

SHEILA DE LIMA KALLAS

**DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO CONGÊNITA POR
CITOMEGALOVÍRUS PELA REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE NA UNIDADE DE INTERNAÇÃO
NEONATAL DO CAISM-UNICAMP**

CAMPINAS

Unicamp

2008

SHEILA DE LIMA KALLAS

**DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO CONGÊNITA POR
CITOMEGALOVÍRUS PELA REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE NA UNIDADE DE INTERNAÇÃO
NEONATAL DO CAISM-UNICAMP**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em Saúde da Criança e do Adolescente.

ORIENTADOR: PROF. DR. SERGIO TADEU MARTINS MARBA

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

K125d Kallas, Sheila de Lima
 Diagnóstico da infecção congênita por citomegalovírus pela reação
 em cadeia da polimerase na unidade de internação neonatal do CAISM
 - UNICAMP / Sheila de Lima Kallas. Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Sérgio Tadeu Martins Marba
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citomegalovírus. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3.
Recém-nascido. I. Marba, Sérgio Tadeu Martins. II. Costa,
Sandra Cecília Botelho. III. Calil, Roseli. IV. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. V. Título.

Título em inglês : Diagnosis of congenital cytomegalovirus infections by polymerase chain reaction in the intensive neonatal care unit of the CAISM - UNICAMP

Keywords: • Cytomegalovirus
 • Polymerase chain reaction
 • Newborn

Titulação: Mestre em Saúde da criança e do Adolescente
Área de concentração: Saúde da criança e do Adolescente

Banca examinadora:

Prof. Dr. Sérgio Tadeu Martins Marba
Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva
Profa. Dra. Maria Regina Bentllin

Data da defesa: 22 - 02 - 2008

Ata da Comissão Examinadora de Tese de Mestrado a que se submeteu **Sheila de Lima Kallas, RA: 019547**, aluno(a) regularmente matriculado(a) no Curso de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Ata da Comissão Examinadora de Tese do(a) aluno(a) **Sheila de Lima Kallas, RA: 019547**, aluno(a) regularmente matriculado(a) no Curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, nível de Mestrado. Aos vinte e dois dias do mês de fevereiro de Dois Mil e Oito com início às quatorze horas no Auditório CIPED/FCM/UNICAMP, reuniu-se a Comissão Examinadora para a prova em epígrafe, formada pelos Professores(as) Doutores(as): Sergio Tadeu Martins Marba, Matrícula: 64513 presidente e orientador, Maria Regina Bentlin e Marcos Tadeu Nolasco da Silva, membros. Os trabalhos foram considerados abertos pelo Prof. Dr. Sergio Tadeu Martins Marba, que agradeceu a presença de todos e passou a palavra ao(a) candidato(a), para que expusesse seu trabalho de Tese, o qual teve a duração de “trinta minutos” e versou sobre o tema **“ESTUDO DA INFECÇÃO CONGÊNITA POR CITOMEGALOVÍRUS PELA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) NA UNIDADE DE INTERNAÇÃO NEONATAL DO CAISM-UNICAMP”**. A seguir deu-se início as arguições na seguinte ordem: Prof.(a) Dr.(a) Maria Regina Bentlin, Prof. Dr. Marcos Nolasco e Prof. Dr. Sergio Tadeu Martins Marba, que colocaram suas dúvidas, as quais foram sendo esclarecidas pelo(a) candidato(a). Logo após foi dado um intervalo de dez minutos para que os examinadores proferissem um parecer final. Considerando o candidato(a) aprovado(a) por unanimidade e levando em conta a relevância do trabalho apresentado, a Banca Examinadora houve por bem concluir pela aprovação. Portanto, o(a) candidato(a) foi considerado **“Aprovado(a)”**, fazendo jus ao Título de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente. Para que o respectivo título possa ser concedido, com as prerrogativas legais dele advindas, é necessário que ocorra a entrega dos volumes definitivos no prazo máximo de **60 dias**, a contar da data da defesa. Nada mais havendo, eu, Tathiane Krahenbuhl, Secretário(a) da SCPG – Saúde da Criança e do Adolescente, lavrei a presente ata. Campinas, 22 de fevereiro de 2008.

Prof. Dr. Sergio Tadeu Martins Marba



Prof.(a) Dr.(a) Maria Regina Bentlin



Prof. Dr. Marcos Nolasco



DEDICATÓRIA

*A Mamãe, Papai,
Maguinho e Helena.*

AGRADECIMENTOS

À Dra Roseli, que primeiro acreditou em mim e na possibilidade dessa tese, e me acompanhou, orientou e muito ajudou em toda trajetória desse trabalho. Inicialmente o respeito e admiração por seu trabalho me fizeram procurar você e lhe pedir ajuda, hoje, o que nos liga é ainda mais forte, a amizade. Muito obrigada!

À Dra Sandra, que com muita sutileza, objetividade e clareza, fez com que esse trabalho fosse possível, ao me abrir as portas do laboratório, dispondo-me de todos os recursos necessários. Obrigada pela orientação e pela gentileza. Obrigada por ter acreditado!

Ao Dr Sérgio, que inicialmente seria somente um nome "emprestado" para que a burocracia não impedisse a realização desse trabalho. Ao longo do tempo, nos momentos de decisão, resolução, e, principalmente, na redação final do trabalho, sua presença foi indispensável e de grande valia. Muito obrigada, Dr Sérgio!

À Edna, técnica de enfermagem do CAISM, responsável pela coleta de sangue dos recém-nascidos. Obrigada por sua boa vontade, simpatia e alegria. Muito obrigada pela ajuda! Sem você não seria possível...

À Paula, bióloga responsável pelo laboratório, a pessoa que me apresentou às técnicas de biologia molecular e pacientemente me ensinou e auxiliou em todas as etapas da execução dos exames. Obrigada pela convivência! Admiro muito a profissional que você é, e, hoje, sou muito feliz de tê-la como amiga!

A todos os amigos do laboratório: Cris e Carolzona que me auxiliaram na execução dos exames, Ana Maria, Bia, Carolzinha, Gláucia, Fernanda, Anali, Keila, Emanuel, Angélica. Você também, Paula! Vocês transformaram o que seria um trabalho árduo num ambiente amigável, leve, onde sempre era bom estar. Sinto saudades...

À Dra Cida Mezzacapa, profissional que muito admiro, que fez parte da minha banca de qualificação e principalmente que fez parte da minha formação como neonatologista.

À Dra Mônica Pessoto, que me ajudou nos dados para o artigo de qualificação, pessoa admirável que ensina principalmente com o exemplo de compromisso total com o paciente.

A todos os médicos docentes, assistentes e residentes da neonatologia que me apoiaram na realização deste trabalho.

À equipe de enfermagem da neo do CAISM, que auxiliou na coleta dos exames de urina. Obrigada pela paciência.

A Andréa e Val, secretárias da neonatologia, sempre prontas a ajudar.

A José Vilton, estatístico do CAISM.

A Tathiane, secretária da pós-graduação.

A meu irmão Edson, que me auxiliou na fase final, por sua paciência, gentileza e tolerância, abrandando meu desespero... Obrigada!

Ao Maguinho, obrigada pelo companheirismo, pela cumplicidade e até pelas críticas. Você me faz querer melhorar sempre!

Obrigada aos bebezinhos, razão maior dessa pesquisa.

*"Quando todos pensam o mesmo,
ninguém está pensando".*

Walter Lippmann

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xiii</i>
ABSTRACT.....	<i>xv</i>
1- INTRODUÇÃO.....	17
2- OBJETIVOS.....	27
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	29
4- RESULTADOS.....	43
5- DISCUSSÃO.....	50
6- CONCLUSÕES.....	57
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
8- ANEXOS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AIG	Adequado para a idade gestacional
BERA	"Brain evoked reflex auditory": Audiometria de respostas elétricas do tronco cerebral
CMV	Citomegalovírus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Desoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EOA	Emissões otoacústicas evocadas
GIG	Grande para a idade gestacional
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV	Herpes Simples Vírus
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
KCl	Cloreto de Potássio
M	Molar
ml	Mililitros
μ l	Microlitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio

nPCR	Nested PCR
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIG	Pequeno para a idade gestacional
RN	Recém-nascido
RNPT	Recém-nascido pré-termo
RNT	Recém-nascido a termo
Rpm	Rotações por minuto
TE	Tampão de TRIS e EDTA
TEB	Tampão de TRIS, EDTA e ácido bórico
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade
US	Ultra-som
UTI	Unidade de tratamento intensivo

LISTA DE TABELAS

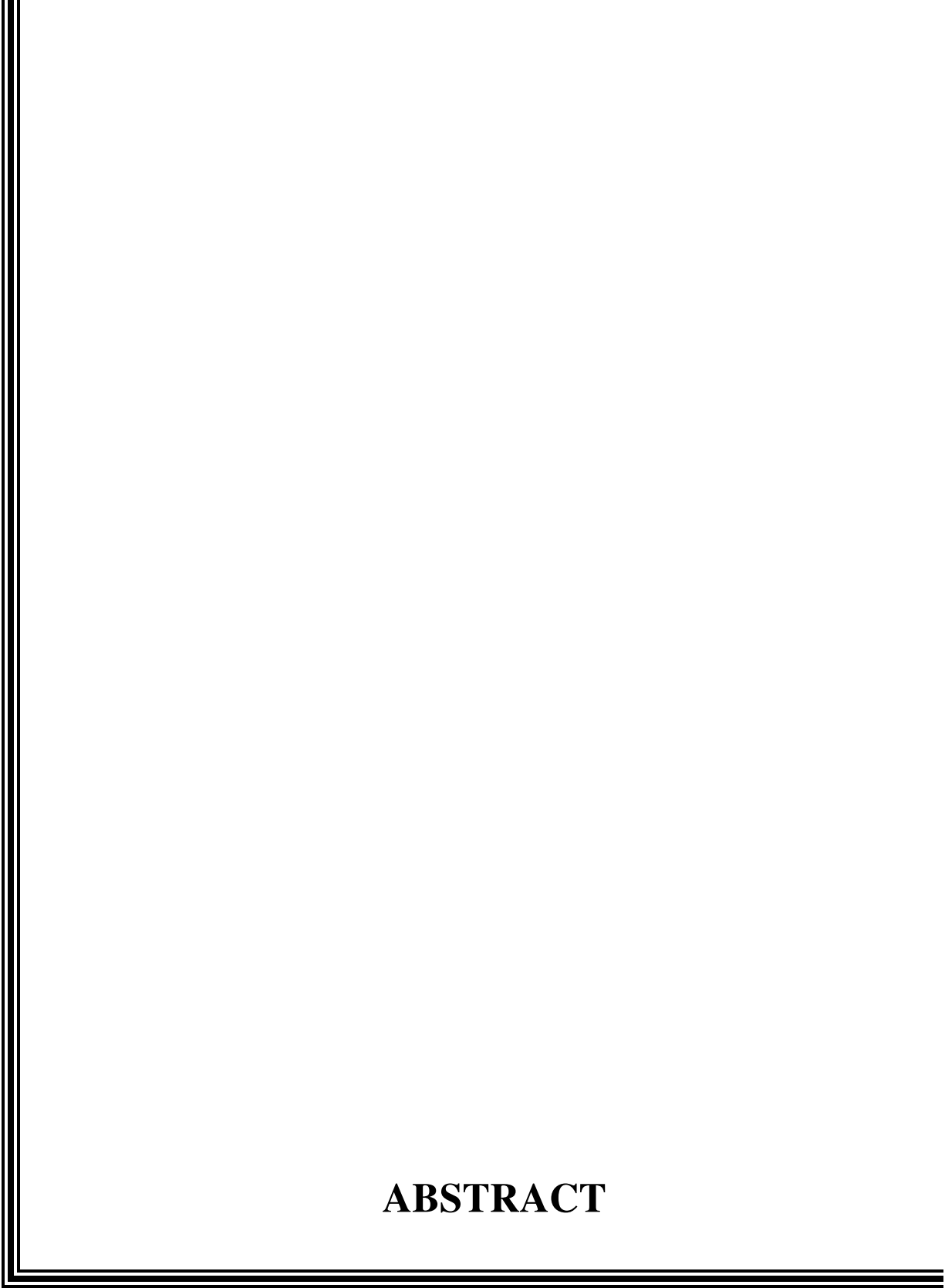
	PÁG.
Tabela 1- Resultados da n-PCR para CMV em sangue estocado em papel filtro em relação à n-PCR em urina.....	44
Tabela 2- Frequência dos diagnósticos de CMV detectados pelo padrão ouro.....	44
Tabela 3- Desempenho do método de nPCR para CMV em papel de filtro em relação ao diagnóstico estabelecido pelo padrão ouro.....	45
Tabela 4- Estatística descritiva da variável idade materna em anos.....	47
Tabela 5- Estatística descritiva da variável procedência materna.....	48
Tabela 6- Frequência da realização de pré-natal entre as mães.....	48
Tabela 7- Frequência do tipo de parto entre as mães.....	48
Tabela 8- Frequência das causas de parto cesáreo.....	48
Tabela 9- Frequência da sorologia para CMV entre as mães.....	49
Tabela 10- Distribuição por peso entre os recém-nascidos.....	49
Tabela 11- Distribuição da classificação da idade gestacional entre os recém-nascidos.....	49
Tabela 12- Estatística descritiva da variável idade gestacional em semanas..	49

