil a determinação do risco de transmissão, no entanto, a mesma pode ocorrer de diversas maneiras, uma delas é o contato direto através da saliva, sangue, urina, secreções respiratórias, secreções do colo uterino e esperma. Outra é de forma horizontal, através de transplantes de órgãos e das transfusões de sangue ou ainda por transmissão vertical, via transplacentária (durante a gestação), durante o parto ou após o parto (via colostro, leite materno) (MARGOTO, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2007; ENGMAN, *et al.*, 2008).

A infecção dos tecidos placentários e células amnióticas pelo vírus favorecem a contaminação do feto que ao deglutir o líquido amniótico colocam o vírus em contato com a mucosa oral e gástrica do feto onde se inicia a replicação viral que alcançará futuramente a circulação sanguínea e se instalará em outros órgãos como rim, as células dos túbulos renais parecem ser um importante sítio de replicação para o CMV (YAMAMOTO *et al.*, 1999).

1.1.3 Epidemiologia

A infecção pelo citomegalovírus varia de acordo com a população estudada, sendo comum em adultos. Apresenta caráter endêmico, com incidência variável e sem variação sazonal. As maiores taxas de soropositivos normalmente acometem pessoas com poder socioeconômico mais baixo e com menor idade, pois a virulência é muito dependente da condição imunológica (TERRA *et al.*, 2000; DEMMLER-HARRISON, 2009).

Sabe-se que em países em desenvolvimento, 95% a 100% de pré-escolares são soropositivos, enquanto que em países desenvolvidos essas taxas estão em torno de 20% (KENNESON, 2007).

Em relação à infecção congênita, os índices são variáveis e dependentes da localidade. Nos Estados Unidos da América do Norte, as taxas de infecção variam de 0,5% a 2,5%, autores relatam que esse tipo de infecção vai de encontro à incidência da infecção em mulheres em idade fértil, que também apresentam taxas com grande variação, em torno de 90% em países menos favorecidos em relação aos países mais desenvolvidos com índice de 50 a 85% de soropositivos (MEDEIROS *et al.*, 2007; KENNESON, 2007).

No Brasil, os estudos têm demonstrado uma prevalência de anticorpos IgG para CMV em gestantes na ordem de 66,5% a 92% (FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2005), no entanto, o risco de soroconversão em mulheres em idade fértil depende de sua condição socioeconômica, chega a 6%, entre a população de nível baixo (maior risco de transmissão vertical) e 2% em população com demais níveis socioeconômicos.

Mundialmente o CMV acomete cerca de 0,5 a 2,2 entre 1000 RN (AZEVEDO *et al.*, 2005). No Brasil a incidência a CMV é em torno de 0,2 a 0,9 entre 1000 RN, enquanto em alguns países de primeiro mundo a incidência chega a 0,7 por 1000 RN (SANTOS *et al.*, 2000).

A infecção congênita pode ocorrer tanto pela infecção primária como pela reativação viral ou infecção secundária da gestante. Estudos relatam que a infecção primária resulta em 40% de recém-nascidos infectados contra 1% de recém-nascidos infectados de mães com infecção secundária (GRAÇA *et al.*, 2004; ENGMAN *et al.*, 2008; NEIL & KANESHIRO, 2011).

Observa-se que a maioria dos danos causados ao feto ocorre quando a mãe é exposta ao vírus nos primeiros meses de gestação, no entanto, estudos citam que neste período há uma menor excreção viral, quando comparada aos demais, sendo esta taxa de excreção de índices parecidos ao de gestantes não infectadas, acredita-se que este possa ser um mecanismo de proteção ao feto (STEHLE *et al.*, 2008; AGAMANOLIS, 2011).

1.1.4 Infecção congênita

A infecção causada pelo citomagalovírus, também conhecida como doença de inclusão citomegálica, pode ser adquirida intra-útero por via transplacentária, diferente da perinatal que, acontece durante a passagem pelo canal de parto infectado ou pelo aleitamento (MIURA *et al.*, 2006).

O CMV é considerado a principal causa de infecção em recém-nascidos, podendo causar danos permanentes ou levar a criança a óbito. Quando transmitidos da mãe para o feto nos primeiros meses de gestação o diagnóstico precoce torna-se difícil e as chances de malformações graves aumentam (LINARI *et al.*, 2005; AGAMANOLI, 2011).

A imunidade materna não impede que o vírus seja transmitido para o feto, logo, a prevalência de infecção pelo CMV nos RN esta diretamente relacionada à soropositividade materna (ZANCONETA *et al.*, 2006).

A infecção materna pode ocorrer de duas formas, primária ou recorrente. Chama-se infecção primária quando esta ocorre em mulheres que nunca tiveram a infecção, sendo que quando ocorre infecção primária as chances do vírus ser transmitido da mãe para o feto são maiores, bem como a possibilidade de sequelas graves. Na forma recorrente o vírus já estava presente e foi reativado ou ocorre reinfeção por outras cepas (KOPELMAN, 2004).

Acredita-se que, provavelmente os leucócitos maternos infectados atravessem a barreira placentária e atinjam a circulação fetal através dos vasos umbilicais. Outro possível mecanismo de transmissão envolve a capacidade do vírus infectar a placenta e, conseqüentemente, o líquido amniótico, que podem ser ingeridas pelo feto e causar infecção (ZALEL *et al.*, 2008).

Bopanna (2001) cita que mulheres com infecção recorrente tenham maior probabilidade de ter bebês assintomáticos ou desenvolver sequelas em relação à infecção primária. Porém, uma gestante soropositiva pode adquirir uma nova cepa quando gestante, por isso que, às vezes mães comprovadamente soropositivas podem dar a luz ao recém-nascido severamente doente ou sintomático.

1.1.5 Diagnóstico

Quando o vírus é identificado nas primeiras semanas de vida (até 20 dias), define-se infecção congênita, já que o vírus pode ficar em período de incubação durante,

aproximadamente, oito semanas (YAMAMOTO *et al.*, 1998; SCHLEISS, 2008; SYRIDOU *et al.*, 2008;

Entre os fluidos corporais que podem ser: leite, lágrima, secreção vaginal, cervical ou da orofaringe, sêmen, sangue e urina (MEDEIROS *et al.* 2007), normalmente utilizados para o diagnóstico do CMV, a urina é o material preferido por conter maiores quantidades de vírus e apresentar maior estabilidade.

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo CMV pode ser feito por diferentes métodos, que incluem: exame direto de amostras (por microscopia eletrônica, demonstração de células com corpúsculos característicos chamadas de “olho de coruja” (Cowdrey tipo A) e detecção de antígenos ou DNA viral), isolamento viral em culturas celulares (MARIN *et al.*, 2002; YAMAMOTO *et al.*, 2007), além dos testes sorológicos, estes são de difícil interpretação porque, no momento do parto, grande parte das mulheres tem IgG antiCMV que é transmitida via transplacentária para o concepto; dessa forma, a presença de IgG no sangue do RN não é obrigatoriamente indicativa de infecção congênita (MELLO *et al.*, 2008).

O fator agravante é que os testes por sorologias podem ser falhos em 50% dos casos de infecção aguda (MELLO *et al.* 2008) ou se houver a necessidade de se diferenciar uma infecção primária de uma reinfecção ou reativação pelo CMV sugere-se utilização de técnicas rápidas, sensíveis e específicas para o diagnóstico.

Assim, testes de biologia molecular mostram-se como nova opção de diagnóstico, a detecção de ácido nucléico viral pela reação em cadeia da polimerase (amplificação do DNA viral) em espécimes biológicos tem permitido definir diferentes diagnósticos (SANTOS *et al.*, 2000; MELLO *et al.* 2008). Nos últimos anos, a PCR vem sendo amplamente utilizada na detecção genômica de CMV, demonstrando sensibilidade superior a outros métodos usualmente utilizados.

1.1.6 Manifestações Clínicas

Os sinais clínicos mais frequentemente observados são prematuridade (90%), petéquias (76%), icterícia e hepatomegalia (60%). Os sinais neurológicos não são específicos em 53% dos casos, observa-se microcefalia, podendo os recém-nascidos apresentar quadro de hipotonia com sonolência (27%), dificuldade de sucção (19%), espasticidade, hemiparesia ou convulsões (7%) (NEIL & KANESHIRO, 2011). Outros sinais também podem ser observados como: coriorretinite, problemas pulmonares, esplenomegalia e baixo peso ao nascimento.

Lactentes infectados podem apresentar sequelas, como surdez neuro-sensorial, que é mais frequente, atingindo 57% dos infectados. Esta alteração torna-se clinicamente aparente nos três primeiros anos de vida. Por esse motivo, devem ser efetuados exames audiométricos e avaliações do desenvolvimento periódicos, independente da infecção ser ou não sintomática (OGAWA *et al.*, 2007; ROSS *et al.*, 2006; ENGMAN *et al.*, 2008; STEHEL *et al.*, 2008). Acredita-se que até 90% das crianças que demonstrem sintomas de infecção pelo CMV ao nascimento apresentarão anormalidades no decorrer de sua existência e 5 a 10% das crianças sem sintomas poderão desenvolver esses problemas (NEIL & KANESHIRO, 2011).

Alguns pacientes, que parecem assintomáticos ao nascimento, podem desenvolver déficit auditivo e até surdez dentro dos primeiros três anos de vida, havendo relato de caso em que surgiu entre oito e 14 anos (AZEVEDO *et al.*, 2005).

A infecção pelo CMV pode desenvolver-se em qualquer estágio da gravidez e continuar após o nascimento. Estudos citam que crianças com infecção congênita pelo CMV têm vários envoltimentos cerebrais, assim como de outros órgãos. Isso ocorre porque a infecção durante a gestação frequentemente causa necrose do tecido cerebral, especialmente das paredes dos ventrículos laterais. Outro fator importante, é que a infecção durante o primeiro trimestre pode ocasionar a migração neuronal, causando microcefalia e displasia cortical. Em alguns casos, a infecção por CMV no feto, destrói grande parte do cérebro causando esquizecefalia, ocasionada por isquemia induzida pela infecção e dentre as sequelas neurológicas pode-se observar calcificações cerebrais periventriculares passíveis de serem detectadas por exames de imagem (KIMBERLIN *et al.*, 2003; LINARI *et al.*, 2005; AGAMANOLIS, 2011).

As alterações do sistema nervoso central (SNC), ouvido interno e da coróide do olho parece só ocorrer nas infecções congênitas. Os sintomas podem ser imediatos ou surgirem depois de um período de tempo, o RN pode apresentar letargia, distúrbio respiratório e convulsões. O paciente pode vir a óbito em um curto período de tempo, dias ou semanas, sendo a maioria das mortes em decorrência de doenças em múltiplos órgãos, com severa disfunção hepática, sangramento, coagulação intravascular disseminada e infecção bacteriana secundária. Os sobreviventes (90% a 95%) têm evidente déficit auditivo ou do SNC (LINARI *et al.*, 2005).

Existe uma estreita relação entre o prognóstico e a precocidade da transmissão. Autores relatam que quanto mais cedo a transmissão da infecção da mãe para o feto acontecer, pior será o prognóstico e maiores serão as chances de malformações graves (MIURA *et al.*, 2006):

1.1.7 Tratamento

Crianças que apresentam sintomas clínicos compatíveis com infecção por CMV deverão ser periodicamente avaliadas quanto à audição e visão, na intenção de prevenir perda auditiva e alterações no desenvolvimento (KIMBERLIN *et al.*, 2003).

O uso de ganciclovir pode prevenir perda auditiva e alterações no desenvolvimento, bem como a melhora em quadros de hepatite colestática (OZKAN *et al.*, 2006).

Durante esse tratamento também é importante monitorar a contagem de leucócitos e neutrófilos absolutos. Essas alterações são droga-dependente e, muitas vezes, há necessidade de suspensão da medicação (CALDÉS *et al.*, 2010). Pacientes em tratamento com ganciclovir podem apresentar algumas reações como: tremores, alterações no local da infusão (flebite), náuseas, vômitos, erupção cutânea e febre (YOUSFI & DOUGLAS, 2003).

A dose usual do ganciclovir é de 10mg/Kg/dia dividido em duas doses administradas por via endovenosa por 2 a 4 semanas durante 60 minutos (Caldés *et al.*, 2010) de acordo com a gravidade da doença. Atualmente pesquisadores sugerem menor tempo de tratamento na remissão da doença com ganciclovir EV por 21 dias, seguido por valganciclovir oral na dose de 15 a 18mg/Kg dose única diária (USA) duas vezes ao dia, durante 21 dias, indicado no tratamento e profilaxia da retinite por CMV em pacientes imunodeprimidos (YOUSFI & DOUGLAS, 2003).

