



DANIEL THOMÉ CATALAN

INFECÇÕES HERPÉTICAS EM PACIENTES
ONCOLÓGICOS PEDIÁTRICOS COM EPISÓDIOS DE
FEBRE

HERPESVIRUSES INFECTIOUS IN PEDIATRIC
ONCOLOGY PATIENTS WITH EPISODES OF FEVER

Campinas
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

DANIEL THOMÉ CATALAN

**INFECÇÕES HERPÉTICAS EM PACIENTES
ONCOLÓGICOS PEDIÁTRICOS COM EPISÓDIOS DE
FEBRE**

Orientador (a): Prof (a). Dra. Sandra Helena Alves Bonon

**HERPESVIRUSES INFECTIOUS IN PEDIATRIC
ONCOLOGY PATIENTS WITH EPISODES OF FEVER**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

Master Thesis presented to Clinical Medicine Postgraduation Programm of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Medical Sciences.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO DANIEL THÔME
CATALAN E ORIENTADO PELA PROF(A).
DRA. SANDRA HELENA ALVES BONON.

Assinatura do Orientador

Campinas
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

C28i Catalan, Daniel Thomé, 1980-
Infecções herpéticas em pacientes oncológicos
pediátricos com episódios de febre / Daniel Thomé
Catalan. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Sandra Helena Alves Bonon.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Pediatria. 2. Oncologia. 3. Infecções por
Herpesviridae. 4. Febre. 5. Neutropenia. I. Bonon, Sandra
Helena Alves. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Herpesviruses infectious in pediatric oncology patients with episodes of fever.

Palavras-chave em inglês:

Pediatrics

Oncology

Herpesviridae infections

Fever

Neutropenia

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Sandra Helena Alves Bonon [Orientador]

Ana Beatriz Rosseti Santos

Ricardo Mendes Pereira

Data da defesa: 31-08-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Daniel Thomé Catalan

Orientador: Profa. Dra. Sandra Helena Alves Bonon

Membros:

1. Profa. Dra. Ana Beatriz Rosseti Santos

2. Prof. Dr. Ricardo Mendes Pereira

3. Profa. Dra. Sandra Helena Alves Bonon

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/08/2012

Dedicatória

Com muitas pessoas aprendi em minha vida, meus pais orientaram, minha esposa ensinou o respeito pelo amor, meus orientadores o caminho da pesquisa, meus colegas de trabalho a vontade de sempre fazer o melhor, contudo as crianças do Grendacc me ensinaram a vontade de viver e esse trabalho é dedicado a todos vocês, com a certeza de que ainda não acabou.

Agradecimentos

Um sonho transforma-se em realidade no momento em que conseguimos trabalhar em equipe para alcançar nossos objetivos. A minha equipe é muito grande e possibilitou que eu realizasse meu sonho, por isso seria injusto citar apenas algumas pessoas. Obrigado Carol, Papai e Mamãe, Tia Lí, Dra. Sandra Bonon, Dra. Sandra Costa, Dr. Saulo, Equipe do Laboratório do Grendacc, Equipe do Grendacc, Equipe do Laboratório de Vírus, ao meu primeiro Orientador Dr. Ney de Souza Cruz, que um dia me disse que a *“pesquisa desperta e aguça a curiosidade de um bom profissional”*. Sem vocês o meu sonho não seria possível e muito menos teria sentido. Obrigado!

Resumo

Pacientes com doenças oncológicas possuem grandes períodos de neutropenia grave e são susceptíveis a complicações infecciosas. O tratamento com drogas quimioterápicas, radioterapia e em alguns casos cirurgia promovem depleção do sistema imunológico e exposição a microrganismos durante o processo cirúrgico. Durante o período de tratamento e em média até um ano após o término de terapia os episódios de febre são freqüentes e na maioria dos casos o agente etiológico não é conhecido. O tratamento faz-se então com administração de antibióticos de grande espectro, com a finalidade de realizar o tratamento empírico para vários tipos de microrganismos e a febre é chamada como febre de origem desconhecida. Através dos meios convencionais de diagnóstico uma pequena porcentagem de agentes etiológicos é identificada, e em muitos estudos não ultrapassa 25% dos episódios de febre. As hemoculturas normalmente são negativas e o tempo do diagnóstico é prolongado. Dada a urgência nos cuidados com os pacientes oncológicos pediátricos a busca por um diagnóstico rápido com alta sensibilidade e especificidade se faz necessário. O objetivo deste estudo foi identificar a infecção ativa causada pelos herpesvírus (EBV, CMV, HHV-6 e HHV-7) em pacientes oncológicos pediátricos com episódios de febre através das técnicas de Antigenemia para o CMV e N-PCR para o EBV, CMV, HHV-6 e HHV-7. Foram coletadas 169 amostras de soro para realização da N-PCR e 100 amostras de sangue total para realização do teste de antigenemia provenientes de 62 pacientes. Infecção ativa pelo Epstein-Barr vírus detectada pela N-PCR no soro ocorreu em 3/169 amostras (1,8%) em 3/62 pacientes diferentes (4,8%). Infecção

ativa pelo CMVH foi detectada pela N-PCR em 16/169 amostras (9,5%) e em 12/62 (19,4%) pacientes; N-PCR no soro para detectar infecção ativa pelo HHV-6 ocorreu em 27/169 amostras (16,0%) e destas, 23/62 pacientes (37,1 %) foram acometidos. Infecção ativa causada pelo HHV-7 detectada pela N-PCR no soro ocorreu em 24/169 (14,8%) das amostras coletadas e em 18/62 (29,0%) pacientes. Para o teste de antigenemia para CMVH foram encontrados 5/100 (5,0%) de positividade nas amostras testadas e em 5/62 (8,1%) dos pacientes. Esses resultados mostram que a infecção ativa causada por pelo menos um dos herpesvírus EBV, CMV, HHV-6 e HHV-7 é frequente nessa população representando em nosso estudo 71/169 (42,0%) dos casos de febre e ocorreu em 62 pacientes portadores de neoplasia. Estudos futuros serão necessários com a inclusão de outros microrganismos para avaliar a etiologia da febre nos pacientes oncológicos pediátricos, assim como a introdução de novas técnicas de biologia molecular como a PCR quantitativa em tempo real.

Abstract

Patients with infiltration cancer cells in bone marrow, solids tumors and treatment with chemotherapy promote high depletion of immune system activity. Most episodes with febrile neutropenia are treated with empiric broad-spectrum antibacterial therapy without identifying the site of infection or agent, such as fever unknown origin (FUO). Through the conventional diagnostic methods a small number of etiologic agents are identified, blood cultures and urine culture are usually negative and time-consuming to identify the source of infection for the clinic usually is difficult, nevertheless only identify bacteria and fungi. They are identified and confirmed by culture in only 25-30% of the cases, in other 15-25% of patients with fever bacterial or fungi infections are suspected on clinical findings and approximately 50% of cases are classified and treated as FUO. Given the urgency of care to cancer patients and fever need rapid diagnosis of infections in these patients, the search for new laboratory tests in order to promote high accuracy in identification of pathogens in these patients is important. The aim of this study is identify active infections caused by herpesvirus EBV, CMV, HHV-6 and HHV-7 in episodes of fever of pediatric oncology patients. 169 samples of whole blood and serum collected from patients with episodes of fever were analyzed using N-PCR methods and cytomegalovirus was analyzed by antigenemia and N-PCR. Active infection caused by Epstein-Barr virus occurred in 3/169 (1,8%) of samples and 3/62 (4,8%) of the patient; cytomegalovirus 16/169 (9,5%) of samples and 12/62 (19,4%) of the patient; HHV-6 27/169 (16,0%) of templates and 23/62 (37,1%) of the patient; HHV-7 24/169 (14,8%) of sample and 18/62 (29,1%) of the patient.

This results shows that active infections caused by EBV, CMV, HHV-6 and HHV-7 are frequent in children receiving cancer treatment, representing high prevalence this cases of fever, with or without neutropenia. New assay are need with real time PCR for to better the diagnostic of the fever episodes.

LISTA DE ABREVIATURAS

β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
%	Símbolo de porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
5' → 3'	Sentido de transcrição
μL	Microlitro
μg	Micrograma
mL	Minilitro
mm^3	Milímetros cúbicos
mL/min	Mililitros por minuto
Nm	Nanômetros
A	Adenina
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
CD	Cluster of differentiation
CFB/MYH1	Alterações cromossômicas
CRS	Célula de Reed-Sternberg
CMVH	Citomegalovírus humano
C	Citosina
Cópias/ μL	Cópias por microlitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DH	Doença de Hodgkin

DHL	Desidrogenase láctica
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay ou ensaio imunoenzimático
EPC	Equipamento de proteção coletiva
EPI	Equipamento de proteção individual
F	Feminino
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
G	Guanina
GRENDACC	Grupo em Defesa da Criança com Câncer
HHV-4	Herpesvírus humano 4
HHV-5	Herpesvírus humano 5
HHV-6 A	Herpesvírus humano 6 tipo A
HHV-6 B	Herpesvírus humano 6 tipo B
HHV-7	Herpesvírus humano 7
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTLV-1	Vírus linfotrópico T tipo 1
H ₂ O	Fórmula química da água
Ig G	Imunoglobulina G
Ig M	Imunoglobulina M
Inv	Inversão cromossômica
Kpb	Quilobases
LH	Linfoma de Hodgkin

LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda tipo M6
LMA	Leucemia mielóide aguda tipo M7
LNH	Linfoma não-Hodgkin
M	Masculino
MB	Meduloblastoma
NB	Neuroblastoma
NK	Célula natural killer
Nested-PCR	N-PCR
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	Osteossarcoma
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PML/RAR	Alteração genética na leucemia promielocítica aguda
<i>pp65</i>	Antígeno do citomegalovírus
<i>p-value</i>	Valor de p
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RBS	Rabdomiossarcoma
RX	Raios X
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada

SNC	Sistema Nervoso Central
T	Timina
t	Translocação
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TGO	Transaminase oxalacética
TGP	Transaminase pirúvica
TMO	Transplante de Medula Óssea
TP53	Gene supressor tumoral
TW	Tumor de Wilms
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

Lista de Tabelas

Tabela	Pág.
Tabela 1: Principais bactérias causadoras de febre e infecção em pacientes oncológicos pediátricos	23
Tabela 2: Principais fungos causadores de febre e infecção em pacientes oncológicos pediátricos	24
Tabela 3: Descrição da técnica de N-PCR (1ª Etapa)	52
Tabela 4: Descrição de primers nested-PCR e referências	53
Tabela 5: Sequência de primers da Beta-globina e localização	56
Tabela 6: Características dos 62 pacientes incluídos no estudo	59
Tabela 7: Resultados Hemoculturas e Uroculturas	61
Tabela 8: Resultados dos testes de Antigenemia para CMVH	62
Tabela 9: Ocorrência de Infecção Ativa utilizando a técnica da N-PCR	63
Tabela 10: Positividade entre os herpesvírus pesquisados pela técnica de N-PCR	64
Tabela 11: Número de microrganismos entre infectados com episódio de febre pela técnica de N-PCR	66
Tabela 12: Período de internação, número de leucócitos e neutrófilos	68
Tabela 13: Fases do tratamento e infecção pelos herpesvírus em pacientes oncológicos pediátricos durante os episódios de febre	69
Tabela 14: Ocorrência de coinfeção entre infecção herpética e bacteriana em onze pacientes com câncer	70

Lista de Figuras

Figura	Pág.
Figura 1: Blastos de LLA	8
Figura 2: Blastos de LMA	8
Figura 3: LNH tipo Burkitt	10
Figura 4: Estrutura básica dos herpesvírus	27
Figura 5: Linfócito monocitóide e quatro linfócitos normais	28
Figura 6: Estrutura do citomegalovírus	30
Figura 7: Antibiograma realizado no laboratório de pesquisas microbiológicas do Instituto Oswaldo Cruz	37
Figura 8: Curva padrão qPCR	43
Figura 9: Duas células positivas para CMVH pela reação de Antigenemia (pesquisa do antígeno <i>pp65</i>) em menor aumento (10x)	63
Figura 10: Uma célula positiva para CMVH pela reação de Antigenemia (pesquisa do antígeno <i>pp65</i>) em menor aumento (40x).	63
Figura 11: Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2% da reação de N-PCR para EBV	64
Figura 12: Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2% da reação de N-PCR para CMV	65
Figura 13: Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2% da reação de N-PCR para HHV-6	65
Figura 14: Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2% da reação de N-PCR para HHV-7	66

Lista de Gráficos

Gráfico

Pág.

Gráfico 1: Detecção de infecção em episódios de febre pelas técnicas de N-PCR e Hemoculturas

67

Lista de Quadros

Quadros	Pág.
Quadro 1: Classificação das Leucemias Linfóides segundo OMS	5
Quadro 2: Classificação das Leucemias Mielóides Agudas segundo OMS	6
Quadro 3: Classificação dos linfomas segundo OMS	8
Quadro 4: Classificação de risco nos episódios de febre	20

SUMÁRIO

Conteúdo	Página
Capa	
Contracapa	I
Ficha Aprovação	III
Dedicatória	IV
Agradecimentos	V
Resumo	VI
Abstract	VIII
Abreviações	X
Lista de Tabelas	XIV
Lista de Figuras	XV
Lista de Gráficos	XVI
Lista de Quadros	XVII
1. Introdução	1
1.1 Cancer Infantil	3
1.1.1 Leucemias	4
1.1.1.1 Leucemias Linfóides	4
1.1.1.2 Leucemias Mielóides	6
1.1.2 Linfomas	8
1.1.3 Neuroblastomas	10
1.1.4 Osteossarcomas	11
1.1.5 Meduloblastomas	12
1.1.6 Tumor de Wilms	13
1.1.7 Gliomas	14
1.1.8 Rabdomiossarcomas	14
1.2 Tratamento	15
1.2.1 Quimioterapia	15
1.2.2 Radioterapia	17
1.3 Febre no paciente oncológico pediátrico	18
1.3.1 Infecções no paciente oncológico pediátrico	20

1.3.2 Infecções causadas por Bactéria e Fungos em pacientes oncológicos pediátricos	21
1.3.3 Infecções causadas por Vírus em pacientes oncológicos pediátricos	24
1.4 Família <i>Herpesviridae</i>	24
1.4.1 Herpesvírus Humano 4 (Epstein-Barr Vírus)	26
1.4.2 Herpesvírus Humano 5 (Citomegalovírus)	27
1.4.3 Herpesvírus Humano 6 (HHV-6)	29
1.4.4 Herpesvírus Humano 7 (HHV-7)	30
1.5 Diagnóstico Laboratorial nos Episódios de Febre em Pacientes oncológicos pediátricos	32
1.5.1 Hemograma	32
1.5.2 Hemocultura	33
1.5.3 Urocultura	34
1.5.4 Antibiograma e Antifungograma	35
1.5.5 Testes sorológicos	36
1.5.6 Métodos Moleculares	37
1.5.6.1 Antigenemia para Citomegalovírus Humano (detecção do antígeno <i>pp65</i> do CMVH por imunofluorescência)	37
1.5.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (Nested PCR)	38
1.5.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real	40
2. Objetivos	43
3. Casuística e Métodos	44
3.1 Casuística	44
3.2 Critérios de Inclusão	44
3.3 Critérios de Exclusão	44
3.4 Critérios utilizados para definição de infecção ativa e doença por herpesvírus	45
3.5 Métodos	47
3.5.1 Detecção da infecção ativa por CMVH através da Antigenemia (detecção do antígeno <i>pp65</i> do CMVH)	47
3.5.2 Amostras de sangue para realização da N-PCR	48

3.5.3 Extração do DNA total	48
3.5.4 Detecção do DNA dos Herpesvírus Humanos através da N-PCR	49
3.5.5 Primers para a reação da N-PCR	51
3.5.6 Detecção dos fragmentos amplificados	52
3.5.7 Amplificação do gene da Beta-Globina	53
3.6 Análises Estatísticas	54
3.7 Cuidados especiais para evitar contaminação das amostras	54
3.8 Biossegurança	55
4. Resultados	57
4.1 Ocorrência de Infecção causada por Bactérias e Fungos detectada pelos testes de Hemocultura e Urocultura nos pacientes estudados	58
4.2 Ocorrência de Infecção Ativa causada pelo CMVH detectada pelo teste de Antigenemia nos pacientes estudados	59
4.3 Ocorrência de Infecção Ativa causada pelos Herpesvírus estudados utilizando a técnica da Nested PCR no soro	61
4.4 Coinfecção por Herpesvírus e Bactérias	66
5. Discussão	71
6. Conclusão	78
7. Referências Bibliográficas	82
Anexo I	101
Anexo II	104

1. Introdução

Os termos câncer, neoplasia, doença oncológica, neoplasma ou simplesmente tumor referem-se atualmente ao conjunto de doenças caracterizadas por alterações em nível de material genético de uma única célula de um tecido ou órgão. As alterações chamadas por muitos de mutação podem ser causadas por agentes químicos, físicos e biológicos encontrados no habitat natural dos seres humanos. A expectativa é que milhões de novos casos de câncer serão diagnosticados a cada ano em todo o mundo. A maior incidência acontece entre adultos de ambos os sexos principalmente entre os 40 e 79 anos de idade. Nesses indivíduos, os carcinomas são os principais tipos de neoplasias. Entre mulheres de 40 a 59 anos destacam-se os tumores de mama, já entre homens de 40 a 79 anos destacam-se os tumores de pulmão e brônquios¹.

O câncer infantil é raro, acometendo cerca de 2% a 5% de todos os diagnósticos de câncer e difere em muitos parâmetros das neoplasias em adultos. Em crianças, as neoplasias podem acometer vários sítios primários com grande diversidade histológica, enquanto que no adulto prevalecem o câncer de mama, pulmão, brônquios e próstata. Na pediatria, a prevalência da neoplasia está em alterações de células embrionárias, sendo as leucemias, linfomas, neuroblastomas e tumor Wilms os mais incidentes. Atualmente na pediatria, as neoplasias são divididas em leucemias e tumores sólidos².

As leucemias geralmente acometem crianças na primeira infância, sendo aproximadamente um terço dos casos de câncer nessa faixa etária. Até meados da década de 1970 as neoplasias infantis eram em sua grande maioria fatais, entretanto com a introdução da quimioterapia e radioterapia a porcentagem de

óbitos diminuiu progressivamente, passando de 25% para 75% a sobrevivência dos pacientes assistidos por um protocolo com terapia intensiva e ajustada a grupos específicos de risco³. A utilização de quimioterápicos e radioterapia trouxe benefícios ao tratamento do câncer pediátrico, contudo a susceptibilidade a infecções aumentou em decorrência da diminuição da atividade do sistema imunológico pela utilização dos anti-neoplásicos^{3,4}.

O risco de desenvolvimento de neutropenia é freqüente e a maior limitação na administração de medicamentos quimioterápicos no tratamento do câncer. Foi descrita em estudo científico por Bodey *et al*, em 1966 quando pela primeira vez a associação entre administração de medicação quimioterápica foi relacionada à diminuição do número de células do sistema imunológico e conseqüente risco de febre e infecção. A neutropenia febril acontece em 40% dos casos já no primeiro ciclo de quimioterapia, é associada com significativo risco de morbidade e com mortalidade variando de 0% a 3% em todos os tipos de neoplasias⁵.

A febre em geral é a primeira manifestação de infecção no paciente oncológico pediátrico e muitas vezes são persistentes durante vários dias. O agente etiológico ou o foco infeccioso da febre nas crianças com câncer é identificado em 30% a 40% dos episódios febris, através dos testes laboratoriais de rotina, como a hemocultura e urocultura. A incidência de bacteremia varia de 8,5% a 28% nos quadros de febre, dependendo da intensidade da quimioterapia, contagem global de leucócitos e diferencial de neutrófilos e monócitos principalmente⁵⁻⁷.

A mortalidade por infecções nos pacientes pediátricos portadores de neoplasias é relativamente baixa, freqüentemente menor que 10%, mas variando de 3% a 17%, dependendo da condição imunológica do paciente, do agente etiológico e das condições de suporte à antibioticoterapia. Muitos casos de septicemia em pacientes oncológicos pediátricos são causados pela associação de neutropenia e bactérias *gram positivas*, entretanto 60% a 80% dos casos ainda são tratados como febre de origem desconhecida⁷⁻¹⁰.

1.1. Câncer Infantil

Apesar de raro, o câncer infantil acomete milhares de crianças todos os anos, sendo a segunda causa de morte dentro desta população. Estima-se que aproximadamente 2% a 5% de todos os tipos de neoplasias acometem crianças até 15 anos de idade⁴.

O câncer é causado por uma série de mutações em nível de DNA que promovem a formação de uma célula com grande capacidade de multiplicação sem controle, estimula a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), possui capacidade de invadir outros tecidos e órgãos, causando metástase e ainda consegue ser resistente ao sistema imunológico do paciente¹. Diversos fatores podem contribuir para o desenvolvimento de uma célula neoplásica, sendo as causas mais comuns como fatores físicos dentre as quais radiações ionizantes e raios solares ultravioletas, fatores químicos como exposição ao benzeno e urânio e fatores biológicos como certos tipos de linfomas associados à infecção e latência pelo vírus Epstein-Barr e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)¹¹.

O câncer em pacientes pediátricos geralmente evolui para a cura chegando a 85% em alguns tipos de leucemias e 100% para alguns tipos de linfomas. As leucemias predominam na população infantil entre os 2 a 15 anos, seguido dos tumores de sistema nervoso central, como os neuroblastomas e tumores nos linfonodos chamados linfomas. Já entre os adolescentes os linfomas e leucemias predominam seguidos pelos tumores de partes moles, como o tumor de Wilms^{11,12}.

1.1.1 Leucemias

As leucemias correspondem ao grupo de neoplasias que acometem as células do sistema sanguíneo, principalmente os leucócitos¹. As leucemias podem acometer a linhagem de células sanguíneas linfóides, a linhagem mielóide ou ainda ambas as linhagens, chamada de leucemia bifenotípica. Didaticamente então, dividimos as leucemias em linfóide e mielóide.