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Amplificação do gene da β -globina humana nas amostras de sangue estocadas em papel filtro: visualização em gel de agarose 2% sob luz ultravioleta.....	46
Figura 2- Nested PCR para CMV de amostras de sangue estocado em papel filtro: visualização em gel de agarose 2% sob luz ultravioleta.....	47

RESUMO

Os objetivos do estudo foram determinar a prevalência da infecção congênita por citomegalovírus em recém-nascidos internados na unidade de internação neonatal do CAISM-UNICAMP, avaliar a eficácia da Nested-PCR para citomegalovírus em sangue estocado em papel filtro e descrever variáveis epidemiológicas da população estudada. Foi realizado um estudo epidemiológico transversal, onde foram selecionados recém-nascidos internados na unidade de internação neonatal durante o período de 01 de Abril de 2005 a 30 de Junho de 2006. Foram coletadas amostras de urina dos recém-nascidos e calculada a prevalência da infecção congênita por CMV pelo método diagnóstico da Nested PCR. Para validação do teste diagnóstico, foram coletados, concomitantemente com a urina, amostras de sangue dos recém-nascidos, estocados em papel filtro, e realizada a Nested-PCR. Os resultados da Nested-PCR em papel filtro foram comparados com os da urina e foram calculados sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo. Dados epidemiológicos da população foram colhidos pela revisão de prontuários. Foram obtidos os seguintes resultados: sensibilidade 75% , especificidade 99,4%, valores preditivos positivo 60,0% e negativo 99,7%. A prevalência da infecção congênita por CMV foi de 1,2%. A média de idade materna foi de 25,5 anos. A maior parte das mães, 40,9%, foram procedentes de Campinas; 86,3% delas realizaram pré-natal, 96,2% das que realizaram o pré-natal não realizaram sorologia para CMV, 65,3% dos partos foram por cirurgia cesariana, sendo que em 46% das cesáreas a indicação foi sofrimento fetal agudo. Sobre os recém-nascidos, 74,3% deles eram pré-termos, 57% pesavam menos que 2 kg, sendo a média de idade gestacional de 34,2 semanas. Concluimos que a prevalência da infecção congênita foi baixa e que o método diagnóstico Nested-PCR em sangue estocado em papel filtro teve alta especificidade e moderada sensibilidade.



ABSTRACT

The aims of this study were: to determine the prevalence of congenital infection by cytomegalovirus in newborn patients of the intensive neonatal care unit of the CAISM-UNICAMP Hospital; to evaluate the efficacy of Nested PCR diagnostic test in blood stored on filter paper and to describe epidemiological characteristics of this population. A cross section study was made including newborns admitted in the intensive care unit from April first, 2005 to June 30, 2006. Urine samples were collected from newborns and the prevalence was determined by Nested-PCR. To evaluate the efficacy of Nested PCR in blood stored on filter paper, the Nested-PCR in urine samples were compared to those in blood samples. Sensibility, specificity, positive and negative predictive values were calculated. Epidemiological characteristics of the population were described. The following results were observed: sensibility: 75%; specificity: 99, 4%; positive predictive values: 60, 0% and negative predictive values: 99,7%. The prevalence of congenital cytomegalovirus infection, calculated by Nested-PCR in urine samples was 1,2% in this period. The average of mother age was 25,5 years old. The most of mothers (40,9%) were from Campinas; 86,3% of them had prenatal care; 96,2% of the mothers who had prenatal care didn't had CMV serology; 65,3% of the delivery were by caesarean, and the reason of caesarean was acute fetal suffering in 46%. The newborn characters were: 74,3% were premature babies, 57% had weight less than 2 kilograms and the average of birth age was 34,2 weeks. We concluded that the prevalence of the congenital infection by CMV was low and that Nested PCR diagnostic test in blood stored on filter paper is highly specific and moderately sensible.

1- INTRODUÇÃO

O citomegalovírus humano (CMV), também conhecido como *Herpes-vírus 5*, é o maior vírus da família *Herpesviridae* e é morfologicamente indistinguível dos outros herpes-vírus humanos, contendo uma fita dupla de DNA, circundada por um capsídeo icosaédrico com 162 capsômeros. O capsídeo é revestido por um envelope com glicoproteínas. Entre o capsídeo e o envelope está o tegumento, que contém proteínas virais e enzimas. Como vírus envelopados, os herpes-vírus são sensíveis ao ácido (pH<5), a solventes, a detergentes e ao ressecamento. São termolábeis, sendo totalmente inativados a 56°C por 30 minutos; pela exposição ao éter por duas horas e pela luz ultravioleta por cinco minutos (DREW, 1992).

Como todos os herpes-vírus, o CMV tem capacidade de se manter latente nos hospedeiros por longos períodos após uma infecção aguda primária e nestes períodos localiza-se em linfócitos, monócitos, em células epiteliais e endoteliais. Oportunistas por excelência, os herpes-vírus, durante uma imunossupressão do hospedeiro, podem se reativar e causar infecção ativa. Pacientes submetidos a transplantes de rim, fígado, medula ou coração, portadores de síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), pacientes em tratamento quimioterápico e fetos e recém-nascidos, estes últimos devido à imaturidade do sistema imunológico, incluem-se entre aqueles que apresentam elevados riscos de contrair doença disseminada por CMV (HO, 1990; COSTA et al.,1994; ERICE et al.,1989; GILBERT et al., 1989; MACHER et al., 1983; RUBIN et al., 1977).

Atualmente, a infecção por CMV é, na maioria das vezes, controlada em pacientes imunodeficientes por drogas antivirais disponíveis. Entretanto, esses vírus continuam a manter seu papel como o mais grave e comum agente de infecção congênita e perinatal no homem (REVELLO e GERNA, 2002).

Estudos analisando a faixa etária e a soroprevalência demonstram que existem dois períodos de maior ocorrência da infecção primária durante a vida. O primeiro seria na infância, devido à infecção perinatal, e o segundo na adolescência, pela transmissão sexual. São demonstrados casos de infecção por CMV em praticamente todas as regiões do mundo. A prevalência de anticorpos para CMV na população adulta varia de 40 a 100%, sendo mais baixa em países desenvolvidos e muito alta em países em desenvolvimento, variando, assim, de acordo com o nível sócio-econômico da população (HO, 1990). A prevalência da

infecção congênita por CMV é variável em diversas partes do mundo, ocorrendo em 0.2 a 2.6% de todos os nascimentos. Estudos na cidade de São Paulo mostraram taxas de 0.98% em população de nível sócio-econômico baixo e 0.49% em população de nível sócio-econômico médio. Estudo realizado em Ribeirão Preto mostrou que 2.6% dos recém-nascidos apresentavam infecção congênita por CMV (PANNUTI et al., 1985; MACHADO et al., 1991; YAMAMOTO et al., 1999a). Ao estudar população específica de recém-nascidos internados em unidades de terapia intensiva, autores encontraram uma variação de prevalência de 0,8 a 15,7% (BARBI et al., 1985; PANHANI e HEINONEN, 1994; SANTOS et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2001; MORGAN et al., 2003; NAGY et al., 2004; MIURA et al., 2006).

A infecção congênita por CMV pode resultar tanto da infecção primária materna como da recorrência de infecção pré-existente materna. A taxa de transmissão vertical é de 40 a 50% na infecção primária e de 0.5 a 2% na infecção recorrente. As manifestações clínicas são quase que exclusivas de recém-nascidos de mães com infecção primária durante a gestação, mas acometem apenas 10 a 15% dos infectados. Nos casos resultantes de infecção recorrente materna somente 0 a 1% dos recém-nascidos apresentam infecção sintomática. De qualquer maneira, mesmo quando a infecção neonatal é assintomática, ocorrem seqüelas em 5 a 15% dos casos (YAMAMOTO et al., 1999b).

Muito pouco se sabe sobre os mecanismos de transmissão vertical do CMV, uma vez que a infecção materna é geralmente assintomática. Uma hipótese seria pela infecção dos tecidos placentários. Durante a infecção primária materna, leucócitos com os vírus no seu interior transmitiriam a infecção às células endoteliais da microvasculatura uterina. Estas células, estando em contato direto com citotrofoblastos também os infectariam, transmitindo os vírus para os tecidos subjacentes até chegar às células endoteliais fetais. No caso de reinfecção materna, a placenta, por funcionar como um “enxerto” induziria imunossupressão local no útero. Isto causaria reativação dos vírus latentes em macrófagos da parede uterina, com transmissão do vírus para os citotrofoblastos, e daí para o feto (REVELLO e GERNA, 2002).

A idade gestacional parece ter pouca influência na frequência da infecção fetal por CMV, mas observa-se acometimento mais grave quando a citomegalovirose é adquirida na primeira metade da gestação. Um estudo desenvolvido em 1983 mostrou que tanto crianças com infecção congênita sintomática por CMV quanto as que desenvolveram seqüelas tardias nasceram de mães com infecção primária nas primeiras 26 semanas de gestação (AHLFORS et al., 1983).

A detecção do CMV em materiais biológicos nas três primeiras semanas de vida define o diagnóstico de infecção congênita por CMV. Faz-se o diagnóstico de doença congênita por CMV quando, junto com a detecção viral, sinais e sintomas da doença são associados (PANNUTI et al., 1985; STAGNO et al., 1983; DEMMLER, 1996). A ausência de virúria ao nascimento, com detecção viral após a quarta semana de vida, define a infecção perinatal por CMV (MACHADO et al., 1991).

A condição de infecção congênita sintomática por CMV foi originalmente denominada doença de inclusão citomegálica. A doença afeta a maioria dos órgãos e os sinais consistem em atraso do crescimento intra-uterino, hepatoesplenomegalia e icterícia, pneumonite intersticial, trombocitopenia e púrpura. O sistema nervoso central está freqüentemente afetado, manifestando-se na forma de microcefalia e ventriculomegalia. Podem-se observar calcificações intracranianas numa distribuição periventricular. Outros problemas neurológicos incluem coriorretinite e surdez neurosensorial. Esses recém-nascidos também podem apresentar lesões cutâneas purpúreas proeminentes provocadas pela eritropoiese dérmica. Em alguns casos, os estigmas da toxoplasmose congênita podem assemelhar-se estreitamente aos da infecção congênita por CMV (GROSE, 1997).