O ganciclovir é um nucleosídeo sintético análogo a 2'-desoxiguanina, que inibe a replicação dos herpes vírus, tanto *in vitro* como *in vivo*. Foi observado que pacientes com hepatite colestática têm melhorado os níveis de bilirrubina direta, AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), GGT, (Gama glutamil transpeptidase) e FAL (fosfatase alcalina) com o uso de ganciclovir.

Além deste, outro fármaco utilizado para tratamento de imunocomprometidos têm demonstrado bons resultados, o foscarnet, que reduz a replicação viral por inibir a enzima DNA viral polimerase (ROSENTHAL, 2001; KIMBERLIN *et al.*, 2003). Tanto o ganciclovir quando o foscarnet, são aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA), ambas as drogas possuem pouca biodisponibilidade oral e elevada toxicidade, agem de forma virustática (inibição da replicação viral) (JUNQUEIRA *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

O objetivo da pesquisa foi estudar a frequência da infecção congênita por CMV em recém-nascidos internados em unidades neonatais em Campo Grande por método de biologia molecular e comparar o resultado da utilização de amostras de sangue e urina para detecção do vírus.

2.2 Objetivos específicos:

- Estimar a frequência de ocorrência de citomegalovírus em pacientes internados em cinco hospitais de Campo Grande-MS no período de março de 2010 a agosto de 2012.
- Estudar os aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes com citomegalia congênita.
- Realizar análise genotípica (DNA cromossomal por PCR *nested*) em amostras de urina e sangue coletados assepticamente.
- Comparar resultados a partir de sangue e urina de neonatos.
- Comparar resultados da PCR com a sorologia
- Contribuir com a equipe médica que assiste aos pacientes dos hospitais de estudo por meio de divulgação dos resultados obtidos e laudos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento da Pesquisa

Trata-se de um estudo comparativo descritivo. O desfecho clínico foi infecção congênita neonatal. A população de estudo foi constituída por todos os recém-nascidos que internavam no setor de neonatologia dos Hospitais: Universitário-UFMS, Hospital Regional de Mato Grosso do Sul, - “Rosa Pedrossian”, Maternidade Candido Mariano (MC) , Hospital Geral El Kadri e Sociedade Beneficente de Campo Grande Santa Casa.

3.2 População

Para uma margem de erro de 3% para mais ou para menos, 380 pacientes seriam necessários para esse estudo.

3.3 Amostra

Foram elegíveis para estudo todos os recém-nascidos (RNs) que internaram no setor de neonatologia dos hospitais acima mencionados no período de março de 2010 a agosto de 2012, totalizando 520 recém-nascidos neste período.

3.3.1 Critérios de Inclusão:

- ✓ Pacientes internados no serviço de neonatologia independente do plano de saúde;
- ✓ Pacientes com idade até 20 dias de vida.
- ✓ Pacientes contendo dados clínicos completos;
- ✓ Pacientes cujos pais ou responsáveis concordaram e assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE III).

3.3.2 Critérios de exclusão:

- ✓ Pacientes com prontuários incompletos;
- ✓ Pacientes de etnia indígena;
- ✓ Pacientes cujos pais ou responsáveis não concordaram em assinar o TCLE.

3.4 Logística

As amostras de sangue e urina foram coletadas utilizando técnicas assépticas e adequadas para a idade (coletor de urina e tamanho e tipo da agulha), respeitando normas de transporte (em caixa térmica contendo gelox trazer para o laboratório no máximo dentro de 1h) e temperatura (4 °C). A coleta foi feita assim que o paciente chegou à unidade de terapia neonatal.

Registros médicos foram revisados para determinar relação com as variáveis: prematuridade, sorologia do RN, idade gestacional, sexo, índice de linfócitos, plaquetopenia, eosinofilia, evolução e sintomas.

Quando a amostra era urina, a mesma foi previamente desnaturada para evitar interferência durante o processo da PCR, no entanto, quando a amostra era sangue, a mesma passou por um processo prévio de extração de DNA que foi executada utilizando o kit illustra blood genomicPrep mini spin (GE Healthcare, Uk) seguindo as recomendações do fabricante (CABRAL, 2010).

A PCR foi desenvolvida no laboratório de biologia molecular da Universidade Católica Dom Bosco e a amplificação do DNA das amostras, foi realizado através do método de PCR *nested*, utilizando os iniciadores externos (5' TG AGG AAT GTC AGC TTC 3' e 5' TC ATG AGG TCG TCC AGA 3') na primeira reação, que amplificaram fragmentos de 347 pb, servindo como alvo para a segunda reação que utilizou os iniciadores internos (5' CCA GCC TCA AGA TCT TCA T 3' e 5' TCG TCC AGA CCC TTG AGG TA 3') que amplificaram fragmentos de 297 bp de acordo com protocolo de Martiny *et al.*, (2011) com modificações, as quais utilizaram as fórmulas descritas no ANEXO I.

Para a amplificação foi preparado um mix contendo 2 µL de urina (previamente desnaturada por 6 minutos a 96°C) ou 1 µL de DNA extraído quando a amostra era sangue, 15 pmol de cada iniciador, 2,5 µmol de cada um dos trifosfatos de desoxinucleotídeo (Ludwig Biotec), 0,2 U de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec), tampão (5mM tris-HCl pH 9,0; 25 mM KCl, 750µM de MgCl₂) e água miliQ em um volume total de 50µL. As condições das reações incluíram: 94°C / 2min., 55°C / 1min 30seg., 72°C / 2min., seguido de 34 ciclos de 94°C / 1min., 55 °C / 1min 30seg., 72°C / 2min., permanecendo refrigerada a 4° C até o uso.

O mix da segunda reação foi idêntico ao da primeira acrescido de 1 µL do fragmento amplificado da primeira reação.

O ciclo efetuado na segunda reação incluíram as seguintes condições: 72° C / 3min., seguido de 30 ciclos de 94°C / 1min., 55 °C / 1min., 72°C / 1min., permanecendo refrigerada a 4° C até o uso.

As reações foram conduzidas no termociclador modelo GeneAmp 9600 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e os produtos finais das reações foram detectados por eletroforese em gel de agarose (Ludwig Biotec) a 1,8%, contendo 2,5 µl/100 mL de corante Gel Red (Biotium) ou Sybr Safe (10.000X concentrado, Invitrogen), porém, as amostras negativas foram reaplicadas em gel de poliacrilamida 6% para confirmação (Figuras 6-13) (ANEXO II). A eletroforese em gel de agarose for feita em tampão TBE 1x e para gel de poliacrilamida foi utilizado tampão TAE 1x. O tamanho dos fragmentos de DNA foi estimado com base no marcador de 100 pb (Invitrogen).

As bandas de DNA foram analisadas por meio do equipamento MultiDoc-It Digital Imaging System (UVP, Upland, CA), sob luz ultravioleta, quando em gel de agarose, fotografadas e documentadas em computador.

Como controle positivo foi utilizado urina comprovadamente positiva cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Os resultados positivos foram repassados aos pacientes em forma de laudo agregado aos prontuários médicos (APÊNDICE IV).

3.5 Análise Estatística.

Análise estatística foi feita com a utilização de um formulário (APÊNDICE V), para coleta de dados em prontuários e posteriormente tabulados no software EPI INFO 3.5.2. e o teste não paramétrico pareado de Wilcoxon.

3.6 Considerações Éticas.

Esta pesquisa foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob nº 1464 (ANEXO III), e a autorização de pais e responsáveis se fez sob a forma de termo de consentimento livre e esclarecido previamente assinado.

A identidade de pacientes e pais foi mantida em sigilo.

Os pais e responsáveis foram devidamente informados e orientados conforme formulário de consentimento.

Os resultados foram repassados aos pediatras em forma de resultados de exame (laudo) (APÊNDICE II).

4. RESULTADOS

Foram analisados 520 pacientes provindos de cinco hospitais de Campo Grande-MS, e percebeu-se que a maior frequência de internação foi no Hospital Universitário da UFMS e no Hospital Regional de Mato Grosso do Sul (Figura 1).

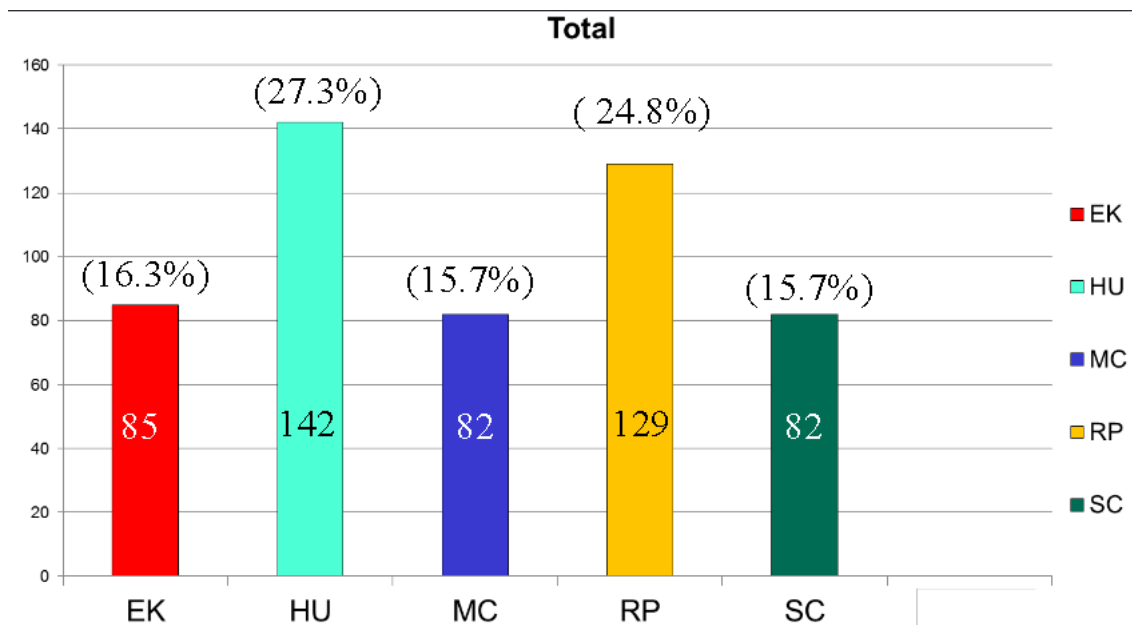


Figura 2. Quantidade e percentuais de pacientes analisados nos hospitais de estudo, Campo Grande-MS, 2010/2012. EK = Hospital Geral El Kadri, HU = Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MC = Maternidade Candido Mariano, RP = Hospital Regional “ Rosa Pedrossian”, SC = Santa Casa.

Durante o período de estudo foram identificados 13 (2.5%) pacientes positivos para CMV na urina e 10 (2%) mostraram-se positivos para CMV no sangue (Figuras 2, 3 e 4).

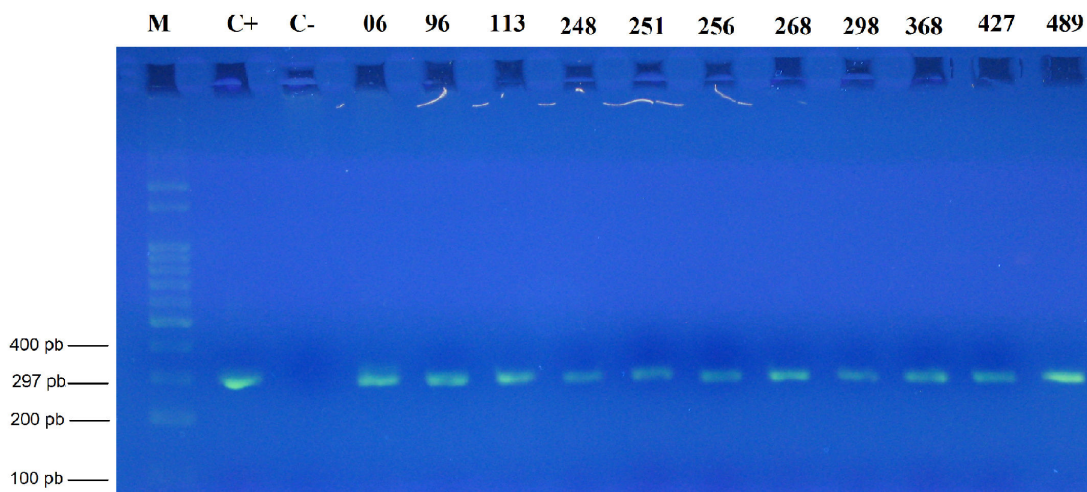


Figura 3. Gel de agarose 1.8% corado com SYBR SAFE. Onze amostras positivas para CMV na urina. M = marcador de peso molecular. (C+) = Controle positivo (amostra biológica sabidamente positiva); Controle negativo (C-) água ultrapura autoclavada.