1.1.1.1 Leucemias Linfóides

As leucemias linfóides representam a maior porcentagem de neoplasias na população infantil, correspondendo de 25% a 35% dos casos, sendo a LLA a leucemia de maior incidência com cerca de 80% dos casos. Aproximadamente 2.500 a 3.000 crianças serão diagnósticos como portadoras de LLA a cada ano nos Estados Unidos, com uma incidência de 3 a 4 casos por 100.000 crianças¹². No Brasil a prevalência de LLA sobre as demais neoplasias do sistema hematopoiético também é encontrada, sendo esperados aproximadamente 2,7 novos casos a cada 100.000 crianças por ano¹³.

Em 85% dos casos a célula alvo é um linfócito imaturo B ou simplesmente chamado de precursor B e os outros 15% dos casos de LLA acometem linhagens

de precursores de células T (linfócitos T)⁴. Essa diferenciação permitiu aos médicos assistentes escalonar os pacientes e observar o grau de risco de cada tipo de LLA e assim adequar o melhor tratamento¹³. A classificação foi proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e classifica as leucemias linfóides conforme Quadro 1:

Quadro 1: Classificação das Leucemias Linfóides, segundo a OMS.

<p>Leucemia Linfóide Aguda de células B:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Neoplasias de células B precursoras: <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma/leucemia linfoblástica de precursor B • Neoplasias de células B maduras: <ul style="list-style-type: none"> - Leucemia linfocítica crônica/Linfoma Linfocítico; - Leucemia Prolinfocítica B; - Tricoleucemia;
<p>Proliferações de células B de potencial maligno incerto:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Granulomatose Linfóide; • Doença Linfoproliferativa Pós-transplante.
<p>Linfóide de células T e NK</p> <ul style="list-style-type: none"> • Neoplasias de células T precursoras: <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma/leucemia linfoblástica de precursor T; - Linfoma de células NK blásticas. • Neoplasia de células T e NK maduras: <ul style="list-style-type: none"> - Leucemia prolinfocítica T; - Leucemia linfocítica de grandes células T granulares; - Leucemia agressiva de células NK; - Leucemia/linfomas de células T do adulto (HTLV1 +).
<p>Leucemia Linfóide Aguda de células B:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Neoplasias de células B precursoras: <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma/leucemia linfoblástica de precursor B • Neoplasias de células B maduras: <ul style="list-style-type: none"> - Leucemia linfocítica crônica/Linfoma Linfocítico; - Leucemia Prolinfocítica B; - Tricoleucemia;
<p>Proliferações de células B de potencial maligno incerto:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Granulomatose Linfóide;

- Doença Linfoproliferativa Pós-transplante.

Fonte: *Adaptado de Paes *et al*, 2002.

Até meados da década de 1940 aproximadamente 5% das crianças com leucemia tinham obtenção de cura. Atualmente combinações de drogas quimioterápicas, protocolos de tratamento em constante atualização, tratamento profilático do SNC e o escalonamento dos pacientes em grupos de risco com base em novos testes laboratoriais, elevaram significativamente a sobrevida livre de doença no paciente pediátrico portador de LLA de 10% a 15% na década de 1960 para 80% em meados de 2000 e alcança níveis de até 90% em países em desenvolvimento¹³⁻¹⁶. Entretanto, a mielodepressão do sistema imunológico decorrente do tratamento e pela própria LLA promovem leucopenia e neutropenia, causando altos índices de morbidade nos portadores pediátricos de LLA¹⁶.

1.1.1.2 Leucemias Mielóides

A LMA é uma neoplasia rara em crianças, geralmente de origem indeterminada, no entanto, doenças de natureza genética, agentes físicos como irradiações ionizantes, produtos químicos e medicamentos, principalmente as drogas utilizadas no tratamento de outras neoplasias, podem estar envolvidos no desenvolvimento de novas neoplasias.

Os tipos de LMA são classificados e variam de M0 para a LMA menos diferenciada até M7. A imunofenotipagem permitiu o escalonamento de pacientes em grupos de risco e adequação dos protocolos de tratamento²¹. Atualmente a OMS classificou as LMA com base em agudos de imunofenotipagem e cariótipo, conforme Quadro 2, abaixo:

Quadro 2: Classificação das Leucemias Mielóides Agudas, segundo a OMS.

<p>Leucemia Mielóide Aguda com anormalidades genéticas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leucemia Mielóide Aguda com t(8:21)(q22;q22), (LMA1/ETO); • Leucemia Mielóide Aguda com eosinófilos anormais na medula óssea e inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22), (CBF/MYH11); • Leucemia Promielocítica Aguda com t(15;17)(q22;q12), (PML/RAR) e variantes; • Leucemia Mielóide Aguda com 11q23 (LLM).
<p>Leucemia Mielóide Aguda com displasia de várias linhagens seguida de:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome Mielodisplásica ou Síndrome Mielodisplásica e Doença Mieloproliferativa; • Sem antecedentes de Síndrome Mielodisplásica ou Síndrome Mielodisplásica e Doença Mieloproliferativa, mas com displasia de pelo menos 50% de células em 2 ou mais linhagens mielóides.
<p>Leucemia Mielóide Aguda e Síndrome Mielodisplásica relacionado com terapia de:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Por agentes alquilantes e radiação; • Inibidor de Topoisomerase II (alguns casos podem ser linfóides).
<p>Outras:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leucemia Mielóide Aguda não categorizada anteriormente; Classificadas como: <ul style="list-style-type: none"> • Leucemia Mielóide Aguda minimamente diferenciada; • Leucemia Mielóide Aguda sem maturação; • Leucemia Mielóide Aguda com maturação; • Leucemia Mielomonocítica Aguda; • Leucemia Monoblástica/Monocítica Aguda; • Leucemia Eritróide Aguda (mielóide/eritróide e eritroleucemia pura); • Leucemia Megacariocítica Aguda; • Leucemia Basofílica Aguda; • Mielofibrose Panmielóide Aguda; • Sarcoma Mielóide.

Fonte: Wardman *et al*, 2002.

Apesar de todos os avanços no diagnóstico da LMA a taxa de cura ainda é muito baixa em relação aquelas encontrada nas LLA. A sobrevida livre de doença em 5 anos varia de 17% a 31% no Brasil e até 46% em países desenvolvidos. Os protocolos de tratamento quimioterápicos são demasiadamente mieloaplasivos e as infecções são freqüentes, com grandes complicações²².

As figuras a seguir mostram os blastos de um caso de LLA e outro de

LMA:



Figura 1: Blastos de paciente portador de LLA. **Fonte:** Laboratório Grendacc.

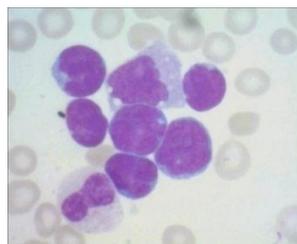


Figura 2: Blastos de paciente portador de LMA. **Fonte:** Laboratório Grendacc.

1.1.2 Linfomas

Os linfomas acometem linfócitos localizados em órgãos linfóides primários e secundários, estes locais contêm linfócitos em várias etapas de desenvolvimento. Os linfócitos se originam de células linfóides progenitoras, proliferam e transformam-se em células efectoras²⁶. Os órgãos linfóides secundários incluem os gânglios, o baço e o tecido linfóide associado às mucosas. Neste ambiente os linfócitos aglomeram-se para que ocorra interação celular com células apresentadoras de antígenos, deflagrando a resposta imunológica^{24, 26}.

Os linfomas são divididos em 2 tipos principais teoricamente como Linfoma ou Doença de Hodgkin (LH) e os Linfomas Não-Hodgkin (LNH), ambos são neoplasias que acometem a série linfocitária presente nos linfonodos, timo, baço e centros germinativos de linfócitos B espalhados pelas mucosas do corpo humano²³.

Atualmente os LH são classificados pela OMS conforme o tipo celular encontrado, assim como, com as características do infiltrado inflamatório, conforme Quadro 3²³⁻²⁶:

Quadro 3: Classificação dos Linfomas, segundo a OMS.

- Linfoma de Hodgkin:
 - Linfoma de Hodgkin, predominância linfocítica nodular;
 - Linfoma de Hodgkin clássico:
 - Linfoma de Hodgkin clássico, esclerose nodular;
 - Linfoma de Hodgkin clássico, rico em linfócitos;
 - Linfoma de Hodgkin clássico, celularidade mista;
 - Linfoma de Hodgkin clássico, depleção linfocítica.
-
- Linfoma Não Hodgkin:
 - Neoplasia de células linfoides B:
 - Linfoma/Leucemia linfoblástica de precursor B
 - Neoplasia de células B maduras:
 - Linfoma linfocítico;
 - Linfoma linfoplasmocítico;
 - Linfoma da zona marginal esplênica;
 - Linfoma da zona marginal extralinfonodal do tecido linfoide associado à mucosa (linfoma Malt);
 - Linfoma da zona marginal linfonodal;
 - Linfoma folicular;
 - Linfoma de células do manto;
 - Linfoma difuso de grandes células B;
 - Linfoma de grandes células B mediastinal (tímico);
 - Linfoma de grandes células B intravascular;
 - Linfoma primário de efusões;
 - Linfoma/leucemia de Burkitt.
 - Neoplasia de células linfoides T e NK:
 - Neoplasia de células T precursoras:
 - Linfoma/leucemia linfoblástica de precursor T;
 - Linfoma de células NK blásticas;
 - Neoplasias de células T e NK maduras:
 - Linfoma de células NK/T extranodal, do tipo nasal;
 - Linfoma de células T do tipo enteropatia;
 - Linfoma de células T hepatoesplênico;
 - Linfoma cutâneo de células T, do tipo paniculite subcutânea;
 - Linfoma cutâneo primário de grandes células anaplásicas;
 - Linfoma de células T periféricas não-especificado;
 - Linfoma de células T angioimunoblástico;
 - Linfoma de grandes células anaplásicas.
 - Proliferações de células T de potencial maligno incerto:

Fonte: adaptado de Paes *et al*, 2002.

O tipo mais comum de linfoma na infância é o LNH. O diagnóstico é realizado através de biópsia do tumor com análise anatomopatológico e imunohistoquímica da biópsia. A celularidade encontrada varia de acordo com o tipo de tumor, assim como o seu infiltrado inflamatório. Como exemplo de LNH segue Figura 3 abaixo:

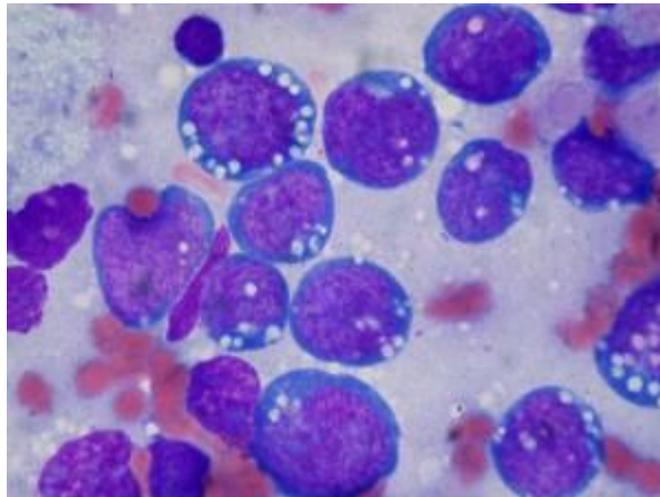


Figura 3: LNH tipo Burkitt. **Fonte:** <http://cienciadiaria.com.br>

Nos dias de hoje em países desenvolvidos a sobrevida livre de doença chega a 100% em países desenvolvidos, como na Alemanha. A partir do desenvolvimento de novos protocolos de tratamento no Memorial Sloan-Kettering Cancer Center em Nova Iorque, EUA, a inclusão do quimioterápico Metotrexate no tratamento dos linfomas aumentou a sobrevida livre de doença para 65,2% em 1986, entretanto, o risco de septicemia foi 4 vezes maior devido às altas concentrações administradas de Metotrexate aos pacientes e consequente mielossupressão pela intoxicação do Metotrexate residual. No final de 1986 foi

introduzida a terapia de resgate de Metotrexate com o medicamento Leucovorin, aumentando para 85% a taxa de remissão após a fase indutora e 94% dos pacientes sobreviveram²⁶.

1.1.3 Neuroblastoma

O termo Neuroblastoma (NB) refere-se a tumores oriundos de células da crista neural, responsáveis pela formação das células do sistema nervoso autônomo simpático e da medula da crista neural. São vários tipos de neoplasias originados desse tipo celular, como o neuroblastoma, ganglioneuroblastomas e ganglioneuromas^{27, 28}.

O NB representa aproximadamente 15% do total de óbitos em crianças com câncer e a taxa de vida livre de episódios foi de 15% em meados da década de 1960, para aproximadamente 60% no fim dos anos 80 na Itália, entretanto o progresso no desenvolvimento de protocolos de tratamento com alta eficiência como em outros tipos de neoplasias não foi conseguido³¹.

As recidivas durante ou após o tratamento são frequentes e geralmente são acompanhadas de metástases em pulmão, fígado e medula óssea. A mielossupressão ocasionada pelo agressivo protocolo de tratamento, que incluem seções de quimioterapia e radioterapia, aumenta as taxas de morbidade e mortalidade nesses pacientes por septicemia²⁹.

1.1.4 Osteossarcoma

O osteossarcoma (OS) é uma neoplasia maligna primária do osso, originado nas células mesenquimais primitivas osteoformadoras. É um tumor caracterizado pela produção de tecido osteóide ou osso imaturo pelas células

malignas, sendo a maior incidência em crianças acima dos 10 anos de idade, adolescentes e adultos jovens^{32, 33}.

Apesar dos tumores primários do osso em crianças serem de baixa incidência, o mais comum são as metástases ósseas originadas de outros tipos de neoplasias, entretanto o OS representa 5% das doenças malignas na segunda década de vida^{34, 35}. As neoplasias maligna dos ossos possuem incidência anual de cerca de 8,7 casos por milhão de crianças e adolescentes com menos de 20 anos nos EUA e estima-se que tenhamos aproximadamente 350 novos casos de OS na população infantil a cada ano no Brasil³⁴.

Atualmente os pacientes são estratificados em grupos de risco com um prognóstico mais favorável para os pacientes com doença localizada, a idade, tamanho do tumor primário, grau de necrose tumoral, local, possibilidade de cirurgia do tumor primário, nível sérico de desidrogenase láctica (DHL) e presença de metástase colaboram para o estabelecimento do prognóstico e grau de risco do paciente³⁵.

O avanço no tratamento do OS deu-se a partir da introdução do Metotrexate em meados dos anos 80, associados à cirurgia. A introdução do quimioterápico Ifosfamida melhorou a sobrevida livre de doença, quando associada aos demais antineoplásicos de 45% para 63% no final dos anos 90. No Brasil vários estudos caracterizaram o tratamento e acompanhamento do OS em crianças, sendo que a sobrevida global e livre de doença varia para pacientes com metástases e sem presença de metástases em outros locais, sendo de 60,5% para esses últimos pacientes³³⁻³⁵.

O tratamento atual é realizado através da associação de quimioterapia, cirurgia e em alguns casos radioterapia.

1.1.5 Meduloblastomas

O meduloblastoma (MB) é uma neoplasia neuroectodérmica originada de células fetais remanescentes no cerebelo, sendo capaz de se diferenciar em células da linhagem ependimal, astrogliar ou neuroglial³⁷.

Os tumores de sistema nervoso central representam 20% de todos os tumores malignos na infância, sendo o MB a neoplasia de SNC mais freqüente, representando 10% a 20% dos casos³⁷.

A incidência de metástase no SNC é baixa e não ultrapassa os 10%, entretanto o MB possui altas taxas de disseminação extraneural, variando de 5% a 30% dos casos, sendo os ossos acometidos em 80% das metástases fora do SNC^{38, 39}.

O diagnóstico inicial geralmente é realizado através de exames de imagem como a tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética nuclear, entretanto o tipo histológico e a classificação do tumor são realizados através do estudo anatomopatológico da biópsia da neoplasia⁴⁰.

O tratamento é baseado em cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A cirurgia tem por objetivo a retirada da maior parte do tumor primário, após é realizada a reavaliação através dos exames de tomografia e ressonância magnética nuclear e então o paciente é classificado em alto ou baixo risco. Após o escalonamento do grau de risco do paciente é então iniciada a fase de radioterapia, que pode ocorrer concomitantemente com a quimioterapia. Neste

período o acompanhamento da imunodepressão é fundamental pela associação entre os tipos de tratamento e a presença de infecções graves³⁷⁻⁴⁰.

1.1.6 Tumor de Wilms (TW)

O TW possui prognóstico favorável quando composto por células blastomatosas, estromais ou epiteliais. Entretanto, a presença de anaplasia com células heterogêneas, figuras mitóticas multipolares em forma focal ou difusa representam pior prognóstico e são responsáveis por 5% das neoplasias renais malignas na infância⁴³.

O TW representa 5% a 6% dos casos de câncer na população pediátrica por ano nos EUA, sendo esperados aproximadamente 460 novos casos por ano. São acometidas principalmente crianças menores de 5 anos de idade, sendo rara após os 10 anos de idade. Em cerca de 7% dos casos confirmados de TW, a neoplasia está presente em ambos os rins, entretanto a presença bilateral do TW está associada a anormalidades congênitas, sendo a forma unilateral predominante^{43, 44}.

O tratamento do TW geralmente é a combinação entre cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A formação de grupos cooperativos nas últimas décadas promoveu a organização de protocolos de tratamento semelhantes e assim analisar um maior número de pacientes⁴³.

1.1.7 Gliomas

O Glioma é um tumor primário do sistema nervoso central proveniente de alterações genéticas das células do tecido glial, formado pelos astrócitos, oligodendrócitos, micróglia e células do epêndima^{45, 46}.

Os tumores primários do SNC representam 21% de todas as neoplasias sólidas da infância, sendo os gliomas de baixo grau e os de alto grau de malignidade responsáveis por 50% a 60% dos casos⁴⁷.

Os gliomas de baixo grau de malignidade tem maior incidência entre os 5 e 7 anos de idade, representando entre 30% a 40% dos gliomas na infância e adolescência. Em países em desenvolvimento como na Alemanha são esperados entre 120 a 150 novos casos ao ano em pacientes menores de 15 anos de idade^{47, 48}.

Os gliomas de alta malignidade representam a maioria dos gliomas na infância e sua sobrevida livre de doença em 10 anos é bastante reduzida e não ultrapassa 10%⁴⁸.

Alguns pesquisadores relacionam o surgimento de gliomas de vias ópticas com a infecção latente pelo Herpesvírus Humano 6 (HHV-6) e sua capacidade de integração do material genético às células da glia⁴⁶⁻⁴⁸.

O tratamento inclui ciclos de quimioterapia para a diminuição do tamanho do tumor e amenização dos sintomas, normalmente não é possível a realização de cirurgia e radioterapia devido à localização do tumor⁵⁰.

1.1.8 Rabdmiossarcoma

O rabdmiossarcoma (RMS) é uma neoplasia maligna originada de células mesenquimais relacionadas à formação de músculos estriados esqueléticos, entretanto, podem surgir em outras células da linhagem mesenquimal como na bexiga e representam 4% a 8% de todas as neoplasias malignas na infância⁵¹.

A incidência anual de RMS em crianças menores de 15 anos de idade é de 4,5% entre todas as neoplasias que acometem crianças, sendo 4 e 7 por 1.000.000 de crianças e adolescentes, com aproximadamente 250 novos casos diagnosticados nos EUA a cada ano⁵¹, dados semelhantes aqueles encontrados no Brasil.

O tratamento do RMS depende do estágio de diagnóstico do tumor que por sua vez é identificado através da localização do tumor primário, tamanho do tumor primário, presença de metástase e delimitação do tumor. Normalmente a associação de quimioterapia e radioterapia promove a cura do paciente, principalmente quando o diagnóstico é realizado rapidamente, entretanto, o acompanhamento nos períodos de altas doses de quimioterapia deve ser realizado diariamente em decorrência da mielodepressão⁵³.

1.2 Tratamento do Câncer

O tratamento dos pacientes com câncer, de uma forma geral, é realizado através da administração de medicamentos quimioterápicos, radioterapia e cirurgia, seguindo protocolos estabelecidos por estudos prévios⁵⁴.

1.2.1 Quimioterapia

Desde a introdução da quimioterapia a mais de 60 anos atrás, o prognóstico favorável dos pacientes com câncer aumentou drasticamente, muitos dos quais eram fatais e sem possibilidade de cura. A sobrevida livre de doença em cinco anos para todos os tipos de câncer aumentou em 68%⁵⁴.

O objetivo do tratamento com drogas quimioterápicas iniciais é a remissão da neoplasia a níveis muito baixos. Os protocolos atuais utilizam vários tipos de quimioterápicos em conjunto para a obtenção da remissão da doença. Neste

período, a concentração das drogas é muito elevada e é chamado de **período de indução**, com duração de aproximadamente 60 a 120 dias. As drogas do período de indução promovem a remissão do câncer na grande maioria dos casos, entretanto não são específicas somente para as células do tumor, acometendo também as células saudáveis, com toxicidade para as células da linhagem vermelha (eritrócitos), branca (leucócitos) e plaquetas. A diminuição dos leucócitos é responsável pelo surgimento de infecções oportunistas com episódios de febre, frequentes no período de indução e consolidação^{55,56}.

Os protocolos atuais têm duração de aproximadamente dois anos variando conforme o tipo de neoplasia, toxicidade dos agentes quimioterápicos, episódios de febre e infecções. Estes protocolos são divididos em períodos ou fases, sendo: **indução, consolidação e manutenção**. Dependendo do tipo de neoplasia, esses períodos podem ser intercalados com fases de radioterapia e/ou cirurgia⁵⁴.