A principal preocupação com recém-nascidos em relação à infecção assintomática é o desenvolvimento subsequente de surdez neurosensorial em até 20% dos casos, além de alterações neurológicas levando a retardo de desenvolvimento (GROSE, 1997). Os casos de perda auditiva por CMV na maioria das vezes passam despercebidos nas triagens auditivas realizadas ao nascimento. Isso porque tal sintomatologia acontece tardiamente, geralmente após um ano de vida. Ao avaliar testes audiométricos de triagem neonatal, visando predizer a capacidade de identificação da perda

auditiva neurossensorial causada por infecção congênita por CMV, autores acompanharam, durante seis anos, 388 crianças com diagnóstico de infecção congênita por CMV, submetendo-as a repetidos exames audiométricos, encontrando os seguintes resultados: perdas auditivas foram detectadas em 5,2% de todas as crianças ao nascimento e se manifestaram ao longo dos primeiros seis anos de vida, com uma incidência de 15,4%. Crianças com infecção sintomática ao nascimento tiveram uma incidência muito maior de perda auditiva do que as assintomáticas: 22,8% *versus* 4% aos três meses e 36,4% *versus* 11,3% aos seis anos de vida. Tais autores concluíram que os testes de triagem auditiva neurossensorial neonatal detectam menos da metade dos casos de perda auditiva causados por infecção congênita por CMV. (FOWLER et al.,1999). Outros autores, num estudo retrospectivo, ao investigar CMV congênita em 130 crianças com perda auditiva, realizando PCR em sangue de papel filtro usado inicialmente para triagem infecciosa dessas crianças ao nascimento, encontraram o CMV como causa de 20 a 30% de todos os casos de perda auditiva. Tais resultados sugerem que a infecção congênita por CMV tem um papel mais importante na etiologia da perda auditiva do que já foi previamente relatado (BARBI et al., 2003).

A infecção perinatal por CMV resulta da contaminação do recém-nascido com secreção cervical, durante o trabalho de parto, ou através do leite materno contendo o vírus. Ela também pode resultar de transmissão iatrogênica através de transfusão sanguínea, principalmente em prematuros politransfundidos. A infecção perinatal pode ser resultado de infecção primária materna, mas, freqüentemente, é causada por infecção recorrente. A mãe que apresenta recorrência de infecção citomegálica, é reconhecidamente a maior fonte de infecção perinatal. Cerca de 30% das crianças expostas ao vírus presente na secreção cervical, no momento do parto, poderão ser infectadas (YAMAMOTO et al., 1999b), com período de incubação variando de 4 a 12 semanas. Aproximadamente 30% destas mães poderão excretar o vírus pelo leite materno e 40 a 60% das crianças amamentadas por mais de um mês poderão adquirir a infecção (STAGNO et al., 1983). O CMV é isolado no leite materno, mais freqüentemente, após um mês do parto, do que do colostro ou do leite nas primeiras semanas pós-parto (NUMAZAKI, 1997), porém este vírus já foi isolado do leite materno desde o primeiro dia até nove meses após o parto (BOECKH & BOIVIN, 1998; ASANUMA et al., 1996). A pasteurização é altamente efetiva na inativação do CMV

(DWORSKY et al., 1982). A incidência da infecção perinatal é variável, de 8 a 38% (MACHADO et al., 1991). Em Ribeirão Preto a taxa foi de 38,2%, mostrando a elevada frequência desta infecção no nosso meio (YAMAMOTO et al., 1999b).

Os métodos diagnósticos utilizados para detecção do citomegalovírus na vida intra-uterina e pós-natal podem ser citológicos, histopatológicos, por isolamento do vírus, sorológicos, por identificação de antígenos virais e por identificação de ácidos nucléicos (CHOU, 1990). No Brasil os métodos mais comumente usados para a detecção de CMV são os métodos sorológicos, principalmente para diagnóstico materno durante a gestação. O diagnóstico de infecção primária materna por CMV apresenta algumas dificuldades. A presença de IgM anti-CMV sugere a ocorrência de infecção recente, porém a interpretação deve ser cuidadosa, uma vez que, na infecção primária, os anticorpos IgM podem persistir por dez a doze semanas, com variação de duas semanas a seis meses, podendo significar infecção recente ou que ocorreu semanas a meses antes da concepção (STAGNO et al., 1985). Além disso, anticorpos contra outros herpes-vírus podem resultar em reação cruzada com o CMV e dar reações falso-positivas (CHOU e SCOTT, 1990). A demonstração de soroconversão na gestante, ou seja, a detecção de anticorpos IgG específicos anti-CMV, de negativo para positivo, pode ser a melhor maneira de documentar a infecção primária (DEMMLER, 1996; LIPITZ et al., 1997). A elevação dos títulos de anticorpos específicos em duas amostras obtidas com intervalo de quatro semanas não é diagnóstica de primoinfecção, uma vez que a infecção recorrente pode ser acompanhada de elevação significativa destes títulos (DEMMLER, 1996). A detecção de IgM e IgG no recém-nascido, através dos diversos métodos sorológicos como Imunofluorescência indireta, ELISA ou Radioimunoensaio, é rotineiramente solicitada para o diagnóstico da infecção congênita por CMV, porém tem papel limitado, não permitindo afastar ou confirmar esta infecção na ausência de detecção viral. De 30 a 95% das crianças sabidamente infectadas intra-útero apresentarão anticorpos IgM anti-CMV ao nascimento (STAGNO, 1995; DEMMLER, 1996). Os anticorpos IgG anti-CMV são, geralmente, adquiridos da mãe e a sorologia seriada para avaliar elevação dos títulos não permite diferenciar a infecção congênita da perinatal.

O método considerado padrão ouro para o diagnóstico de infecção ativa por CMV é o isolamento do vírus em urina, saliva, secreções cervicais, sêmen, leite, sangue, lavados e aspirados de órgãos, por cultivo em fibroblastos humanos. Nos fibroblastos cultivados a partir de prepúcio e pulmões embrionários humanos, o CMV demonstra seu efeito citopático característico num período de aproximadamente 30 dias após a inoculação (COSTA, 1999). Além da cultura tradicional, o vírus pode ser isolado por método de identificação rápido, conhecido por *shell vial*, no qual a adsorção viral às células de cultura pode ser facilitada por centrifugação a baixa velocidade ou adição de dexametasona. Posteriormente, usando-se anticorpos monoclonais contra antígenos precoces imediatos do vírus, pode-se ter a conclusão do exame em 24 a 48 horas, por meio das técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase. Estas técnicas revelam a ligação dos anticorpos monoclonais às proteínas precoces expressas nos núcleos das células infectadas. Os resultados dessas técnicas, quando comparados à cultura tradicional, são variáveis e discordantes. Dependendo do anticorpo utilizado, a sensibilidade do teste é superior ao método de cultura tradicional (COSTA, 1999; GLEAVES et al., 1984; SHUSTER et al., 1985; STIRK e GRIFFITHS, 1987).

A reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a detecção do DNA viral através da amplificação de milhares de vezes de um pequeno segmento específico de DNA, é um método alternativo para materiais biológicos como urina, sangue, líquido, lavado broncoalveolar, apresentando sensibilidade e especificidade semelhantes ao isolamento viral e possuindo grandes vantagens tais como a necessidade de pequena quantidade de amostra, a possibilidade de congelar e armazenar as amostras até seu processamento e a rapidez do resultado, que pode ocorrer em menos de vinte e quatro horas (YAMAMOTO et al., 1998; REVELLO e GERNA, 2002). Os elementos envolvidos nesta reação são basicamente os mesmos componentes do processo de replicação que ocorre no interior das células: DNA que contém o trecho a ser amplificado (DNA alvo); nucleotídeos (A,T,C e G); enzima DNA polimerase; dois iniciadores – “primers” - (pequena sequência específica de DNA complementar ao DNA alvo). A reação ocorre em aparelho chamado termociclador que, através de sucessivas mudanças de temperatura, direciona as três etapas da reação:

1. Desnaturação: é o processo no qual ocorre a separação da dupla fita de DNA por meio da elevação da temperatura a aproximadamente 95°C;
2. Anelamento: uma vez separadas as fitas de DNA, a temperatura da reação é reduzida para aproximadamente 55°C e os iniciadores encaixam-se, um em cada fita, nas respectivas seqüências complementares vicinais à região alvo da amplificação;
3. Extensão: eleva-se a temperatura para aproximadamente 72°C para que a enzima Taq-DNA polimerase posicione-se junto aos iniciadores que se anelaram anteriormente e se comece a duplicação da fita, recrutando no meio os nucleotídeos que contenham as bases nitrogenadas complementares à fita molde.

Após o término deste ciclo, todo o processo é repetido a partir da desnaturação até a extensão por várias vezes (35 vezes em média) até que se obtenha uma quantidade razoável do DNA a ser amplificado.

A PCR foi usada pela primeira vez para detecção do CMV na urina de recém-nascidos infectados no fim da década de oitenta (DEMMLER et al., 1988). Quando comparada com o isolamento viral em cultura de tecido, o método de PCR seguido por hibridização mostrou uma sensibilidade e especificidade de 100% (REVELLO e GERNA, 2002). Estes resultados levaram cientistas a testar o método com amostras de sangue de recém-nascidos infectados, comparando-o com os demais. Em 1992, um estudo reportou a detecção do DNA do CMV no soro em cinco de cinco recém-nascidos infectados, enquanto que dois desses cinco RN eram negativos para IgM específica para CMV (BRYTTING et al., 1992). Em outro estudo, em 1995, foi demonstrada a detecção de DNA do CMV no soro de 18 dos 18 recém-nascidos com infecção congênita sintomática por CMV, um de dois recém-nascidos com infecção assintomática e zero de 32 casos controle (NELSON et al., 1995). Em 1999, autores investigaram o valor diagnóstico e prognóstico da carga viral por CMV determinado por diferentes amostras de sangue de 41 recém-nascidos com infecção congênita e 34 recém-nascidos não infectados. A sensibilidade da DNAemia pelo método de PCR quantitativo, antigenemia, viremia e

determinação por IgM foram, respectivamente 100%, 42.2%, 28.2% e 70.7%, enquanto que a especificidade foi de 100% para todos os métodos (REVELLO et al., 1999).

Uma simplificação do método de detecção do DNA viral no sangue de recém-nascidos com infecção congênita por CMV foi proposta em 1994 (SHIBATA et al., 1994) com amostras de sangue estocadas em papel de filtro. Entretanto, nesse estudo, encontrou-se uma alta taxa de positividade de DNA viral no sangue de recém-nascidos japoneses saudáveis, sugerindo a possibilidade de contaminação no laboratório. A proposta japonesa foi verificada por outros autores. Em 1996, com amostras de sangue coletadas de recém-nascidos nos primeiros dias de vida durante os procedimentos de coleta de rotina para doenças metabólicas e genéticas, verificou-se que dos recém-nascidos com infecção congênita por CMV, oito dos oito RN sintomáticos e 11 dos 11 assintomáticos, foram positivos para DNAemia. O método mostrou 100% de sensibilidade e especificidade quando comparado com isolamento viral por cultura (BARBI et al., 1996). Os mesmos autores avaliaram, em estudos posteriores, a eficácia do método reduzindo a quantidade de amostra para a metade: três discos de sangue em papel filtro de seis milímetros de diâmetro no primeiro estudo para três discos de três milímetros no segundo – encontrando resultados semelhantes: com tamanho amostral de 509 recém-nascidos, sendo 72 casos positivos, encontrou-se sensibilidade de 100% e especificidade de 99% (BARBI et al., 2000). Numa terceira tentativa esses autores encontraram os mesmos resultados reduzindo a quantidade da amostra para 1/6 da inicial: um disco de três milímetros (BINDA et al., 2004). Tais estudos, com menor quantidade de amostra visaram identificar as melhores condições de exame para triagem diagnóstica: menor custo e menor quantidade de material biológico. Também avaliando a técnica de PCR em sangue estocado em filtro de papel, em 1997 autores reportaram que, de 16 recém-nascidos com infecção congênita por CMV confirmada pela técnica de isolamento viral, 13 (81%) tiveram resultado positivo e três (19%) negativo. Todas as amostras de sangue dos controles sem infecção foram negativas. Entretanto quando 31 amostras em papéis de filtro foram estocadas acima ou abaixo das amostras testadas de recém-nascidos infectados, seis (19%) tiveram uma fraca reatividade, sugerindo que o DNA do CMV pode ser transferido de um papel de filtro para outro durante a estocagem (JOHANSSON et al., 1997).