A figura acima representa a positividade de onze das treze amostras de urina positivas para CMV processadas por PCR. A presença de banda na altura de 297 pb comparadas ao controle positivo (C+) confirmam que o DNA encontrado nas amostras de urina dos RN possuem DNA do CMV. As amostras com ausência de bandas como é o caso do controle negativo (C-) indicam que a amostra analisada não tem DNA.

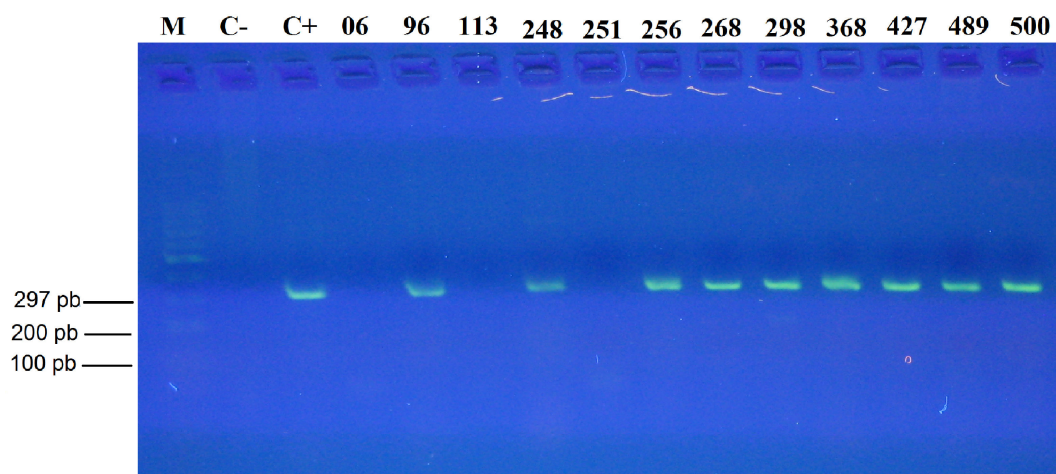


Figura 4. Gel de agarose 1.8% corado com SYBR SAFE. (B). Amostras 06, 113 e 251 foram negativas para DNA de CMV, as demais amostras foram positivas. M = marcador de peso molecular. (C+) = Controle positivo (amostra biológica sabidamente positiva); Controle negativo (C-) água ultrapura autoclavada.

A figura 4 representa nove das dez amostras positivas para CMV no sangue. A amostra 06, 113 e 251 não mostraram bandas na altura de 297 pb, logo não possuem DNA presente, ou seja, são negativas. O Controle negativo (C-), deixa claro que não houve contaminação durante o procedimento e o controle positivo (C+), representa que a reação foi segura e confiável, pois neste contem DNA sabidamente conhecido (CMV) e assim tem que apresentar bandas.

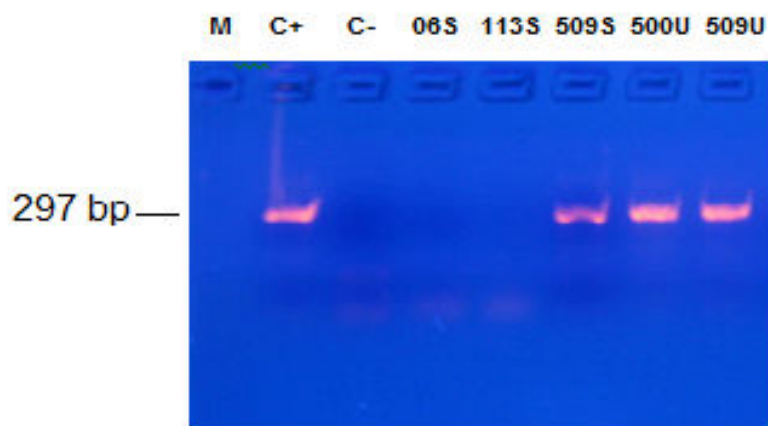


Figura 5. Gel de agarose 1.8% corado com gel red,. Amostras 06S e 113S confirmam negatividade para CMV. Amostra 509S mostra-se positiva para CMV no sangue e amostras 500U e 509U são positivas para CMV na urina.

Na figura 5 pode-se observar que a amostra 509S apresentou banda completando as 10 amostras positivas para CMV no sangue. As amostras 500U e 509U, também apresentaram bandas na altura de 297 pb, completando 13 amostras positivas para CMV na urina. As amostras 06S e 113S assim como o controle negativo (C-) não apresentaram bandas, logo são negativas quanto à presença de DNA de CMV.

Em relação à sorologia feita para os 520 pacientes analisados, apenas 1 (0.2%) apresentou IgG+ e IgM+.

Quanto aos sintomas observados nos 13 RN positivos para CMV confirmaram 3 (23%) assintomáticos e 10 (77%) sintomáticos. Os principais achados clínicos dos pacientes sintomáticos encontram-se elencados na tabela 1.

Tabela 1 – Características clinica dos recém-nascidos positivos sintomáticos para CMV,
 Campo Grande,-MS, 2010/12.

Sintomas	n.o	%
Prematuridade*	10	(100.0)
Petéquias	2	(20.0)
Insuficiência respiratória.	5	(50.0)
Microcefalia	1	(10.0)
Índice de linfocitose **	5	(50.0)
Índice de eosinofilia ***	4	(40.0)
Trombocitopenia ****	5	(50.0)
Transfusão	5	(50.0)
Hidrocefalia	1	(10.0)
Icterícia colestática ^Φ	7	(70.0)

Nota: * (< 37 semanas); ** > 50%; *** > 2%; **** < 140.000/ μ L; ^Φ (bilirrubina direta > 2 mg/dL).

Quanto a evolução, do total de positivos, 1 (7,7%) evoluiu para óbito. Outros dados relacionados às características descritas em prontuários podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis analisadas a partir de dados de pacientes obtidos dos prontuários.

Paciente	Sexo	Peso (g)	Raça	Tipo Sanguíneo	Evolução	IG *	Hospital	Parto
06	F	1600	Parda	O+	Alta	33	HU	Cesárea
96	F	1675	Parda	O+	Alta	31	RP	Cesárea
113	F	1860	Branca	O+	Alta	33	SC	Cesárea
248	F	1020	Branca	O+	Alta	32	RP	Cesárea
251	F	2300	Branca	O+	Alta	36	RP	Vaginal
256	M	1805	Branca	O+	Alta	31	SC	Vaginal
281	M	NC	Branca	A+	Óbito	38	SC	Cesárea
298	F	1290	Branca	A+	Alta	33	MC	Cesárea
368	M	2645	Branca	A+	Alta	35	RP	Cesárea
427	F	1000	Branca	O+	Alta	28	HU	Cesárea
489	M	2450	Parda	O+	Alta	39	HU	Cesárea
500	M	3800	Branca	O+	Alta	40	HU	NC
509	F	1950	Branca	O+	Alta	33	HU	Cesárea

Nota: IG = idade gestacional; NC = não consta; HU = Hospital Universitário; RP = Hospital Regional de Mato Grosso do Sul; MC = Maternidade Candido Mariano; SC = Sociedade Beneficente de Campo Grande Santa Casa.

As figuras de 6 a 13, representam géis de poliacrilamida feitos para confirmar a negatividade das amostras que no gel de agarose deram negativo, em função da sensibilidade apresentada por este gel, juntamente com as amostras negativas foram colocadas algumas amostras já comprovadamente positivas no gel de agarose não geral dúvidas quanto a reação ao procedimento. O gel de poliamcrlamida tem a característica de revelar pequenas quantidades de DNA que as vezes não são visualizadas no gel de agarose, por isso tivemos o cuidado de fazer uma contra prova para não deixar passar como negativo uma amostra que era positiva porém com pequena quantidade de DNA.

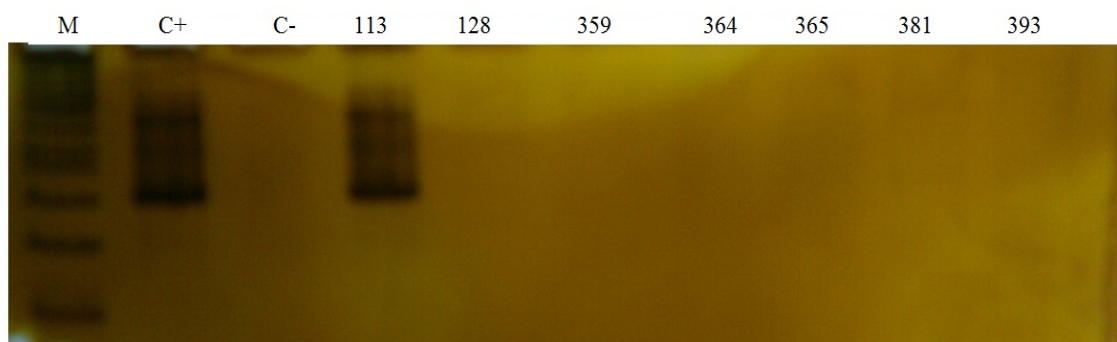


Figura 6. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. Amostra 113 positiva para CMV na urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.

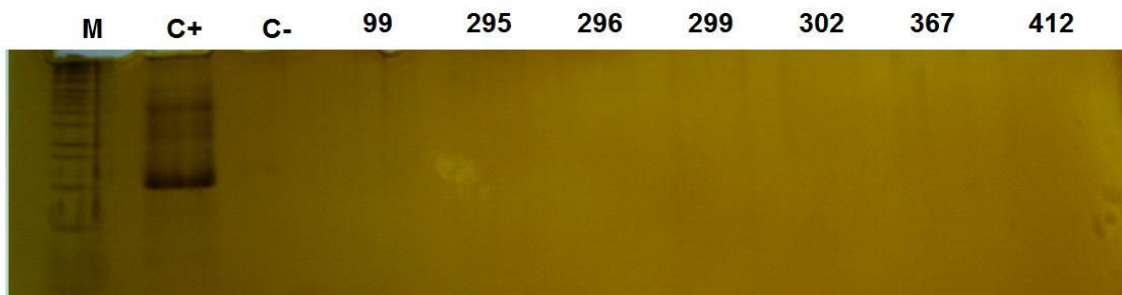


Figura 7. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.

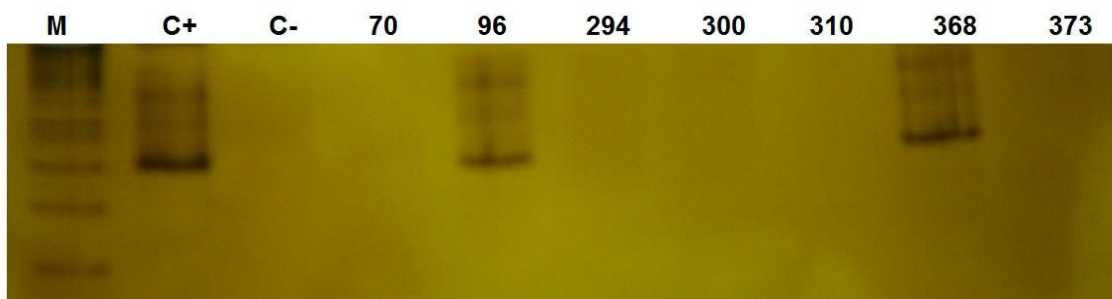


Figura 8. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. Amostra 96 e 368 foram positiva para CMV na urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.



Figura 9. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.

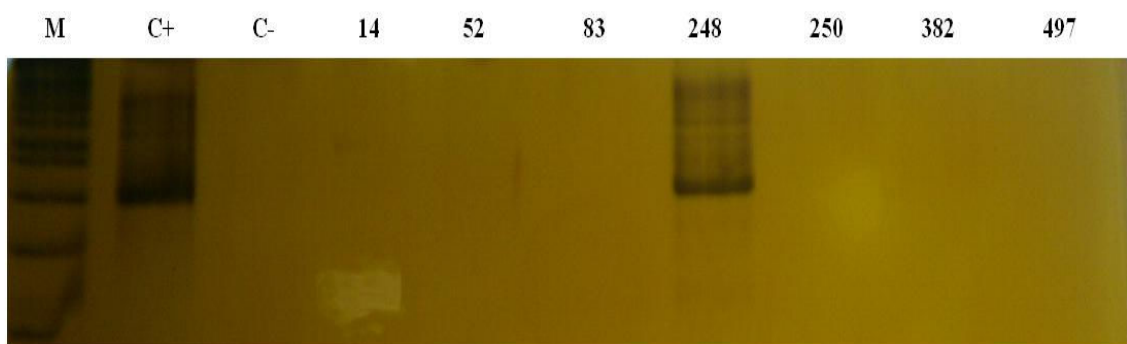


Figura 10. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. Amostra 248 positiva para CMV na urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.