Os períodos de **indução e consolidação** são aqueles com agentes quimioterápicos em maior concentração, na sua grande maioria administrados de forma endovenosa. É neste período que a toxicidade desses agentes pode causar febre e infecções oportunistas devido à mielossupressão, muitas vezes com episódios de neutropenia febril⁵⁶.

Na fase de **manutenção** as drogas são administradas em sua grande maioria por via intramuscular e em baixas concentrações, entretanto a leucometria permanece em índices abaixo dos valores considerados normais e com sua fisiologia alterada, contudo os episódios de febre e infecções são menores⁵⁶⁻⁵⁸.

1.2.2 Radioterapia

A aplicação de radiação ionizante no tratamento de neoplasias iniciou-se a mais de 1 século atrás com o descobrimento da utilização dos raios X por *Roentgen*. Este tipo de tratamento normalmente é utilizado em conjunto com a quimioterapia ou após procedimento cirúrgico no tratamento de tumores sólidos⁵⁹.

O objetivo do tratamento através de radiações ionizantes é a morte das células tumorais através de danos ao DNA da célula tumoral, através do processo de ionização das moléculas de água presentes no citoplasma das células tumorais pelos raios ionizantes e a liberação de radicais livres no citoplasma celular. Como o sucesso da radioterapia depende do estado fisiológico da célula tumoral a vascularização do tecido formador do tumor é importante para regulação da quantidade de água e oxigênio no citoplasma da célula tumoral⁶⁰.

Assim como no tratamento através da quimioterapia, a aplicação de radiação ionizante não é restrita somente as células tumorais, acometendo também células de tecidos adjacentes à neoplasia. Entretanto, o raio de ação é limitado à localização do tumor sólido, ou seja, não expõe o organismo como um todo à radiação ionizante, como acontece na administração de quimioterapia^{59, 60}.

As localizações de maior preocupação no tratamento das neoplasias em crianças estão na radioterapia do tórax e pelve. Isso porque as células com maior radiosensibilidade, além das células tumorais, são as células da hematopoiese e células germinativas. A radiação de tumores localizados nos testículos, ovários e/ou aqueles presentes em tecidos adjacentes, como a bexiga, implica em esterilidade total para o paciente⁶⁰.

A radioterapia da pelve em crianças e adolescentes também promove mielodepressão, pois acometem em grau médio de radiosensibilidade as células hematopoiéticas dos ossos da bacia, principal produtor de células sanguíneas nessa faixa etária. O acompanhamento laboratorial através da realização periódica do hemograma ajuda no monitoramento do tratamento com a radioterapia, evitando o surgimento de episódios de febre e infecções oportunistas⁵⁹⁻⁶¹.

1.3 Febre no paciente oncológico pediátrico

Estudos demonstram que a febre no paciente oncológico é frequente em decorrência da imunodepressão causada pelos agentes quimioterápicos, doença de base e exposição a agentes biológicos em instituições de saúde durante os vários períodos de internação, sendo que 86% são hospitalizados devido aos episódios de febre⁵.

Os episódios de febre aliados à imunodepressão decorrente do uso de quimioterápicos ou radioterapia merecem atenção médica imediata. O risco aumentado de infecções nestes casos tem variabilidade conforme o tipo de deficiência ou tratamento ao qual este paciente é submetido, mas nem sempre é possível a identificação do agente etiológico⁴. Como em mais da metade dos episódios de febre o agente etiológico não é identificado, o consenso entre a maioria dos oncologistas é o tratamento com antibióticos de amplo espectro, com a finalidade de se estabelecer um tratamento prévio ao surgimento de uma infecção^{62, 63}.

Com base em estudos anteriores os pacientes são classificados conforme o grau de risco para o desenvolvimento de infecção, principalmente com a análise

do número de neutrófilos absolutos no sangue periférico, temperatura corpórea, fase da terapia e outros episódios de febre com detecção de microrganismo⁶³.

Os critérios de risco são listados no quadro abaixo:

Quadro 4: Classificação de risco nos episódios de febre.

<ul style="list-style-type: none">• Pacientes com baixo risco de infecção:<ul style="list-style-type: none">- São pacientes com contagem absoluta de neutrófilos < 1.000 células/mm³ até 500 células/mm³ em períodos menores de 7 dias, sem sinais e sintomas de disfunção renal e hepática.
<ul style="list-style-type: none">• Pacientes com alto risco de infecção:<ul style="list-style-type: none">- São pacientes com contagem absoluta de neutrófilos < 500 células/mm³ por um período superior a 7 dias, comprometimento renal e hepático;- Pacientes com contagem absoluta de neutrófilos < 100 células/mm³, independente do período de neutropenia e comprometimento dos rins e fígado.
<ul style="list-style-type: none">• Outros tipos de sinais e sintomas que aumentam o risco de infecção:<ul style="list-style-type: none">- Instabilidade hemodinâmica;- Mucosite oral ou gastrointestinal com episódio de vômito e diarreia;- Disfunção gastrointestinal, causando enjôo, vômitos e diarreia;- Alterações do sistema nervoso central;- Infecção de cateter venoso central;- Metástase pulmonar e hipoxemia;- Recidiva tumoral com metástase hepática e pulmonar;- Evidência de insuficiência hepática com aumento das transaminases > 5 vezes o valor normal;- Evidência de insuficiência renal com aumento do clearance de creatinina > 30 mL/min.

Fonte: adaptado de Friefeld, 2011.

Alguns estudos como o realizado por Peack *et al*, 2007 sugerem a coleta de vigilância e acompanhamento dos pacientes neutropênicos, desde a detecção da neutropenia no exame de hemograma, independente da detecção de febre. Este estudo utilizou as técnicas convencionais de detecção de microrganismos em casos de pacientes com suspeita de bacteremia, encontrando 23/773 (3,0%) hemoculturas positivas em pacientes oncológicos sem episódio de febre, mas com

neutropenia, sendo que destes, 18 apresentaram febre após 1 ou 2 dias da detecção da neutropenia e a hemocultura também foi positiva no episódio de febre⁶³.

1.3.1 Infecções em pacientes com câncer

O paciente com câncer pode ter o sistema imunológico comprometido em decorrência da própria doença de base, assim como pela administração de quimioterapia mielodepressiva e radioterapia. A associação entre quimioterapia e diminuição dos leucócitos e neutrófilos, causando febre e infecções foi descrita primeiramente por Bodey *et al*, 1966. As pesquisas realizadas por esse grupo perceberam que quanto menor o número de neutrófilos maior era a chance de febre e infecção, assim como, quanto maior o período da diminuição dos granulócitos maior era o risco de surgimento de complicações febris⁶².

É importante reconhecer que os tipos de infecção variam de paciente para paciente, em virtude do ambiente familiar e social em que vive, localização da doença de base, tipo de tratamento, etc., portanto, algumas neoplasias possuem maior índice de infecções por bactérias, outros por fungos e outros são mais susceptíveis a infecções virais^{4,63}.

Os Linfomas de Hodgkin e não Hodgkin pela diminuição da resposta imune celular promove maior sensibilidade a vírus e fungos aos pacientes acometidos por essa neoplasia. Todavia, os pacientes portadores de leucemia aguda são mais susceptíveis a microrganismos bacterianos *Gram negativos* pela diminuição do número de granulócitos neutrofílicos, tanto pela doença de base ao

diagnóstico, como pela fase inicial do tratamento com quimioterápicos mielossupressivos^{64, 65}.

No início do tratamento quimioterápico, as infecções bacterianas são consideradas como principal agente e o tratamento empírico com antimicrobianos são sempre utilizados na prática clínica, apesar de nem sempre ser possível a identificação do agente etiológico. Acredita-se que a sepse, nestes pacientes, está relacionada predominantemente, a translocação bacteriana proveniente do trato gastrointestinal ou respiratório, ou ainda, do cateter venoso central^{4, 9}.

1.3.2 Infecções causadas por Bactérias e Fungos em pacientes oncológicos pediátricos

Atualmente, as infecções causadas por bactérias em pacientes portadores de neoplasmas possuem maior atenção dos médicos oncologistas. Seja pela doença de base ou pela administração dos quimioterápicos e radioterapia, as bactérias que fazem parte da microbiota normal da pele, trato respiratório e trato gastrointestinal são suspeitas de causar febre e infecção⁴.

As infecções por bactérias **Gram negativas** e anaeróbicas normalmente são originadas de microrganismos da flora gastrointestinal. Já as infecções causadas por bactérias **Gram positivas** são originadas de microrganismos da pele e trato respiratório e normalmente também são encontradas em colonização de cateter venoso central e em mucosites causadas pelas altas doses de quimioterapia. Entretanto, as infecções causadas por bactérias **Gram negativas** possuem maior atenção dos médicos, pois normalmente são microrganismos de

maior resistência a antibióticos utilizados no tratamento empírico de amplo espectro⁷.

Os principais microrganismos bacterianos causadores de febre e infecção são listados na tabela 1, abaixo:

Tabela 1: Principais bactérias causadoras de febre e infecção em pacientes oncológicos pediátricos.

Bactérias	Gram positivas	Gram negativas
	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Streptococcus spp</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Enterococcus spp</i>	<i>Klebsiella spp</i>
	<i>Corynebacterium spp</i>	<i>Enterobacter spp</i>
	<i>Bacillus spp</i>	<i>Serratia spp</i>
	<i>Clostridium spp</i>	<i>Anaeróbios</i>

Fonte: Freifeld, 1997.

Apesar dos recentes avanços no diagnóstico dos episódios de febre em pacientes portadores de neoplasias, somente em 10% a 30% dos casos de febre são identificados os microrganismos. Contudo, quando identificado o agente etiológico pelos métodos laboratoriais convencionais como a hemocultura e urocultura, de 85% a 90% dos casos são bactérias Gram positivas e Gram negativas⁷.

Febre e infecções por fungos são menos frequentes em pacientes pediátricos portadores de neoplasias, entretanto, estas infecções aparecem com maior incidência em pacientes com prolongada neutropenia (> 10 dias), recebendo

altas doses de corticóides e durante a imunodepressão após transplantes de órgãos sólidos e medula óssea⁶³.

Os fungos podem causar infecções superficiais e profundas. As infecções superficiais acometem a pele, unha e cabelos, contudo em pacientes imunodeprimidos, as infecções superficiais que colonizam as camadas subcutâneas da pele podem causar abscessos ou granulomas. As infecções fúngicas profundas podem ocasionar fungemia sistêmica ou restrita, principalmente por fungos oportunistas como a *Candida spp*, *Aspergillus* e *Criptococcus*. Nestes pacientes existe risco considerável à vida e as infecções são caracterizadas por necrose tecidual, hemorragia e oclusão vascular⁶⁴.

Os fungos normalmente isolados através das técnicas laboratoriais tradicionais são listados na Tabela 2, a seguir:

Tabela 2: Principais fungos causadores de febre infecção em pacientes oncológicos pediátricos.

Fungos

Candida spp

Aspergillus spp

Zygomycetes

Fusarium spp

Scedosporium spp

Cryptococcus neoformans

Pneumocystis jirovec

Fonte: Freifeld, 1997.

Através das técnicas tradicionais utilizadas na rotina laboratorial um pequeno número de fungos é identificado, pois esses microrganismos possuem crescimento lento, mas com a introdução das técnicas de biologia molecular um número maior desses microrganismos podem ser identificados em pacientes pediátricos portadores de doença oncológica com febre e neutropenia prolongada, enquanto em outros tipos de pacientes a detecção foi menor⁶⁴.

1.3.3 Infecções causadas por Vírus em pacientes oncológicos pediátricos.

Os episódios de febre em pacientes oncológicos pediátricos, na grande maioria dos casos, são tratados como febre de origem desconhecida em cerca de 40% a 70%. Os microrganismos identificados na rotina laboratorial através da hemocultura restringem-se a bactérias e fungos. O caso de febre provocado por agentes etiológicos virais é pouco identificado na rotina laboratorial, entretanto, a forma de transmissão e a patogênese causada pelos vírus são muito mais fáceis de acometer crianças do que fungos e bactérias⁶³⁻⁶⁵.

Vírus respiratórios são transmitidos através de secreções e gotículas aéreas de forma que a transmissão entre indivíduos da mesma espécie é rápida e capaz de causar epidemias⁶⁵. Outros vírus são caracterizados por infecções leves e assintomáticas em crianças com sistema imunológico em boas condições, como o *Herpes simplex* e sua reativação podem ocorrer em pacientes imunodeprimidos. Esse e outros vírus da família *Herpesviridae* são caracterizados por permanecer em estado de latência durante muitos anos após a primeira infecção, podendo causar reinfecções em pacientes imunodeprimidos, como as crianças portadoras de neoplasias. A infecção primária pelo *Citomegalovírus* ou sua reativação podem

causar pneumonia, colite, hepatite, pancitopenia e febre em pacientes após quimioterapia antineoplásica e transplantados⁶⁶⁻⁶⁹.

1.4 Vírus da Família *Herpesviridae* em pacientes pediátricos com episódios de febre.

Diversos estudos sugerem que a participação dos vírus nos episódios de febre deve ser considerada. Os vírus da família *Herpesviridae*, como o Herpesvírus Humano 4 (Vírus Epstein-Barr – EBV /HHV-4), Herpesvírus Humano 5 (Citomegalovírus Humano – CMVH), Herpesvírus Humano 6 (HHV-6), variante A e B e o Herpesvírus Humano 7 (HHV-7), são conhecidos patógenos causadores de infecção em pacientes portadores da imunodeficiência humana adquirida e em pacientes submetidos a transplante de medula óssea ou órgãos sólidos. Entretanto, o estudo da participação desses vírus como agentes infecciosos em pacientes portadores de doenças oncológicas é pouco descrito na literatura^{70, 71}.

Os vírus da família *Herpesviridae* possuem DNA como material genético envelopado por um capsídeo icosaédrico. São divididos em *Alphaherpesvirus* – *herpesvírus tipos 1 e 2* (HHV-1 e HHV-2) e *Vírus da Varicela-zoster* (HHV-3); *Betaherpesvirus* – *Citomegalovírus Humano*, *herpesvírus tipos 6 e 7* (CMVH, HHV-6 e HHV-7) e *Gamaherpesvirus* – *Epstein-Barr vírus* (EBV/HHV-4) e HHV-8. São considerados vírus cosmopolitas, infectando todos os grupos raciais e não possui sazonalidade definida, ou seja, causa infecção durante todo ano. O homem é seu único hospedeiro, sendo altamente espécie-específico. Esses patógenos geralmente produzem infecções sem sinais e sintomas clínicos relevantes, acometendo principalmente crianças na primeira infância⁷¹.

Uma característica relevante dos herpesvírus é a capacidade de permanecer em latência no organismo do hospedeiro infectado, reativando-se quando estes se encontram com o sistema imunológico comprometido, como nos casos de doenças oncológicas⁷²⁻⁷⁴.

As estruturas básicas comuns a todos os membros da família *Herpesviridae* são mostradas na figura 4 abaixo:

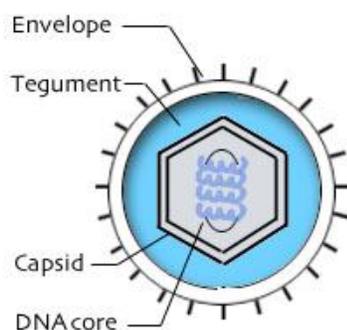


Figura 4: Estrutura básica presente na maioria dos herpesvírus. **Fonte:** <http://stdgen.northwestern.edu>

1.4.1 Herpesvírus Humano 4 (Vírus Epstein-Barr – EBV)

O EBV foi descoberto em 1964 por Epstein e Barr, que lhe deram o nome. Foi identificado a partir da observação de viriões típicos dos herpesvírus humanos numa biópsia ao Linfoma de Burkitt do tipo africano. Desde então, está amplamente relacionado à mononucleose em crianças menores de 5 anos e em adultos jovens, assim como no surgimento de alguns tipos de câncer. Apresenta uma vasta distribuição mundial e transmitem-se pela saliva, objetos contaminados (escova de dente, talheres, louça, etc.) ou através de transfusões de sangue⁷⁶⁻⁷⁸.

O EBV faz parte da subfamília dos herpesvírus denominada *Gamaherpesviridae*, gênero *Epstein-Barr vírus*. É composto por um capsídeo revestido por glicoproteínas tegumentares de adesão com aproximadamente 180nm de diâmetro no qual está inserido o material genético composto por DNA de 172 kpb de comprimento⁷⁸.

O período de incubação pode variar de 30 dias a mais de 50 dias, dependendo do estado fisiológico do infectado. Normalmente acomete as glândulas da região cervical, e em indivíduos com perfeita saúde pode ser assintomática ou gerar a mononucleose, caracterizada pela presença de linfócitos atípicos com aspecto monocitóide ao exame de hemograma⁷⁹. O leucograma pode estar normal ou ligeiramente aumentado em pacientes sem doença oncológica, entretanto, as características dessa infecção em pacientes oncológicos pediátricos sob tratamento com quimioterápicos ainda não estão bem estabelecidas⁷³.

Após a infecção, o EBV permanece latente no interior dos linfócitos B do sangue periférico, medula óssea, linfonodos e tecidos^{76,79-81}. A representação do linfócito infectado pelo EBV em um caso de mononucleose infecciosa confirmada por sorologia positiva (IgM e IgG) está na Figura 5:

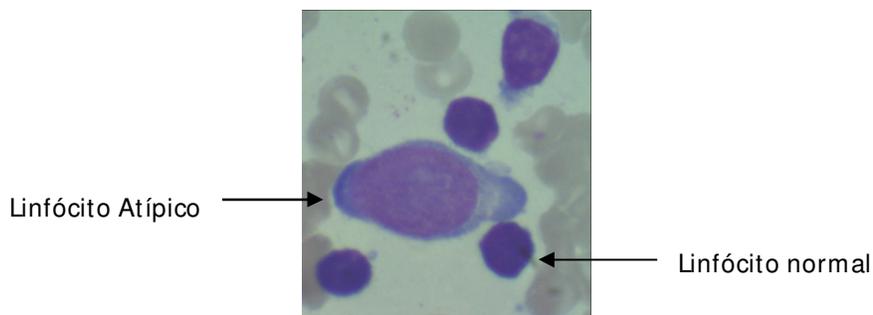


Figura 5: Linfócito monocitóide e quatro linfócitos normais. **Fonte:** Laboratório Grendacc.

1.4.2 Herpesvírus Humano 5 (Citomegalovírus Humano - CMVH)

O CMVH pertence à família *Herpeviridae*, subfamília *Betaherpesviridae* e gênero *Cytomegalovirus*, sendo o maior tipo de herpesvírus com tamanho médio de 200nm. A partícula viral consiste de um capsídeo de 110nm de diâmetro composto por 162 capsômeros revestido por proteínas tegumentares, no interior se encontra o material genético (DNA) com aproximadamente 240 kpb⁸¹⁻⁸³.

A maioria das pessoas adultas em todo o mundo já foi infectada pelo Citomegalovírus Humano (CMVH)⁸⁴.

As manifestações clínicas resultantes de uma infecção por CMVH dependem da condição do sistema imunológico do indivíduo e do modo de contaminação do mesmo. São geralmente infecções assintomáticas, adquiridas durante a primeira infância, que algumas vezes podem causar alteração na morfologia linfocitária promovendo uma infecção muito semelhante à mononucleose causada pelo EBV. Diversos trabalhos foram realizados em relação à infecção primária e reativação do CMVH em pacientes que realizaram transplante de medula óssea ou órgãos sólidos, sugerindo que o tratamento precoce mediado pela positivação dos testes diagnósticos de infecção ativa são válidos para o controle da infecção e da doença associada, uma vez que a terapia universal com o medicamento específico utilizado pode causar neutropenia nos pacientes imunodeprimidos^{84,85}.

Independentemente do modo de infecção, a criança libera na urina, grandes quantidades do CMVH, durante longos períodos, constituindo uma fonte de disseminação. Em pacientes com doença oncológica, podem surgir

complicações graves, como por exemplo, pneumonite intersticial⁷⁸. A figura abaixo mostra as características morfológicas do CMVH.

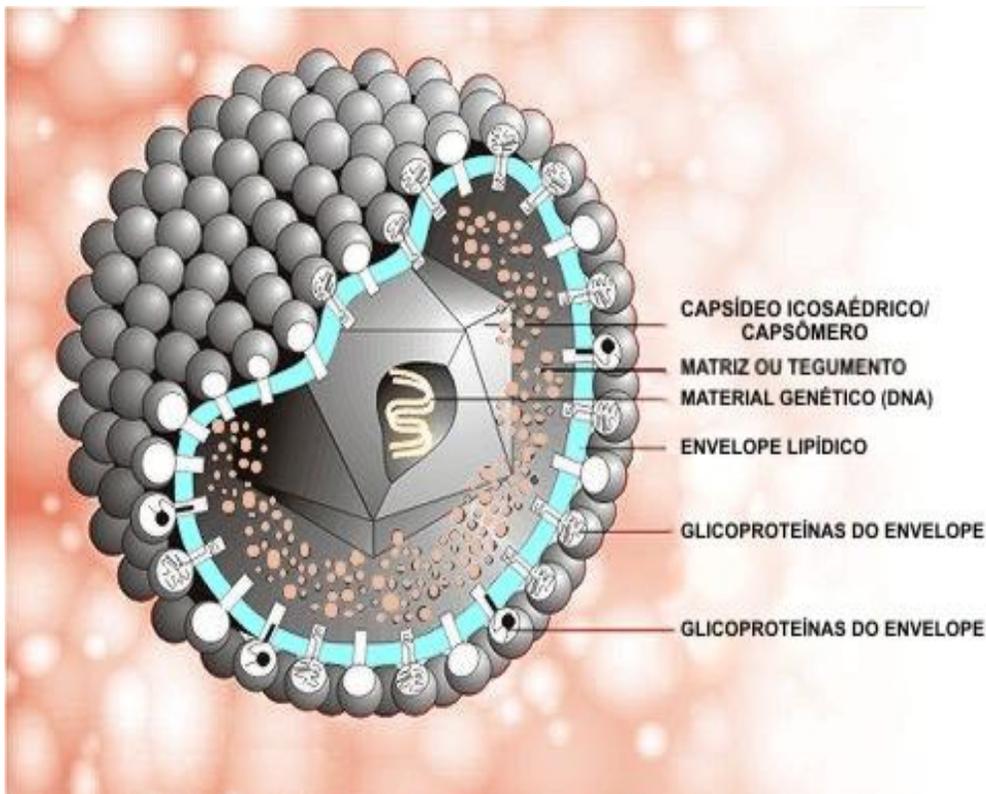


Figura 6: Estrutura do Citomegalovírus. **Fonte:** modificado de <http://biografix.de/>

1.4.3 Herpesvírus Humano 6 (HHV-6)

Inicialmente denominado por Vírus Humano B – linfotrópico, o HHV-6 foi primeiramente isolado em pacientes portadores de AIDS ou doença linfoproliferativa por Salahuddin em 1986. A partícula viral possui entre 160nm e 200nm de tamanho, o DNA viral central está envolto por um capsídeo e uma estrutura tegumentar de revestimento, assim como os demais herpesvírus. O DNA

é formado por um conjunto de genes de aproximadamente 159 kpb a 170 kpb de tamanho e possui sete genes em comum com os demais herpesvírus⁸⁶⁻⁸⁹.