Autores relataram a importância do estoque de sangue em papel filtro ao conseguirem fazer o diagnóstico retrospectivo de quatro casos de lactentes com diagnóstico de CMV com sintomatologia tardia – após as três primeiras semanas de vida – onde foi possível diagnosticar, em três casos, a infecção congênita e excluí-la em um caso, através da realização de PCR em sangue coletado em papel filtro, dentro das três primeiras semanas de vida, utilizados inicialmente para triagem metabólica neonatal (KIEZEBRINK-LINDENHOVIUS et al, 2001).

Outra vantagem do método de PCR em papel filtro é a possibilidade de estocagem do material por tempo prolongado, sem necessidade de refrigeração. Ao avaliar a estabilidade do DNA em sangue estocado em papel filtro, um estudo mostrou, através da amplificação do gene da β -globina pelo método de PCR, que o DNA permanece estável em condições ambientes tropicais por pelo menos dez anos, sem perda da qualidade de amplificação (CHAI SOMCHIT et al.).

O método Nested PCR (nPCR) é uma modificação da PCR que busca reduzir as possíveis contaminações causadas por amplificações de segmentos não desejados, devido à ligação dos “primers” a regiões incorretas do DNA que pode ocorrer no PCR convencional. A Nested PCR, que emprega, a partir do produto da primeira PCR, uma segunda etapa de amplificação com um par de “primers” internos aos utilizados na primeira etapa, visa aumentar a sensibilidade e especificidade do método (LINS COTT, 2002).

Mesmo quando assintomática, a infecção congênita por citomegalovírus pode muitas vezes causar, tardiamente, seqüelas graves tais como surdez sensorial e retardo de desenvolvimento. A precocidade no diagnóstico dessa infecção permite que se estabeleça também inicialmente o plano de seguimento especializado dessas crianças, possibilitando seu melhor desenvolvimento.

O estabelecimento de um método simples e eficaz é necessário para o diagnóstico da infecção por CMV. O método da nPCR em amostras de sangue armazenadas em papel filtro tem como vantagem uma maior facilidade de coleta e armazenamento, podendo ser inserido nas rotinas de triagem para doenças metabólicas já existentes em nosso meio.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Determinar a prevalência da infecção congênita por CMV e avaliar o método diagnóstico da Nested-PCR para CMV congênita em papel de filtro.

2.2- Objetivos específicos

Determinar a prevalência da infecção congênita em recém-nascidos internados na unidade de terapia intensiva e semi-intensiva do CAISM (Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher) da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas) por meio do método diagnóstico Nested-PCR em urina.

Avaliar a eficácia do método diagnóstico, para CMV congênita, da Nested-PCR em sangue armazenado em papel de filtro.

Descrever as variáveis epidemiológicas da população estudada.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Desenho do estudo

Estudo epidemiológico para estabelecer a prevalência da infecção congênita por CMV durante um período de 15 meses.

Estudo do tipo validação de teste diagnóstico.

Estudo epidemiológico do tipo descritivo para caracterizar a população estudada.

3.2- Critérios para a seleção dos sujeitos

Os sujeitos foram recém-nascidos internados na unidade de terapia intensiva e semi-intensiva do Serviço de Neonatologia do CAISM/UNICAMP, no período de 1º de abril de 2005 a 30 de junho de 2006, num total de 343 pacientes.

Foram excluídos do estudo: recém-nascidos cujos responsáveis não autorizaram a inclusão de seus filhos na pesquisa; recém-nascidos que receberam transfusão sanguínea antes que pudessem ser coletados os materiais biológicos – sangue e urina – para o estudo e recém-nascidos que apresentaram resultado inconclusivo – controle interno da reação não positivo – no exame da nested-PCR na urina.

3.3- Tamanho amostral

Para validação do teste diagnóstico da PCR em papel filtro para infecção congênita por CMV, considerando-se uma prevalência de expostos de 5% (PANHANI e HEINONEN, 1994; SANTOS et al., 2000; MORGAN et al., 2003; NAGY et al., 2004; MIURA et al., 2006), uma sensibilidade esperada de 99%, com erro aceitável para sensibilidade de 5% e nível de significância de 5%, o tamanho amostral mínimo necessário calculado para que os dados tivessem valor estatístico foi de 320 pacientes.

3.3.1- Conceitos

- a) Infecção congênita por CMV – nPCR positiva para CMV realizada em urina coletada até três semanas de vida.
- b) Padrão ouro – diagnóstico de infecção congênita por CMV estabelecido pelo método de nPCR em urina.
- c) Peso – peso de nascimento realizado na sala de parto em balança digital.
- d) Idade gestacional – avaliação da idade gestacional por amenorréia de certeza ou ecografia precoce, complementada por avaliação clínica pelo método de Capurro e/ou New Ballard.
- e) RN pré-termo – recém-nascido com idade gestacional menor que 37 semanas.
- f) RN termo – recém-nascido com idade gestacional entre 37 a 41 semanas completas.
- g) RN pós-termo – recém-nascido com idade gestacional igual ou maior que 42 semanas.
- h) PCR: Sigla de *polymerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase: reação de extensão de DNA que emprega dois iniciadores – “primers” - externos que hibridizam próximos um ao outro na fita de DNA molde (ou alvo), e permitem a produção de milhões de cópias do fragmento de DNA situado entre os dois “primers”.
- i) Hibridização: O pareamento de duas moléculas de DNA fita simples através da complementariedade de bases, seguindo a regra de Chargaff (A-T, G-C). Aplica-se a mesma designação para o pareamento RNA-DNA ou RNA-RNA.

- j) "Primers": iniciadores da síntese de DNA. São pequenos oligonucleotídeos sintéticos de fita simples de DNA. O “primer” vai parear com uma fita do DNA alvo, formando uma dupla fita. Para a PCR empregam-se, geralmente, dois “primers” que costumam ter entre 10 e 25 bases.
- k) Oligonucleotídeo: um filamento curto de ácido nucléico, em geral fita simples, que pode variar desde poucas bases até algumas dezenas. Em geral são sintéticos. São chamados abreviadamente de oligos (ex., oligodT, oligos para sequenciamento, etc.)
- l) dNTPs: Desoxinucleotídeos trifosfatados. Precursores da síntese de DNA, são empregados para a extensão de fitas simples *in vitro* pela ação de uma DNA polimerase, a partir de “primers” e DNA moldes adicionados ao sistema. Podem ser dATP, dGTP, dTTP ou dCTP, ou seus análogos dideoxi.
- m) Nested-PCR: consiste numa segunda PCR a partir do produto da primeira, com a utilização de pares de “primers” internos aos da primeira reação de amplificação.

3.3.2- Variáveis

- n) idade materna em anos: idade das mães, calculada em anos, no momento do parto.
- o) procedência materna: cidade de origem das mães.
- p) realização de pré-natal entre as mães: número de mães que realizaram e que não realizaram o seguimento pré-natal.
- q) tipo de parto entre as mães: distribuição em número do tipo de parto realizado entre as mães.
- r) causas de parto cesáreo: causas mais comuns que motivaram o parto cesáreo.

- s) sorologia para CMV entre as mães: número de mães que realizaram sorologia para CMV no pré-natal e resultados das sorologias.
- t) distribuição por peso entre os recém-nascidos: distribuição dos recém-nascidos por grupos de peso em gramas.
- u) distribuição da classificação da idade gestacional entre os recém-nascidos: distribuição dos recém-nascidos por grupos de idade gestacional, em semanas.
- v) média da idade gestacional em semanas: média das idades gestacionais dos recém nascidos, calculada em semanas.

3.4- Coleta de Dados e Amostras

Na admissão ao estudo, foram preenchidas pela pesquisadora fichas individuais para cada paciente, com dados obtidos a partir dos prontuários médicos desses pacientes. As fichas foram complementadas, ao longo do estudo, com os dados relativos aos exames laboratoriais (Ficha de Dados – ver Anexo 1) Esses dados foram usados para descrição da população estudada.

As amostras de sangue e urina foram coletadas de recém-nascidos internados na unidade de internação neonatal do Departamento de Pediatria da FCM - UNICAMP que se encontra no CAISM que possui 30 leitos, sendo 16 de unidade de terapia intensiva e 14 leitos de unidade semi-intensiva. Atende recém-nascidos pré-termos, de baixo peso ou com alguma outra patologia, nascidos predominantemente na própria maternidade e eventualmente recebe recém-nascidos da cidade de Campinas ou região que necessitem atendimento especializado. Estes recém-nascidos são atendidos por um corpo clínico constituído de docentes em neonatologia do Departamento de Pediatria da FCM-UNICAMP, médicos assistentes neonatologistas, médicos residentes do segundo e terceiro anos de Pediatria, por uma equipe de enfermagem constituída de enfermeiras e técnicos de enfermagem e por fisioterapeutas. Na unidade de internação da neonatologia do

CAISM/UNICAMP, a investigação diagnóstica para infecção por CMV é feita pelo método de pesquisa de nPCR (qualitativo) e antigenemia (quantitativo) no sangue, estocado em tubo contendo EDTA, e urina do recém-nascido somente a partir da suspeita clínica de infecção por CMV ou positividade de sorologias maternas. Não existe um programa de triagem de rotina para CMV congênito ou perinatal, podendo os casos assintomáticos passar despercebidos. A triagem auditiva neurosensorial pelo método BERA é feita em todos os pacientes com fator de risco para hipoacusia: recém-nascidos internados por mais de 48 horas na UTI; recém-nascidos do alojamento conjunto que falharam na avaliação de triagem auditiva pelo método de emissões otoacústicas evocadas (EOA); sinais e síndromes associadas à deficiência auditiva condutiva ou neurosensorial; infecções congênitas e anomalias craniofaciais. Todos os demais pacientes nascidos na unidade sem fatores de risco para hipoacusia são avaliados pelo método de EOA. De qualquer maneira, tal triagem tem suas limitações no diagnóstico de perda auditiva causada por infecção por citomegalovírus.

Para o processamento da nPCR para CMV em urina, foram coletadas, pela equipe de enfermagem do berçário, amostras de urina em saco coletor (1 ml) dos recém-nascidos internados, sendo que essas amostras foram coletadas nas três primeiras semanas de vida para que se pudesse caracterizar a infecção congênita por CMV.

Para o processamento da nPCR em papel de filtro, foram coletadas, pela equipe de enfermagem responsável pela coleta de exames dos recém-nascidos, amostras de sangue dos recém-nascidos internados no berçário do CAISM, também dentro das três primeiras semanas de vida.

Os exames foram processados no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecto-contagiosas da FCM- UNICAMP pela pesquisadora, pela bióloga responsável pelo laboratório e por técnicas em biologia molecular do laboratório. Este laboratório, localizado no Hospital das Clínicas da Unicamp, destina-se a diagnosticar infecções pelo método de biologia molecular e também a realizar pesquisas científicas que envolvam o método.

3.5- Técnicas Laboratoriais

3.5.1- Coleta e armazenamento prévio do material

- Papel filtro: a amostra de sangue de cada recém-nascido foi aplicada diretamente sobre o cartão (uma gota), e posteriormente foi aguardada a secagem completa. O papel filtro com a amostra de sangue foram envoltos em papel alumínio e armazenados em temperatura ambiente, ao abrigo da luz e da umidade, até o momento de uso.
- Urina: após a coleta, foi armazenada em uma geladeira a -70°C até sua utilização.

3.5.2- Extração do material do papel filtro

De cada papel filtro, foram removidos, das área onde foi aplicada a amostra de sangue do papel filtro, quatro discos, cada um com aproximadamente 1,0 mm de diâmetro. Cada dois destes discos foram colocados em um tubo estéril onde foram adicionados 200 μl do reagente de purificação MGM durante 20 minutos; e, após, lavado duas vezes com 200 μl do reagente MGM[®]. Após cada lavagem, o reagente era descartado. Posteriormente, foram adicionados 200 μl de tampão tris-EDTA (TE) no tubo que também foi lavado por duas vezes com esse reagente, sendo o TE descartado após cada lavagem. Os papéis eram deixados dentro do tubo até secarem completamente.