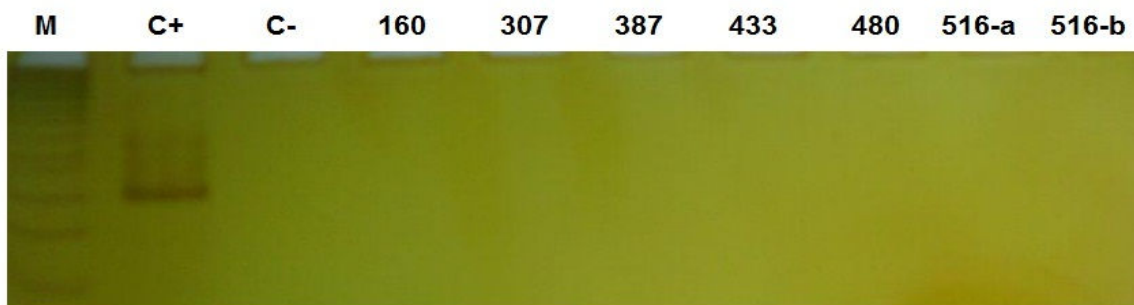


Figura 11. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.

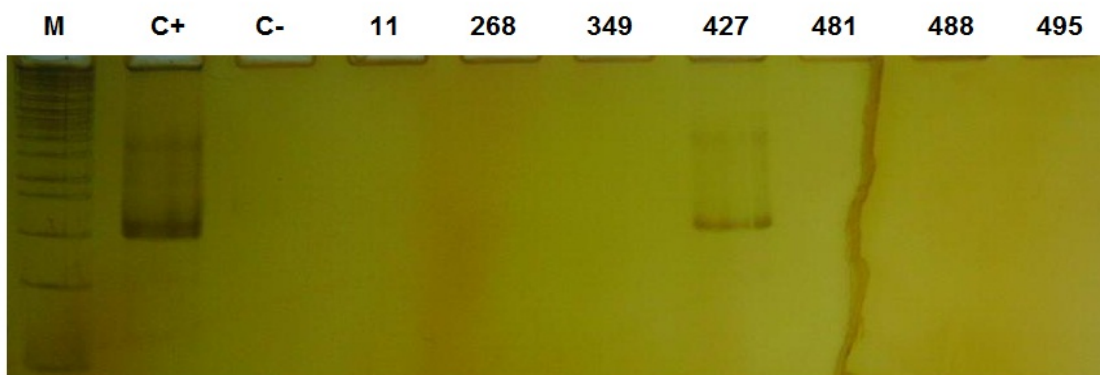


Figura 12. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. Amostra 427 positiva para CMV na urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.

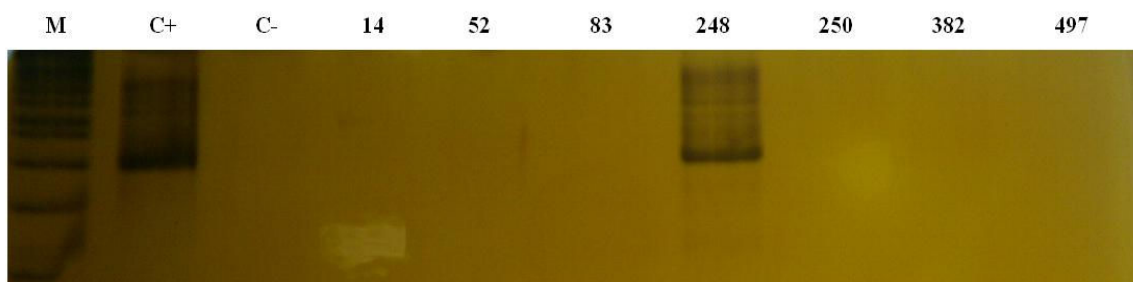


Figura 13. Gel de poliacrilamida 6%, confirmando negatividade de amostras da urina. Amostra 248 positiva para CMV na urina. (C+) = controle positivo. (C-) = controle negativo. M = marcador de peso molecular.

5. DISCUSSÃO

A citomegalia é uma infecção que afeta 0,2 a 2,2% dos nascidos-vivos em todo mundo, variando consoante o país e as diferentes classes socioeconômicas, além de estar intimamente relacionada com o estado imunitário do hospedeiro (KENNESON, 2007; SYRIDOU *et al.*, 2008).

Nos resultados observados na presente pesquisa os hospitais que apresentaram maior número de internações, bem como de pacientes infectados foram o Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e o Hospital Regional “Rosa Pedrossian”. Segundo pesquisadores, estes são hospitais escola de referência no estado em atendimento a população de baixa renda (FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2007), devemos enfatizar que o CMV é um vírus associado a condição imunitária encontrado com maior frequência em populações de condição socioeconômica baixa.

Na cidade de São Paulo, foram observadas taxas de 0,98% em população de nível sócioeconômico baixo e 0,49% em população de nível sócioeconômico médio. Estudo, realizado em Ribeirão Preto, mostrou que 2,6% dos recém-nascidos estudados tinham infecção congênita por CMV (YAMAMOTO *et al.*, 1999).

Infecção por CMV no RN, segundo Paixão *et al.*, 2005 é definida como infecção congênita quando o vírus é detectado nas 3 primeiras semanas de vida, logo, pode-se afirmar que treze RNs apresentaram infecção congênita, visto que, a coleta foi realizada num prazo de até 20 dias de vida.

Quanto à utilização da PCR como método de diagnóstico para CMV, foi possível detectar o vírus através do método PCR *nested*, com maior positividade a partir da urina, concordando com outros trabalhos já citados, em função da estabilidade do espécime e maior quantidade de vírus excretado, além da redução de uma fase do processo (extração), fase essa que pode ser demorada, assim, mesmo tendo que fazer a desnaturação (fase que leva 6 minutos) da urina previamente, a utilização desse espécime biológico no diagnóstico diminuirá o tempo para a liberação do resultado. A desnaturação da urina é necessária, pois, a mesma possui compostos como ácido úrico, ureia, etc que podem interferir com a PCR (THEILER *et al.*, 2006; MUSSI-PINHATA *et al.*, 2009).

Segundo Mello *et al.*, 2008, a PCR é uma técnica que está sendo amplamente utilizada na detecção genômica de CMV possuindo sensibilidade superior a outras técnicas utilizadas (antigenemia e sorologia), pode fornecer resultados qualitativos e quantitativos apresentando vantagens como maior flexibilidade com os materiais em teste, permitindo

armazená-los a – 20 °C até o processamento e a possibilidade de repetir os testes em caso de resultados duvidosos devido a utilização de pequenos volumes do material biológico.

Dentre os resultados da PCR, observou-se que algumas amostras foram positivas na urina e negativa no sangue, isso pode acontecer devido ao fato de o paciente não estar desenvolvendo viremia restringindo assim o diagnóstico utilizando sangue (MUSSI-PINHATA *et al.*, 2009), além de pesquisas citarem que a punção venosa com utilização de anticoagulante, pode inibir a amplificação do DNA no sangue (KERMEKCHIV *et al.*, 2009).

Além das peculiaridades citadas, estudos mencionam que a técnica da PCR oferece rapidez e alta sensibilidade baseada na amplificação seletiva de sequências específicas de ácido nucleico e a capacidade de armazenamento e congelamento das amostras, quando comparada a sorologia (Elisa), onde se pode observar resultados falsos positivos em 50% dos resultados de infecção aguda, autores relatam que esse fato decorre do condicionamento de IgM residuais ou outra infecção recente especialmente reações cruzadas com alguns vírus da família *Herpesviridae*, mas os falsos negativos também são de grande importância, pois, os pacientes podem estar infectados com CMV, mas, como o resultado falso negativo não recebem terapia específica (ZANCONETA *et al.*, 2006; THIO E LOCARNINI, 2007; MARTINY *et al.*, 2011; VRIES *et al.*, 2012).

Os resultados observados na presente pesquisa relatam que dos 520 pacientes analisados, apenas 1 (0.2%) apresentou IgG e IgM sérico anti-CMV.

Um trabalho feito por Schlesinger *et al.*, 2003, demonstra que de 2000 RN, 40 foram positivos para PCR na urina. Quatorze deles apresentaram infecção congênita e desses dois foram IgM reagente.

Um resultado negativo para IgG indica que a imunidade não foi adquirida, mas não exclui uma infecção aguda, a menos que o teste de IgM também tenha dado negativo. Normalmente o teste de IgG geralmente dá negativo durante os primeiros 20 dias após a infecção. A positividade para IgM indica infecção recente (até 8 meses antes do teste), reativação do vírus latente ou reinfeção (infecção secundária) (Oliveira *et al.*, 2002). Este mesmo autor relata um resultado onde de 86 RN, 83 (96,5%) apresentaram anticorpos IgG anti-CMV, somente 2 (2,3%) apresentaram IgG e IgM, os quais negativaram 3 meses após o nascimento.

Apenas 30 a 80% das crianças sabidamente infectadas intra-utero apresentarão anticorpos IgM anti-CMV ao nascimento. Os anticorpos IgG anti-CMV são geralmente

adquiridos da mãe e a sorologia seriada para a avaliação dos títulos não permite diferenciar a infecção congênita da perinatal (JUNQUEIRA *et al.*, 2008).

A infecção primária ocorre em 1 a 4% das mulheres gestantes soronegativas e levam à infecção do feto em 40 a 50% destas gestações. A reativação do CMV materno ou reinfecção com uma linhagem diferente leva a infecção fetal em cerca de 1% das mulheres gestantes soropositivas. Portanto, a infecção primária é muito mais danosa ao feto que a sua reativação. O fato se explica porque, na infecção primária, a transmissão vertical ocasiona-se no auge da viremia, momento em que está começando a produção de anticorpos e células imunitárias. Nas reativações, a transmissão vertical ocorreria na presença de anticorpos e células imunitárias, o que atenuaria o efeito deletério do vírus no concepto (ZANCONETA *et al.*, 2005; JUNQUEIRA *et al.*, 2008).

As manifestações clínicas são quase exclusivas de recém-nascidos de mães com infecção primária (JUNQUEIRA *et al.*, 2008).

Cerca de 30% das crianças sintomáticas ao nascimento poderão evoluir para óbito, as que sobreviverem poderá apresentar sequelas neurológicas. Das crianças assintomáticas, 10 a 15% terão alterações tardias (SCIARRONE, *et al.*, 2005).

Na presente pesquisa observamos que a maioria dos infectados, ou seja, dos 13 pacientes positivos para CMV, 10 (77%) apresentaram sintomas compatíveis com infecção para CMV, acreditamos que essa inversão de resultados pode ser devido ao local de execução do estudo, que no caso, foi o setor de neonatologia onde estão internados pacientes em estado crítico.

Estudos relatam a associação da prematuridade com a infecção congênita por CMV, assim como, um índice de até 30% de mortalidade em pacientes sintomáticos, pelo fato desta infecção estar intimamente ligada ao estado imunológico do paciente. Neste caso, os resultados observados na presente pesquisa corroboram com a literatura (MIURA *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2010).

A presente pesquisa relata que 70% dos recém-nascidos positivos apresentaram icterícia. Em estudo feito por Passos *et al.*, (1996) dos 10 pacientes estudados, 9 deles (90%) apresentaram icterícia.

A icterícia colestática pode ser definida como uma redução no fluxo normal da bile. Pode ser diagnosticada no neonato, em especial no prematuro, devido a vários fatores, dentre eles, a infecção por citomegalovírus, que podem desencadear diversas alterações hepáticas, apresentando alterações laboratoriais como: o aumento sérico dos sais biliares, do colesterol e

da bilirrubina direta, que se estiver maior que 2,0 mg/dL ou se a bilirrubina total for maior que 20 % da bilirrubina total, sempre indicará alterações patológicas. Estudos relatam também altos índices de hepatites ocasionadas por CMV, em torno de 7 a 17% (OLIVEIRA *et al.*, 2002; SEEHOFER *et al.*, 2002; SHIBATA *et al.*, 2005; LEGENDRE & PASCUAL, 2008).

A hiperbilirrubinemia ocasionada por CMV pode ser transitória e a lesão hepática na citomegalovirose congênita costuma ser benigna, porém alguns casos isso pode se agravar apresentando quadros de doença hepática crônica (YAMAMOTO, *et al.*, 1994).