Como a maioria dos herpesvírus, permanece no hospedeiro em períodos prolongados de latência no interior dos linfócitos B, monócitos e células das glândulas salivares que secretam em pequenas quantidades HHV-6 juntamente com a saliva, reativando-se em períodos de imunodepressão prolongada⁸⁶. A frequente detecção do DNA do HHV-6 em saliva e tecido de glândulas salivares sugere que a saliva é um veículo de transmissão tanto de mãe para filho quanto de criança para criança. A detecção do DNA viral em cordão umbilical de recém-nascidos saudáveis e em ausência de imunoglobulinas M (IgM) no soro corroboram com a hipótese de transmissão intra-uterina⁹⁰.

O HHV-6 é um *Betaherpesvirus* com subgrupos A e B e está relacionado principalmente com roséola e exantema súbito, sendo denominada a primeira infecção que acomete crianças de até 3 anos de idade, mas geralmente ocorre no primeiro ano após o nascimento ou através da via transplacentária em um número menor de casos. Cerca de 100% dos indivíduos possuem sorologia positiva para o HHV-6 demonstrando seu acometimento mundial, ainda não foi comprovada sua sazonalidade em estudos científicos⁸⁸. O subgrupo B é a variante freqüentemente relacionada com a infecção de indivíduos sadios e a variante A possui maior relação com pacientes imunodeprimidos, onde muitas vezes pode causar febre e complicações no sistema nervoso central como encefalite, principalmente em pacientes portadores do HIV. Já em pacientes com imunodepressão prolongada por doença oncológica a infecção ou reativação viral é responsável por sérias

complicações infecciosas como mielodepressão, pneumonia, encefalopatias, hepatite e febre^{74, 87}.

1.4.4 Herpesvírus Humano 7 (HHV-7)

O HHV-7 também é um membro da subfamília *Betaherpesvirus*, gênero *Herpesvírus humano 7* e suas características são semelhantes às do HHV-6. Foi isolado primeiramente da saliva de indivíduos saudáveis e posteriormente em doentes com Síndrome da Fadiga Crônica na década de 1990⁹¹.

Sua capacidade de causar doença com sinais e sintomas em indivíduos sem quaisquer alterações do sistema imunológico é a menor entre os herpesvírus. Algumas vezes pode causar o surgimento de roséolas, assim como no HHV-6, raramente causa febre, permanecendo os sinais por cerca de 6 dias. A primeira infecção aparece por volta dos 5 anos de idade, acometendo cerca de 95% da população pediátrica⁹². Após a infecção primária, ele permanece no hospedeiro em latência no interior dos linfócitos, podendo causar reativação e infecção em períodos de imunodepressão. Em pacientes imunocomprometidos, como portadores de doenças oncológicas e pacientes que receberam transplante de medula óssea ou órgãos sólidos, o HHV-7 está relacionado com a presença do CMVH e/ou HHV-6 causando episódios de febre e infecção concomitante⁸⁹.

A replicação viral do HHV-7 induz à perda do receptor CD4 na superfície celular. Estudos demonstram que o HHV-7 *in vitro* pode competir com o HIV (vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida tipo 1), interferindo negativamente na replicação deste último em cultura. Mas, *in vivo*, o efeito sobre a replicação do

HIV-1 permanece incerto e merece investigação, principalmente em crianças com infecção primária pelo HHV-7⁹².

A prevalência da infecção primária pelo HHV-7 na população em geral é alta, sendo de cerca de 5 infectados para cada 7 crianças (71%) segundo relatos de Tanaka e col. (1994)⁹². No Brasil, 93% dos indivíduos adultos e das crianças maiores de dez anos de idade apresentam anticorpos de classe IgG contra o HHV-7. A primeira infecção pelo HHV-7 incide em idades entre 5 e 6 anos de vida, um pouco mais tarde do que ocorre para o Herpesvírus Humano Tipo 6 (HHV-6), a qual ocorre aos 2 anos, aproximadamente⁹². A infecção pelo HHV-7 pode ocorrer tardiamente em regiões tropicais, como o Brasil⁹¹.

A transmissão horizontal do HHV-7 se dá, provavelmente, através da saliva. O índice de isolamento do HHV-7 a partir da saliva é muito alto, cerca de 75%^{91,92}.

1.5 Diagnóstico laboratorial clássico de infecção nos episódios de febre de pacientes oncológicos pediátricos

O diagnóstico laboratorial nos episódios de febre geralmente inicia-se pela coleta do hemograma, hemocultura periférica e de cateter (quando indicado), urocultura (suspeita de infecção urinária), dosagem de proteína C reativa quantitativa e realização do perfil hepático e renal⁶³.

Dependo das características e sinais verificados durante o exame médico a pesquisa de infecção pulmonar através de RX de tórax faz-se necessária.

1.5.1 Hemograma

A contagem e qualificação das células através da análise do sangue periférico em pacientes portadores de doenças oncológica são eventos regulares e muitas vezes no início do tratamento são realizadas diariamente. A esse exame chamamos Hemograma, pois analisa das 3 linhagens de células que compõem o sangue periférico e teoricamente é dividido em eritrograma, leucograma e plaquetograma⁹³.

O leucograma representa o melhor dado para avaliação do sistema imunológico celular do sangue periférico, onde podemos avaliar os valores quantitativos e a qualidade das células do sistema imunológico de cada paciente⁹³.

A contagem global de leucócitos em pacientes oncológicos pediátricos é padrão de avaliação para suspensão do tratamento ou continuidade do mesmo, assim como sugestivo de prováveis infecções após vários ciclos de medicamentos quimioterápicos, que possuem como efeito colateral a diminuição dos leucócitos totais e mielodepressão. O leucograma é dividido em 5 tipos celulares diferentes, composto por neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos. Atualmente, a maior atenção é dada ao número global de neutrófilos, pois sua diminuição chamada neutropenia, normalmente está relacionada a episódios de febre e infecção, muitas vezes sem origem determinada. A contagem global de neutrófilos em indivíduos sadios normalmente está estabelecida entre 3.000 a 8.000 neutrófilos/mm³. Níveis inferiores a 500 células/mm³ são caracterizados como neutropenia severa, menores que 100 neutrófilos/mm³ risco grave de septicemia. Pacientes sob protocolos quimioterápicos que causam mielodepressão com

neutrófilos de aproximadamente 1.000 células/mm³ com risco de diminuição pela continuidade do protocolo devem ser acompanhadas diariamente através do hemograma⁹³⁻⁹⁵.

1.5.2 Hemocultura

Em decorrência da diminuição do número de leucócitos e conseqüentemente de neutrófilos, os episódios de febre em pacientes portadores de neoplasia são freqüentes⁴.

Atualmente a pesquisa do envolvimento de microrganismos nos episódios de febre na rotina laboratorial dessa população tem como padrão “ouro” a coleta de hemocultura de sangue periférico e de cateter quando indicado. Através da hemocultura é possível diagnosticar a presença de bactérias e fungos pela incubação em meios de cultura apropriados para muitos tipos de microrganismos. São coletados através de punção periférica pelo menos 5 mL de sangue imediatamente incubados em meios de cultura e levados a estufa bacteriológica a 37°C por até 5 dias, onde serão observados ou não o crescimento de microrganismos⁹⁶.

A utilização da hemocultura faz-se na rotina laboratorial atualmente, pela facilidade de realização do teste e pelo baixo custo de realização do exame. A hemocultura permite a realização de coletas diárias para vigilância dos episódios de febre, sem gerar grandes custos para as instituições de assistência ao paciente com câncer. Entretanto, sua positividade é relativamente baixa e varia entre 8% até 25% e em alguns estudos existe o consenso de que a freqüência de exames falso – negativos é alta^{96,97}.

1.5.3 Urocultura

A cultura de urina se faz necessária, durante o episódio de febre, sempre que o paciente apresentar sinais e sintomas de infecção urinária, que incluem dor ao urinar, presença de hematúria macroscópica, vermelhidão de mucosas e presença de secreções⁹⁷.

O teste é realizado através da incubação em meios de cultura apropriados para microrganismos que causam infecção das vias urinárias em estufas bacteriológicas a 37°C por pelo menos 24 horas. Quando ocorrer crescimento bacteriano, ou seja, formação de colônias, é realizada a contagem de colônias e identificação da espécie bacteriana ou fúngica através de testes de coloração e bioquímicos⁹⁸.

1.5.4 Antibiograma e Antifungigrama

Quando ocorrer crescimento bacteriano, tanto no teste de hemocultura como no teste de urocultura a realização do teste de antibiograma ou antifungigrama se faz necessário para a identificação da sensibilidade bacteriana ou fúngica às drogas testadas. São testados diversos tipos de antibióticos e antifúngicos através a inoculação de pequenos discos contendo as drogas a serem testadas diretamente em meio de cultura semeado com a amostra positiva⁹⁶. A presença de grandes “alôs” ao redor dos discos contendo as drogas testadas representa sensibilidade da cepa ao antibiótico ou antifúngico, conforme mostrado na figura abaixo (Figura 7):

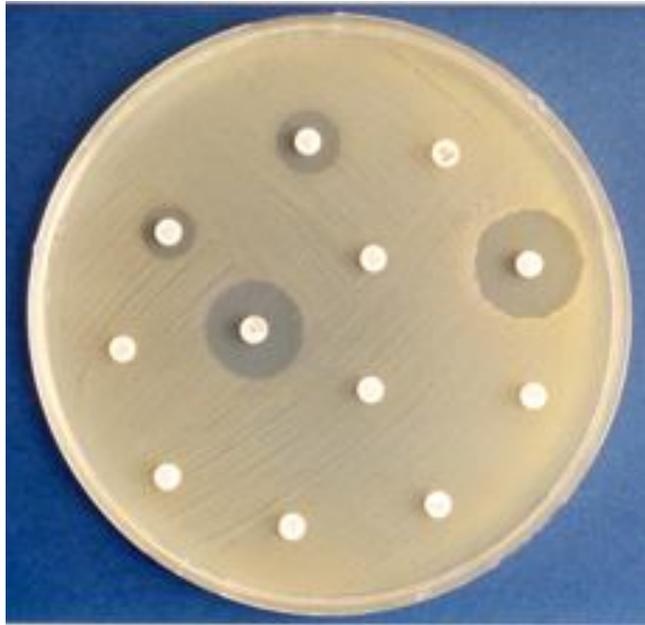


Figura 7: Antibiograma realizado no laboratório de pesquisas microbiológicas do Instituto Oswaldo Cruz, RJ (2007).

1.5.5 Testes sorológicos

Os testes sorológicos são realizados para a identificação de anticorpos específicos contra alguns tipos de microrganismos, principalmente virais. Os exames normalmente são realizados no momento do diagnóstico da doença oncológica, juntamente com os demais testes bioquímicos. Durante a rotina laboratorial a pesquisa de imunoglobulinas através dos testes sorológicos não é realizada com freqüência, pois o tempo de realização dos testes é longo e os microrganismos de maior interesse aos médicos assistentes não são realizados nesse tipo de exame⁹⁸.

A sorologia pode ser realizada por vários tipos de técnicas diferentes, entretanto as mais utilizadas são o ELISA e a Imunofluorescência Indireta. Em ambas, o objetivo é a identificação de imunoglobulinas contra um microrganismo

específico através da exposição do soro do paciente aos antígenos fixados em um tubo ou placa de ensaio. Após algumas incubações e lavagens da placa um leitor faz a identificação da fixação ou não dos anticorpos nos antígenos e declara o teste como positivo ou negativo⁹⁹.

As imunoglobulinas normalmente pesquisadas nesse tipo de exame são das classes imunoglobulina M de fase aguda da infecção e imunoglobulina G de fase crônica, ou seja, através da medida da titularidade dos anticorpos podemos avaliar o período da infecção como agudo, onde a titularidade de IgM é maior que a de IgG. Fase de transição, onde a titularidade entre as imunoglobulinas é praticamente equivalente e uma fase crônica em que a concentração de IgG é superior à quantidade de IgM^{98,99}.

A sorologia nos pacientes oncológicos pediátricos é realizada somente no momento do diagnóstico, sendo pouco solicitado na rotina laboratorial do paciente com câncer. Os testes realizados no momento do diagnóstico incluem somente o EBV e o CMV, pois até o momento são considerados herpesvírus potenciais causadores de neoplasias, sendo o HHV-6 e HHV-7 não pesquisados na rotina convencional⁷⁷⁻⁷⁹.

1.5.6 Métodos Moleculares

Os testes moleculares começaram seu desenvolvimento entre as décadas de 70 e 80 e se expandiram rapidamente entre o meio científico e para a rotina laboratorial. Após o desenvolvimento dos testes utilizando antígenos pré-fixados em meio como tubos e placas de ensaio, veio o desenvolvimento concomitante de anticorpos monoclonais para a pesquisa do antígeno diretamente na amostra de

um paciente como no teste de antigenemia. No final da década de 1980 desenvolveu-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) que possibilitou a amplificação da quantidade de material genético em uma amostra biológica, sendo na década de 1990 foi aperfeiçoada a técnica, surgindo muitas outras derivadas da PCR convencional com a Nested PCR⁴.

1.5.6.1 Antigenemia para Citomegalovírus Humano (detecção do antígeno *pp65* do CMVH por imunofluorescência)

A técnica de pesquisa de antígenos virais através da utilização de anticorpos monoclonais como a técnica da Antigenemia, foi considerada como um grande avanço no diagnóstico de infecção ativa pelo CMVH em pacientes receptores de transplantes de medula e órgãos sólidos. A técnica possibilita a identificação qualitativa e quantitativa do antígeno viral *pp65* diretamente nos leucócitos do paciente, sendo considerado um marcador precoce de infecção ativa¹⁰¹. O antígeno viral *pp65* é identificado nos lóbulos nucleares dos polimorfonucleares neutrofílicos quando o processo de infecção pelo CMVH encontra-se na fase precoce do seu ciclo de replicação^{84,85}.

A limitação do teste consiste na identificação de partículas virais somente no interior dos neutrófilos, entretanto os resultados quantitativos em número de células infectadas podem auxiliar na monitorização do tratamento com antivirais¹⁰¹.

O teste de antigenemia consiste da análise de leucócitos isolados a partir da coleta de sangue total em tubo com anticoagulante EDTA, isolamento dos leucócitos do sangue periférico pela lise direta dos eritrócitos, com tampão de lise,

preparação de lâminas para microscopia, imunocoloração com o uso de anticorpos monoclonais contra o CMVH, incubação e lavagens, avaliação microscópica e contagem de células positivas^{101,102}.

As desvantagens da técnica de antígenemia são que ela não pode ser realizada em pacientes com neutropenia¹⁰¹, existe a necessidade de equipamentos específicos como microscópio de imunofluorescência, processamento imediato das amostras e microscopistas altamente treinados nas identificações das células positivas⁷¹.

1.5.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (Nested PCR).

Com a introdução da amplificação de DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR), a detecção de microrganismos aumentou consideravelmente em amostras contendo pequena concentração de material genético viral^{103,104}. A amplificação gênica por meio da PCR permite a produção de grandes quantidades de fragmentos específicos de DNA alvo a partir de substratos complexos e em baixas concentrações¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Este procedimento consiste em repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de uma enzima chamada *Taq* polimerase e por pelo menos dois iniciadores chamados “primers” com orientações opostas para a realização de uma cópia da sequência alvo¹⁰⁵. Essa enzima permite o trabalho em altas temperaturas, otimizando a reação sem a necessidade da inclusão de enzima a cada ciclo do teste. Portanto, o exame consiste na cópia de uma determinada sequência do DNA viral através de vários ciclos de clonagem da mesma, aumentando o número de cópias do fragmento alvo muitas vezes mais do que se encontrava na amostra

do paciente. Os “primers” com sua orientação oposta permitem que a síntese de DNA ocorra na região interna entre eles. Logo o produto da extensão de um “primer” é utilizado como substrato para o outro em um novo ciclo da reação, o que resulta a cada novo ciclo na duplicação do DNA do ciclo anterior. Temos então uma produção exponencial do número de cópias de um determinado fragmento alvo podendo chegar a ordem de 10^6 cópia de uma sequência a partir de uma simples molécula de DNA viral, por exemplo¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

A PCR é um método rápido de realização após a extração do material genético das amostras biológicas, específico e extremamente sensível, porém devido a sua alta sensibilidade os principais problemas são os resultados falso-positivos derivados da contaminação na execução dos testes. Resultados falso-negativos podem ser causados pela variabilidade genética dos microrganismos ou pela presença de inibidores da reação. As amostras para a realização da PCR são mais estáveis em relação aquelas utilizadas para a realização da Antigenemia e podem ser estocadas em geladeira por até 72 horas antes da extração do material genético sem grandes perdas na concentração do DNA total^{107, 108}.

O aumento da especificidade e sensibilidade da PCR foi alcançado com a implementação do teste de dupla PCR chamada de “Nested-PCR”. Essa reação consiste na realização de uma nova amplificação a partir do resultado de amplificação de uma primeira PCR. Na prática são “desenhados” dois pares de “primers” que são utilizados em duas etapas distintas da reação, o primeiro conjunto de “primers” é chamado “primers externos” e tem por objetivo amplificar uma sequência do DNA alvo maior, enquanto que o segundo conjunto, chamado de “primers internos” tem por finalidade amplificar uma sequência interna à

sequência amplificada pelos “primers externos” aumentando ainda mais a concentração do DNA alvo. Após a segunda reação o produto é então detectado através da eletroforese em gel de agarose¹¹⁰.

Ambos os testes, Antigenemia de N-PCR, foram idealizados neste estudo com a finalidade de estabelecer infecção ativa nos pacientes oncológicos pediátricos, sendo que o teste de Antigenemia fica restrito ao CMVH e a N-PCR pode ser utilizada para a pesquisa de infecção ativa nos quatro tipos de herpesvírus escolhidos para este trabalho, são eles: CMVH, EBV, HHV-6 e HHV-7. Novos testes moleculares foram propostos para a realização de estudos futuros, como a reação em cadeia da polimerase em tempo real, a qual permite uma série de avanços no diagnóstico e pesquisa de DNA e RNA. Vantagem é a utilização do soro no diagnóstico da infecção ativa.

1.5.6.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real é uma adaptação da técnica de PCR convencional que permite a detecção da amplificação da sequência alvo a cada ciclo da reação¹⁰⁶.

Essa técnica foi aprimorada contendo a *Taq* DNA polimerase, um par de primers e a introdução de uma sonda com parte do DNA alvo marcada com um fluoróforo que quando ocorre o processo de anelamento e extensão para a formação de uma nova cópia da sequência alvo ela emite luz, captada por um sistema óptico/eletrônico. A PCR em tempo real permitiu então a detecção de DNA alvo em um menor período de tempo, dispensando a corrida em gel de

agarose com substâncias tóxicas aos executores da pesquisa e que demandava um tempo maior na sua realização¹⁰⁸.

Para a utilização na pesquisa viral podemos utilizar a PCR em tempo real quantitativa (qPCR). Este tipo de PCR nos possibilita a detecção da carga viral presente em uma determinada amostra biológica, através da utilização de uma curva padrão para comparação¹⁰⁸. Normalmente os resultados são expressos em número de cópias do DNA alvo, após a análise da curva da reação, conforme figura abaixo:

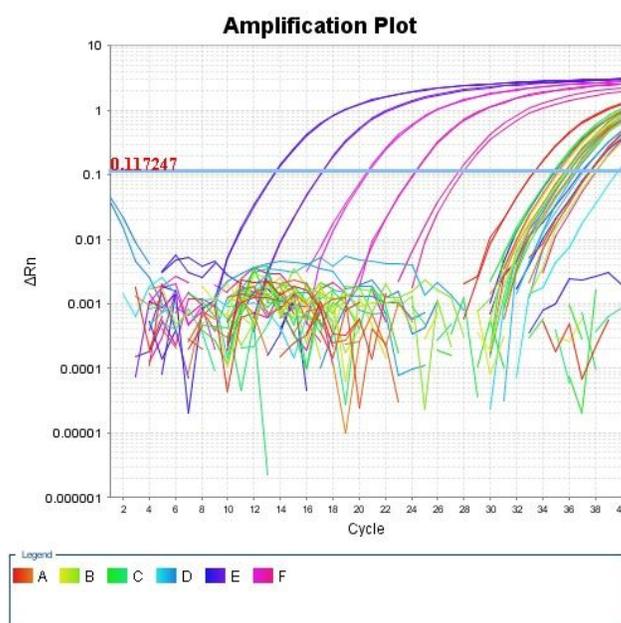


Figura 8: Curva padrão qPCR. **Fonte:** Laboratório de Vírus FCM/Unicamp.