3.5.3- Preparo da urina

Em todos os procedimentos foram utilizadas amostras de urina sem nenhum tratamento prévio.

3.5.4- Detecção de partículas virais no sangue pela nested-PCR

3.5.4.a- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR) do sangue

A PCR seguiu o método descrito por SAIK et al. (1985) com algumas modificações. Cada reação de amplificação continha 2 discos de papel de 1 mm de diâmetro do DNA a ser estudado, 0,4 µl de cada “primer”, 4,0µl de buffer (50mM de cloreto de potássio; 20 mM de Tris-HCl - pH 8,4), 2,0 µl de cloreto de magnésio, 4,0µl da mistura de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) , 2U de Taq DNA polimerase e água destilada para completar o volume total de 40µl, num tubo Eppendorf®.

Foram complementados 35 ciclos de amplificação para cada amostra e cada ciclo constitui-se de:

desnaturação: separação das hélices de DNA por aquecimento a 96 graus centígrados durante cinco minutos;

anelamento: ligação complementar entre os “primers” e o DNA em temperatura de 55 graus centígrados por um minuto;

extensão: síntese do DNA pela Taq-polimerase, em temperatura de 72 graus centígrados por um minuto.

Os ciclos foram realizados automaticamente em uma termocicladora (DNA Thermal Cycler Perkin Elmer / Cetus, Norwalk, Conn, EUA®). As amostras foram aquecidas inicialmente a 94 graus centígrados por 7 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que pudessem interferir com a reação enzimática e, no último ciclo o período de extensão (72 graus centígrados) foi de sete minutos.

"Primers": para essa reação, foram usados um par de iniciadores externos, **MIE4** (CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C) e **MIE5** (CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTG G), que flanqueiam uma região do gene que codifica o principal antígeno precoce imediato do CMV, sendo específicas para o CMV, não amplificando DNA de outros herpes-vírus.

3.5.4.b- Nested PCR do sangue

Utilizando-se o mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação de 1,3µl foi reamplificado com o par de “primers” interno: **IE1** (CCACCC GTG GTG CCA GCT CC) e **IE2** (CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC). As condições da reação foram as mesmas usadas para fazer a primeira amplificação.

3.5.4.c- Detecção do fragmento amplificado

Após as duas reações: amplificação e reamplificação, 5µl do produto do “nested- PCR” foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio para visualização e fotografia do fragmento com luz ultravioleta. Nas amostras positivas foi observado um fragmento de DNA de 159 pares de bases ao passo que não foi amplificado nenhum fragmento nas amostras negativas.

Em todos os experimentos feitos, sempre foi usado como controle positivo da reação 1,0 µl da cepa AD-169 do CMV e como controle negativo um tubo com a mistura da reação apenas.

3.5.4.d- Amplificação gênica pela PCR com controle interno da reação (utilização de “primers” que detectam o gene da β-globina)

A amplificação do fragmento do gene β-globina humana evidencia a viabilidade do DNA da amostra e funciona como controle da reação de PCR. A não amplificação desse gene demonstra que o DNA presente na amostra avaliada não é viável. A reação em cadeia da polimerase com controle interno da reação seguiu o método descrito por SAIKI et. Al (1985), com algumas modificações. O produto amplificado foi usado como controle interno da reação. O fragmento obtido indicou a presença de DNA.

Foram usados dois iniciadores– **PCO3+** (5'CCT CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC3') e **PCO4+** (5'TCA CCA CCA ACT TCA TCC ACG TTC ACC3') que flanquearam uma região constante do gene da beta-globina.

As condições da reação foram as mesmas usadas para fazer a primeira amplificação (PCR) e as condições de detecção também foram as mesmas. Em todas as amostras foi observado um fragmento de 257 pares de base correspondente ao gene da beta-globina. Nos casos em que não houve a amplificação do gene da beta-globina, mesmo após repetições do procedimento, o resultado final da PCR sangue papel filtro foi considerado inconclusivo, já que não se puderam excluir casos de falso negativo.

3.5.5- Detecção de partículas virais na urina pela nested-PCR

3.5.5.a- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR seguiu o método descrito por SAIK et al. (1985) com algumas modificações. Cada reação de amplificação continha 1,0µl da urina (DNA), 0,2 µl de cada “primer” (MIE4 e MIE5), 2,0µl de buffer (50mM de cloreto de potássio; 20 mM de Tris-HCl - pH 8,4), 0,6 µl de cloreto de magnésio 50 mM, 2,0µl da mistura de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,5 U de Taq DNA polimerase, e água destilada para completar um volume de 20 µl.

Foram complementados 35 ciclos de amplificação para cada amostra e cada ciclo constitui-se de desnaturação, anelamento e extensão.

Os ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler Perkin Elmer / Cetus, Norwalk, Conn, EUA”). As amostras foram aquecidas inicialmente a 94 graus centígrados por 7 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que pudessem interferir com a reação enzimática e, no último ciclo o período de extensão (72 graus centígrados) foi de sete minutos.

3.5.5.b- Nested PCR

Utilizando-se do mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação -0,5µl foi reamplificado com o par de “primers” interno: IE1 e IE2. As condições da reação foram as mesmas usadas para fazer a primeira amplificação.

3.5.5.c- Detecção do fragmento amplificado

Após as duas reações de amplificação e reamplificação, 5µl do produto do “nested PCR” foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio para visualização e fotografia do fragmento com luz ultra-violeta. Nas amostras positivas foi observado um fragmento de DNA de 159 pares de bases ao passo que não foi amplificado nenhum fragmento nas amostras negativas.

Em todos os experimentos feitos, sempre foi usado como controle positivo da reação a cepa AD-169 do CMV e como controle negativo um tubo com a mistura da reação apenas.

3.5.5.d- Amplificação gênica pela PCR da urina com controle interno da reação - plasmídeo

A amplificação do plasmídeo controle sintetizado no laboratório contendo, em suas extremidades, a sequência complementar dos “primers” MI4 e MIE5- funciona como controle da reação de PCR. A não amplificação desse gene demonstra que houve algum inibidor da reação na urina. A reação em cadeia da polimerase com controle interno da reação seguiu o método descrito por SAIKI et al. (1985), com algumas modificações. O produto amplificado foi usado como controle interno da reação. O fragmento obtido indicou a presença de DNA.

As condições da reação foram as mesmas usadas para fazer a primeira amplificação (PCR) e as condições de detecção também foram as mesmas. Em todas as amostras foi observado um fragmento de 365 pares de base correspondente ao gene do plasmídeo. Nos casos em que não houve a amplificação do gene do gene do plasmídeo, mesmo após repetições do procedimento, o resultado final da PCR no sangue foi considerado inconclusivo, já que não se puderam excluir casos de falso negativo.

3.5.6- Cuidados especiais que foram tomados para evitar contaminação das amostras durante a reação

- todas as amostras amplificadas foram manipuladas em sala diferente (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 de tubos de microcentrífuga foi efetuada rápida centrifugação para concentrar o líquido contido no tubo na região inferior e evitar sua dispersão por aerosol;
- todo o material plástico (ponteiras e ependorffs®) utilizado era novo e não autoclavado e foi descartado após o uso;
- trocas constantes de luvas foram feitas durante todo o procedimento.

Nos casos em que o diagnóstico de infecção congênita por CMV aconteceu após a alta do paciente, os responsáveis pelo RN foram informados para que fizessem o acompanhamento necessário.

3.6- Análise de Dados

Para análise de dados foi utilizado o programa SPSS versão 10.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, EUA).

Para o estudo de validação do teste diagnóstico: foram montadas tabelas onde foram computados os resultados da PCR em papel de filtro em relação aos resultados da PCR em urina (utilizado como padrão-ouro). A partir desses dados foram calculados, então, a sensibilidade (proporção dos indivíduos com a doença que têm um teste positivo para a doença); a especificidade (proporção dos indivíduos sem a doença que têm um teste negativo para a doença); o valor preditivo positivo -VPP (probabilidade de doença em um paciente com resultado positivo) e o valor preditivo negativo - VPN (probabilidade de não ter a doença quando o resultado é negativo) (FLETCHER et al ., 1996):

		PCR em urina		
		positivo	negativo	total
PCR em papel de filtro	positivo	a	b	a+b
	negativo	c	d	c+d
Total		a + c	b+d	a+b+c+d

$$\text{sensibilidade: } \frac{a}{a + c} ; \quad \text{especificidade: } \frac{d}{b + d} ;$$

$$\text{VPP: } \frac{a}{a + b} ; \quad \text{VPN: } \frac{d}{c + d} .$$

Para o estudo de frequência: foi calculada a prevalência de infecção congênita por CMV no período de um ano e meio, sendo definida a prevalência, nesse caso do tipo prevalência período, como a proporção de um grupo de pessoas que apresenta uma doença em qualquer momento durante um período especificado de tempo (FLETCHER et al., 1996). Nesse estudo, os casos, ou numerador, foram definidos como os recém-nascidos com

nPCR para CMV positivos na urina, e a população, ou denominador, foram todos os recém-nascidos internados na unidade neonatal intensiva e semi-intensiva do CAISM no período de tempo do estudo

Para descrever o perfil da amostra segundo as diversas variáveis, foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas e estatísticas descritivas das variáveis contínuas.

3.7- Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP sem restrições.

Foram respeitados os termos da Declaração de Helsinque emendada na cidade de Edimburgo, Escócia em 2000 e da Resolução 196 (CNS 196/96) em relação às diretrizes e normas de pesquisa envolvendo seres humanos.

Na admissão ao estudo, os pais dos recém-nascidos foram informados sobre os objetivos e métodos da pesquisa e os recém-nascidos só foram admitidos quando os pais concordaram, assinando um Termo de Consentimento livre e esclarecido, (Anexo 2), elaborado em duas vias, sendo uma cópia para o responsável pelo sujeito da pesquisa e outra cópia para o pesquisador.

Os resultados dos exames colhidos foram afixados no prontuário individual de cada paciente e seus pais foram devidamente informados.

Os responsáveis pelos recém-nascidos que participaram do estudo não receberam qualquer tipo de remuneração por essa participação.

4- RESULTADOS

Foram avaliados, inicialmente, 343 recém-nascidos de 324 mães, sendo que 17 dessas mães apresentavam gestação gemelar e uma apresentava gestação trigemelar. Quatro dos recém-nascidos estudados apresentaram resultados inconclusivos em relação à nested-PCR da urina (o controle interno da urina não positivou), sendo, então, excluídos dos resultados. Assim, os cálculos de prevalência e de validação diagnóstica, além da descrição da população estudada, se basearam numa população de 339 recém-nascidos de 320 mães.

No período de tempo de coleta dos dados para o estudo, 422 recém-nascidos estiveram internados no serviço. Além dos pacientes excluídos pelos critérios de exclusão, por razões de ordem prática, não se pôde colher exame de todos os pacientes internados. Assim, o tamanho amostral correspondeu a 81,2% dos pacientes internados.