Além da icterícia os resultados revelaram 50% dos pacientes positivos para CMV com insuficiência respiratória. Estudos revelam que isso pode ser devido à doença parenquimatosa severa pela pneumonite que o citomegalovírus pode ocasionar, lembrando que se trata de prematuros, ambas as origens ao final culminam com insuficiência respiratória e morte. Esse fato também pode predispor ou agravar o curso de infecções bacterianas (MARGOTTO, 2005; PAIVA & AMARAL, 2009).

Um estudo feito por Yamamoto *et al.*, 1994, relatam que analisando 25 crianças positivas para CMV, uma delas apresentou diagnóstico inicial de pneumonite intersticial onde na radiografia de tórax podia-se observar velamento intersticial com atelectasia no pulmão direito.

Herdy *et al.*, 2008 cita que de 23 crianças selecionadas com pneumonite intersticial, 9 tinham infecção por CMV, constatada no lavado brônquico por PCR e 4 mostraram positividade na urina. Entre os nove infectados por CMV, 7 foram evidenciados à sorologia com IgM e IgG presentes para CMV.

Quanto a exames laboratoriais, chama atenção os resultados do leucograma, com linfocitose (> 50%), trombocitopenia (< 140.000/ μ L). Estudos citam que quadros constituídos por petéquias associadas à trombocitopenia transitórias podem ser observados em pacientes neonatos infectados por citomegalovírus e que os quadros de linfocitose, são características típicas de doenças virais (RAJU & ARORA, 2004; ROBERTS & MURRAY, 2003; BUSSEL & VISNER, 2009; ZHANG *et al.*, 2010).

A presente pesquisa citou um óbito entre os 13 positivos, um índice compatível aos trabalhos citados na literatura. Os neonatos geralmente evoluem para óbito no período neonatal em decorrência dos graves quadros que a infecção pode desenvolver. Estudos

relatam que 30% dos sintomáticos podem evoluir para óbito (SHIBATA *et al.*, 2005; THIO & LOCARNINI, 2007; SYRIDOU *et al.*, 2008; ZALEI *et al.*, 2008).

A excreção dos CMV através do cervix uterino em mães soropositivas parece aumentar com o decorrer da gestação, ocorrendo em 0 a 2% das gestantes no primeiro trimestre, 6 a 10% no segundo trimestre e 11 a 28% no terceiro trimestre. Relaciona-se o aumento da excreção viral à depressão da imunidade celular que ocorre principalmente no segundo e no terceiro trimestre da gestação, resultando na reativação viral e no aumento de sua excreção (STAGNO, 1975; OLIVEIRA, 2002-b; STAGNO, 2009).

Segundo MACHADO *et al.*, (1991), a infecção congênita pelo CMV pode depender do tipo de parto. Parto, tipo cesáreo teoricamente excluiria o contato com secreção cervical, dificultando a infecção neste período, porém, os resultados obtidos demonstram que mesmo o paciente nascido por parto cesáreo pode apresentar infecção pelo CMV. Sugere-se que a infecção possa ter ocorrido por via transplacentária, já que os anticorpos da mãe não protegem o feto (OLIVEIRA, 2002-a; YAMAMOTO *et al.*, 2010).

Estudos afirmam, sem maiores explicações, que em se tratando de infecção causada por CMV pessoas com o tipo sanguíneo A, independente do fator Rh, estão mais susceptíveis, entretanto, o presente estudo obteve maiores resultados positivos para CMV em neonatos com o tipo sanguíneo O⁺, ou seja, dos treze positivos para CMV, 9 (69%) tinham sangue tipo O⁺, talvez pela miscigenação do país de estudo (NOVARETTI *et al.*, 2000). Além do tipo sanguíneo esses estudos mostram que pessoas do sexo feminino e da raça branca são mais susceptíveis a infecção pelo CMV que o sexo masculino e raça negra (LUBY. & SHASBY, 1972; MATHUR *et al.*, 1981). Em relação a essas últimas informações, o estudo realizado demonstrou que dos treze positivos para CMV, 8 (61,53%) eram do sexo feminino, prevalecendo a raça branca nos treze positivos para CMV.

Um trabalho feito por Santos *et al.*, 2000, analisou urina de 292 recém-nascidos, destes 20 (6,8%) foram positivos para DNA-CMV, porém o autor cita que não observou a associação da infecção com o sexo dos pacientes.

Outro trabalho realizado por Manchon *et al.*, 2001, cita que a predisposição à infecção por CMV em pacientes do sexo feminino, possa decorrer das alterações hormonais, este fato deprime a resposta imune celular favorecendo a infecção primária bem como a reativação viral.

Acreditamos que maiores estudos devam ser instituídos nesta área para que se possam ter resultados mais confiáveis e seguros.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ A frequência de pacientes com infecção congênita por CMV observada no presente estudo foi de 2,3%.
- ✓ Dentre os pacientes analisados houve uma inversão nos índices de pacientes com sintomas, prevalecendo um número maior de pacientes sintomáticos dentre os positivos.
- ✓ Os achados clínicos apontaram a prematuridade e a icterícia como maioria dentre os aspectos clínicos mais frequentemente encontrados.
- ✓ Em relação aos demais aspectos, acredita-se que mais estudos devam ser instituídos para poder relatar com maior segurança a relação entre tipo de parto, tipo sanguíneo, sexo, raça e a infecção pelo CMV.
- ✓ O teste de biologia molecular utilizando urina na identificação de CMV, mostrou-se mais prático, viável, econômico, seguro do que a sorologia e o teste de biologia molecular feito a partir de amostras de sangue, mostrando-se importante ferramenta no diagnóstico de infecção neonatal.

RECURSOS FINANCEIROS

- a) O suporte financeiro do projeto foi realizado através da Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNDECT) (Edital Fundect/MS/CNPq/SES N ° 07/2009 Saúde) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Edital MCT/CNPq nº 70/2008 - Doutorado).

- b) Adicionalmente, foi feita parceria com a Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) no período de janeiro a julho de 2011 e com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em fevereiro de 2011, que disponibilizaram seus respectivos laboratórios de Biologia Molecular para a realização do projeto.

- c) Bolsa CAPES – 2009 a 2013.

REFERÊNCIAS

AGAMANOLIS, D. P. Viral Diseases Of The Nervous System-General Principles. In: _____ . **Neuropathology**. Rio de Janeiro: Akron; 2011. cap. 5.

AZEVEDO, P. F.; SOUZA, A. S. R.; NORONHA NETO, C.; LIMA, M. M. S.; CARDOSO, A. S.; PORTO, A. M. F. Citomegalovirose congênita: relato de caso. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** 2005, v. 27, n. 12, p. 750-8, 2005.

BOPPANA, S.B.; RIVERA, L. B.; FOWLER, K.B.; MACH, M.; BRITT, W. J. Intrauterine Transmission of Cytomegalovirus to Infants of Women with Preconceptional Immunity. **N Engl J Med**, v. 344, p. 1366-1371, 2001.

BUSSEL, J.; VISNER, M.S. Current approaches to the evaluation and management of the fetus and neonate with immune thrombocytopenia. **Sem Perinatol**, v. 33, n. 1, p. 35-42, 2009.

CABRAL, C.H.K. Determinação de haplótipos do gene beta S em pacientes com anemia falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32, n. 6, p. 491-92, 2010.

CALDÉS, A.; GIL-VERNET, S.; ARMENDARIZ, Y.; COLOM, H.; POU, L.; NIUBÓ, J. *et al.* Sequential treatment of cytomegalovirus infection or disease with a short course of intravenous ganciclovir followed by oral valganciclovir: efficacy, safety, and pharmacokinetics. **Transpl Infect Dis**, v. 12, n. 3, p. 204-12, 2010.

DEMMLER-HARRISON, G.J. Cytomegalovirus. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler-Harrison GJ, Kaplan SL. Feigin & Cherry's **Textbook of Pediatric Infectious Diseases**. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009. p. 138-46.

ENGMAN, M.L.; MALM, G.; ENGSTROM, L.; PETERSSON, K.; KARLTORP, E.; TEAR FAHNEHJELM, K. *et al.* Congenital CMV infection: Prevalence in newborns and the impact on hearing deficit. **Scand Infect Dis**, v. 40, n. 11, p. 935-42, 2008.

FIGUEIRÓ-FILHO, E.A.; LOPES, A.H.A.; SENEFONTE, F.R.A.; SOUZA JÚNIOR, V.G.; BOTELHO, C.A.; FIGUEIREDO, M.S. *et al.* Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da Região Centro-Oeste do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 27, n. 8, p. 442-9, 2005.

FIGUEIRÓ-FILHO, E.A.; SENEFONTE, R.F.A.; LOPES, A.H.A.; MORAIS, O.O.; SOUZA JUNIOR, V.G.; MAIA, T.L. *et al.* Frequência das infecções pelo HIV-1, rubéola, sífilis, toxoplasmose, citomegalovírus, herpes simples, hepatite B, hepatite C, doença de Chagas e HTLV I/II em gestantes, do Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop.** [online], v. 40, n. 2, p. 181-7, 2007.

GRAÇA, A.; SILVÉRIO, C.; FERREIRA, J.P.; BRITO, A.; ALMEIDA, S.; PAIXÃO, P. *et al.* Congenital neonatal cytomegalovirus infection? **Acta Méd Port**, v. 17, p. 335-340, 2004.

GRANATO, C. A problemática da infecção pelo citomegalovirus em pacientes imunodeprimidos. **Rev Bras de Hematol Hemoter**, v. 23, n. 3, p. 543-544, 2001.

HARRIS, S.; AHLFORS, K.; IVARSSON, S.; LERNMARK, B., SVANBERG, L. Congenital cytomegalovirus infection and sensorineural hearing loss. **Ear Hear**, v. 5, p. 352-5, 1994.

HERDY, V.G.; SIAS, S. M.; ESTEVES, J.; LOPES, V. G.; LEITE, J. P.; FERREIRA, M. . Infecção por citomegalovírus em crianças com infiltrado pulmonar difuso crônico. **Pediatrics** (São Paulo), v. 29, p. 257-262, 2008.

JUNQUEIRA, J.J.M.; SANCHO, T.M.; SANTOS, V.A. Citomegalovírus: Revisão dos Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Diagnósticos e de Tratamento. **NewsLab**, v. 86, p. 88-104, 2008.

KENNESON, M.J. Cannon. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. **Rev Med Virol**, v. 17, p. 253-276, 2007.

KERMEKCHIEV, M.B.; KIRILOVA, L.I.; VAIL, E.E.; BARNES, W.M. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n.5, p. 2-14, 2009.

KIMBERLIN, D.W.; LIN, C.Y.; SÁNCHEZ, P.J.; DEMMLER, G.J.; DANKNER, W.; SHELTON, M. *et al.* Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. **J Pediatr**, v. 143, n. 1, p. 16-25, 2003.

KOPELMAN, B. I. **Infecção congênita e neonatal pelo citomegalovirus.** In: KOPELMAN, B. I.; SANTOS, A. M. N.; GOULART, A. L.; ALMEIDA, M. F. B.; MIYOSHI, M. H. GUINSBURG, R. *Diagnóstico e Tratamento em Neonatologia.* 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. v. 1. p. 445 a 450.

LEGENDRE, C.; PASCUAL, M. Improving outcomes for solid-organ transplant recipients at risk from cytomegalovirus infection: late-onset disease and indirect consequences. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 5, p. 732-40, 2008.

LIMA, A.J. **Pediatria Essencial.** São Paulo: Atheneu; 1999. p. 950.

LINARI, M.; LAZZAROTTO, T.; VENTURI, V.; PAPA, I.; GABRIELLI, L.; GUERRA, B. *et al.* Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. **Pediatrics**, v. 11, n. 1, p. 76-83, 2005.

LUBY, J.P.; SHASBY, D.M. Sex difference in the prevalence of antibodies to Cytomegalovirus. **JAMA**, v. 222, n. 10, p. 1290-91, 1972.

MACHADO, C.M.; FINK, M.C.D.S.; VILAS BOAS, L.S.; SUMITA, L.M.; WEINBERG, A.; SHIGUEMATSU, K.; SOUZA, L.C. *et al.* Infecção perinatal pelo citomagalovírus em Hospital Público do Município de São Paulo: estudo prospectivo. **Rev Inst Trop S Paulo**, v. 33, n. 2, p. 159-166, 1991.

MADDEN, S.; WILEY, S.; SCHLEISS, M.; BENTON, C.; MEINZEN-DERR, J. *et al.* Audiometric, clinical and educational outcomes in a pediatric symptomatic congenital cytomegalovirus (CMV) population with sensorineural hearing loss. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 69, p. 1191-1198, 2005.