A qPCR permite comparar o perfil da febre com a quantificação da carga viral e com isso estabelecer novos padrões de risco para os pacientes oncológicos pediátricos com episódios de febre. Atualmente, outra vantagem da PCR em tempo real é a disponibilização de kits comerciais com a possibilidade de detecção

de vários tipos de microrganismos em uma mesma reação, chamada de multiplex PCR, contudo esse tipo de teste não permite a quantificação absoluta da carga viral, somente aponta para presença ou ausência da seqüência alvo desejada. Entretanto, a realização da técnica necessita de intensa padronização, com utilização de clonagem de amostras de herpesvírus, diluição seriada e construção da curva-padrão. Outra desvantagem da qPCR está relacionada ao custo dos equipamentos, reagentes e materiais de consumo, em sua grande maioria de fabricação fora do nosso país.

Atualmente, inúmeras tecnologias de promoção e recuperação da saúde foram incorporadas ao tratamento de pacientes de alto risco através de estudo científicos, tendo como meta principal o diagnóstico etiológico no menor período de tempo possível e com alta confiabilidade. Doenças até então não detectáveis ou de difícil diagnóstico, estão sendo conhecidas através do conhecimento dos genomas e disponibilização das técnicas monoclonais e moleculares de diagnóstico. Por outro lado, nenhum teste molecular substituirá os métodos convencionais, o exame e o raciocínio clínico. Saber escolher entre todas essas ferramentas tecnológicas para traçar o melhor caminho de se chegar ao diagnóstico etiológico dos episódios de febre de cada paciente oncológico pediátrico traduz a competência médica e a qualidade das análises, constituindo a maior integração clínico - laboratorial nas crianças com câncer em episódios febris.

2. Objetivos

- Verificar a presença de infecção ativa causada pelos vírus Epstein-Barr (EBV), Citomegalovírus Humano (CMVH), HHV-6 E HHV-7 através da Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested (N-PCR) e Antigenemia para CMVH em amostras de sangue coletadas de pacientes oncológicos pediátricos em episódios febris;
- Verificar o impacto clínico causado pela infecção ativa causada pelos herpesvírus detectada pelas técnicas da Antigenemia e da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tipo Nested em pacientes oncológicos pediátricos em episódios febris.

3. Casuística e Métodos

3.1 Casuística

O estudo foi do tipo prospectivo realizado no período de Maio de 2010 a Dezembro de 2011, no Laboratório de Vírus da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, no hospital infantil do Grupo em Defesa da Criança com Câncer (GRENDACC), conveniado ao Sistema Único de Saúde (SUS). Os pacientes atendidos pela instituição possuem idade de 0 a 19 anos, são portadores de doença oncológica e estavam em período de tratamento da neoplasia.

O hospital do GRENDACC possui atendimento como hospital-dia e em nível ambulatorial, constituído por 7 consultórios, setor de quimioterapia com 15 leitos sendo 6 de isolamento. Possui ainda laboratório de análises clínicas e equipe multidisciplinar para acompanhamento dos casos.

3.2 Critérios de inclusão

O estudo incluiu crianças e adolescentes de zero a 19 anos de idade, portadoras de doença oncológica, com um ou mais episódios de febre com temperatura axilar igual ou superior a $37,8^{\circ}\text{C}$ em pelo menos 24 horas antes da coleta do material. As amostras de material biológico da população estudada foram coletadas somente após a assinatura do termo de consentimento pelos responsáveis pelo paciente (Anexo I).

3.3 Critérios de exclusão

Foram excluídas as crianças cujo responsável não aceitou em participar da pesquisa ou crianças com risco iminente de vida e outras condições que impeçam a

coleta de um dos materiais biológicos.

3.4 Critérios utilizados para Definição de Infecção Ativa e Doença por Herpesvírus:

O diagnóstico de infecção ativa herpética foi baseado na história das características de infecção. As informações foram coletadas utilizando-se protocolos padronizados. Para avaliar as condições clínicas e a gravidade do caso foi utilizado o escore clínico modificado proposto por Boeck *et al*, 1997. As definições utilizadas neste estudo foram as seguintes:

- **Febre:** temperatura axilar maior que 38°C durante em período anterior de até uma hora ou ao menos duas medidas de temperatura axilar de 37,8°C em 24 horas em intervalo de até 30 dias do último ciclo de quimioterapia¹¹¹;
- **Infecção Ativa pelos Herpesvírus:** foi considerada infecção ativa a detecção do DNA dos herpesvírus pela técnica de Nested-PCR e/ou a detecção do antígeno pela técnica da Antigenemia para CMVH em amostras de sangue dos pacientes estudados¹⁰⁹, como se segue:
- **Infecção ativa pelo CMVH:** uma ou mais reações positivas de Nested-PCR no soro e/ou uma ou mais células antígeno-positivas para CMVH, detectadas nos leucócitos polimorfonucleares através da técnica da antigenemia¹¹².
- **Infecção ativa pelo EBV:** uma ou mais reações positivas para EBV no soro ou plasma através da N-PCR^{79,80}.

- **Infecção ativa pelo HHV-6:** duas ou mais reações positivas para HHV-6, consecutivas de N-PCR no sangue total (conforme proposto por Einsele *et al*, 1995 para definir infecção ativa para o CMVH)¹¹³.
- **Infecção ativa pelo HHV-7:** uma ou mais reações positivas para HHV-7 no soro ou plasma através da N-PCR¹¹².
- **Sintomas de Doença por Herpesvírus:** pacientes com desenvolvimento de sintomas como febre, hepatoesplenomegalia, aumento dos linfonodos com ou sem neutropenia, erupções cutâneas, disfunção hepática (TGO e TGP alterados), sintomas no trato gastrointestinal, pneumonite intersticial, microangiopatia trombótica, encefalite e mielossupressão¹¹⁰ juntamente com a positividade dos testes laboratoriais de infecção ativa pelos herpesvírus acima descritos foram considerados como sintomas de doença por herpesvírus⁸².

3.5 Métodos

3.5.1 Detecção da Infecção Ativa por CMVH através da Antigenemia (detecção do antígeno *pp65* do CMVH).

O teste de antigenemia seguiu o método descrito em literatura¹⁰¹ com algumas modificações:

1- Extração de Polimorfonucleares: as amostras de sangue foram enviadas ao laboratório no máximo até 6 horas após a coleta; foi coletado pelo menos 10 ml de sangue total.

2- Preparação das Lâminas: foi preparada uma suspensão com $1,5$ a 2×10^6 células/ml, colocado 100 μ l desta solução por “cup” da citocentrífuga (Marca Revan – mod. Citociclo) e centrifugado por 5 minutos à 970 RPM (as lâminas serão feitas em duplicatas). A seguir as lâminas foram secas, fixadas com Paraformaldeído por 10 minutos, lavadas 3 a 4 vezes com PBS e soro fetal bovino e permeabilizadas com Nonidet P-40 por 5 minutos; após nova lavagem, as lâminas foram novamente secas 10 minutos à temperatura ambiente e a área da reação foi delimitada com esmalte. Após, foram embrulhadas em papel manteiga e papel alumínio e estocadas à temperatura de -80°C , até o momento da revelação.

3 - Coloração das Lâminas: As lâminas foram rinsadas com PBS e escorridas. O anticorpo monoclonal utilizado foi o CMV Brite® Turbo (Rozenburglaan, Netherlands), contendo uma combinação de anticorpos monoclonais C-10 e C-11, que reconhecem o antígeno *pp65*.

A seguir, foram aplicados 35 µl de monoclonal por área de reação, incubado por 60 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A área de reação na lâmina a partir desse ponto, não pode secar. A seguir, as lâminas foram lavadas 3 vezes, 5 minutos cada, com PBS.

Foi aplicado glicerina tamponada (1 gota) e coberto com lamínula para observação. As lâminas foram mantidas em geladeira até o momento da leitura para evitar perda da coloração, sensível à luz.

4 - *Leitura das Lâminas*: foi utilizado um microscópio óptico, marca NIKON (Eclipse E200) e foram observadas:

Células positivas: Núcleo com coloração esverdeada total ou perinuclear em polimorfonucleares e ocasionalmente em monócitos.

Células negativas: Células avermelhadas sem coloração dos núcleos.

3.5.2 Amostras de sangue para realização da Nested-PCR

Foram coletados 4 mL de sangue total em tubo sem a adição de qualquer anticoagulante. O material foi submetido a centrifugação a 4.000 rpm por 5 minutos para a separação do soro, uma alíquota foi separada em tubo tipo eppendorf de 2,0mL e congelados a -20°C até o momento da realização da extração do DNA total.

3.5.3 Extração do DNA total

A amostra de soro alíquotada e congelada foi submetida a extração de material genético com o auxílio do kit *Qiagen Blood* (Qiagen, Hilden, Germany) conforme orientações do fabricante. O produto final da extração foi eluída em 50

uL de água destilada livre de DNA e estocada em tubos tipo eppendorf em freezer -80°C até a realização da N-PCR.

3.5.4 Detecção do DNA dos Herpesvírus Humanos através da Nested-PCR

A reação em cadeia da polimerase seguirá o método descrito por Saiki, Shibata e Demmler *et al*, com algumas modificações¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

A detecção da presença de DNA viral através da Nested – PCR foi realizada a partir da extração de DNA do soro do paciente para os vírus CMVH, EBV, HHV-6 e HHV-7.

A amplificação de um fragmento do gene da Beta-Globina (β -Globina) humana foi utilizada para checar a qualidade da extração do DNA em todas as amostras testadas. O produto obtido de 110 pares de bases indicou principalmente a presença de DNA nas amostras e se o DNA extraído era de boa qualidade e não continha substâncias inibidoras da reação, garantindo assim, um controle interno de qualidade do experimento, indispensável à segurança dos resultados.

Cada reação de amplificação utilizou 0,5 a 1 μ g do DNA (obtido pelo método de extração de DNA anteriormente descrito) em volume total de 20 μ l, com adição do kit GoTaq® Hot Start Master Mix (PROMEGA, USA) seguindo orientação do fabricante e do conjunto de primers para N-PCR descritos por Clinque *et al*, 1993¹¹⁴; Yalcin *et al*, 1994¹¹⁵; Ehrnst *et al*, 1995¹¹⁶; Wang *et al*, 1996¹¹⁷. A reação foi então realizada (Tabela 3) utilizando os reagentes citados anteriormente e a padronização das temperaturas segundo temperatura de

“melting” de capa conjunto de primers. A técnica de reação em cadeia da polimerase tipo Nested-PCR é realizada em duas etapas.

Tabela 3: Descrição da técnica de N-PCR (1ª Etapa)

Reagentes	Volume	Programação de temperaturas	Temperatura	Tempo
H ₂ O livre de DNA	6,0 uL	Desnaturação inicial	95°C	2'
Master mix	10,0 uL	Desnaturação	95°C	30"
Primer 1	1,0 uL	Anelamento	Conforme temperatura de Melting de cada primer	30"
Primer 2	1,0 uL	Extensão	72°C	1'
Amostra	2,0 uL	Extensão final	72°C	7'
Volume final/reação	20,0 uL	Estocagem	4°C	

Foram realizados 3 ciclos na desnaturação inicial a 95°C com a finalidade de abrir todas as cadeias de DNA presentes na amostra, após foram realizados 35 ciclos com os períodos de desnaturação, anelamento e extensão dos primers nas temperaturas e tempos anotados na tabela. Essa etapa é caracterizada pela amplificação do material genético exponencialmente a cada ciclo da reação, ou seja, a quantidade de DNA é dobrada a cada ciclo da reação, possibilitando a detecção de pequenas quantidades de DNA viral.

A segunda etapa do teste possui as mesmas características da primeira, entretanto os primers são diferentes dos primeiros sendo chamados de primers internos. Esses primers amplificam uma região interna aos primers externos,

possibilitando o aumento da quantidade de DNA alvo, aumentando assim a especificidade e sensibilidade do teste. Os ciclos serão realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler” - MJ, EUA).

3.5.5 Primers para reação de Nested-PCR

Para a realização da N-PCR foi necessária a confecção de primers externos e internos, sendo 2 pares de primers para cada herpesvírus pesquisado. A sequência dos primers foi descrita por Clinque *et al*, 1993¹¹⁴; Yalcin *et al*, 1994¹¹⁵; Ehrnst *et al*, 1995¹¹⁶; Wang *et al*, 1996¹¹⁷. Os primers geraram produtos de tamanhos diferentes entre si, sendo o resultado final do EBV com 209 pb, CMVH 167 bp, HHV-6 variante A 195 pb, HHV-6 variante B 423 pb e HHV-7 com 264 pb. Nota-se que através de 2 pares de primers foram realizadas as pesquisas para as duas variantes do HHV-6 com produtos de tamanhos diferentes. Os primers que foram utilizados para a realização da N-PCR são listados na tabela abaixo:

Tabela 4: Descrição de primers nested-PCR e referências

Vírus	Sequência de primers	Referência
EBV	Externos: 5' AAGGAGGGTGGTTTGGAAAG 3' 5' AGACAATGGACTCCCTTAGC 3' Internos: 5' ATCGTGGTCAAGGAGGTTCC 3' 5' ACTCAATGGTGTAAGACGAC 3'	Clinque <i>et al</i> , 1993
CMVH	Externos:	Ehrnst <i>et al</i> , 1995

5' ATGGAGTCCTCTGCCAAGAG 3'

5' CAATACACTTCATCTCCTCG 3'

Internos:

5' GTGACCAAGGCCACGACGTT 3'

5' TCTGCCAGCACATCTTTCTC 3'

HHV-6 A e Externos:

Wang *et al*, 1996

B

5' CAAGCCCTAACTGTGTATGT 3'

5' TCTGCAATGTAATCAGTTTC 3'

Internos:

5' CTGGGCGGCCCTAATAACTT 3'

5' ATCGCTTTCACCTCATAAG 3'

HHV-7 Externos:

Yalcin *et al*, 1994

5' AGTTCCAGCACTGCAATCG 3'

5' CACCAAAGCGTCGCTATCAA 3'

Internos:

5' CGCATACACCAACCCTACT 3'

5' GACTCATTATGGGGATCGAC 3'

A sensibilidade dos primers foi estimada pelos autores citados acima em 10 cópias para o EBV, 1 cópia para o CMVH, 10 cópias para o HHV-6 variante A e B e 10 cópias para o HHV-7¹¹⁴⁻¹¹⁷.

Para todas as reações foram colocados controles positivos derivados de amostras submetidas à cultura celular em laboratórios de apoio da FCM/Unicamp. Como controle negativo foi utilizada como amostra água destilada livre de DNA.

3.5.6 Detecção dos fragmentos amplificados

Após as duas reações de amplificação e reamplificação 3 uL do produto da N-PCR e 3 uL de azul de bromofenol foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio para a visualização dos fragmentos em luz ultravioleta. Os produtos amplificados foram comparados em altura de banda com um ladder 100 pb aplicados juntamente no gel de agarose. Os produtos amplificados tinham como tamanho para o EBV 209 pb, CMVH 167 bp, HHV-6 variante A 195 pb, HHV-6 variante B 423 pb e HHV-7 com 264 pb.

3.5.7 Amplificação do gene da Beta-Globina

Para o acompanhamento do processo de extração e certeza da presença de DNA nas amostras testadas foi realizado a pesquisa do gene da Beta-globina humana em todas as amostras realizadas neste estudo com controle interno. O produto obtido de 411 pb indicou principalmente a presença de DNA nas amostras, que o DNA extraído era de boa qualidade e que não continha substâncias inibidoras da reação, garantindo assim um controle de qualidade do experimento, indispensável à segurança dos resultados.

A reação da beta-globina pode ser realizada em etapa única através da reação de PCR e amplificação em gel de agarose 2% com brometo de etídio, descrito segundo Saiki *et al* ¹⁰⁵. Foram utilizados dois iniciadores que flanqueiam uma região constante do gene da Beta-globina, conforme tabela abaixo:

Tabela 5: seqüência de primers da Beta-globina e localização

Primers	Seqüência (5'→3')	Localização do produto amplificado no genoma humano*
P3	AGACAGAGAAGACTCTTG	62336-62353
P5	TCATTTCGTCTGTTTCCCATTTC	62726-62746

Genoma de *Homo Sapiens*, região do complexo genômico da Globina beta (HBB), localizado no braço curto do cromossomo 11, posição da banda 15 (GeneBank NG000007). *Amplificação do genoma expresso em número de nucleotídeos. Os nucleotídeos são numerados sequencialmente dentro de cada gene.

3.6 Análise Estatística

Para a realização das análises estatística distribuimos os casos em grupos utilizando o melhor teste para o respectivo tamanho amostral. Foram utilizados para variáveis quantitativas, a comparação entre os grupos (sem infecção e com infecção) a estatística **z** (distribuição normal), pois o número de casos em cada grupo foi superior a 30 ($n > 30$). Já para a comparação dos grupos infectados com um microrganismo ou com dois ou mais microrganismos foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, pois os dados não apresentavam normalidade, verificada através dos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e de *Shapiro-Wilk*.

Para as variáveis qualitativas, a comparação foi feita através do teste do Qui-Quadrado ou, quando necessário, pelo teste Exato de Fisher.

O nível de significância para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

Os programas computacionais utilizados foram Microsoft Excel 2010 e SPSS versão 13.0.

3.7 Cuidados especiais para evitar contaminação das amostras

- As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em salas diferentes (sala pré-PCR) de onde a amplificação foi feita (sala pós-PCR);
- Todos os reagentes e materiais pré-PCR e pós-PCR foram preparados e utilizados em ambientes diferentes;
- Antes da abertura dos tubos, foi efetuada rápida centrifugação para concentrar o líquido contido no tubo na região inferior e evitar a dispersão dos aerossóis;
- Todo material plástico (ponteiras e tubos plásticos para PCR) utilizado foi novo e autoclavado;
- Trocas constantes de luvas foram feitas durante todo procedimento;
- Lavagem das mãos.

3.8 Biossegurança

O laboratório está atuando desde o dia vinte e nove de abril do ano de dois mil e oito de acordo com a Vigilância Sanitária e está adequado para o funcionamento através da emenda que estabelece regulamento Técnico de Produtos para Diagnóstico de uso in vitro e seu registro, cadastramento, e suas alterações, revalidações e cancelamento tendo como órgão emissor a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através das Resoluções RDC 206, de 17 de novembro de 2006 e RDC 302 de 13 de outubro de 2005.

Precauções Padrão: para o desenvolvimento do trabalho, entramos em contato com material biológico. Estes materiais biológicos, ou seja, sangue e outros fluídos corporais podem alojar microrganismos e por isso consideramos estes fluídos contaminados por agentes transmissores de doenças. Sempre devemos estar conscientes da importância de proteção na manipulação destes materiais, artigos, resíduos e ambientes. Para isso, utilizamos as precauções padrão:

- Uso sistemático de Equipamento de Proteção Individual (EPI), de acordo com os procedimentos que foram realizados e específicos para este fim;
- Atenção para riscos ao manipular, preparar, recolher, transportar ou limpar materiais perfurocortante usados;
- Cuidados ao desprezar material perfurocortante de único uso em contentor adequado;
- Descarte sistematizado de material usado.

4. Resultados

Participaram do estudo **62** pacientes portadores de doença oncológica em tratamento que tiveram pelo menos um episódio de febre até 24 horas antes das coletas das amostras. Durante o período de estudo foram coletados **169** amostras de soro para realização do teste de N-PCR e **100** amostras de sangue total em EDTA para a realização do teste de Antigenemia para o CMVH. Todos os pacientes receberam assistência através do hospital-dia mantido pelo Grendacc na cidade de Jundiaí, SP. As características dos pacientes estudados são mostradas na tabela abaixo:

Tabela 6: Características dos 62 pacientes incluídos no estudo.

Diagnóstico	Nº de Pacientes	Sexo (M/F)*	Idade em anos (mediana)
Leucemia Linfóide Aguda	26	12/14	7,1
Leucemia Mielóide Aguda	3	1/2	4,3
Leucemia Bifenotípica	1	1/0	5
Leucemia Mielóide Crônica	3	1/2	11
Linfoma de Hodgkin	7	3/4	14,2
Linfoma Não Hodgkin	1	1/0	8
Osteossarcoma	6	3/3	15,2
Neuroblastoma	2	0/2	4,2
Rabdomiossarcoma	1	1/0	3
Histiocitose	4	2/2	2,5
Outros	8	3/5	8,9
Total	62	28/34	8,2

*M= sexo masculino; F= sexo feminino

4.1 Ocorrência de Infecção causada por Bactérias e Fungos detectada pelos testes de Hemocultura e Urocultura nos pacientes estudados.

Dos 169 episódios de febre constatados, foram coletadas **196** hemoculturas (sangue periférico e/ou cateter) com **8/196** (4%) de culturas positivas, sendo **2/8** (25%) **Staphylococcus** coagulase negativa resistente a Eritromicina e Sulfa/Trimetoprim, sensível a Ciprofloxacina, Clindamicina, Gentamicina, Oxacilina, Rifampicina, Tetraciclina, Teicoplanina e Levofloxacina dos antibióticos testados. **Escherichia coli** **3/8** (37,5%) resistente a Ampicilina e Sulfa/Trimetoprim e sensível a Amicacina, Cefepime, Cefoxitina, Ceftazidina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Gentamicina, Imipenem e Meropenem dos antibióticos testados, e **3/8** (37,5%) **Klebsiella pneumoniae** resistente a Cefepime, Ceftazidina, Ceftriaxona, Amoxicilina + Ácido Clavulâmico, Cefalotina e Ampicilina e sensível a Meropenem, Gentamicina, Amicacina, Ciprofloxacina, Sulfazotrim e Cloranfenicol dos antibióticos testados.