Tabela 1- Resultados encontrados da nested-PCR para CMV em sangue estocado em papel filtro, em relação à nested-PCR em urina:

		PCR em urina		
		positivo	negativo	total
PCR em papel de filtro	positivo	3	2	5
	negativo	1	333	334
	total	4	335	339

4.1- Resultado da prevalência de infecção congênita por CMV nos recém-nascidos internados na Unidade de Internação Neonatal do CAISM

Tabela 2- Frequência dos diagnósticos de CMV detectados pelo padrão ouro (PCR em urina)

PCR urina	N	%
Negativo	335	98,8
Positivo	4	1,2
Total	339	

4.2- Avaliação do método diagnóstico nPCR para CMV em papel filtro em relação ao padrão ouro – nPCR urina:

$$\text{sensibilidade: } \frac{3}{3 + 1} ; \quad \text{especificidade: } \frac{333}{2 + 333} ;$$

$$\text{VPP: } \frac{3}{3 + 2} ; \quad \text{e} \quad \text{VPN: } \frac{333}{1 + 333} .$$

Tabela 3- Desempenho do método de nPCR para CMV em papel de filtro em relação ao diagnóstico estabelecido pelo padrão ouro (nPCR em urina):

Diagnóstico	estimativas	(IC 95%)
Sensibilidade	75,0%	(32,56 - 117,44)
Especificidade	99,4%	(98,54 - 100,23)
Valor preditivo positivo	60,0%	(17,06 - 102,94)
Valor preditivo negativo	99,7%	(99,09 - 100,29)
Acurácia	99,09%	(98,07 - 100,11)

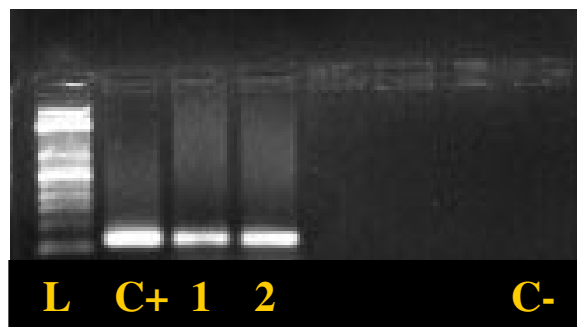


Figura 1- Eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio fotografada sob luz ultravioleta de amostras de sangue estocado em papel filtro visualizando amplificação do gene da β -globina humana. **L:** marcador de peso Molecular – Ladder 100 pb Gibco – BRL, USA); **C+:** controle positivo da reação; **1,2:** pacientes positivos para β -globina; **C-:** controle negativo:

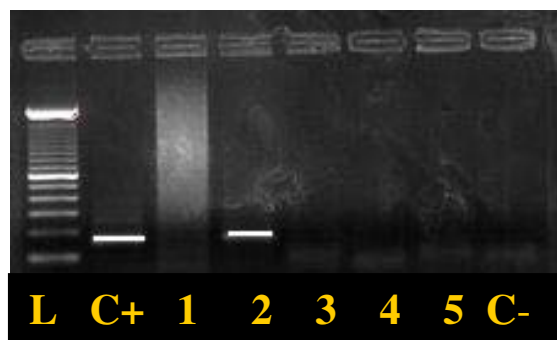


Figura 2- Eletroforese em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio fotografada sob luz ultravioleta de amostras de sangue estocado em papel filtro submetidas a amplificação e reamplificação (nested-PCR) para CMV. . **L:** Marcador de peso Molecular – Ladder 100 pb Gibco – BRL, USA); **C+:** Controle positivo da reação; **1,3,4,5:** pacientes negativos para CMV; **2:** paciente com resultado positivo para CMV; **C-:** controle negativo:

4.3- Resultados das análises descritivas da população estudada

As características da população estudada – dados maternos e dados dos recém-nascidos são evidenciadas nas tabelas a seguir:

Tabela 4- Estatística descritiva da variável idade materna em anos.

Características	n	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Idade materna	306*	25,5	6,8	25	14	46

* em 14 casos, não havia descrição da idade materna

Tabela 5- Estatística descritiva da variável procedência materna.

Procedência materna	n	%
Campinas-SP	131	40,93
Paulínia-SP	21	6,56
Hortolândia-SP	12	3,75
Sumaré-SP	11	3,44
Artur Nogueira-SP	10	3,12
Santo Antônio de Posse-SP	10	3,12
Outras cidades do estado de SP	119	37,19
Outros estados	6	1,89
Total	320	

Tabela 6- Frequência da realização de pré-natal entre as mães.

Realização de pré-natal	n	%
Sim	276	86,3
Não	44	13,7
Total	320	

Tabela 7- Frequência do tipo de parto entre as mães.

Tipo de parto	n	%
Vaginal	102	31,8
Fórceps	9	2,8
Cesáreo	209	65,3
Total	320	

Tabela 8- Frequência das causas do parto cesáreo.

motivo do parto	n	%
sofrimento fetal agudo	96	46,0
pré-eclâmpsia / eclâmpsia	31	14,9
outras doenças maternas	19	9,0
Outros	63	30,1
Total	209	

Tabela 9- Frequência da sorologia para CMV entre as mães.

Sorologia CMV materna	n	%
IgG e IgM negativos	4	1,2
IgG positivo e IgM negativo	8	2,5
não realizada/ em branco	308	96,2
Total	320	

Tabela 10- Distribuição por peso entre os recém-nascidos.

Peso dos RNs	n	%
501 a 1000g	41	12,0
1001 a 1500g	60	17,6
1501 a 2000g	93	27,4
2001 a 2500g	52	15,3
maior que 2500g	92	27,1
Não pesado	1	
Total	339	

Tabela 11- Distribuição da classificação da idade gestacional entre os RNs.

IG dos RNs	n	%
RNPT / AIG	208	61,3
RNT / AIG	65	19,2
RNPT / PIG	38	11,2
RNT / PIG	16	4,7
RNT / GIG	6	1,8
RNPT / GIG	6	1,8
Total	339	

Tabela 12- Estatística descritiva da variável idade gestacional em semanas.

Características	n	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Idade gestacional	339	34,2	3,8	34,0	24,1	41,9

5- DISCUSSÃO

Inicialmente serão discutidos alguns achados relevantes da descrição da população estudada. Os dados maternos são condizentes com os de populações que freqüentam uma maternidade de serviço terciário como é o Hospital do CAISM-UNICAMP: gestantes com patologias obstétricas que requerem acompanhamento especializado. Daí também se justifica o grande número de gestantes patológicas encaminhadas de cidades vizinhas. A grande porcentagem de partos cesárea também se justifica dessa maneira. Observa-se que, mesmo sendo uma população de renda mais baixa (nosso estudo mostrou-se falho ao não coletar dados referentes às características socioeconômicas da população estudada, assim, essa é uma hipótese presumida levando-se em conta o fato do hospital em questão ser público), a maioria das pacientes (86,3%) fizeram o acompanhamento pré-natal. Apesar disso, apenas 5% das mães com acompanhamento pré-natal realizaram exames de sorologia para CMV. Nota-se que esse fato é pertinente apenas à sorologia para CMV, não se repetindo ao se investigar as demais infecções congênitas (rubéola, toxoplasmose, sífilis). Não há consenso na literatura sobre a recomendação do rastreamento do CMV no pré-natal. No Brasil esse rastreamento não é recomendado como rotina no serviço público de acompanhamento pré-natal, justificado no fato de não haver imunidade permanente; não haver uma terapia eficaz que possa ser utilizada durante a gestação e na possibilidade de gerar ansiedade desnecessária aos pais e na equipe médica (COUTO et al., 2003; BRASIL, 2005).

Sobre as características da população neonatal em questão, estas também são condizentes com as encontradas em unidades de terapia intensiva neonatal. Trata-se de recém nascidos na grande maioria prematuros (74,3%), com baixo peso de nascimento (72,3). A escolha dessa população específica se deveu à tentativa de aumentar o número de casos do estudo (pacientes com infecção congênita por CMV), já que há na literatura dados bem delineados mostrando que a prevalência dessa infecção é maior nessa população (SANTOS et al., 2000; PANHANI e HEINONEN, 1994; MORGAN et al., 2003; NAGY et al., 2004; MIURA et al., 2006). Avaliando os quatro pacientes que apresentaram exames positivos para infecção congênita por CMV, apenas um apresentou sintomas da doença, com hepatoesplenomegalia e pneumonite. Nenhum dos quatro apresentou exame de acuidade auditiva alterado durante o período de internação, o que vai ao encontro da literatura, que evidencia que a alteração auditiva acontece a partir do primeiro ano de vida.

Nenhum dos pacientes positivo para CMV apresentou exame de fundo de olho com alterações típicas de infecção por CMV. Da mesma maneira aconteceu com o exame de ultra-som cerebral.

O presente estudo encontrou uma taxa de prevalência da infecção congênita por CMV de 1,2%. Dados de literatura evidenciam uma variação, entre autores, de 0,8 a 15,7%, ao se estudar a prevalência dessa infecção em recém-nascidos internados em unidades de tratamento intensivo (BARBI et al., 1985; PANNUTI et al., 1985; PANHANI e HEINONEN, 1994; SANTOS et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2001; MORGAN et al., 2003; NAGY et al., 2004; MIURA et al., 2006;). A grande variação da prevalência de CMV congênita nos diversos estudos aponta como fatores de risco mais as características da população materna – idade materna, idade da primeira reação sexual; número de parceiros sexuais; paridade; nível sócio-econômico; escolaridade - do que as características do RN - idade gestacional, peso, sintomatologia, entre outros- (HO, 1990, YAMAMOTO et al., 1999^a, SANTOS et al., 2000). Assim, esperava-se que a prevalência dessa infecção fosse maior do que a encontrada em nosso estudo, ao levar em conta que, na maioria das vezes, pacientes atendidos em hospitais públicos apresentam um nível socioeconômico mais baixo. O estudo falhou por não investigar algumas dessas variáveis maternas que poderiam influenciar na prevalência. A prevalência da infecção congênita na unidade intensiva de tratamento neonatal do CAISM/UNICAMP foi, então, considerada baixa.

Em relação aos resultados referentes à validação do teste diagnóstico, antes de ser iniciada a discussão sobre os resultados do estudo em si, iremos, inicialmente, argumentar sobre alguns pontos específicos da metodologia. Alguns estudos recentes testaram a eficácia do método da PCR para CMV em sangue estocado em papel filtro, conforme já citado anteriormente. Nosso estudo se diferenciou dos demais em dois pontos específicos: primeiro a quantidade de amostra de sangue, baseada no tamanho do papel filtro utilizado na reação, que em nosso estudo é de 2 discos de 1 mm de diâmetro. Autores relataram altas sensibilidade e especificidade - 99 a 100% - ao utilizarem, inicialmente 3 discos de 6 mm de diâmetro para realização da PCR e, em estudos posteriores, os resultados se repetiram com 3 discos de 3mm e, após, 1 disco de 3 mm.

(BARBI et al., 1996; BARBI et al., 2000 e BINDA et al., 2004). A busca de uma menor quantidade de amostra revela a tentativa de identificar as melhores condições para um exame de triagem diagnóstica que incluem, além da menor quantidade de material a ser coletado, que também causa menor dano ao paciente, o menor custo. Com o tamanho reduzido dos discos a serem processados, é possível aproveitar o material coletado da triagem metabólica neonatal de rotina, não sendo necessária a realização de nova coleta e, também, diminuindo o custo ao utilizar outro papel filtro. O segundo ponto diferencial deste estudo se diz respeito ao método de extração, que no nosso caso foi utilizado o kit comercial de extração do papel filtro MGM®. Na maioria dos estudos, para a extração do DNA do papel filtro, usa-se a extração com fenol e clorofórmio seguida de tratamento com proteinase K ou a extração aquecida em cultura de células, métodos considerados mais trabalhosos e que levam maior tempo para realização, comparativamente. A escolha por esse tipo de extração se objetivou, além de testar o método, na facilidade e praticidade do procedimento, quando comparado com os demais. As modificações realizadas não alteraram os resultados do estudo, quando comparados com o padrão ouro, mostrando-se, assim, efetivas. Em nosso estudo, o exame de nPCR em amostra sanguínea de papel filtro mostrou especificidade de 99,4% e sensibilidade de 75%, com alto valor preditivo negativo e elevada acurácia. Estes dados nos permitem, a princípio, concluir sobre a relevância do teste como método diagnóstico para a afecção estudada, com importantes repercussões práticas. No entanto, a conclusão a respeito do significado destes valores não se restringe ao seu caráter numérico. Assim, em concordância com a correta discussão científica se faz necessária a análise dos possíveis vieses presentes no estudo para que se possa estabelecer o real significado do exame como teste diagnóstico. A avaliação da acurácia de um teste baseia-se sempre na sua relação com algum meio de saber se a doença está ou não realmente presente através de um indicador mais fiel à verdade, geralmente referido como “padrão ouro”. A análise crítica do padrão ouro é primordial na interpretação dos estudos de testes diagnósticos. No presente estudo foi considerado padrão ouro o método de nPCR para CMV em amostra isolada da urina. Estudos prévios e bem delineados na literatura mostram que este exame é altamente sensível (99 -100%) e específico (99-100%) no diagnóstico de infecção congênita por CMV. No entanto, ao estudar a fisiologia da infecção congênita por CMV, sabe-se que existe a possibilidade da ocorrência de viremia sem

virúria, o que poderia interferir negativamente na correta avaliação do teste diagnóstico em estudo. No presente estudo houve dois casos em que a amostra de papel filtro mostrou resultado positivo e a urina negativo no exame nPCR. Os testes, nesse caso foram repetidos por 3 vezes – urina e sangue – e os controles internos (positivo e negativo) de cada teste mostraram resultados adequados em todas as vezes, porém, o resultado final se repetiu. Diante de tais evidências laboratoriais, e da própria fisiologia da infecção por CMV, os resultados finais dos exames foram considerados positivos, apesar de, estatisticamente serem considerados falsos positivos, levando a uma diminuição do valor referente ao valor preditivo positivo (de 100 para 60%) Nestes casos, quando o exame em teste detecta o vírus e o padrão ouro apresenta-se negativo, pode-se enfrentar uma situação em que o exame testado seja superior ao considerado padrão ouro. Ao proceder assim, pode-se originar um aparente paradoxo. No entanto, este aspecto, inerente aos testes de validação diagnóstica, não invalida as conclusões, uma vez que, na ocorrência de situações como essa, considera-se a repetição dos exames com avaliação pormenorizada e, se necessário, recorre-se a outros métodos diagnósticos já consagrados, que nesse caso seria a cultura viral. Devemos esclarecer que essa última alternativa não foi realizada, pela limitação da pesquisadora referente aos materiais e metodologia desse exame por ele não ser, atualmente, rotineiro nos laboratórios de investigação diagnóstica.

Quanto ao espectro dos pacientes, a escolha da população deveu-se à tentativa de aumentar o número de casos positivos da doença a fim de adequar o teste de validação diagnóstica, o que possibilita melhor estudo do valor preditivo e da sensibilidade do teste. Apesar de a literatura mostrar maiores taxas de prevalência para CMV nessa população, nosso estudo não encontrou resultados semelhantes. Assim, deve-se ressaltar que a sensibilidade encontrada foi estimada a partir de amostra pequena de casos positivos, e esses valores são cientificamente questionáveis. Devido ao acaso, como a amostra de casos positivos foi pequena, os valores podem não representar a sensibilidade correta. Os valores normalmente observados são compatíveis com uma faixa de valores verdadeiros, caracterizada tipicamente pelo intervalo de confiança de 95%. A amplitude desta gama de valores define o grau de precisão das estimativas de sensibilidade e especificidade. Assim observamos que os intervalos de confiança encontrados neste estudo para a sensibilidade (32,56 - 117,44) e para o valor preditivo positivo (17,06 - 102,94) são muito amplos. Se

mais pacientes doentes fossem estudados o intervalo de confiança em 95% se estreitaria, com a obtenção de resultados mais fidedignos. Na análise prévia do cálculo amostral, foi considerada a necessidade de 16 exames positivos, que seriam conseguidos, com um tamanho amostral de 320 pacientes – cálculo baseado nos valores de prevalência da infecção congênita por CMV em populações de unidades de terapia intensiva. No entanto, este número não foi atingido pela menor prevalência de infecção congênita pelo CMV encontrada em nosso estudo, abaixo da previsão inicial, a despeito do número significativo de pacientes (343). Deve-se ressaltar que o tamanho amostral foi adequado para validação da especificidade do teste, que se mostrou alta. O intervalo de confiança estreito da especificidade confirma sua validade, assim como do valor preditivo negativo. A acurácia elevada encontrada no estudo, como medida que sumariza o valor global do teste diagnóstico (proporção de todos os resultados corretos) acaba por relevar os pontos negativos, uma vez que constitui uma medida sumária e genérica com pouca utilidade clínica caso as informações específicas (sensibilidade, especificidade e valor preditivo) não estejam corretamente estabelecidas. Concluimos que para chegar a um resultado mais fidedigno da validade deste teste diagnóstico, será necessário um aumento do número de pacientes a ser estudado a fim de chegar ao número mínimo de 16 casos.

Finalmente deve-se enfatizar a utilidade do presente teste diagnóstico em análise. As vantagens da realização da PCR em amostra sanguínea de papel filtro referem-se à facilidade de armazenamento e à quantidade de material biológico coletado. Este último dado torna-se ainda mais relevante nesta população que obviamente possui limitações importantes na quantidade de tecido sanguíneo disponível. Outra aplicabilidade do método seria no diagnóstico retrospectivo da infecção congênita por CMV nos casos de diagnóstico tardio de perda auditiva, ou outros sintomas tardios que levarem a hipótese dessa infecção, a fim de se estabelecer a etiologia. Tal diagnóstico, ou a exclusão dele, é possível, ao se recapturar partes, que não foram usadas do papel filtro utilizado nos testes de triagem neonatal. A estabilidade do papel estocado, permite tal procedimento em longo prazo, até 10 anos, conforme testaram alguns autores (BARBI et al, 2003; BINDA et al., 2001; KIEZEBRINK et al., 2001; CHAISOMCHIT et al., 2005).

No caso da doença causada pelo CMV, deve-se ainda discutir a própria utilidade do diagnóstico uma vez que a prevalência da doença é baixa, a relação entre infecção e doença é pequena, não existem meios disponíveis de prevenção e o tratamento não revela evidências científicas sólidas e carecem de comprovação em recém nascidos. Quanto à infecção congênita sintomática por CMV não há dúvidas sobre o benefício do diagnóstico, sendo a discussão apenas pertinente nos casos assintomáticos em que o teste pode ser considerado exame de “triagem”. A principal preocupação em recém-nascidos com relação à infecção assintomática é o desenvolvimento subsequente de surdez neurossensorial em até 30% dos casos (BARBI et al, 2003), além de alterações neurológicas levando ao retardo de desenvolvimento. Neste caso a precocidade no diagnóstico dessa infecção permite que se estabeleça um plano de seguimento especializado dessas crianças, possibilitando seu melhor desenvolvimento, reduzindo então a morbidade dessa doença. Barbi et al. (2006), num artigo de revisão de opiniões, baseados na frequência e na gravidade da perda auditiva causada por essa infecção, evidenciou os benefícios da inclusão da infecção congênita por CMV em testes de triagem neonatal. Particularmente no Brasil, o fato da investigação para CMV não fazer parte da rotina pré-natal em serviços públicos, acaba sendo um fator a mais de fundamentação na implantação de um exame de triagem para investigação dessa infecção.

6- CONCLUSÕES

Concluimos que a prevalência da infecção congênita na unidade intensiva de tratamento neonatal do CAISM/UNICAMP foi de 1,2%.

Concluimos que o teste diagnóstico Nested PCR para CMV em sangue estocado em papel filtro mostrou elevadas especificidade e valor preditivo negativo e moderada sensibilidade e valor preditivo positivo. Devido aos vieses encontrados, os resultados da sensibilidade e do valor preditivo positivo podem não condizer com a realidade. Para resolver essa questão, mais exames deverão ser coletados a fim de aumentar o número de casos até que se chegue a um valor estatisticamente relevante de no mínimo 16 pacientes infectados.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLFORS, K.; FORSGREN, M.; IVARSSON, S.A.; HARRIS, S.; SVANBERG, L. Congenital cytomegalovirus infection: on the relation between type and time of maternal infection and infant's symptoms. **Scand J infect Dis**, 15: 129-38, 1983.

ASANUMA, H.; NUMAZAKI, K.; NAGATA, N.; HOTSUBO, T.; HORINO, K.; CHIBA, S. Role of milk whey in the transmission of human cytomegalovirus infection by breast milk. **Microbiol Immunol**, 40: 201-04, 1996.

BARBI, M.; CAPPELLINI, D.; FERRANTE, P.; RUGGERI, M.; LATTANZIO, M.; FERLIGA, et al. Congenital cytomegalovirus infections in a neonatal pathology unit. **Boll Ist Sieroter Milan**, 64(4):262-8, 1985.

BARBI, M.; BINDA, S.; PRIMACHE, V.; LURASCHI, C.; CORBETTA, C. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in dried blood spots. **Clin Diagn Virol**, 6: 27-32, 1996.

BARBI, M.; BINDA, S.; PRIMACHE, V.; CAROPPO, S.; DIDO, P.; GUIDOTTI, P.; et al. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. **J Clin Virol**, 17: 159-165, 2000.

BARBI, M.; BINDA, S.; CAROPPO, S.; AMBROSETTI, U.; CORBERTTA, C.; SERGI, P.. A wider role for congenital cytomegalovirus infection in sensorineural hearing loss. **Pediatr Infect Dis J**, 22:39-42, 2003.

BARBI, M.; BINDA, S.; CAROPPO, S.; PRIMACHE, V. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. **J Clin Virol**, 35(2): 206-9, 2006.

BINDA, S.; CAROPPO, S.; DIDO, P.; PRIMACHE, V.; GUIDOTTI, P.; PASTORINO, G. et al. Cytomegalovirus DNA detection on guthrie cards: a useful method to identify hearing loss cases due to congenital infection. **Int Pediatr**, 16(1): 1-3, 2001.

BINDA, S.; CAROPPO, S.; DIDO, P.; PRIMACHE, V.; VERONESE, L.; CALVARIO, A.; et al. Modification of CMV DNA detection from dried blood spots for diagnosing congenital CMV infection. **J Clin Virol**, 30(3): 276-9, 2004.

BOECKH, M.; BOIVIN, G. Quantification of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical application. **Clin Microbiol Rev**, 11: 533-54, 1998.

BRASIL, 1996. Brasil. Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº196/96 sobre pesquisas envolvendo seres humanos. **Inf. Epidm. do SUS**, v.2, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Pré-natal e puerpério: atenção qualificada e humanizada – **manual técnico**. Brasília: Ministério da Saúde; 40-8, 2005.

BRYTTING, M.; XU, W.; WABREN, B.; SUNDQVIST, V.A. Cytomegalovirus DNA detection in sera samples from patients with active cytomegalovirus infections. **J Clin Microbiol**, 30: 1937-41, 1992.

CHAISSOMCHIT, S.; WICHAJARN, R.; JANEJAI, N.; CHAREONSIRIWATANA, W. Stability of genomic DNA in dried blood spots stored on filter paper. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, 36(1):270-3, 2005.

CHOU, S. Newer Methods for Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. **Rev Infect Dis**, 12 (17): 727-36, 1990.

CHOU, S.; SCOTT, K.M. Rises in antibody to human herpesvirus 6 detected by enzyme immunoassay for detection of cytomegalovirus immunoglobulin M antibody. **J Clin Microbiol**, 28: 851-4, 1990.

COSTA, S.C.B. Infecção por citomegalovírus (CMV): epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Rev Brás Clin Terap, Campinas**, 25 (1): 18-28, 1999.

COSTA, S.C.B.; MIRANDA, S.R.P.; ALVES, G.; ROSSI, C.L.; FIGUEREDO, L.T.M.; COSTA, F.F. Donated organs as a source of cytomegalovirus (CMV) in renal transplant patients. **Bras J Med Biolog Research**: 27, 1994.

COUTO, J.C.F.; RODRIGUES, M.V.; MELO, G.E.B.A.; MENEZES, G.A.; LEITE, J.M. Citomegalovírus e gestação: um antigo problema sem novas soluções. **Femina**, 31(6):509-16, 2003.

DECLARAÇÃO DE HELSINKI. Sobre os princípios éticos para pesquisa em seres humanos. Edimburgo, Escócia, 2000. Disponível em: <<http://www.ibemol.com.br/declarações/helsinque>>. Acesso em 5 Maio 2003.

DEMMLER, G.J. Congenital cytomegalovirus infection and disease. **Adv Pediatr Infect Dis**, 11: 135-62, 1996.

DEMMLER, G.J.; BUFFONE, G.J.; SCHIMBOR, C.M.; MAY, R.A..Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using Polimerase Chain Reaction DNA amplification. **J Infect Dis**, 158: 1177-84, 1988.

DREW, W.L. Herpesvirus. In: MURRAY, DREW, KOBAYASHI, THOMPSON. **Microbiologia Médica**. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1992. p.367-84.

DWORSK, M.; STAGNO, S.; PASS, R.F.; CASSADY, G.; ALFORD, C. Persistense of cytomegalovirus in human milk storage. **J Pediatr**, 101: 440-3, 1982.

ERICE, A.; CHOW, S.; BIRON, K.K.; STANAT, S.C.; BALFOUR, H.H.; JORDAN, M.C. Progressive disease due to ganciclovir resistant cytomegalovirus in immunocompromised patients. **New Engl J Med**, 320: 289-93, 1989.

FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.H. Diagnóstico. In: FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.H. **Epidemiologia clínica: elementos essenciais**. 3. ed.-Porto Alegre: Artes Médicas, 1996.p.52-83.

FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.H. Frequência. In: FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.H. **Epidemiologia clínica: elementos essenciais**. 3. ed.-Porto Alegre: Artes Médicas, 1996.p.84-102.

FOWLER, K.B.; DAHLER, A.J.; BOPPANA, S.B.; PASS, R.F. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? **J Pediatr**, 135(1):60-4, 1999.

GILBERT, G.L.; HAYES, K.; HUDSON, I.L.; JAMES, J. The neonatal cytomegalovirus infection study group. **Lancet**, 1:1228-31, 1989.

GLEAVES, C.A.; SMITH, T.F.; SHUSTER, E.A.; PEARSON, G.R. Rapid detection of cytomegalovirus in MCR-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. **J Clin Microbiol**, 19: 917-9, 1984.

GROSE, C. Citomegalovirus. In: NELSON, BEHRMAN, KLIEGMAN, ARVIN, eds. **Tratado de Pediatria**, 15^a. ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1997, p.608, v.1.

HO, M. Epidemiology of Cytomegalovirus infections. **Rev Infect Dis**, 12 (7): 701-10, 1990.

JOHANSSON, P.J.H.; JONSSON, M.; AHLFORS, K.; IVARSSON, S.A.; SVANBERG, L.; GUTHENBERG, C. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection performed by polymerase chain reaction in blood stored on filter paper. **Scand Infect Dis**, 29: 465-8, 1997.

KIEZEBRINK-LINDENHOVIUS, H.H.; VAN DEN BERG, Y.L.; SPRIKKELMAN, A.B.; WEEL, J.F.; VEENHOVEN, R.H. Cytomegalovirus infection: congenital or postnatally acquired? Importance of the Guthrie card. **Ned Tijdschr Geneesk**, 145(26):1259-61, 2001.

LINSCOTT, A.J. Molecular diagnostics for infectious disease. **Pathol. Case Rev**, 7(2):64-9, 2002.

LIPITZ, S.; YAGEL, S.; SHALEV, E.; ACHIRON, R.; MASHIACH; SCHIFF, E. Prenatal diagnosis of fetal primary cytomegalovirus infection. **Obstet Gynecol**, 90: 457-64, 1997.

MACHADO, C.M.; FINK, M.C.D.S.; VILAS BOAS, L.S.; SUMITA, L.M.; WEINBERG, A.; SHIGUEMATSU, K.; et al. Infecção perinatal pelo citomegalovírus em hospital público do município de São Paulo: estudo prospectivo. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, 33 (2): 159-66, 1991.

MACHER, A.M.; REOCHERT, C.M.; STRAUS, S.E. Death in the AIDS patient: role of cytomegalovirus. **New Engl J Med**, 309: 1454-6, 1983.

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

MORGAN, M.A.; EL-GHANY EL-S.M.; KHALIFA, N.A.; SHERIF, A.; RASSLAN, L.R. Prevalence of cytomegalovirus (CMV) infection among neonatal intensive care unit (NICU) and healthcare workers. **Egypt J Immunol**, 10 (2):1-8, 2003.

NAGY, A.; ENDREFFY, E.; STREITMAN, K.; PINTER, S.; PUSZTAI, R. Incidence and outcome of congenital cytomegalovirus infection in selected groups of preterm and full-term neonates under intensive care. **In vivo**, 18(6): 819-23, 2004.

NELSON, C.T.; ISTAS, A.S.; WILKERSON, M.K.; DEMMLER, G.J. PCR detection of cytomegalovirus DNA in serum as a diagnostic test for congenital cytomegalovirus infection. **J Clin Microbiol**, 33: 3317-8, 1995.

NUMAZAKI, K. Human cytomegalovirus infection of breast milk. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 18: 91-8, 1997.

PANHANI, S.; HEINONEN, K.M. Screening for congenital cytomegalovirus infection among preterm infants born before the 34th gestational week in Finland. **Scand J Infect Dis**, 26(4): 375-8, 1994.

PANNUTI, C.S.; VILAS BOAS, L.S.; ANGELO, M.J.O.; CARVALHO, R.P.S.; SEGRE, C.M. Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in two socioeconomically distinct populations of a developing country. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 27: 105-7, 1985.

REVELLO, M.G.; GERNA, G. Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus, and Newborn Infant. **Clin Microbiol Rev**: 680-715, 2002.

REVELLO, M.G.; ZAVATTONI, M.; BALDANTI, F.; SARASINI, A.; PAOLUCCI, S.; GERNA, G. Diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody in blood of congenitally infected newborns. **J Clin Virol**, 14: 57-66, 1999.

RUBIN, R.H.; COSIMI, A.B.; TOLKOFF RUBIN, N.E.; RUSSEL, R.S.; HIRSCH, M.S. Infectious disease syndromes attributable to cytomegalovirus and their significance among renal transplant recipients. **Transplantation**, 24: 458-64, 1977.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, A.F. Enzymatic amplification of betaglobin genome sequences and restriction site analysis for diagnoses of sickle cell anemia. **Science**, 230: 1350-4, 1985.

SANTOS, D.V.; SOUZA, M.M.; GONÇALVES, S.H.; COTTA, A.C.; MELO, L.A.; ANDRADE, G.M.; et al. Congenital cytomegalovirus infection in a neonatal intensive care unit in brazil evaluated by PCR and association with perinatal aspects. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 42(3): 129-32, 2000.

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

SHUSTER, E.A.; BENEKE, J.S.; TEGTMEIER, G.E.; PEARSON, G.R.; GLEAVES, C.A.; WOLD, A.D.; et al. Monoclonal antibody for rapid laboratory detection of cytomegalovirus infections: characterization and diagnostic application. **Mayo Clin Proc**, 60: 577-85, 1985.

STAGNO, S.; PASS, R.F.; DWORSKY, M.E. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. **Semin Perinatol**, 7: 31-42, 1983.

STAGNO, S. Cytomegalovirus. In: REMINGTON JS & KEIN JO, eds. **Infect diseases of the fetus and newborn**, 4^a ed, WB Saunders, Philadelphia, p. 312-45, 1995.

STAGNO, S.; TINKER, M.K.; ELROD, C.; FUCCILLO, D.A.; CLOUD, G.; O'BEIRNE, A.J. Immunoglobulin M antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay in the diagnosis of cytomegalovirus infections in pregnant women and newborn infants. **J Clin Microbiol**, 21: 930-35, 1985.

STIRK, P.R.; GRIFFITHS, P.D. Use of monoclonal antibodies for the diagnosis of cytomegalovirus infection by the detection of early antigen fluorescent foci (DEAFF) in cell culture. **J Med Virology**, 21: 329-37, 1987.

YAMAMOTO, A.Y.; AQUINO, V.H.; FIGUEREDO, L.T.M.; PINHATA, M.M.M. Diagnosis of congenital and perinatal cytomegalovirus infection by using the polymerase chain reaction. **Rev Soc Bras Med Trop**, 31: 19-26, 1998.

YAMAMOTO, A.Y.; FIGUEREDO, L.T.M.; MUSSI-PINHATA, M.M. Infecção congênita por citomegalovírus: muito freqüente mas pouco diagnosticada. **J Pediatr (Rio Janeiro)**, 75: 126-30, 1999.

YAMAMOTO, A.Y.; MUSSI-PINHATA, M.M.; FIGUEIREDO, L.T.M. Infecção congênita e perinatal por citomegalovírus: aspectos clínicos, epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Medicina, Ribeirão Preto**, 32: 49-56, 1999.

YAMAMOTO, A.Y.; MUSSI-PINHATA, M.M.; CRISTINA, P.; PINTO, G.; MORAES FIGUEIREDO, L.T.; JORGE, S.M. Congenital cytomegalovirus infection in preterm and full-term newborn infants from a population with a high seroprevalence rate. **Pediatr Infect Dis J**, 20(2): 188-92, 2001.

8- ANEXOS

ANEXO 1

Ficha de dados

Nome: _____ HC _____

Caso nº: _____

Caso nº _____

DADOS MATERNOS:

Idade: _____

Procedência: _____

Sorologia para CMV: () negativa : IgG e IgM negativas

() imune: IgG positiva, IgM negativa

() positiva: IgG e IgM positivas

() não realizada/ em branco

tipo de parto: _____

motivo do parto, quando cesária: _____

Antecedentes Gestacionais ou pessoais _____

Caso nº: _____

DADOS DO RN:

Peso de nascimento: _____

Idade gestacional: _____

Diagnósticos durante a internação:

Óbito: () não () sim

Bera: () não realizado () normal

() alterado: _____

Eco Cerebral: () não realizado () normal

() alterado: _____

Fundo de olho: () não realizado () normal

() alterado: _____

PCR de Urina:

() negativo

() positivo

() inconclusivo

PCR de sangue em papel filtro:

() negativo

() positivo

() inconclusivo

ANEXO 2

Informação e consentimento pós-informação para pesquisa

Meu nome é Sheila de Lima Kallas e estou desenvolvendo a pesquisa ESTUDO DA INFECÇÃO CONGÊNITA E PERINATAL POR CITOMEGALOVÍRUS (CMV) PELA REAÇÃO DE CADEIA DE POLIMERASE com o objetivo de avaliar a prevalência e a incidência da infecção por CMV nos recém-nascidos e validar o teste diagnóstico de PCR em papel de filtro. Este estudo é necessário porque possibilitará a implementação de medidas que irão prevenir a infecção por CMV e também permitirá que os recém nascidos que apresentem a infecção sejam seguidos desde o período inicial da doença, através do diagnóstico precoce. Serão realizadas coletas de urina (em saco coletor) e de sangue (colhido no momento da coleta de exames de rotina do serviço) do recém-nascido. Isto não traz quaisquer riscos e desconfortos, mas esperamos que possa trazer benefícios. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais que o seu filho (a) faça parte do mesmo, pode entrar em contato comigo pelo telefone (19) 32695912. . Se você estiver de acordo em participar, posso garantir que as informações fornecidas sobre os resultados serão confidenciais e só serão utilizadas neste trabalho. Você será informado sobre o resultado dos exames no momento que desejar.

Assinatura _____

Orientador _____

Consentimento Pós-Informação

Eu, __ (nome completo) __, responsável pelo menor _____, fui esclarecido sobre a pesquisa ESTUDO DA INFECÇÃO POR CMV PELO MÉTODO DE REAÇÃO DE CADEIA DE POLIMERASE NA UNIDADE DE INTERNAÇÃO NEONATAL DO CAISM e concordo que sejam coletados os exames do meu (minha) filho (a) e que seus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Campinas, ____ de _____ de 200__.

Assinatura: _____ RG: _____