MANCHÓN, F. O.; MORENO, J. C. S.; LÓPEZ, R. C.; FERNÁNDEZ, R. R.; REGA P. L.; DEL AMO, I. P. Seroepidemiología frente a citomegalovirus en la comunidad de Madrid. **Rev. Esp. Salud Pública**, v.75 n.1, p. 55-62, 2001.

MARGOTTO, P.R. Incidence and clinical manifestations of breast milk-cytomegalovirus infection in low birth weight in newborns. **J Perinatol**, v. 25, p. 299-303, 2005.

MARIN, L.J.; MARIN, L.J.; CUNHA, A.A.; AQUINO, V.H.; FIGUEIREDO, L.T.M. Desenvolvimento de uma metodologia de PCR semiquantitativa utilizando plasmídeo clonado com parte do gene Gb de citomegalovírus. **Medicina**, v. 35, p. 85-94, 2002.

MARTINY, P.B.; PARIS, F.; MACHADO, A.B.M.P.; MELLO, R.O.; SENGER, M.B.; CORRÊA, M.C.M. *et al.* Comparison of the performance of polymerase chain reaction and pp65 antigenemia for the detection of human cytomegalovirus in immunosuppressed patients. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop [online]**, v. 44, n. 3, p.286-289, 2011.

MATHUR, A.; JINDAL, I.; CHATURVEDI, U.C. A serological study of Cytomegalovirus infection at Lucknow. **Indian J med Res**, v. 73, p. 678, 1981.

MEDEIROS, R.L.F.; LEMOS, J.A.R.; ASSIS, M.F.L.; JESUS, I.M.; SANTOS, E. Detecção do citomegalovírus humano em doadores de sangue através de PCR em tempo real. **Cad. Saúde colet**, v. 15, n. 3, p. 393-400, 2007.

MELLO, R.O.; MACHADO, A.B.P.; SENGER, M.B.; CORRÊA, M.C.M.; JÚNIOR, L.C.; TURRA, G. *et al.* Comparison between qualitative polymerase chain reaction and PP65 antigenia for the diagnosis of cytomegalovirus infection in immunosuppressed patients. **Rev HCPA**, v. 28, n. 1 p. 16-20, 2008.

MIURA, C.S.; MIURA, E.; MOMBACH, A.B.; CHESKY, M. The prevalence of congenital cytomegalovirus infection in newborn infants at an intensive care unit in a public hospital. **J Pediatr**, v. 82, p. 46-50, 2006.

MORTON, C.C.; NANCE, W.E. Newborn hearing screening—a silent revolution. **N Engl J Med**, v. 354, p. 2151-64, 2006.

MORZARIA, S.; WESTERBERG, B.D.; KOZAK, F.K. Systematic review of the etiology of bilateral sensorineural hearing loss in children. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 68, n. 9, p. 1193-98, 2004.

MUSSI-PINHATA, M.M.; YAMAMOTO, A.Y.; MOURA, B.R.M.; LIMA, I.M.; CARVALHO, O.P.F.; BOPANA, S. *et al.* Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. **Clin Infect Dis**, v. 15, n. 4, p. 522-28, 2009.

NEIL, K.; KANESHIRO, M.H.A. **Congenital cytomegalovirus Medline Plus Clinical**, [online]. 2011 [acesso em 03 set 2012]. Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/001343.htm>

NOVARETTI, M.C.Z.; DORLHIAC-LLACER, P.E.; CHAMONE, D.A.F. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucásicos e negróides na cidade de São Paulo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter** [online], v. 22, n. 1, p. 23-32, 2000.

OGAWA, H.; SUZUTANI, T.; BABA, Y.; KOYANO, S.; NOZAWA, N.; ISHIBASHI, K. *et al.* Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. **J Infect Dis**, v. 195, n. 6, p. 782-788, 2007.

OHLMS, L.A.; AMY, Y.; CHEN, A.Y.; STEWART, M.G.; FRANKLIN, D.J. Establishing the etiology of childhood hearing loss. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 120, p. 159-63, 1999.

OLIVEIRA, A.M.; LEITE, A.D.; SILVA, V.E.A.; ZAGO, S.C.S.; CARNEIRO, L.E.P.; MOLITERNO, R.A. Pesquisa de anticorpos IgG e IgM para citomegalovírus em parturientes e recém-natos do município de Presidente Prudente e região, Estado de São Paulo. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 3, p. 737-41, 2002.

OLIVEIRA, N.L.G.; KANAWATY, F.R.; COSTA, S.C.B.; HESSEL, G. Infection by cytomegalovirus in patients with neonatal cholestasis. **Arq. Gastroenterol** [online], v. 39, n. 2, p. 132-136, 2002.

ORNOY, A.; DIAV-CITRIN, O. Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. **Reprod Toxicol**, v. 21, p. 399-409, 2006.

OZKAN, T.B.; MISTIK, R.; DIKICI, B.; NAZLIOGLU, H.O. Antiviral therapy in neonatal cholestatic cytomegalovirus hepatitis. **BMC Gastroenterol**, v. 7, p. 7-9, 2007.

PAIVA, M.A.S.S.; AMARAL, S.M.M. Chronic interstitial lung diseases in children. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 8, p. 792-803, 2009.

PAIXÃO, P.; ALMEIDA, S.; GOUVEIA, P.; BINDA, S.; CAROPPO, S.; BARBI, M. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in urine pools. **J Virol Methods**, v. 128, p.1-5, 2005.

PANNUTI, C.S. Citomegalovirose. In: Foccacia R. **Tratado de Infectologia**. 4^a ed. rev. E atual. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 363 – 371.

PASS, R.F. Congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. **Herpes**, v. 12, p. 50-55, 2005.

PASSOS, A.O.; FERNANDES, M.I.M.; GALVÃO, L.C.; ZUCOLOTO, S.; SAWAMURA, R.; GOLDANI, H.A.S. Colestase neonatal e infecção por citomegalovírus: formas de apresentação clínica e histopatológica. **J. pediatr**, v. 72, n. 3, p. 159-163, 1996.

PECKHAM, C.S.; CHIN, K.S.; COLEMAN, J.C.; HENDERSON, K.; HURLE, Y. R.; PREECE, P.M. Cytomegalovirus infection in pregnancy: preliminary findings from a prospective study. **Lancet**, v. 1, p. 1352-1355, 1983.

PECKHAM, C.S.; STARK, O.; DUDGEON, J.A.; MARTIN, J.A.; HAWKINS, G. Congenital cytomegalovirus infection: a cause of sensorineural hearing loss. **Arch Dis Child**, v. 62, p. 1233-1237, 1987.

PORTO, A. G. M. **Infecções Sexualmente Transmissíveis na Gravidez**. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 116.

RAJU, C.; ARORA, L. Neonatal Immune Thrombocytopenia. **MJAFI**, v. 60, p. 333-336, 2004.

ROBERTS, I.; MURRAY, N. A. Neonatal thrombocytopenia: causes and management. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**, v. 88, p. 88-359, 2003.

ROSENTHAL, P. Neonatal Hepatitis and Congenital Infections. In: **Suchy F. Liver Disease in Children**. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2001. p. 239-252.

ROSS, S.A.; FOWLER, K.B.; ASHRITH, G.; STAGNO, S.; BRITT, W.J.; PASS, R.F. *et al.* Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. **J Pediatr**, v. 148, p. 332-336, 2006.

SANTOS, D.V.V.; SOUZA, M.M.R.; GONÇALVES, S.H.L.; COTTA, A.C.S.; MELO, L.A.O.; ANDRADE, G.M.Q. *et al.* Congenital cytomegalovirus infection in a neonatal intensive care unit in Brazil evaluated by PCR and association with perinatal aspects. **Rev Inst Med trop S Paulo**, v. 42, n. 3, p. 129-132, 2000.

SCHLEISS, M.R.. Congenital Cytomegalovirus Infection: Update on Management Strategies. **Curr Treat Options Neurol**, v. 10, n. 3, p. 186-192, 2008.

SCHROEDER, L.; PETROU, S.; KENNEDY, C.; MCCANN, D.; LAW, C.; WATKIN, P.M. *et al.* The economic costs of congenital bilateral permanent childhood hearing impairment. **Pediatrics**, v. 117, p.1101-1112, 2006.

SCIARRONE, A.; MASTURZO, B.; BOTTA, G.; BASTONERO, S.; CAMPO-GRANDE, M.; VIORA, E. First-trimester fetal hearth block and increased nuchal translucency: an indication for early fetal echocardiography. **Prenat. Diagn.**, v. 25, n. 12 p. 1129-32, 2005.

SEEHOFER, D.; RAYES, N.; TULLIUS, S.G.; SCHMIDT, C.A.; NEUMANN, U.P.; RADKE, C. *et al.* CMV hepatitis after liver transplantation: incidence, clinical course, and long-term follow-up. **Liver Transpl.** v. 8, n. 12, p. 1138-46, 2002.

SHIBATA, M.; TAKANO, H.; HIRONAKA, T.; HIRAI, K. Detection of human cytomegalovirus DNA in dried newborn blood filter paper. **J. Virol. Methods**, v. 46, p. 279-85, 1994.

SHIBATA, Y.; KITAJIMA, N.; KAWADA, J.; SUGAYA, N.; NISHIKAWA, K.; MORISHIMA, T. *et al.* Association of cytomegalovirus with infantile hepatitis. **Microbiol Immunol**, v. 49, n. 8, p. 771-7, 2005.

STAGNO, S. Cervical cytomegalovirus excretion in pregnant and no pregnant women: suppression in early gestation. **J Infect Dis**, v. 131, p. 522-27, 1975.

STAGNO, S. **Citomegalovirus**. In: KLIEGMAN.N. R. M. *et al.* Tratado de Pediatria. 18.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. p.1381 – 1383.

STEHEL, E.K.; SHOUP, A.G.; OWEN, K.E.; JACKSON, G.L.; SENDELBACH, D.M.; BONEY, L. F. *et al.* Newborn hearing screening and detection of congenital cytomegalovirus infection. **Pediatrics**, v. 121, n. 5, p. 970-75, 2008.

SYRIDOU, G.; SPANAKIS, N.; KONSTANTINIDOU, A.; PIPERAKI, E.T.; KAFETZIS, D.; PATSOURIS, E. *et al.* Detection of cytomegalovirus, parvovirus B19 and herpes simplex viruses in cases of intrauterine fetal death: association with pathological findings. **Med Virol**, v. 80, n. 10, p. 1776-82, 2008.

TERRA, A.P.S.; SILVA-VERGARA, M.L.; GOMES, R.A.S.; PEREIRA, C.L.L.; SIMPSON, A.J.G.; CABALLERO, O. L. Monitoring AIDS patients for the development of cytomegalovirus (CMV) disease using multiplex PCR. **Rev Soc Bras de Med Tropical**, v. 33, n. 6, p. 583-9, 2000.

THEILER, R.N.; CALIENDO, A.M.; PARGMAN, S.; RAYNOR, B.D.; BERGA, S.; MCPHEETERS, M. Umbilical cord blood screening for cytomegalovirus DNA by quantitative PCR. **J Clin Virol**, v. 37, n. 4, p. 313-6, 2006.

THIO, C.L.; LOCARNINI, S. Treatment of HIV/HBV coinfection: clinical and virologic issues. **AIDS. Rev**, v. 9, p. 40 -53, 2007.

TURCHI, M.D.; PANNUTI, C.S.; SUMITA, L.M.; VILAS BOAS, L.S.; WEINBERG, A.; STAVALE, J.N. *et al.* Infecção pelo citomagalovírus em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS): relações clínico-viológicas e anatomopatológicas. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v. 33, n. 4, p. 243-50, 1991.

VAZ, F. A.C.; DINIZ, E.M.A. Hidropisia fetal em recém-nascido com citomegalia congênita. **Rev Assoc Méd Bras**, v. 48, n. 4, p. 275-96, 2002.

VRIES, J.J.; VESSEUR, A.; ROTTEVEEL, L.J.; KORVER, A.M.; RUSMAN, L.G.; WESSELS, E. *et al.* Cytomegalovirus DNA detection in dried blood spots and perilymphatic fluids from pediatric and adult cochlear implant recipients with prelingual deafness. **J Clin Virol**. No prelo. 2012.

WEIRICH, J. Congenital cytomegalovirus infection : a study carried out in the “Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, Brasil”. **Rev Soc Bras de Med Tropical**, v. 31, n. 3, p. 325-6, 1998.

YAMAMOTO, A.Y.; AQUINO, V.H.; FIGUEIREDO, L.T.; MUSSI-PINHATA, M.M. Diagnosis of congenital and perinatal cytomegalovirus infection by using the polymerase chain reaction. **Rev Soc Bras de Med Tropical**, v. 31, v. 1, p. 19-26, 1998.

YAMAMOTO, A. Y.; MUSSI-PINHATA; FIGUEIREDO, L. T. M. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections: clinical aspects, epidemiology, diagnosis and treatment. **Medicina**, v. 32, p. 49-56, 1999.

YAMAMOTO, A.Y.; MUSSI-PINHATA, M.M.; PINTO, P.C.; FIGUEIREDO, L.T.; JORGE, S.M. Usefulness of blood and urine samples collected on filter paper in detecting cytomegalovirus by the polymerase chain reaction technique. **J Vir Met**, v. 97, p. 159-64, 2001.

YAMAMOTO, A.Y.; MUSSI-PINHATA, M.M.; MARIN, L.J.; WAGATSUMA, V. M.; DUARTE, G.; FIGUEIREDO, L.T.M. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Brazilian mothers and their congenitally infected infants. **J Med Virol**. v. 79, p. 1164-68, 2007.

YAMAMOTO, A.Y.; MUSSI-PINHATA, M.M.; BOPPANA, S.B.; NOVAK, Z.; WAGATSUMA, V.M.; OLIVEIRA, P.F. *et al.* Human cytomegalovirus reinfection is associated with intrauterine transmission in a highly cytomegalovirus-immune maternal population. **Am J Obstet Gynecol**, v. 202, n. 3, p. 297-8, 2010.

YOUSFI, M.M.; DOUGLAS, D.D. Other Hepatitis Viruses. In: Zakim, Boyer, editor. **Hepatology**. 4. Philadelphia: Saunders; 2003. pp. 1063–1072.

ZALEL, Y.; GILBOA, Y.; BERKENSHTAT, M.; YOELI, R.; AUSLANDER, R.; ACHIRON, R. *et al.* Secondary cytomegalovirus infection can cause severe fetal sequelae despite maternal preconceptional immunity. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v. 31, n. 4, p. 417-20, 2008.

ZANCONETA, A.M.; DE LEU, P.R.; MARTIN, G.C.; PEIXOTO, G.P.; GARRIDO, A.G.; COSTA, M. A. *et al.* Cytomegalovirus infection pregnancy: to screen or not to screen? **Brasília méd**, v. 43, n. 1/4, p. 69-74, 2006.

ZHANG, S.; ZHOU, Y.H.; LI, L.; HU, Y. Monitoring human cytomegalovirus infection with nested PCR: comparison of positive rates in plasma and leukocytes and with quantitative PCR. **Virology Journal**, 2010; v. 7, p. 73, 2010.

ANEXOS

ANEXO - I**FÓRMULAS DE SOLUÇÕES****1) SDS 10%**

SDS (Sódio Dodecyl Sulfate)----- 10g
 H₂O MILLI-Q ----- 100 mL
 Conservar em temperatura ambiente e vidro âmbar.

2) EDTA 500 MM usa 0,5M

(aquecer para dissolver em banho-maria)

Na₂EDTA-----186,1g
 H₂O MILLI-Q----- 800 mL
 NaOH (pastilha)----- 20g
 H₂O MILLI-Q----- 1000 mL
 Conservar em temperatura ambiente e garrafa branca. PH = 8,0

3) TAMPÃO TE

TRISBASE (TRIZMA-BASE)----- 0,121g
 EDTA 500 MM----- 0,2 mL
 H₂O MILLI-Q----- 100 mL
 Autoclavar e conservar temperatura ambiente em vidro âmbar, pH = 7,5.

4) TAMPÃO TBE

TRISBASE----- 54g
 AC. BÓRICO----- 27,5g
 EDTA (0,5M) ----- 20 mL
 H₂O MILLI-Q----- 500 mL
 Autoclavar e conservar em geladeira e vidro âmbar.

5) TAMPÃO TAE 10x

TRISBASE----- 48,4g
 AC. ACÉTICO GLACIAL----- 11,42g
 EDTA (0,5M) ----- 20 mL
 H₂O MILLI-Q----- 1000 mL
 Autoclavar e conservar em geladeira e vidro âmbar.

6) GEL DE AGAROSE PARA CORRIDA DE DNA

5.1) CUBA PEQUENA

Agarose 1,2% ----- 0,6g
TBE 10X ----- 5 mL
H₂O destilada----- 50 mL
Obs. O gel é 1,2 % . A água destilada acrescentar para 50 mL

7) CORANTE

Solução azul bromofenol (Solução 1)

Sucrase ----- 40%
Azul de bromofenol----- 25%
q.s.p. H₂O destil. ----- 10mL

Glicerol ----- 50 %
Solução 1 ----- 0,25%
TBE 5X q.s.p. ----- 10 mL

ANEXO - II**GEL DE POLIACRILAMIDA**

1) Preparação da solução estoque de Acrilamida 30%:

Acrilamida..... 30%.
 Acrilamida..... 72,5 g
 Bis- Acrilamida..... 2,5 g
 água milli-Q (q.s.q.)..... 250 ml

Obs.: Dissolva os reagentes em metade do volume, então complete com água filtrada.

2) TBE 5X (pH 8.3)

Tris-base.....54g
 Ácido bórico.....27.5g
 EDTA 0.5 M pH 8.0.....20 mL
 H2O destilada (q.s.p.)..... 1000 mL

3) Preparação do Gel a 4% :

Reagentes	Quantidades
Solução estoque de acrilamida a 30%	4ml
TBE 5x	6ml
Perssulfato de Amônio a 10%	220µl
TEMED	20µl
H2O mili-Q (q.p.s.)	30ml

3.1. Preparar o Perssulfato de amônio a 10% em água Mili-Q e armazenar em alíquotas de 1000 microlitros a -20°C.

3.2. Tampão de corrida: TBE 1x

Medir 200 mL TBE 5x e acrescentar para 1000 mL de água mili-Q.

3.3. Tampão da amostra 5X (estoque): (isto é opcional; você pode usar tampão feito com azul de bronofenol e glicerol. Use 2µL para cada 10µL corridos.

reagentes	Quantidades
Azul de bromofenol (0,25%)	0,05g
Xilenocianol (0,25%)	0,05g
Ficoll 400 (25%)	12,5g Pre-dissolvido em 25ml de TBE 5X at 60°C
TBE 5X (q.p.s.)	50ml

Obs.:

TAMPÃO DE AMOSTRA 2X (uso)

- Tampão de amostra 5X (estoque) – 50 mL

- H₂O destilada – 60 mL

4. Método de coloração com nitrato de prata:

4.1. Fixar o gel por 5 min ou pode deixar de um dia para outro neste solução de fixação (#1):

reagentes	Quantidades
Etanol (10%)	10ml
Ácido acético glacial (0,5%)	0,5ml
H ₂ O mili-Q (q.p.s.)	100ml

4.2. Impregnar com prata por 4 min em solução de prata (#2):

reagentes	Quantidades
AgNO ₃ (0,2%)	0,2g
H ₂ O mili-Q (q.p.s.)	50ml

4.3. Enxague em água mili-Q (\pm 100ml), 3 a 5 min.

4.4. Mergulhe na solução de revelação (#3) (aproximadamente 5-10 min; após observar as bandas, interrompa o processo, lavando com água mili-Q.

Produto	Quantidade I	Quantidade II
NaOH (3,6%)	3g	6g
40% Formaldeído (final 0,3%)	0,3ml	0,6ml
H ₂ O mili-Q ou deionizada	100ml	200ml

Obs:

1. Dissolva NaOH em água primeiro, então adicione o formaldeído.
2. Mergulhe o gel e o mantenha sob agitação.

Reagentes	4% Gel (VF 30ml)	8% Gel (VF 30ml)	8% Gel (VF 50ml)	8% Gel (VF 60ml)
30% acrilamida	4 ml	8 ml	13,3 ml	16 ml
5x TBE	6 ml	6 ml	10 ml	12 ml
10% Persulfato de amônio	220µl	220µl	366µl	440µl
TEMED	20µl	20µl	33µl	40µl
Água milli-Q	19,76 ml	15,76 ml	26,3 ml	31,52 ml

ANEXO - III



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS



Carta de Aprovação

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1464 da Pesquisadora Paula Cristhina Niz Xavier intitulado "Infecção por citomegalovírus em pacientes internados em unidade de terapia intensiva neonatal em Campo Grande-MS, Brasil", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 25 de junho de 2009, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos

Coordenador em exercício do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 29 de junho de 2009.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

APÊNDICES

APENDICE - I

Banner de Agradecimento

Enfermeiras e técnicas de enfermagem,

Sua colaboração para a realização do Projeto CMV foi fundamental e de suma importância, não tem preço que pague. Por isso, só tenho a agradecer de coração e pedir que Deus as abençoe para que possam continuar sendo esses anjos da UTI que são.

Muitos, sem a sua dedicação e carinho não sobreviveriam, no entanto, estão fortes e saudáveis graças a Deus supremo e a vocês. MUITO OBRIGADA.

Paula - Projeto CMV (UFMS)

APÊNDICE - II**Identification of cytomegalovirus in blood and urine of newborns by a molecular biology method****Identificação de citomegalovírus em sangue e urina de recém-nascidos por método de biologia molecular.**

Paula Cristhina Niz Xavier ^{1*}; Patrícia Gonçalves Vieira ²; Theocir de Souza Arantes ²; Luciana Venhofen Martinelli Tavares³; Almir de Sousa Martins ⁴; Durval Batista Palhares ⁵.

¹Departamento de Pós-graduação da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

²Departamento de Farmácia da Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brasil.

³Departamento de Fisioterapia da Universidade Católica Dom Bosco e Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

⁴Departamento de Fisiologia e Biofísica-ICB/UFMG, Belo Horizonte, Brasil.

⁵Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

* *Corresponding Author*. Mailing Address: Rua Itacaja, 06 – casa 49 – Res. Guarany. CEP 79092-400. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, MS, Brazil.; Phone: +55-67-9283-6620. E-mail: paulaxavier80@yahoo.com.br

Resumo. *Introdução:* A identificação de CMV (citomegalovírus) em mostras de sangue e urina de recém-nascidos pode evitar graves sequelas. *Material e Métodos:* As amostras foram coletadas nos período de 2010 a 2012 e submetidas a PCR (Reação em cadeia da polimerase) e sorologia. *Resultados:* Foram estudados 520 recém-nascidos, destes, 13 (2.5%) foram

positivos para CMV na urina, 10 (2%) positivos no sangue, 1 (7.8%) apresentou IgG+ e IgM+ e 1 (7.7%) evoluiu para óbito. *Discussão:* A presença de DNA (ácido desoxirribonucleico) na urina demonstrou maior número de achados positivos para CMV do que no sangue e maior sensibilidade do que na sorologia.

Palavras-chaves: CMV, neonatal, PCR.

Abstract. Introduction: The identification of CMV (cytomegalovirus) in samples of blood and urine of newborns can prevent serious sequelae. *Methods:* Samples were collected in the period from 2010 to 2012 and subjected to PCR (polymerase chain reaction) and serology. *Results:* We studied 520 newborns, of these, 13 (2.5%) were positive for CMV in urine, 10 (2%) positive blood, 1 (7.8%) had IgG + and IgM + and 1 (7.7%) died within. *Discussion:* The presence of DNA (deoxyribonucleic acid) in the urine demonstrated a greater number of positive findings to CMV than in the blood and the greater sensitivity than serology.

Keywords: CMV, neonatal, PCR.

Cytomegalovirus is considered the main responsible for 0.5% to 2.5% of congenital infections, and 10% of these newborns may present with symptomatic infection with risk of 30% for mortality ¹. The use of rapid and reliable techniques is indispensable to choose the specific therapy and reduce sequelae.

In the period from 2010 to 2012, samples of blood and urine of newborns admitted to the unit of neonatology of five hospitals in Campo Grande - MS, Brazil, were collected and processed by nested PCR under the protocol of Martiny *et al.*, 2011 ², with modifications. The serology results and other data were obtained from medical records. PCR was developed in the laboratory of molecular biology at the Dom Bosco Catholic University. The research was approved by the Ethics Committee of the UFMS (Federal University of Mato Grosso do Sul) and statistical analyzes were performed using the EPI INFO 3.5.2. and WILCOXON test.

During the study period 520 newborns were analyzed as congenital infection to CMV; among these, 13 (2.5%) were positive in urine and 10 (2%) were positive in blood (Figures 1 and 2).

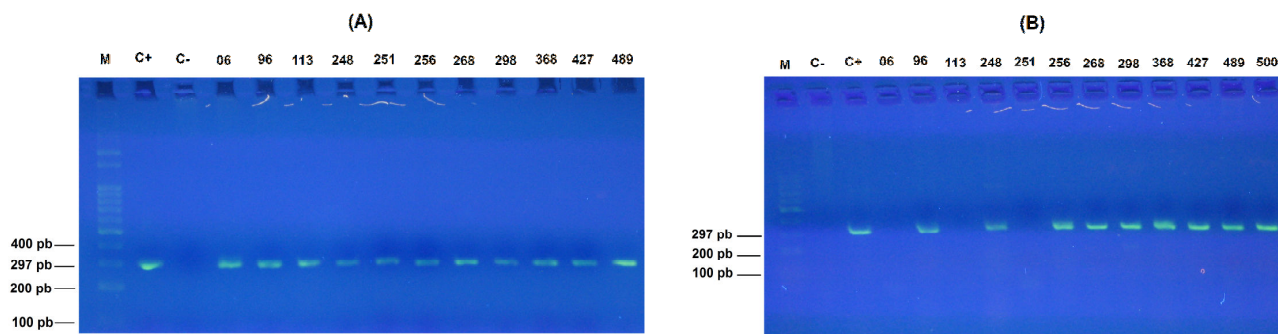


Figure 1. (A) Agarose gel of 1.8% stained with SYBR SAFE. Urine specimens positive para CMV. (B) Results of *nested* PCR of CMV in blood samples. Samples 06, 113 and 251 were negative for DNA CMV, the others were positive. M = molecular weight marker. (C+) = positive control (recognizably positive clinical sample); Negative control (C-) autoclaved ultrapure water.

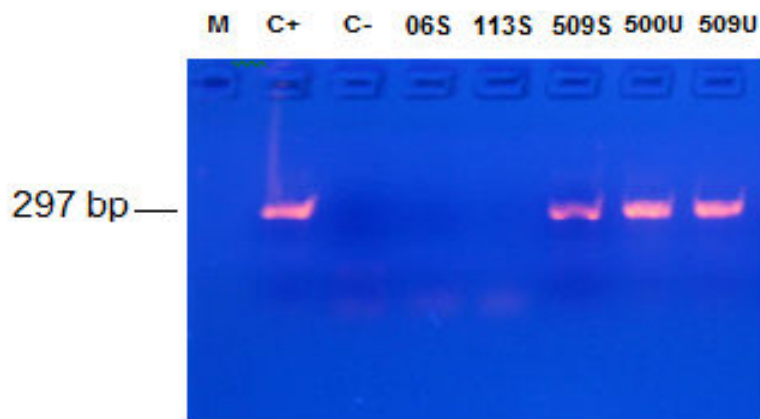


Figure 2. Agarose gel of 1.8% stained with RED GEL, samples 06S, 113S, 509S in blood and Samples 500U and 509U processed from urine, both confirmed positivity for CMV. Samples: 06s and 113s were negative excluding possibilities of contamination.

Concerning the thirteen RNs (newborn) positive for CMV, 3 (23%) was asymptomatic and the major clinical findings of symptomatic patients are shown in Table 1.

Table 1 – Clinical characteristics of cytomegalovirus - positive newborns .

Symptoms	number	%
preterm births *	10	(100.0)
Petechiae	2	(20.0)
Respiratory insufficiency	5	(50.0)
Microcephaly	1	(10.0)
lymphocytosis **	5	(50.0)
Eosinophilia ***	4	(30.8)
Thrombocytopenia ****	5	(50.0)
Transfusion	5	(50.0)
Hydrocephaly	1	(10.0)
Jaundice [¶]	7	(70.0)

Note: * (< 37 weeks); ** > 50%; *** > 4%; **** < 140.000/ μ L; [¶] (bilirrubina direta > 2 mg/dL).

Regarding serology, only 1 (0.2%) presented immunoglobulin IgG+ and IgM+. As for evolution, one (7.7%) ended in death. According to data contained in records, over 50% were female, 11 (84.5%) were Caucasian, and 9 (69.2%) were born by cesarean section. The mean birth weight was 1.782.5g and the mean gestational age was 33.5 weeks. As for the blood type, O + was the most frequently found (69.2%).

Congenital infection is featured when CMV is detected in the newborn's first three weeks of life ³, so it can be stated that thirteen newborns had congenital infection. Regarding the use of nested PCR, a higher sensitivity was seen from urine, in compliance with work ⁴. However venipuncture using anticoagulants may inhibit the PCR amplification ⁵. When PCR and serology are compared, it is known that the latter can provide false positive results in 50% ^{2,4}.

In this study, over 70% of infected newborns had symptoms compatible with CMV infection, but these symptoms are nonspecific of the intercurrent disease, other diseases may be present.

Studies have reported the association of pre-term birth with congenital CMV infection, and the results observed in this study corroborate the literature ⁶. When the studied variables are related, the cesarean section would theoretically exclude contact with the vaginal secretion, however the newborn may acquire the infection transplacentally, emphasizing that the mother's antibodies do not protect the fetus ⁷. Studies mentions, without explanation, that blood individuals type A, regardless of Rh factor, are more susceptible to CMV infection. The present study, however, showed contradictory results, perhaps because of the miscegenation of people of the country under study. It also showed that females and Caucasians are more susceptible to CMV infection, which is in accordance with other findings ^{8,9}.

We conclude that further studies must be developed so as to more safely report the relationship between type of birth, blood type, gender, race and CMV infection. Molecular biology tests using urine in identifying CMV demonstrated more positive findings than in blood, and higher sensitivity than in serology ($p=0.001$), becoming an important tool for the diagnosis of neonatal infection.

Acknowledgments: the authors are grateful to FUNDECT-MS and CAPES for financial support.

Reference

1. Matos SB, Meyer R, Lima FWM Cytomegalovirus: a review of pathogenesis, epidemiology and diagnosis of infection. *Rev Saúde Com* 2011; **7**(1):44-57.
2. Martiny PB, Paris F, Machado ABMP, Mello RO, Senger MB, Corrêa MCM et al. Comparison of the performance of polymerase chain reaction and pp65 antigenemia for the detection of human cytomegalovirus in immunosuppressed patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [online] 2011; **44**(3):286-289.
3. Paixão P, Almeida S, Gouveia P, Binda S, Caroppo S, Barbi M. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in urine pools. *J Virol Methods* 2005; **128**:1-5.
4. Vries JJC. Congenital cytomegalovirus infection : disease burden and screening tools : towards newborn screening. 2012, Doctoral thesis, Leiden University.
5. Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, Barnes WM. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Research* 2009; **37** (5):2-14.
6. Miura CS, Miura E, Mombach AB, Chesky M. The prevalence of congenital cytomegalovirus infection in newborn infants at an intensive care unit in a public hospital. *J Pediatr (Rio J)* 2006; **82**:46-50.
7. Machado CM, Fink MCDS, Vilas Boas LS, Sumita LM, Weinberg A, Shiguematsu K, et al. Infecção perinatal pelo citomagalovírus em Hospital Público do Município de São Paulo: estudo prospectivo. *Rev Inst Trop S Paulo* 1991; **33**(2):159-166.
8. Novaretti MCZ; Dorlhiac-Ilacer PE; Chamone DAF. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides na cidade de São Paulo. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* [online]. 2000; **22**(1):23-32.

9. Luby JP, Shasby DM. Sex difference in the prevalence of antibodies to Cytomegalovirus. *JAMA* 1972; **222**:1.290.

APÊNDICE - III

TERMO DE CONSENTIMENTO

Este documento registra o consentimento dos pais e/ou responsáveis legais dos recém-nascidos que serão estudados durante a realização da pesquisa para a tese de doutorado da farmacêutica Paula Cristhina Niz Xavier, intitulado: “**Infecção por Citomegalovirus em pacientes internados em unidade de terapia intensiva neonatal em Campo Grande – MS, Brasil.**”

Mãe, você esta sendo convidada a participar dessa pesquisa e eu gostaria muito que, antes de tomar sua decisão, que você lesse muito bem este escrito abaixo, caso você tenha alguma duvida o que leu, estarei a sua disposição.

Alguns bebês ao nascer podem estar infectados por um vírus chamado citomegalovírus, esta infecção congênita pode ser transmitida via transplacentária, durante o parto, pelo aleitamento materno ou ainda por transfusão sanguínea.

Alguns bebês desenvolvem a doença com presença de sintomas, mas a maioria não apresentam sintomas nenhum, podendo no futuro acarretar seqüelas como surdez, acometimento neurológico entre outros problemas, podendo até ser fatal.

Para tanto o propósito deste trabalho é fazer o exame através da urina para detectar se os bebês que estão internados na UTI neonatal estão infectados por este vírus, mesmo sem apresentar sintoma nenhum.

Esta investigação não terá risco nenhum para o bebê, porque usará a urina coletada com o coletor apropriado.

Não haverá ônus algum para o paciente e sua família. Os resultados serão repassados e o bebês que tiverem positivos serão devidamente tratados e encaminhados para fazer o teste da orelhinha.

Será de grande importância conhecer qual o índice de infecção que acomete os recém-nascido internados em UTIs neonatal para que se possa instituir um tratamento precoce evitando assim seqüelas futuras.

Os pais e/ou responsáveis tem o direito de não autorizar a participação do seu filho(a) na pesquisa.

As informações coletadas terão total confiabilidade e privacidade sendo garantida a preservação do anonimato dos participantes do estudo, quando da sua divulgação.

Eu _____ declaro que estou ciente dos termos aqui apresentados e autorizo a inclusão do meu filho(a) na pesquisa.

Campo Grande, ____ de _____ de 2010.

Obs. Este documento foi feito em duas vias de igual teor sendo uma via do sujeito de pesquisa e outro para o pesquisador. O sujeito da pesquisa poderá ter acesso ao Comitê de Ética em Pesquisa (Fone: 3312-3614), no momento em que desejar. Pesquisadora: Paula Cristhina Niz Xavier – Telefone para contato: 9283-6620.

APÊNDICE - IV



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Resultado de Exame

Paciente: RN de

Data: / /

Material: URINA

Exame/Método: Detecção de Citomegalovírus através de PCR *nested*

Resultado:

Paula Cristina Niz Xavier
Farmacêutica Responsável (CRF: 1867)

Projeto: Infecção por Citomegalovirus em pacientes internados em unidade de terapia intensiva neonatal em Campo Grande – MS, Brasil

TIPO DE SANGUE DO BEBE:

PCR:

EVOLUÇÃO:

Procedimentos:

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Dreno | <input type="checkbox"/> Punção lombar |
| <input type="checkbox"/> Cateter subnasal ou O ₂ | <input type="checkbox"/> Vent. Mecânica (VM) |
| <input type="checkbox"/> Cateter umbilical venoso | <input type="checkbox"/> Cateter umbilical arterial |
| <input type="checkbox"/> Cateter de acesso venoso central | <input type="checkbox"/> Transfusão sanguínea |
| <input type="checkbox"/> Nutrição parenteral (NP) | <input type="checkbox"/> Traqueostomia |
| <input type="checkbox"/> Sonda enteral | <input type="checkbox"/> Intubação traqueal |
| <input type="checkbox"/> Fototerapia | <input type="checkbox"/> Sonda Nasogástrica |
| <input type="checkbox"/> Punção ventricular | <input type="checkbox"/> Dissecção de artéria |
| <input type="checkbox"/> Caixa de Hood | <input type="checkbox"/> Dissecção de veia |
| <input type="checkbox"/> Halo | <input type="checkbox"/> Capacete de Hood |
| <input type="checkbox"/> AVP – Acesso venoso periférico | <input type="checkbox"/> Sonda orogástrica |
| <input type="checkbox"/> Sonda vesical | <input type="checkbox"/> Gastrectomia |
| <input type="checkbox"/> Cirurgia _____ | <input type="checkbox"/> Punção torácica |
| _____ | <input type="checkbox"/> PICC |

Fez hemocultura?: Sim () Resultado: _____ Não: ()

Fez cultura de sangue para fungos? Sim () Resultado: _____ Não: ()

Fez swab retal/anal? Sim () Resultado: _____ Não: ()

Fez cultura de liquor:

a) Para fungos? Sim () Resultado: _____ Não: ()

a) Para bactérias? Sim () Resultado: _____ Não: ()

Dados da Mãe

Idade:

Tipo de Sangue:

Tipo de Parto: apresentação: com Fórceps: Sim () Não ()

Gesta: _____ P: _____ A: _____ Rotura de bolsa :

Patologia na gestação:

Drogas usadas na gestação:

Sorologia para CMV ----- Positivo () Negativo () Não consta ()