As Uroculturas positivas **10/130** (7,7%) apresentaram **2/10** (20%) **Staphylococcus coagulase** – **negativa** resistente a Clindamicina, Eritromicina, Sulfa/trimetoprim e Tetraciclina, sensível a Ciprofloxacina, Gentamicina, Oxacilina, Rifampicina, Teicoplanina e Levofloxacina e 8/10 (80%) **Escherichia coli** resistente a Ampicilina e Sulfa/Trimetoprim e sensível a Amicacina, Cefepime, Cefoxitina, Ceftazidina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Gentamicina, Imipenem e Meropenem dos antibióticos testados (Tabela 7).

Em relação à pesquisa de fungos, não obtivemos resultados positivos pelos testes de hemocultura e urocultura nas amostras estudadas, porém tivemos uma porcentagem de positividade para bactérias em **10,6%** das amostras estudadas.

Tabela 7: Resultados das Hemoculturas e Uroculturas realizadas nas amostras coletadas dos 62 pacientes nos episódios de febre.

Diagnóstico	Hemoculturas Positivas			Uroculturas	
	<i>Staph. Coag. Neg.</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Staph. Coag. Neg.</i>	<i>E. coli</i>
Leucemia Linfóide Aguda	2/2	1/3	0	0	0
Leucemia Mielóide Aguda	0	0	0	0	0
Leucemia Bifenotípica	0	0	0	0	0
Leucemia Mielóide Crônica	0	0	0	0	0
Linfoma de Hodgkin	0	2/3	0	0	1/8
Linfoma Não Hodgkin	0	0	0	0	0
Osteossarcoma	0	0	2/3	0	2/8
Neuroblastoma	0	0	0	0	1/8
Rabdomiossarcoma	0	0	0	0	0
Histiocitose	0	0	0	0	1/8
Outros	0	0	1/3	2/2	3/8
Total	2/2	3/3	3/3	2/2	8/8

4.2 Ocorrência de Infecção Ativa causada pelo CMVH detectada pelo teste de Antigenemia nos pacientes estudados.

Através dos testes propostos pelo projeto de estudo, a Antigenemia para CMVH apresentou resultado positivo para **5** amostras de um total de **100** testes realizados, representando **5%** dos casos (Tabela 8). Somente 100 testes foram realizados das 169 amostras coletadas em decorrência da baixa contagem de

polimorfonucleares neutrofílicos nas amostras coletadas dos pacientes pediátricos portadores de doença oncológica. Os resultados da infecção pelo CMVH realizados através da técnica de Antigenemia estão na **Tabela 8**, abaixo:

Tabela 8: Resultados dos testes de Antigenemia para CMVH nas 100 amostras de sangue analisadas.

Diagnóstico	Antigenemia CMVH Positiva*
Leucemia Linfóide Aguda	1
Leucemia Mielóide Aguda	0
Leucemia Bifenotípica	0
Leucemia Mielóide Crônica	0
Linfoma de Hodgkin	1
Linfoma Não Hodgkin	0
Osteossarcoma	2
Neuroblastoma	0
Rabdomiossarcoma	0
Histiocitose	1
Outros	0
Total	5/100

*Antigenemia positiva pelo número de microrganismos identificados em pelo menos uma técnica.

A observação das células positivas para infecção ativa pelo CMVH pode ser visualizada na **Figura 9 e 10** abaixo:

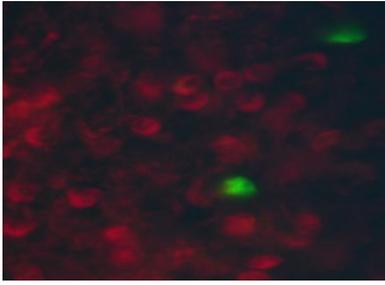


Figura 9: Duas células positivas para CMVH pela reação de Antigenemia (pesquisa do antígeno *pp65*) em menor aumento (10x).
Fonte: Laboratório de Vírus FCM/Unicamp.

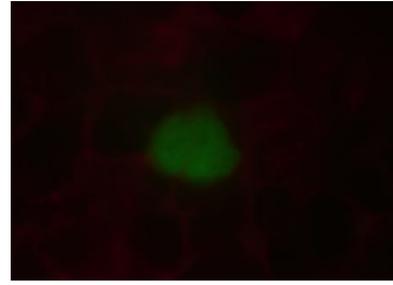


Figura 10: Uma Célula positiva para CMVH pela reação de Antigenemia (pesquisa do antígeno *pp65*) em maior aumento (40x).
Fonte: Laboratório de Vírus FCM/Unicamp.

4.3 Ocorrência da Infecção Ativa causada pelos herpesvírus estudados utilizando a técnica da Nested-PCR no soro.

Foram realizadas **169** coletas para pesquisa dos herpesvírus EBV, CMVH, HHV-6 E HHV-7 propostos pelo estudo pela técnica de N-PCR, dos **62** pacientes envolvidos no estudo. A frequência de infecção ativa causada por pelo menos um desses herpesvírus foi de **71/169 (42%)**, dentro da população estudada, sendo **56 (90,3%)** pacientes. As infecções ativas detectadas pela técnica de N-PCR estão registrados na Tabela 9, abaixo:

Tabela 9: Ocorrência de Infecção Ativa utilizando a técnica da N-PCR nas amostras estudadas.

Característica da amostra	Resultados
Infecção Ativa	71/169 (42,0%)
Não infecção	98/169 (58,0%)
Total	169 (100%)

Dentro dos 71 episódios de febre positivos para pelo menos 1 herpesvírus, a ocorrência da infecção ativa foi a seguinte: HHV-6: 27/169 (16,0%); HHV-7: 25/169 (14,8%); CMVH: 16/169 (9,5%) e EBV: 3/169 (1,8%), vírus que

apresentou a menor ocorrência de detecção de infecção ativa, dentre os herpesvírus pesquisados (Tabela 10).

Tabela 10: Positividade para os herpesvírus pesquisados e detectados pela técnica de Nested-PCR.

Herpesvírus	Pacientes	Resultados
EBV	3/62 (4,8%)	3/169 (1,2%)
CMVH	12/62 (19,4%)	16/169 (9,5%)
HHV-6	23/62 (37,1%)	27/169 (16,0%)
HHV-7	18/62 (29,0)	25/169 (14,8%)
Total	56/62 (90,3%)	71/169 (42,0%)

As figuras abaixo representam as corridas em gel de agora dos produtos finais de amplificação pela técnica de N-PCR para os herpesvírus pesquisados em nosso estudo.

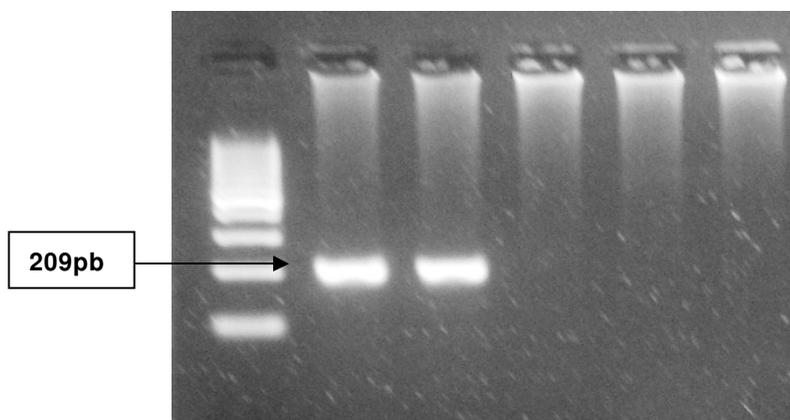


Figura 11: Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2% da reação de N-PCR para EBV. A figura 11 mostra nas colunas: 1- Padrão de peso molecular (Ladder), 2 – controle positivo para o EBV (209pb) e 3 – amostra positiva para EBV e nas colunas 4,5 e 6 – amostras negativas para EBV.

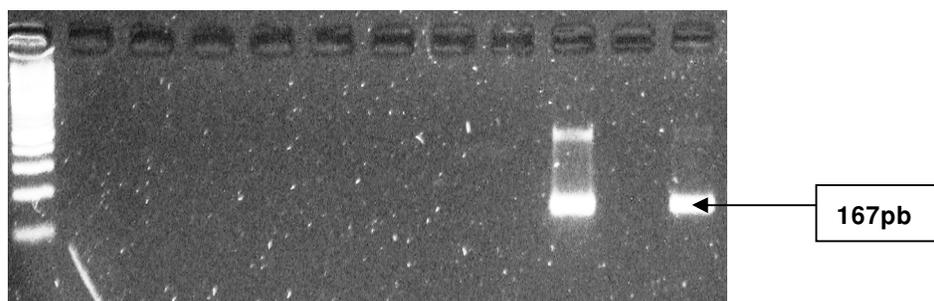


Figura 12: Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2% da reação de N-PCR para CMV. A figura 12 mostra nas colunas: 1- Padrão de peso molecular (Ladder), 12 – controle positivo para o CMVH (167pb) e 10 – amostra positiva para CMVH e nas colunas 2-9 e 11 – amostras negativas para CMVH.

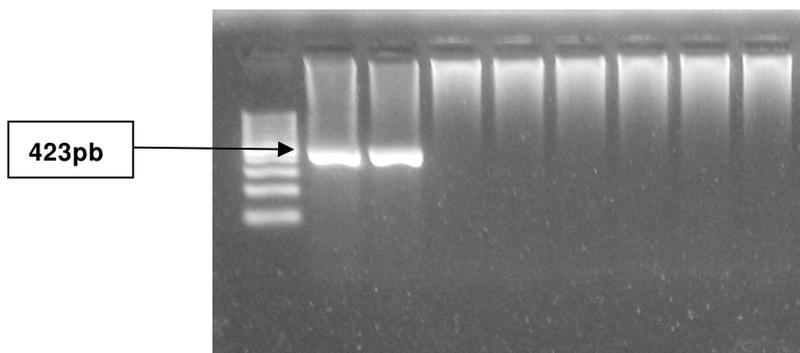


Figura 13: Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2% da reação de N-PCR para HHV-6. A figura 13 mostra nas colunas: 1- Padrão de peso molecular (Ladder), 2 – controle positivo para o HHV-6 B (423pb) e 3 – amostra positiva para HHV-6 B e nas colunas 4-9 – amostras negativas para HHV-6.

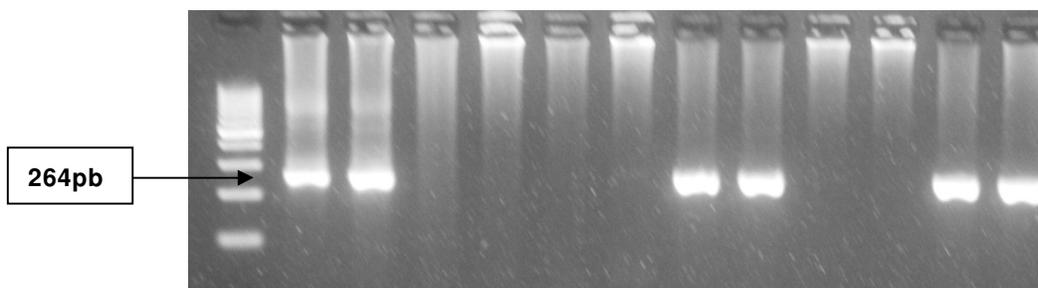


Figura 14: Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2% da reação de N-PCR para HHV-7. A figura 14 mostra nas colunas: 1- Padrão de peso molecular (Ladder), 2 – amostra de controle positivo, colunas 3,8,9 12 e 13 – positivas para HHV-7(264pb) e, em 4,5,6,7 e 10 e 11 – amostras negativas para HHV-7

Entre as amostras infectadas encontramos monoinfecção em **56/169 (33,1%)**, infecção por 2 herpesvírus em **2 (1,2%)** e coinfeção entre pelo menos 1 herpesvírus e 1 bactéria em **9 (5,3%)** pacientes (Tabela 11).

Tabela 11: Número de microrganismos entre infectados com episódio de febre pela técnica de N-PCR.

Infecção Viral Simples	Coinfecção Viral	Coinfecção Viral e Bacteriana
n = 56 (35,5%)	n=2 (1,2%)	n=9 (5,3%)
EBV (n=3)	CMVH, HHV-6 (n=1)	<i>E.coli</i> , CMVH (n=3)
CMVH (n=9)	HHV-6, HHV-7(n=1)	<i>E. coli</i> , HHV-7 (n=2)
HHV-6 (n=22)		<i>K. pneumonia</i> , CMV (n=1)
HHV-7 (n=22)		<i>Staph. Coag. nevativa</i> , HHV-6 (n=1)
		<i>E. coli</i> , HHV-6, HHV-7 (n=1)
		<i>K. pneumonia</i> , CMVH, HHV-6 (n=1)

Independente do método laboratorial utilizado, a pesquisa dos herpesvírus EBV, CMVH, HHV-6 e HHV-7 aumentou significativamente a positividade de identificação do agente etiológico nos episódios de febre (Gráfico 1).

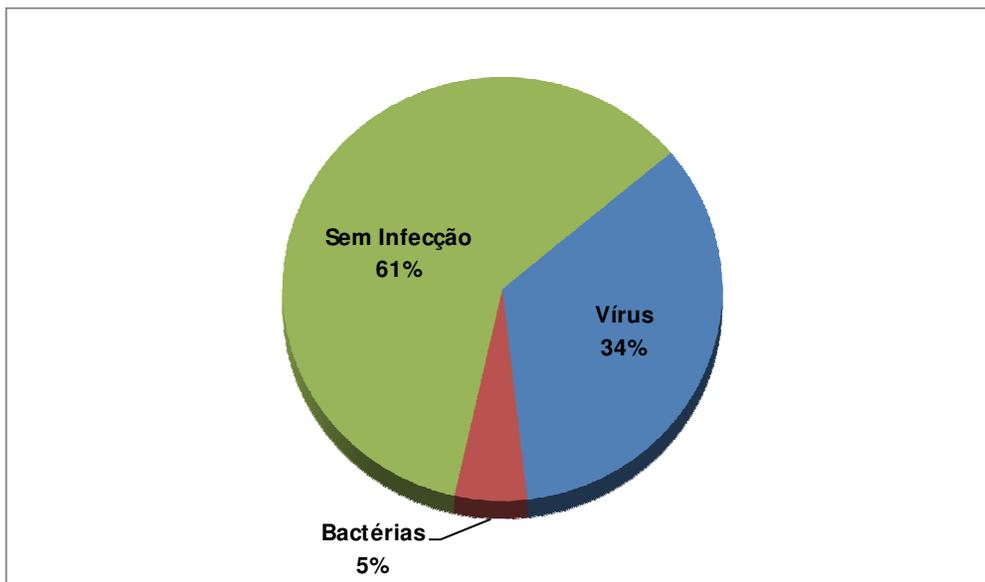


Gráfico 1: Detecção de infecção nos episódios de febre utilizando as técnicas de N-PCR e Hemocultura.

O período de internação dos pacientes assistidos pelo estudo variou de 0 a 21 dias com média de **4,73 dias**. Entre os pacientes infectados por um ou mais herpesvírus, o período médio de internação foi superior àqueles sem infecção comprovada **6,7/3,4 dias ($p=0,001$)** indicando maior morbidade nesses pacientes. A tabela 12 mostra os dados referentes ao período de internação, média de leucócitos e neutrófilos nesses pacientes:

Tabela 12: Período de internação, número de leucócitos e neutrófilos

Variável	Média*	Valor p
Internação	4,73	0,001
Sem infecção	3,4	
Infectados	6,7	
Número de leucócitos	1,9	0,531
Sem Infecção	2,0	
Infectados	1,8	
Número de neutrófilos	0,9	0,854
Sem infecção	1,0	
Infectados	1,0	

*valores expressos em dias para o período de internação; valores expressos em número de células/mm³ para o número de leucócitos e neutrófilos.

O período do tratamento compreende pacientes em três fases distintas: **indução e consolidação** 93/169 (55,0%), **consolidação** 68/169 (40,2%) e **fora de terapia** a menos de um ano 8/169 (4,8%). Os dados encontrados referentes ao período de tratamento encontram-se na tabela 13, abaixo:

Tabela 13: Fases do tratamento e infecção pelos herpesvírus em pacientes oncológicos pediátricos durante os episódios de febre.

Fases	Resultados (número de amostras)*
Indução e consolidação:	93/169 (55%)
Sem infecção	60/169 (35,5%)
Infectados	33/169 (19,5%)
Manutenção:	68/169 (40,2%)
Sem infecção	39/169 (23,1%)
Infectados	29/169 (17,1%)
Fora de terapia:	8/169 (4,8%)
Sem infecção	5/169 (3,0%)
Infectados	3/169 (1,8%)

*número de amostras positivas nas 3 fases do tratamento.

4.4 Coinfecção causada por herpesvírus e bactérias

A presença de coinfecção nos pacientes oncológicos pediátricos representa alto risco de mortalidade e morbidade, ocasionando grandes períodos de internação e prolongamento do estado febril em 28/566 aproximadamente 5% dos pacientes estudados por Santolaya *et al* 2008⁹.

Os achados de coinfecção são apresentados na tabela 14 a seguir:

Tabela 14: Ocorrência de coinfeção entre infecção herpética e bacteriana em onze pacientes com câncer.

Paciente	Idade*	Diagnóstico	Hemocultura	Urocultura	Antigenemia (CMVH)	N-PCR
1	15	Linfoma Hodgkin recidiva	negativo	<u><i>E. coli</i></u>	negativo	CMVH
2	7	Leuc. Bifenotípica recidiva	<u><i>E. coli</i></u>	negativo	negativo	CMVH
3	10	LMA recidiva	<u><i>E. coli</i></u>	negativo	Positivo 1 Célula	CMVH
4	15	OS	<u><i>K. pneumonia</i></u>	negativo	Positivo 2 Células	CMVH
5	7	LLA	<u><i>Staphylococcus Coag. Neg.</i></u>	negativo	negativo	HHV-6
6	6	LLA	negativo	<u><i>E. coli</i></u>	negativo	HHV-7
7	10	LLA	<u><i>E. coli</i></u>	negativo	negativo	HHV-7
8	6	LLA	<u><i>K. pneumonia</i></u>	negativo	Positivo 3	CMVH e HHV-6
9	17	LLA recidiva	negativo	negativo	negativo	CMVH e HHV-6
10	15	LLA recidiva	<u><i>E.coli</i></u>	negativo	negativo	HHV-6 e HHV-7
11	18	LLA recidiva	negativo	negativo	negativo	CMVH e HHV-6

*Idade em anos.

Tivemos 11 pacientes com resultados positivos para mais de um microrganismo durante o período febril, através da associação entre hemocultura, N-PCR e antigenemia, sendo 5/11 (45,4%) com presença de neutropenia severa (contagem absoluta de neutrófilos menor ou igual a 500 células/mm³). Entre esses casos foram constatados **5/169 (3,0%)** óbitos com coinfeção por pelo menos 2 microrganismos, descritos a seguir:

1) O paciente **LSSL**, 10 anos, portador de Leucemia Mielóide Aguda com presença de hemocultura positiva para ***Escherichia coli***, resistente a **Ampicilina e Sulfa/Trimetoprim** e com **infecção ativa pelo CMVH comprovada** através do exame de **Antigenemia e Nested-PCR**, sem administração de ganciglovir ou qualquer outro antiviral, após entrada no atendimento ambulatorial permaneceu internado por 7 dias consecutivos com episódios repetidos de febre, taquicardia e hipotensão arterial, sem imagem de pneumonia pelo exame de Raio X, após 5ª dia de internação, sendo transferido para a Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTI) onde veio a falecer 2 dias após a admissão na UTI, sendo a causa morte falência múltipla de órgãos em decorrência de septicemia.

2) O paciente **AEGJ**, 5 anos, portador de Leucemia Bifenotípica, chegou ao ambulatório do GRENDAACC com febre e neutropenia, sendo coletados os exames de rotina e para pesquisa dos herpesvírus. Comprovada positividade na hemocultura para ***Escherichia coli* e CMVH** através do exame de Nested PCR o paciente já se encontrava internado por 5 dias. Não foi administrado nenhum tipo de antiviral e após 7 dias do período de internação foi detectada através dos exames de hemograma e mielograma a recidiva deste paciente para uma leucemia monoblástica aguda, confirmada através do exame de imunofenotipagem. Devido a complicações hemorrágicas, com sangramento de mucosas e derrame pleural, o paciente faleceu após 3 dias do diagnóstico de recidiva.

3) **JMS**, 17 anos portador de LLA com recidiva durante o tratamento na fase de consolidação. Apresentou-se com dois episódios de febre consecutivos em um período de 3 horas até a chegada ao serviço de emergência não superior a

38,3°C, os exames radiológicos não captaram imagem pulmonar suspeita de pneumonia intersticial. Os exames laboratoriais descreveram neutropenia severa < **100 neutrófilos/mm³**, durante 5 dias consecutivos, mesmo após suspensão de medicamentos quimioterápicos. Diariamente o paciente apresentava febre não superior a 38,0°C, mesmo com administração de antibióticos de amplo espectro, não foram indicados antivirais neste período. Paciente permaneceu internado por 15 dias e foi dado alta após período superior a 72 horas afebril. Todos os resultados de hemocultura foram negativos durante o período, os resultados em soro pela técnica de N-PCR foram positivos para **CMV e HHV-6** cinco dias após alta do paciente. O paciente faleceu em Julho de 2012 após internação de 8 dias por neutropenia severa e falência múltipla de órgãos.

4) **IPM** 15 anos, paciente portadora de LLA recidivada duas vezes, internou com episódio de febre de 39,6°C com resultados de hemocultura positiva para *E. coli* multirresistente aos antibióticos de amplo espectro iniciais, descoberto após 4 dias de internação após resultado de antibiograma. Imagem captada através de exames de Raio X mostrou discreta pneumonia intersticial. O hemograma apresentou **neutropenia severa < 500 neutrófilos/mm³** durante quatro dias consecutivos, não recebeu tratamento para infecção viral, pois os resultados dos testes de N-PCR foram positivos para **HHV-6 e HHV-7** após 15 dias do episódio febril. A paciente faleceu após 11 dias de internação e neutropenia persistente durante o período de internação de falência múltipla de órgãos.

5) **ACSA**, 18 anos, paciente portador de LLA recidivado e encaminhado para transplante de medula óssea com doador compatível 6/6, iniciou o protocolo de quimioterapia para transplante quando foi diagnosticado **antigenemia positiva**

para **CMVH** no serviço de TMO. Paciente faleceu no serviço de TMO 15 dias após internação para transplante. O exame de antigenemia realizado 21 dias antes do início dos preparativos para o TMO, quando o paciente apresentou um **pico febril de 38,0°C** foi negativa para CMVH, entretanto o teste de N-PCR realizado posteriormente foi positivo para **CMVH e HHV-6**. As hemoculturas coletadas nesse episódio foram negativas, não foram realizados exames de imagem para esse paciente durante este episódio de febre. Paciente faleceu após 15 dias do início da quimioterapia para TMO de falência de múltiplos órgãos.

Para os outros seis pacientes com presença de coinfeção, o tempo de internação médio foi de **14 dias (6 – 21 dias)**, com períodos variados de febre em média de **6 picos febris (2 – 9 picos febris)** durante o período de internação. Em todos os casos os pacientes com coinfeção receberam alta após um período de 72 horas afebril e resultado de hemocultura final ou parcial negativos.

5. Discussão

Os episódios de febre nos pacientes oncológicos pediátricos é um evento comum muitas vezes acompanhado ou não de neutropenia. A quimioterapia, um dos tratamentos para o câncer é um dos causadores de febre nos pacientes portadores de câncer. Por sua vez, a neutropenia é um dos fatores de risco para a aquisição de infecções.

O tratamento inicial dos episódios de febre em pacientes oncológicos pediátricos é a administração via oral e/ou endovenosa de antibióticos de amplo espectro, mesmo sem a identificação do agente etiológico causador do aumento de temperatura corpórea. A duração da antibioticoterapia depende da evolução do quadro febril do paciente, número de leucócitos e neutrófilos totais, número total de plaquetas, fase do protocolo de tratamento, etc. A respeito do diagnóstico etiológico, a presença de bacteremia e/ou septicemia aumenta em cerca de 10 vezes a possibilidade de morte nesses pacientes^{3, 118-120}.

A utilização dos antibióticos de amplo espectro nessa população trouxe grandes benefícios no suporte ao tratamento do paciente com câncer e episódios de febre, com ou sem neutropenia. Entretanto, percebe-se em estudos atuais, um aumento de resistência bacteriana às drogas utilizadas na rotina hospitalar e o surgimento de bactérias com resistência múltipla a vários tipos de drogas, conseqüentemente aumentando o período de internação dos pacientes e os custos impostos às instituições de apoio¹¹⁹.

Os exames laboratoriais que iniciam a investigação do agente etiológico atualmente restringem-se ao hemograma, hemocultura periférica e/ou de cateter

venoso central, urocultura (quando indicado), dosagem de proteína C reativa (PCR quantitativa) e dosagem das enzimas hepáticas como as transaminases. Alguns outros tipos de marcadores de infecção estão sendo estudados e incluídos na rotina laboratorial das instituições cuidadoras de pacientes pediátricos portadores de doença oncológica como a procalcitonina¹²⁰⁻¹²⁴, por exemplo.

Neste estudo, incluímos os resultados de hemograma, hemocultura, urocultura e os testes de biologia molecular para detecção de infecção ativa viral para os herpesvírus EBV, CMVH, HHV-6 e HHV-7 em amostras provenientes de episódios de febre em 62 pacientes oncológicos pediátricos¹²⁵.

A contagem global de leucócitos e neutrófilos obtidas através do hemograma não sugere o tipo de agente etiológico causador da febre, sendo esses dados somente para definição do prognóstico da febre, onde pacientes com neutropenia severa ($<500/\text{mm}^3$) são mais susceptíveis a altos índices de mortalidade e morbidade, com período de internação superior a 7 dias¹²⁶⁻¹²⁸. Esse dado estatístico não foi encontrado em nosso estudo, pois incluímos entre os episódios de febre pacientes com neutropenia severa e sem neutropenia severa. Os pacientes com período de internação de 6,6 dias com a identificação de pelo menos um microrganismo tiveram média de 1.800 leucócitos/ mm^3 e 1.000 neutrófilos/ mm^3 . Entretanto, se considerarmos os valores de referência para indivíduos normais, ou seja, onde a neutropenia é caracterizada por contagem de neutrófilos inferior a 2.100 células/ mm^3 , a quantidade de pacientes aumenta consideravelmente, assim como o período de internação. São **145 episódios de febre** e neutropenia absoluta, com média de **internação de 9 dias**, enquanto que os pacientes sem neutropenia, ou seja, com contagem de neutrófilos superior a

2.100 células/mm³ tiveram período de internação médio de apenas 2 dias ($p=0,0005$). Os dados encontrados são pertinentes aqueles encontrados na literatura¹³⁴ para pacientes portadores de LLA em que **363/610 (59,5%)** infecções foram registradas em pacientes com contagem global de neutrófilos > 1000 neutrófilos/mm³.

A pesquisa de bactérias e fungos através da técnica de hemocultura resultou na identificação de apenas **8** amostras positivas dos **169 (4,7%)** episódios de febre coletados. A cultura sanguínea (periférico e cateter), provenientes de **8** pacientes diferentes em **72 infecções (11,0%)** registradas nesse período é comum a vários outros estudos em que **52/610 (8,5%)** dos agentes etiológicos foram identificados através do teste de hemocultura. A identificação de microrganismos através dos testes de hemocultura identifica aproximadamente 25% dos microrganismos causadores de febre^{66, 129}.

O tempo de diagnóstico através da hemocultura foi em média de 4 dias, com variação de 3 a 6 dias com a realização do antibiograma.

Não foram identificados fungos durante a realização do nosso estudo, o que esta em concordância com o trabalho de Yee-Guardino, 2008 e Hakin *et al*, 2009, que também não encontrou a presença de fungos em 30 pacientes pediátricos com câncer^{66,73}.

A infecção causada pela presença de mais de um microrganismo é comum e freqüentemente fatal em pacientes oncológicos pediátricos, entretanto, receberam pouca atenção em recentes publicações¹³⁰.

Nosso estudo mostrou a presença de coinfeção em **11/62 (17,7%)** pacientes, sendo que em **5/11 casos (45,4%) de óbito** entre os pacientes com coinfeção e **5/62 (8,1%)** em número absoluto de pacientes. Em dados de publicações científicas em pacientes pediátricos portadores de neoplasia o índice de mortalidade variou de 1,5% a 5,3% utilizando para diagnóstico de agentes etiológicos somente o teste de Hemocultura^{127, 132-135}. Em estudo recente utilizando hemocultura e um painel com vários microrganismos pela técnica de PCR em tempo real encontrou três episódios de coinfeção pela técnica de hemocultura e 17 infecções por pelo menos 2 microrganismos pela técnica de PCR em tempo real em 221 pacientes com neutropenia febril¹³².

Os dados referentes ao número de pacientes infectados e não infectados nos chamam a atenção para o número de amostras que ainda permanece sem um diagnóstico etiológico para o episódio de febre, que em linhas gerais do nosso estudo foi estimado em **102/169 (60,4%)**, mesmo com o diagnóstico das infecções herpéticas realizado neste trabalho.

A introdução de novos testes diagnósticos para pesquisa de vários tipos de microrganismos visa aumentar a identificação dos agentes etiológicos causadores da febre⁶⁶. Os testes de biologia molecular, tais como a N-PCR possibilitou a identificação de pelo menos **1 herpesvírus** dentre os herpevírus pesquisados em **71 episódios de febre** de 169 episódios de febre, aumentando para **42% a identificação da etiologia** em casos de febre nos pacientes oncológicos pediátricos, sendo que nossa pesquisa se restringiu à identificação dos herpesvírus EBV, CMVH, HHV-6 e HHV-7.

Dos herpesvírus pesquisados, aquele que foi menos detectado foi o EBV com 3 infecções em 169 episódios de febre representando 1,8% dos casos. Esse resultado é compatível com dados encontrados em literatura onde a infecção por EBV em pacientes pediátricos com câncer não ultrapassou 1% (2/610) de positividade segundo Katsimpardi *et al* 2006¹³⁶.

O CMVH foi positivo em 16 episódios de febre em 169 episódios de febre representando 9,5% dos casos, compatível com o encontrado na literatura onde a associação entre infecção ativa pelo CMVH e presença de bacteremia foi encontrada em outros estudos, como por Sheen *et al* 2009 onde 26/252 (10,3%) permaneceram com neutropenia moderada e grave durante um período de 3 meses em pacientes menores de 1 ano com detecção de infecção ativa pelo CMVH¹³⁰. Em nosso estudo o CMVH esteve com presença superior aos demais herpesvírus nos casos de coinfeção, onde dos 11 casos de coinfeção o CMVH foi encontrado em 7 (63,6%) casos.

O teste de antigenemia para detecção de infecção ativa pelo CMVH foi positivo em **5/100 (5%)** dos episódios de febre, todas confirmadas pela técnica de N-PCR em soro. Foram realizados somente 100 testes de antigenemia em decorrência da neutropenia encontrada em 69 pacientes com episódios de febre, o que não possibilitou a obtenção de neutrófilos para a realização do teste mesmo com a coleta de um volume maior de amostra. Isso reflete a colocação de vários estudos que relatam a prolongada neutropenia em pacientes oncológicos pediátricos na fase de indução do tratamento para a neoplasia^{4,66,136}.

O HHV-6 foi encontrado em **27** episódios de febre dos **169** casos de febre representando **16%** do total, sendo o herpesvírus mais encontrado em nosso estudo. Hubacek *et al* 2007, através da técnica de PCR convencional encontrou 107/367 (29,1%) e Yee-Guardino 2008 também através da técnica de PCR encontrou 7/39 (18%) de positividade para o HHV-6 em pacientes portadores de doença oncológica encaminhados para TMO^{73, 137}.

O HHV-7 foi encontrado em 25 dos 169 episódios de febre representando (**14,8%**) dos casos. Pouco foi investigado até o momento o papel desse herpesvírus em pacientes com câncer e episódios de febre, entretanto, Persson *et al* 2002¹²⁰, analisou 20 episódios de febre para a presença de HHV-7 e não encontrou casos positivos.

A utilização dos testes de biologia molecular para outros microrganismos como bactérias e fungos poderia aumentar consideravelmente a identificação dos agentes causadores de febre nessa população, possibilitando o tratamento adequado aos pacientes, menor tempo de diagnóstico e comparação com o teste de hemocultura para observação de sensibilidade e especificidade do teste.

Com o domínio das técnicas de PCR, N-PCR, PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é possível realizar reações chamadas de “multiplex PCR” com a finalidade de pesquisar vários microrganismos em uma mesma reação, otimizando o tempo de diagnóstico dos episódios de febre em quaisquer tipos de pacientes¹²⁴⁻

¹²⁶.

Atualmente, no Laboratório de Vírus da FCM/Unicamp, estamos introduzindo a técnica de qPCR para os herpesvírus EBV, CMVH, HHV-6 e HHV-

7. Essa técnica nos permitirá a realização da quantificação em número de cópias/uL dos microrganismos pesquisados, aumento da sensibilidade do teste e diminuição do tempo de diagnóstico em relação à hemocultura e N-PCR.

Nossa pesquisa está em alinhamento com os grandes institutos de tratamento de câncer infantil no mundo, como o caso do St. Jude Children's Research Hospital sediado nos Estados Unidos da América que iniciou suas pesquisas para alguns herpesvírus e outros vírus respiratórios através da técnica de PCR no ano de 2009, possibilitando a pesquisa de infecção por mais de um microrganismo⁶⁶.

O paciente imunocomprometido pela administração de medicamentos quimioterápicos, radioterapia, cirurgia ou pela doença de base está exposto a uma variedade de infecções e apresenta um risco potencial de complicações médicas, necessita de cuidados intensivos e longos períodos de internação. Na prática clínica, a febre, com ou sem a presença de neutropenia é o principal limitador da correta sequência do tratamento em crianças e adultos portadores de doença oncológica¹³².

A presente investigação sugere associação entre infecção ativa herpética e episódios de febre em pacientes oncológicos pediátricos e reforça a necessidade de estudos adicionais utilizando outras técnicas incluindo a investigação de outros patógenos para melhor compreender a relação entre infecções e episódios de febre.

6. Conclusão

- Verificou-se a presença de infecção ativa causada pelos vírus Epstein-Barr (EBV), Citomegalovírus (CMVH), HHV-6 e HHV-7 através da Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested (N-PCR) e Antigenemia para CMVH em pacientes oncológicos pediátricos em episódios febris; os resultados mostraram que a N-PCR no soro apresentou melhor desempenho do que a Antigenemia para CMVH, principalmente nos casos de pacientes neutropênicos;
- Verificou-se o impacto clínico causado pela infecção ativa por herpesvírus detectada pelas técnicas de Antigenemia e Reação em Cadeia da Polimerase (N-PCR) em pacientes oncológicos pediátricos com episódio febril.

7. Referências Bibliográficas

1. Kumar V, Abbas A, Fausto, N. Neoplasias. In: Kumar V, Abbas A, Fausto, N. Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 7ª Ed. São Paulo: Elsevier; 2005, 281-356.
2. Koskevu M, Mottonen, M. Respiratory viral infections in children with leucekemia. *Pediatric Infect Dis Journal*, 2008 (27)11: 974 – 980.
3. El-Mahallawy HA, El-Wakil M, Monner MM. Antibiotic Resistance Is Associated With Longer Bacteremic Episodes and Worse Outcome in Febrile Neutropenic Children With Cancer. *Pediatr Blood Cancer*. 2011; 57: 283-288
4. Ganme APP, Pasternak J. Infecção em pacientes com câncer. In: Guimarães JRQ. Manual de Oncologia. São Paulo: BBS. 2004; 637-640.
5. Sayed HA, El-Mahallawy HA, Kaddah AM, Ismael HT, Talaat SM. Profile of Infections in Newly Diagnosed Patients with Acute Leukaemia During the Induction Phase of Treatment. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst*. 2009 December; 21(4): 315-322.
6. Forgie AED, Robinson JL. Pediatric malignancies presenting as possible infectious disease. *BMC Infectious Diseases* 2007 May; 7(44): 3-22.
7. Pancera CF, da Costa CML, Hayashi M, Gutierrez R, Lamelas Y. Sepsis grave e choque séptico em crianças com câncer: Fatores preditores de óbito. *Rev Assoc Med Bras* 2004; 50(4): 439-443.
8. Klastersky J, Paesman M, Rubenstein EB. The Multinational Association for Supportive Care in Cancer risk index: A multinational scoring system for

- identifying low-risk febrile neutropenic cancer patients. *J Clin Oncol* 2000 August; 18(16): 3038-3051.
9. Santolaya, ME, Alvarez AM, Becker A. Prospective multicenter evaluation of risk associated with invasive bacterial infection in children with cancer, neutropenia and fever. *J Clin Oncol.*, 2002 (19): 3415 – 3421.
 10. Maschmeyer, G. Guidelines of infectious diseases working party of the German Society of Hematology and Oncology. *Ann Hematol.*, 2003 (82) Suppl 2: 105-107.
 11. Robison LL. General Principles of the Epidemiology of Childhood Cancer. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 3^a Ed. Philadelphia: 1997; Lippicott-Raven Publisher: 1-10.
 12. Plon SE, Peterson LE. Childhood Cancer, Hereditary, and the Environment. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 3^a Ed. Philadelphia: 1997; Lippicott-Raven Publisher: 11-36.
 13. Carroll WL, Raetz EA. Clinical and Laboratory Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *The Journal of Pediatrics*. 2012 (1) 160: 10-18.
 14. Ford AM, Ridge SA, Cabrera ME, Mahmoud H, Steel CM, Chan LC. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature* 1993; 363: 358-60.
 15. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. *Blood* 2003; 102: 2321-33.
 16. Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:639-49.

17. Maia AT, van der Velden VH, Harrison CJ, Szczepanski T, Williams MD, Griffiths MJ, et al. Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins. *Leukemia* 2003; 17: 2202-6.
18. Loggetto SR, Benites ECA. Leucemia Linfóide Aguda na Infância e Adolescência. In: Guimarães JRQ. Manual de Oncologia. São Paulo: BBS; 2004, 615-624.
19. Dores GM, Devesa SS, Curtis RE. Acute leukemia incidence and patient survival among children and Adults in the United States, 2001-2007. *Blood Journal* 2012; 119:34-43.
20. Golub TR, Weinstein HJ, Grier HE. Acute Myelogenous Leukemia. In: Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 3ª Ed. Philadelphia: 1997; Lippicott-Raven Publisher: 463-482.
21. Pereira WV. Leucemia Mielóide Aguda na Infância e Adolescência. In: Zago MA, Falcão RP, Paquini R. Hematologia Fundamentos e Prática. 2ª Ed. São Paulo: 2005; Atheneu: 459-476.
22. Gjertsen BT. Stratification of pediatric acute myeloid leukemia through cancer cell gene-expression profiling. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2011; 11(3), 355–357.
23. Hudson MM, Donaldson SS. Hodgkin's Diseases. In: Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 3ª Ed. Philadelphia: 1997; Lippicott-Raven Publisher: 523-544.
24. Shad A, Magrath IT. Malignant Non-Hodgkin's Lymphomas in Children. In: Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 3ª Ed. Philadelphia: 1997; Lippicott-Raven Publisher: 545-588.

25. Seibel NL, Cossman J, Magrath IT. Lymphoproliferative Disorders. In: Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 3^a Ed. Philadelphia: 1997; Lippicott-Raven Publisher: 589-614.
26. Spector N. Biologia Celular, Molecular e Imunologia dos Linfomas. In: Zago MA, Falcão RP, Paquini R. Hematologia Fundamentos e Prática. 2^a Ed. São Paulo: 2005; Atheneu: 589-598.
27. Jennings RW, LaQuaglia MP, Leong K, Hendren WH, Adzick NS. Fetal neuroblastoma: prenatal diagnosis and natural history. J Pediatr Surg. 1993; 28(9):1168-74.
28. Goodman M, Gurney, JG, Smith, MA, Olshan, AF. Sympathetic nervous system tumors. National Cancer Institute, Bethesda, MD1999; Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program, 1975-1995.
29. Acosta S, Lavarino C, Paris R. Comprehensive characterization of neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells. BMC Developmental Biology. 2009; 9:12 1-14.
30. Olshan A, Bunin. Epidemiology of Neuroblastoma. Neuroblastoma, Elsevier, Amsterdam: 200; 33-9.
31. Menegaux F, Olshan AF, Neglia JP, Pollock BH, Bondy ML. Day care, childhood infections, and risk of neuroblastoma. Am J Epidemiol 2004; 159(9):843-51.
32. Olshan AF, Smith J, Cook MN, Grufferman S, Pollock BH, Stram DO, et al. Hormone and fertility drug use and the risk of neuroblastoma: a report from

- the Children's. Cancer Group and the Pediatric Oncology Group. *Am J Epidemiol.* 1999; 150(9):930-8.
33. Link MP, Eilber F. Osteosarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* 3^a Ed. Philadelphia: 1997; Lippicott-Raven Publisher: 889-920.
34. Petrilli AS. Osteossarcoma: Criança e Adolescente. In: Guimarães JRQ. *Manual de Oncologia.* São Paulo: BBS; 2004: 549-558.
35. Gurney JG, Swensen AR, Bulterys M. Bone Tumor. In: *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975.* 1999; 994649: 99-109.
36. Petrilli AS, Gentil FC, Epelman S, Lopes LF, Bianchi A, Lopes A, et al. Increased survival, limb preservation, and prognostic factors for osteosarcoma. *Cancer.* 1991; 68: 733-7.
37. Fenichel G. In: *Neurologia Pediátrica.* Porto Alegre: Artes Médicas; 1995. p. 260-1.
38. Rondinelli PIP, Martinez CAO, Júnior PIS. Meduloblastomas: Experiência de dez anos do departamento de Pediatria do hospital do Câncer de São Paulo. *Prática Hospitalar* 2004; 6(35): 83-90.
39. Packer RJ, Sutton LN, Elterman R, Lange B, Goldwein J, Nicholson HS, et al. Outcome for children with medulloblastoma treated with radiation and cisplatin, CCNU, and vincristine chemotherapy. *J Neurosurg.* 1994;81(5):690-8.

40. Packer RJ, Goldwein J, Nicholson HS, Vezina LG, Allen JC, Ris MD, et al. Treatment of children with medulloblastomas with reduced-dose craniospinal radiation therapy and adjuvant chemotherapy: A Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol.* 1999;17(7):2127-36.
41. Park PC, Taylor MD, Mainprize TG, Becker LE, Ho M, Dura WT, et al. Transcriptional profiling of medulloblastoma in children. *J Neurosurg.* 2003; 99(3):534-41.
42. Blakely M, Ritchey ML. Controversies in the management of Wilms' Tumor. *Sem Ped Surg* 2001; 10: 127-131.
43. Camargo B. Formação de um grupo brasileiro para o tratamento do tumor de Wilms. *J Bras Urol.* 1987; 13: 52-56.
44. D'Ángio G. Pre or Post Operative treatment for Wims' tumor. Who, What, When, Where How, Why – and Which. *Med Pediatr Oncol.* 2003; 41: 545-549.
45. Green DM, Coppes MJ, Breslow NE, Grundy PE, Ritchey ML. Wilms Tumor. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* 3^a Ed. Philadelphia: 1997; Lippicott-Raven Publisher: 733-760.
46. Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* 2008;113:1953–68.
47. Ohgaki H. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol* 2009;472:323–42.

48. Kyritsis AP, Bondy ML, Rao JS, Sioka C. Inherited predisposition to glioma. *Neuro Oncol* 2010;12:104–13.
49. Scheurer ME, Etzel CJ, Liu M. Familial aggregation of glioma: a pooled analysis. *Am J Epidemiol* 2010; 172:1099–107.
50. de Martel C, Franceschi S. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009;70:183–94.
51. Wexler LH, Helman LJ. Rhabdomyosarcoma and the Undifferentiated Sarcomas. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 3^a Ed. Philadelphia: 1997; Lippicott-Raven Publisher: 799-830.
52. Rodeberg DA, Paidas CN, Lobe TL. Surgical principles for children and adolescents with newly diagnosed rhabdomyosarcoma: a report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group. *Sarcoma*. 2002; 6: 111.
53. Leaphart C, Rodeberg D. Pediatric surgical oncology: Management of rhabdomyosarcoma. *Surgical oncology*. 2007; 16: 173-185.
54. Crist WM, Anderson JR, Meza JL. Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol* 2001; 19:3091.
55. Balis FM, Holcenberg JS, Poplack DG. General Principles of Chemotherapy. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 3^a Ed. Philadelphia: 1997; Lippicott-Raven Publisher: 215-272.

56. Spiegel RJ. The acute toxicities of chemotherapy. *Cancer Treat Rev.* 1981; 8:197.
57. Perry MC, Yarbaro JW. *Toxicity of chemotherapy.* Orlando: Grune & Stratton. 1984.
58. Li Y, Womer RB, Silber JH. Predicting cisplatin ototoxicity in children: The influence of age and the cumulative dose. *Eur J Cancer* 2004; 40:2445–2451.
59. Lewis MJ, DuBois SG, Fligor B. Ototoxicity in children treated for osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52:387–391.
60. Kun LE. General Principles of Radiation Therapy. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* 3^a Ed. Philadelphia: 1997; Lippicott-Raven Publisher: 289-322.
61. Corrêa S. Princípios da Radioterapia de Alta Tecnologia. In: JRQ. *Manual de Oncologia.* São Paulo: BBS. 2004; 537-542.
62. Bodey GP, Buckley M, Sathe YS. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1966; 64:328-340.
63. Freifeld AG, Walsh TJ, Pizzo PA. Infectious Complications in the Pediatric Cancer Patient. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* 3^a Ed. Philadelphia: 1997; Lippicott-Raven Publisher: 1069-1114.

64. Freifeld AG, Bow EJ, Sepkowitz KA. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis* 2011; 52-56.
65. Collins PL, Chanock RM, McIntosh K. Parainfluenza Viruses. In: Fields. *Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Pub., Philadelphia, 1996. (1):1205-1241.
66. Hakin H, Flynn PM, Knapp KM, Srivastava DK, Gaur A. Etiology and Clinical Course of Febrile Neutropenia in Children with Cancer. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2009 September; 31(9): 623-629.
67. Klastersky J, Paesman M, Rubenstein EB. The Multinational Association for Supportive Care in Cancer risk index: A multinational scoring system for identifying low-risk febrile neutropenic cancer patients. *J Clin Oncol* 2000 August; 18(16): 3038-3051.
68. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brow AE, Calandra T, *et al*. Guidelines for the use antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis.*, 2002 (34): 730 – 751.
69. Kikano GE, Stange KC, Flocke SA, Zyzanski SJ. Effect of the white blood count on the clinical management of the febrile infant. *J Fam Pract*. 1991; 33(5):465-9.
70. Pizo, P. Fever in Immunocompromised Patients. *N Engl J Med*. 1999; 341: 893-900.
71. Ljungman P. Viral Infections: current diagnosis and treatment. *Hematology J*. 2004; 5: S63-S68.

72. Christensen MS, Nielsen LP. Few but severe viral infections in children with cancer: A prospective RT-PCR and PCR-based 12-month study. *Pediatric Blood & Cancer*, 2005 (45) 7: 945 – 951.
73. Yee – Guardino, S, Gowans, K, Yen – Lieberman, B, Berk, P, Kohn, D, Wang, FZ. Beta Herpesviruses in Febrile Children with Cancer. *Emerging Infectious Diseases*, 2008 (14)4: 579 – 585.
74. Hara S, Kimura H, Hoshino Y, Tanaka N, Nishikawa K, Ihira M, *et al.* Detection of Herpesvirus DNA in the Serum of Immunocompetent Children. *Microbiol. Immunol.*, 2001 (46)3: 177 – 180.
75. Wade, J.C. Viral Infections in Patients With Hematological Malignancies. *Hematol Oncol North Am.*, 2006 (7): 368 – 373.
76. Ljungman P. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplantation* 2008; 42: 227-240.
77. Hermouet S, Sutton CA, Rose TM, Greenblatt, Corre I. Qualitative and quantitative analysis of human herpesvirus in chronic and acute B cell lymphocytic leukemia and in multiple myeloma. *Leukemia* 2003; 17: 185-195.
78. Niederman, JC, Evans, AS. Epstein – Barr Virus In: Evans, AS, Kaslow, RA. *Viral Infections of Humans*. 4^a Edição. New York, Plenum Medical Book, 1997: 253 – 283.

79. Michálek, J, Horvath, R. High incidence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and human herpesvirus 6 infections in children with cancer. *BMC Pediatrics*, 2002 (2)1: 1471 – 1481.
80. Sehgal S, Mujtataba S, Gupta D, Aggarwal R, Marwaha. High incidence of Epstein Barr vírus infection in childhood acute lymphocytic Leukemia: A preliminary study. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*. 2010; 53(1): 63-67.
81. Jebbink J, Bai X, Rogers BB, Dawson DB, Scheuermann RH and Domiati-Saad R. Development of Real-Time PCR Assays for the Quantitative Detection of Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus, Comparison of TaqMan Probes, and Molecular Beacons. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2003 February; 5(1): 15-20.
82. Uys R, Cotton MF, Wessels G, Hesseling PB, Bester . Viral Isolates During Febrile Neutropenia in Children with Cancer. *Journal of Tropical Pediatrics* 2000 February; 46: 21-24.
83. Ljungman P. Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients. *Br J Haematol*, 2002 118;(1):44-57.
84. Gershon AA, Gold E, Nankervis GA. Cytomegalovirus In: Evans, AS, Kaslow, RA. *Viral Infections of Humans*. 4^a Edição. New York, Plenum Medical Book, 1997: 229 – 251.
85. Bonon SHA. Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. *Journal of Infection* 2005; 50: 130-137.

86. Ihira M, Yoshikawa T, Suzuki K, Ohashi M, Suga S, Asonuma K, *et al.* Correlation between human herpesvirus 6 and 7 infection after living related liver transplantation. *Microbiol Immunol.* 2001;45(3):225-32.
87. Razonable RR, Paya CV. The impact of Human herpesvirus-6 and -7 infection on the outcome of liver transplantation. *Liver Transplant* 2002; 8: 651-658.
88. Razonable RR, Fanning C, Brown RA, Espy MJ, Rivero R. Selective reactivation of human herpesvirus 6 variant A occurs in critically ill immunocompetent hosts. *J Infect Dis* 2002; 185: 110-113.
89. Ward KN, Andrews NJ, Verity CM, Miller E, Ross EM. Human herpesvirus-6 and -7 each cause significant neurological morbidity in Britain and Ireland. *Arch Dis Child* 2005; 90: 619-623.
90. Levine, PH. Human Herpesvirus 6 and Human Herpesvirus 7 In: Evans, AS, Kaslow, RA. *Viral Infections of Humans.* 4^a Edição. New York, Plenum Medical Book, 1997: 455 – 471.
91. Oliveira S A, Turner D J, Knowlesw, Nascimento J P, Brown D W, Ward K N. Primary human herpesvirus-6 and 7 infections, often coinciding, misdiagnosed as measles in children from a tropical region of Brazil. *Epidemiol Infect* 2003; 131:873-879.
92. Tanaka K, Kondo T, Torigoe S, Okada S, Mukai T, Yamanishi K. Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthem subitum). *J Pediatr* 1994; 125:1-5.

93. Coutinho V, Coutinho MA. Alterações dos Eritrócitos. In: Zago MA, Falcão RP, Paquini R. Hematologia Fundamentos e Prática. 2ª Ed. São Paulo: 2005; Atheneu: 77-86.
94. Coutinho V, Coutinho MA. Leucocitose e Leucopenias: Alterações Morfológicas e Funcionais dos Leucócitos. In: Zago MA, Falcão RP, Paquini R. Hematologia Fundamentos e Prática. 2ª Ed. São Paulo: 2005; Atheneu: 87-96.
95. Coutinho V, Coutinho MA. Alterações Sanguíneas em Doenças não Hematológicas. In: Zago MA, Falcão RP, Paquini R. Hematologia Fundamentos e Prática. 2ª Ed. São Paulo: 2005; Atheneu: 97-102.
96. Buchanan GR. Hematologic Supportive Care of the Pediatric Cancer Patient. In: Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 3ª Ed. Philadelphia: 1997; Lippicott-Raven Publisher: 1051-1068.
97. Penack O, Rempf P, Eisenblatter M, Stroux A, Wagner J. Bloodstream infections in neutropenic patients: early detection of pathogens and directed antimicrobial therapy due to surveillance blood cultures. *Annals of Oncology*. 2007; 18: 1870–1874.
98. Lüthi F, Leibundgut K, Niggli FK, Nadal D, Aebi C. Serious Medical Complications in Children With Cancer and Fever in Chemotherapy-Induced Neutropenia: Results of the Prospective Multicenter SPOG 2003 FN Study. *Pediatr Blood Cancer*. 2011; 1-6.

99. Jawets E, Nelnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Buttl JS. *Microbiologia Médica*. 18^a Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan: 1991.
100. Ferreira W, Sousa J. *Microbiologia*. Vol. III. Lidel – edições técnicas, lda; Lisboa, Portugal; 2002.
101. van den Berg AP, Klompaker IJ, Haagsma EB, Scolten-Sampson A, Bijlevel CMA. Antigenemia in the Diagnosis and Monitoring of Active Cytomegalovirus Infection after Liver Transplantation. *J Infect Dis*. 1991; 164: 265-270.
102. Erice A. Resistance of Human Cytomegalovirus to Antiviral Drugs. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; 12(2): 286-297.
103. Ho M. Cytomegalovirus. In: Mandell GL, Douglas JRG, Bennett JE. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 3^a Ed. New York, Churchill Livingstone: 1990; 1159-1172.
104. Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM. Detection of Cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood of Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *J Infect Dis*. 1988; 158: 1185-1192.
105. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Erlich HA. Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*. 1985; 230: 1350-1354.
106. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of Cytomegalovirus in Urine from Newborns by Using Polymerase Chain Reaction DNA Amplification. *J Infect Dis*. 1988; 158: 1177-1184.

107. Olive DM, Simsek M, Al-Mufti S. Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 1238-1242.
108. Roberts TC, Buller RS, Gaudreault-Keener M, Sternhell KE, Garlock K. Effects of Storage Temperature and time on qualitative and quantitative detection of cytomegalovirus in blood specimens by shell vial culture and PCR. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(9): 2224-2228.
109. The TH, van den Berg AP, Harmsen MC, Van der Bij W, Vanson WJ. The cytomegalovirus antigenemia assay: a plea for standardization. *Scand J Infect Dis.* 1995; 99: 25-29.
110. Brytting M, Sundquist V, Stalhandske P, Linde A, Wahren B. Cytomegalovirus detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. *J Virol Methods.* 1991; 32: 127-138.
111. Hughes, WT, Armstrong, D, Bodey, GP, Bow, EJ, Brow, AE, Calandra, T. Guidelines for the use antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis.*, 2002; (34): 730 – 751.
112. Ljungman P. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplantation* 2008; 42: 227-240.
113. Einsele H, Ehninger G, Hebart H, Wittkowski KM, Schuler U. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood.* 1995; 86(7):2815-20.

114. Clinque P, Brytting M, Vago L, Castagna A, Parravicini C, Zanchetta N, *et al.* A Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet.* 1993; **342**: 398–401.
115. Yalcin S, Karpuzoglu T, Suleymanlar G, Mutlu G, Mukai T, Yamamoto T, *et al.* Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 infections in renal transplant recipients and healthy adults in Turkey. *Archives of Virology.* 1994; **136**: 183–190.
116. Ehrnst A, Barkholt L, Lewensohln-Fuchs I, Ljungman P, Teodosiu O, Staland Å, *et al.* CMV PCR monitoring in leukocytes of transplant patients. *Clinical and Diagnostic Virology.* 1995; **3**: 139–153.
117. Wang FZ, Dahl H, Linde A, Brytting M, Ehrnst A & Ljungman P. Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 1996; **88**: 3615–3620.
118. Persson L, Vikerforst T, Sjoberg L, Engervall P, Tidefelt U. Increased incidence of bacteremia due to viridians streptococci in an unselected population of patients with acute myeloid leukaemia. *Scand J Infect Dis* 2000, 32:615-621.
119. Pizzo, PA. Management of fever in patients with cancer and treatment-induced neutropenia. *N Engl J Med* 1993 328(18): 1323-32.
120. Persson L, Dahl H, Linde A, Engervall P, Vikerforst T, Tidefelt U. Human cytomegalovirus, human herpesvirus-6 and human herpesvirus-7 in

- neutropenic patients with fever of unknown origin. *Clin Microbiol Infect* 2003, 9:640-644.
121. Quadrelli C, Barozzi P, Riva G, Vallerini D, Zanetti E, Potenza L, *et al.* β -HHVs and HHV-8 in Lymphoproliferative Disorders. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011, 3(1):e2011043.
 122. Luppi M, G Torelli. The new lymphotropic herpesviruses (HHV-6, HHV-7, HHV-8) and hepatitis C virus (HCV) in human lymphoproliferative diseases: an overview. *Haematologica* 1996, 81(3): 265-81.
 123. Crawford, D. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001, 356(1408): 461-73.
 124. Ogata M, Satou T. Correlations of HHV-6 viral load and plasma IL-6 concentration with HHV-6 encephalitis in allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2009, 45(1): 129-36.
 125. Campadelli-Fiume G, Mirandola P. Human herpesvirus 6: An emerging pathogen. *Emerg Infect Dis* 1999, 5(3): 353-66.
 126. Ariffin H, Navaratnam P, Lin HP. Surveillance study of bacteraemic episodes in febrile neutropenic children. *Int J Clin Pract* 2002, 56(4):237–240.
 127. Castagnola E, Fontana V, Caviglia I. A prospective study on the epidemiology of febrile episodes during chemotherapy-induced neutropenia in children with cancer or after hemopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2007, 45(10):1296–1304.

128. Lehrnbecher T, Varwig D, Kaiser J, Reinhardt D, Klingebiel T, Creutzig U. Infectious complications in pediatric acute myeloid leukemia: analysis of the prospective multi-institutional clinical trial AMLBFM 93. *Leukemia* 2004, 18(1):72–77.
129. Mullen CA, Buchanan GR. Early hospital discharge of children with cancer treated for fever and neutropenia: identification and management of the low-risk patient. *J Clin Oncol* 1990, 8(12):1998–2004.
130. Sheen J-M, Kuo HC, Yu HR, Huang EY, Wu CC. Prolonged Acquired Neutropenia in Children. *Pediatr Blood Cancer*. 2009; 1-5.
131. Khan S, Dhadda A, Fyfe D, Sundar S. Impact of neutropenia on delivering planned chemotherapy for solid tumours. *European Journal of Cancer Care*. 2008; 17: 19-25.
132. Lodes U, Bohmeier B, Lippert H, Konig B, Meyer F. PCR-based rapid sepsis diagnosis effectively guides clinical treatment in patients with new onset of SIRS. *Langenbecks Arch Surg*. 2011; 1-10.
133. Wicki S, Keisker A, Aebi C. Risk prediction of fever in neutropenia in children with cancer: A step towards individually tailored supportive therapy? *Pediatr Blood Cancer*. 2008;51:778–783.
134. Paganini HR, Aguirre C, Puppa GI. A prospective, multicentric scoring system to predict mortality in febrile neutropenic children with cancer. *Cancer*. 2007; 109:2572–2579.

135. Meyer S, Gottschling S, Biran T. Assessing the risk of mortality in paediatric cancer patients admitted to the paediatric intensive care unit: A novel risk score? *Eur J Pediatr.* 2005; 164:563–567.
136. Katsimpardi K, Papadakis V, Pangadis A, Parcharidou A, Panagiotou JP. Infections in a pediatric patient cohort with acute lymphoblastic leukemia during the entire course of treatment. *Support Care Cancer.* 2006; (14): 277-284.
137. Hubacek P, Virgili A, Ward KN, Pohlreich D, Keslova P. HHV-6 DNA throughout the tissues of two stem cell transplant patients with chromosomally integrated HHV-6 and fatal CMV pneumonitis. *British Journal of Haematology.* 2009; (145): 349-398.

ANEXO I

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

EU,.....
....., RG....., responsável pelo
menor.....,

Endereço:..... Telefone:.....

Data Nascimento ___/___/___, N^o Prontuário, abaixo assinado, declaro ter pleno conhecimento do que se segue, CONCORDO que meu filho(a) participe como voluntário na pesquisa: **Infeções Herpéticas em Pacientes Oncológicos Pediátricos com Episódios de Febre.**

- Entendo que o objetivo deste estudo é a detecção dos vírus causadores de infecções herpéticas em pacientes oncológicos pediátricos e sua correlação com os exames de sangue (hemograma).
- Fui devidamente esclarecido (a) que será necessário coletar amostras de sangue de veia para a realização dos exames laboratoriais, a fim de comprovar a presença dos vírus estudados.
- Estou ciente que será necessária coleta por punção digital (pontinha de dedo) ou de veia para os exames de sangue, que são rotina do Hospital onde meu filho está sendo acompanhado (a), nos episódios onde ele encontra-se febril.
- Estou ciente que os exames não põem em risco a vida do meu filho (a) nem a das outras crianças.
- Receberei respostas ou esclarecimentos a quaisquer dúvidas, antes e durante o curso da pesquisa, sobretudo dos riscos, benefícios e outros assuntos relacionados.
- Todo o material utilizado na coleta da pesquisa será esterilizado e descartável e toda a coleta será feita dentro dos padrões e normas técnicas, por profissionais especializados como Biomédicos, Enfermeiros e Técnicos de Enfermagem.
- Será mantido o caráter confidencial as informações relacionadas com a privacidade, proteção da minha imagem e do meu filho (a), garantindo que estas informações não serão utilizadas em prejuízo de pessoas e/ou comunidade. Não haverá remuneração financeira de qualquer espécie pela nossa participação neste estudo.
- Estou ciente que as informações médicas resultantes da pesquisa farão parte do prontuário médico do meu filho (a) e seguirão o regulamento de dados confidenciais e privacidade.
- Estou ciente de que caso os dados sejam utilizados em publicação médica ou de ensino, não serão utilizados nomes e os dados de identificação como foto, áudio, vídeo tape só serão utilizados com minha permissão por escrito.
- Estou ciente que serão respeitados nossos valores culturais, religiosos e morais.

- Estou ciente que como a minha participação e do meu filho é voluntária e poderei retirar a qualquer tempo o consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem problema de qualquer ordem e sem prejuízo ao seu cuidado.
- Declaro que recebi uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado por pelo menos um dos pesquisadores ou colaboradores do projeto.

As amostras serão armazenadas em freezer -80° graus, seguindo as normas da Resolução 347, como fonte de material biológico para estudos futuros após aceitação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Para isso, tenho a opção de aceitar ou não que meu material biológico seja armazenado para utilização em pesquisas futuras:

Autorizo o uso deste material para pesquisas futuras, desde que o projeto de pesquisa seja apresentado ao Comitê de Ética, sendo assim avaliado e aprovado.

Não autorizo o uso deste material em pesquisas futuras.

Declaro que recebi informações sobre o estudo e tive minhas dúvidas esclarecidas sobre a pesquisa, além disso, recebi também orientações sobre a utilização desta documentação para fins acadêmicos e científicos.

JUNDIAÍ, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Responsável Legal

Pesquisador Responsável

Daniel Thomé Catalan - Tel.: (11) 87528044

E-mail: dtcatalan@hotmail.com

Profa. Dra. Sandra Helena A. Bonon - Tel.: (19) 3249-1247

E-mail: sbonon@unicamp.br

Profa. Dra. Sandra Cecília B. Costa - Tel.: (19) 3289-2351

E-mail: costa@fcm.unicamp.br

- Hospitais: Grupo em Defesa da Criança com Câncer – Bolívar Risso: (11) 4815 8440; Laboratório de Vírus da Câmara de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP: (19) 3521 7734.

ANEXO II: Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Jundiaí.



FACULDADE DE MEDICINA DE JUNDIAÍ

Autarquia Municipal criada por Lei Municipal Nº 1506 de 12 de março de 1988 - C.N.P.J Nº 80.985.266/0001-09
Reconhecimento Federal Decreto Nº 71653 de 04/01/1973

R. Francisco Telles, 250 - CEP: 13.202-550 - Cx. Postal: 1295
Fone/Fax: (11) 4587-1095 - Jundiaí-SP - site: www.fmj.br - e-mail: fmj@fmj.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Jundiaí, 4 de novembro de 2009

Ilustríssimo Senhor
DANIEL THOMÉ CATALAN

Ref.: Aprovação de Projeto de Pesquisa.

Título: "INFECÇÕES HERPÉTICAS EM PACIENTES ONCOLÓGICOS PEDIÁTRICOS COM EPISÓDIOS DE FEBRE".

Prezado Pesquisador:

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP desta Faculdade, em reunião no dia 4 de novembro de 2009, no cumprimento de suas atribuições e após revisão ao seu protocolo de pesquisa em epígrafe, emitiu parecer **APROVANDO** os seguintes documentos:

- » Protocolo de Pesquisa original – Versão nº 1, de outubro de 2009.

Lembramos a V.Sa. que é necessário enviar a este CEP relatórios semestrais e relatório de eventos adversos, caso estes venham a ocorrer, assim como relatório final com os resultados da pesquisa, para finalização do processo. Quaisquer dúvidas estamos à disposição.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rogério Bonassi Machado
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa