

MARINA DOS SANTOS BRITO SILVA FURTADO

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO ERITROVÍRUS B19 E
ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS EM CRIANÇAS COM ANEMIA
FALCIFORME PROVENIENTES DA TRIAGEM NEONATAL E
ACOMPANHADAS NO HEMOCENTRO DE BELO HORIZONTE (MG)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

2012

MARINA DOS SANTOS BRITO SILVA FURTADO

PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO ERITROVÍRUS B19 E ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS EM CRIANÇAS COM ANEMIA FALCIFORME PROVENIENTES DA TRIAGEM NEONATAL E ACOMPANHADAS NO HEMOCENTRO DE BELO HORIZONTE (MG)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde – Área de concentração em Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Prof. Dr. Marcos Borato Viana

Professor Emérito do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientadora: Dra. Marina Lobato Martins

Gerência de Desenvolvimento Técnico-Científico da Fundação Hemominas

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Pró-reitor de Pós-graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Diretor da Faculdade de Medicina: Francisco José Penna

Chefe do Departamento de Pediatria: Profa. Benigna Maria de Oliveira

Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente: Profa. Ana Cristina Simões e Silva

Colegiado do Programa de Pós-graduação em Medicina – Área de concentração em Saúde da Criança e do Adolescente:

Profa. Ana Cristina Simões e Silva

Prof. Cássio da Cunha Ibiapina

Prof. Eduardo Araújo de Oliveira

Prof. Francisco José Penna

Prof. Jorge Andrade Pinto

Profa. Ivani Novato Silva

Prof. Marcos José Burle de Aguiar

Profa. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana

Profa. Maria de Lourdes Melo Baeta

MARINA DOS SANTOS BRITO SILVA FURTADO

PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO ERITROVÍRUS B19 E ASSOCIAÇÕES CLÍNICAS EM CRIANÇAS COM ANEMIA FALCIFORME PROVENIENTES DA TRIAGEM NEONATAL E ACOMPANHADAS NO HEMOCENTRO DE BELO HORIZONTE (MG)

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Marcos Borato Viana

Dra. Marina Lobato Martins

Prof. Daniel Dias Ribeiro

Dr. Svetoslav Nanev Slavov

Suplente:

Dr. Ricardo Andrade Carmo

Dedico este trabalho ao meu marido Fabiano e à minha filha Ana Luísa, que são o que tenho de mais precioso nessa vida.

Agradecimentos

A Deus pela vida e por renovar em mim a dedicação e persistência para que eu pudesse concluir esse trabalho.

Às crianças e aos seus pais ou responsáveis que aceitaram participar desse estudo.

Ao meu orientador Professor Marcos Borato Viana pela oportunidade, incentivo e pelos diversos ensinamentos. Pela solução conjunta de inúmeros problemas e pelas valiosas sugestões dadas.

À co-orientadora Dra. Marina Lobato Martins pela paciência, oportunidade, incentivo, apoio e disponibilidade. Pelas essenciais contribuições no desenvolvimento do trabalho. Pelo exemplo de dedicação e ética na vida profissional.

Às bolsistas de iniciação científica que me acompanharam nas diversas etapas do desenvolvimento do estudo, agradeço pela colaboração à Denise Martins Van Putten Vasconcelos, Raquel Laís Lima Gontijo e Jéssica Silqueira Hickson Rios.

Aos funcionários do Laboratório de Hematologia e Coagulação da Fundação Hemominas pela disponibilização das amostras dos pacientes.

A todos os colegas do serviço de pesquisa da Fundação Hemominas pela convivência e apoio.

Ao NUPAD pelo apoio logístico e financiamento parcial do estudo.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo financiamento.

À Marcilene Rezende Silva, pela amizade, apoio, companheirismo e por compartilhar tantas dúvidas e angústias.

À funcionária do NUPAD Ivanir pelo fundamental apoio prestado durante a coleta dos termos de consentimento.

Às funcionárias do cadastro do ambulatório da Fundação Hemominas pela presteza na disponibilização dos prontuários consultados.

Às hematologistas Rosangela Figueiredo e Célia Maria Silva pela convivência agradável, pelo estímulo e pela troca de informações preciosas, e principalmente, por serem exemplos de profissionalismo e dedicação.

Ao Centro de Pós Graduação da Faculdade de Medicina da UFMG.

À Fundação Hemominas por colaborar no financiamento e por disponibilizar sua estrutura física e organizacional para realização dos experimentos e coleta de dados e pela oportunidade de participar do Programa de capacitação de recursos Humanos da instituição.

Aos membros da banca examinadora Prof. Daniel Dias Ribeiro, Dr. Svetoslav Nanev Slavov e Dr. Ricardo Andrade Carmo por aceitarem o convite e dedicarem atenção à minha dissertação.

Ao meu marido Fabiano pela paciência, carinho, apoio e incentivo.

À Ana Luísa, que mesmo com suas limitações de criança, soube ser paciente e incentivadora do meu trabalho.

A todos os meus amigos e familiares pelo apoio, paciência e incentivo.

Agradeço por fim a todos que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: O eritrovírus humano B19 (B19V) causa significativa morbidade em crianças com anemia falciforme, mas há poucos estudos sobre a epidemiologia da infecção pelo B19V nessa população, principalmente no Brasil. O vírus possui tropismo por eritroblastos causando-lhes apoptose, o que em pacientes com anemia hemolítica crônica pode levar a uma aplasia medular transitória, que se caracteriza por suspensão temporária da eritropoiese, com queda abrupta dos níveis de hemoglobina e reticulócitos. **Objetivos e métodos:** O objetivo deste estudo foi estimar a prevalência e incidência da infecção pelo eritrovírus B19 em crianças com doença falciforme triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais e acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação Hemominas. Foram testadas amostras de 239 pacientes por ensaios de ELISA (Biotrin, Dublin, Irlanda) para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-B19V, e por metodologia padronizada de PCR em tempo real usando SYBR Green para detecção de DNA viral. As amostras DNA-positivas foram também testadas usando-se sondas de hidrólise (TaqMan) para identificação do genótipo viral. **Resultados:** A idade mediana das crianças testadas foi de 5,8 anos. Destas, 10,9% (26/239) apresentavam quadro que caracterizam infecção atual ou recente: 6 (2,5%) positivas apenas para o DNA viral, 2 (0,8%) positivas apenas para IgM, 1 (0,4%) positiva para IgM e DNA, 16 (6,7%) positivas para DNA viral e IgG, e apenas 1 (0,4%) positiva para DNA viral, IgG e IgM. Foram identificadas 37 (15,5%) amostras positivas apenas para IgG, caracterizando perfil de infecção pretérita. Mais de 70% (176/239) apresentaram resultados sorológicos e moleculares negativos para B19V. Para esse grupo, foi possível realizar acompanhamento de 51 crianças que tiveram uma segunda amostra colhida em intervalo médio de um ano. Foi possível detectar 14 (27,5%) casos de viragem sorológica e/ou molecular, caracterizando-os como casos incidentes.

Das 45 amostras positivas no teste molecular utilizando SYBR Green, 32 foram confirmadas pelo sistema TaqMan. A infecção pelo genótipo 1 estava presente em todas as amostras DNA-positivas, exceto uma, na qual foram identificados os genótipos 1 e 3, concomitantemente. A análise de dados clínicos e hematológicos evidenciou associação da infecção pelo B19V com crise aplástica transitória, com o número de transfusões recebidas e com frequência mais elevada de hospitalização. Também foi observado que quanto mais elevada a idade da criança, mais elevada a probabilidade de infecção pelo vírus B19. **Conclusões:** Os dados encontrados no estudo permitiram estimar uma prevalência de 26,4% e incidência de 29,1 casos/100 pacientes-ano para a infecção pelo B19V nessa população. Essa infecção é, portanto, frequente em crianças com doença falciforme em Belo Horizonte e associou-se, como esperado, com crise aplástica. A associação de elevado número de internações com a infecção pelo B19V indica que esta pode levar ao agravo da doença falciforme. É possível que a transmissão viral tenha também ocorrido por transfusões sanguíneas, mas o desenho do estudo não permite inferir tal conclusão. Testes sorológicos e moleculares devem, sempre que possível, ser realizados em conjunto para melhor eficácia do diagnóstico da infecção.

ABSTRACT

Introduction: The human erythrovirus B19 (B19V) causes significant morbidity in children with sickle cell anemia, but there are few studies on the epidemiology of B19V infection in this population, especially in Brazil. The virus has tropism for erythroblasts causing apoptosis, which in patients with chronic hemolytic anemia can lead to a transient bone marrow aplasia, which is characterized by a temporary halt in erythropoiesis, with a sharp drop in hemoglobin concentration and reticulocyte count. **Objectives and methods:** The aim of this study was to estimate the prevalence and incidence of infection with erythrovirus B19 in children with sickle cell disease screened by the Newborn Screening Program of Minas Gerais and followed at Blood Center of Belo Horizonte, Hemominas Foundation. Samples from 239 patients were tested using ELISA (Biotrin, Dublin, Ireland) for detection of IgG and IgM anti-B19V, and with a standardized assay for real-time PCR using SYBR Green for detection of viral DNA. The positive DNA samples were also tested using hydrolysis probes (TaqMan) for identification of virus genotype. **Results:** The median age of the children tested was 5.8 years. Of these, 10.9% (26/239) presented current or recent infection characterized as follows: six (2.5%) positive only for the viral DNA, 2 (0.8%) positive only for IgM, 1 (0.4%) positive for IgM and DNA, 16 (6.7%) positive for viral DNA and IgG, and only 1 (0.4%) positive for viral DNA, IgG, and IgM. We identified 37 (15.5%) individuals positive only for IgG, featuring a profile of past infection. More than 70% (176/239) presented negative serological and molecular results for B19V and from this group 51 children had a second sample withdrawn at a mean interval of one year. Conversion of negative to positive serological and/or molecular status was detected in 14 incident cases (27, 5%). Of the 45 positive samples tested using molecular SYBR Green, 32 were confirmed positive by the TaqMan system. Genotype 1 infection was present in all positive DNA samples, except for one, in which there was a co-infection by genotypes 1 and 3. The analysis of clinical and hematological data showed an association of B19V infection with

transient aplastic crisis, higher number of transfusions, and higher rate of hospital admissions. It was also observed that the higher the child's age, the higher the probability of B19 infection. **Conclusions:** The findings in this study allowed us to estimate a prevalence of 26.4% and an incidence of 29.1 cases/100 patient-years for B19V infection in this population. B19 infection is thus common in children with sickle cell disease in Belo Horizonte and, as expected, is associated with transient bone marrow aplasia. The association of the infection with high frequency of hospital admissions also indicates that viral infection can lead to worsening of sickle cell manifestations. It is possible that virus transmission has occurred through blood transfusion but the study design is inadequate to demonstrate it. Serological and molecular tests should be performed together, whenever possible, in order to increase the efficacy of the infection diagnosis.

SUMÁRIO

	página
Resumo	viii
Abstract	x
Lista de abreviaturas e siglas	xiv
Lista de tabelas	xvii
Lista de figuras	xviii
1 – Introdução	1
2 – Revisão bibliográfica	3
2.1 – Histórico	3
2.2 – Classificação do Eritrovírus B19	4
2.3 – Características do Eritrovírus B19	4
2.3.1 – Estrutura viral	4
2.3.2 – Genoma viral	5
2.4 – Ciclo de replicação viral	7
2.5 – Epidemiologia e curso da infecção	9
2.6 – Transmissão de B19V por produtos do sangue	12
2.7 – Diagnóstico laboratorial	14
2.7.1 – Diagnóstico direto	15
2.7.2 – Testes moleculares	15
2.7.3 – Diagnóstico indireto	17
2.8 – Manifestações clínicas	18
2.8.1 – Eritema infeccioso	18
2.8.2 – Artropatia	19
2.8.3 – Crise Aplástica Transitória.....	19
2.8.4 – Infecção fetal	20
2.8.5 – Infecção em pacientes imunodeficientes	21
2.9 – Tratamento e prevenção	21
2.10 – Anemia falciforme	23
2.11 – Anemia falciforme no Brasil	25
2.12 – Patogênese da anemia falciforme	27
2.13 – Principais manifestações clínicas na infância	28
2.13.1– Vaso-oclusão	28
2.13.2 – Crise de dor	28
2.13.3 – Sequestro esplênico	29
2.13.4 – Síndrome torácica aguda	30
2.13.5 – Acidente vascular cerebral	30
2.13.6 – Infecções	31
2.14 – Anemia falciforme e infecção pelo Eritrovírus B19 ..	32
3 – Objetivos	36
3.1 – Objetivo geral	36

	página
3.2 – Objetivos específicos	36
4 – Materiais e métodos	37
4.1 – Desenho e local do estudo	37
4.2 – Caracterização da população de estudo	37
4.3 – Avaliação dos dados clínicos e laboratoriais	39
4.3.1 – Dados hematológicos	39
4.3.2 – Eventos clínicos da anemia falciforme	40
4.4 – História transfusional e exames hematológicos basais	41
4.5 – Diagnóstico da infecção pelo Eritrovírus B19	41
4.6 – Preparação das amostras	42
4.7 – Testes imunoenzimáticos para detecção de anticorpos anti-B19	42
4.8 – Extração do DNA viral	43
4.9 – Teste PCR em tempo real	46
4.9.1 – Teste PCR em tempo real utilizando SYBR Green	46
4.9.2 – PCR em tempo real pelo sistema TaqMan	48
4.9.3 – Validação dos testes de PCR em tempo real	49
4.9.3.1 – Capacidade de detecção dos genótipos 1, 2 e 3 das PCRs em tempo real utilizando SYBR Green e TaqMan	49
4.9.4 – Avaliação do limite de detecção mínima da PCR em tempo real para B19V utilizando SYBR Green	52
4.10 – Aspectos éticos	56
4.11 – Análise estatística	56
5 – Resultados	58
5.1 – Características da população de estudo	58
5.2 – Análise das amostras clínicas	59
5.3 – Análise das características clínicas da população	61
5.4 – Análise dos eventos clínicos	65
5.5 – Relato de evidência de transmissão intrafamiliar do B19V com agravo clínico	68
6 – Discussão	70
7 – Conclusões	81
8 – Referencias bibliográficas	82
9 – Anexos	103
9.1 – Termo de Consentimento Livre e esclarecido	103
9.2 – Parecer do Departamento de Pediatria	106
9.3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG ..	107
9.4 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL – microlitros

μM – micromolar

A – Adenina

AVC – Acidente Vascular Cerebral

B19V – Vírus B19

CAT – Crise Aplástica Transitória

cm – centímetros

COV – Valor do *Cut-off*

DF – Doença Falciforme

dL – Decilitros

DNA – *Deoxyribonucleic acid* - ácido desoxirribonucleico

dNTP – *Deoxynucleotide triphosphate* - Desoxirribonucleotídeo trifosfatado

DO – Densidade ótica

EDTA – *Ethylenediamine tetracetic acid* – ácido etilenodiamino tetra-acético

EI - Eritema infeccioso

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay* - Ensaio imunoenzimático

FDA - *Food and Drugs Administration*

g – grama

G –Guanina

Hb – Hemoglobina

Hb A – Hemoglobina do tipo A

Hb AS – Traço falciforme

Hb S – Hemoglobina do tipo S

Hb S – Hemoglobina S

HbF – Hemoglobina fetal

HPFH – *Hereditary persistence of fetal hemoglobin* - persistência hereditária de hemoglobina fetal

HPLC – Cromatografia Líquida de alta resolução

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

KDa - Kilodalton

Kg – Kilograma

LEU – Leucócitos

MG – Minas Gerais

mL – mililitro

mM – milimolar

NIBSC – *National Institute for Biological Standards* - Instituto Nacional de Padrões Biológicos

nm - nanômetro

NUPAD – Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb - pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PETN – MG – Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais

pH – Potencial hidrogeniônico

PHHF – Persistência hereditária de hemoglobina fetal

PLAQ - Plaquetas

RET – Reticulócitos

RNA – Ácido ribonucleico

RPM – Rotações por minuto

SEA - sequestro esplênico agudo

STA – Síndrome Torácica Aguda

T – Timina

UI – Unidades Internacionais

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Iniciadores utilizados na amplificação da região NS1 do B19V através da PCR em tempo real SYBR Green	47
Tabela 2 Sondas TaqMan utilizadas na reação de PCR em tempo real	48
Tabela 3 Resultados sorológicos e moleculares para B19 V em amostras de crianças com doença falciforme	59
Tabela 4 Características hematológicas e número de transfusões recebidas em 239 crianças com doença falciforme	61
Tabela 5 Número de transfusões recebidas por crianças com doença falciforme e status da infecção pelo B19V	62
Tabela 6 Características das crianças com doença falciforme de acordo com o status da infecção pelo B19V	63
Tabela 7 Associação da frequência de eventos clínicos e internação hospitalar com a infecção pelo B19V	65

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Microscopia eletrônica de partícula do eritrovírus B19	5
Figura 2	Representação esquemática do genoma de eritrovírus B19 e regiões de transcrição (Corcoran & Doyle, 2004)	6
Figura 3	Ciclo de replicação do eritrovírus B19 (Kasamatsu & Nakanshi, 1988) ...	8
Figura 4	Pronormoblasto gigante com inclusões citoplasmáticas sugerindo infecção pelo B19V (Garcia <i>et al</i> , 2009)	9
Figura 5	Principais eventos hematológicos e imunológicos e diagnósticos durante infecção aguda e persistente pelo B19V (Slavov <i>et al</i> , 2011)	12
Figura 6	Mutação gênica responsável pela Hb S	23
Figura 7	Frequência do gene β^S nas diferentes regiões do Brasil (Cançado e Jesus, 2007)	26
Figura 8	Algoritmo de testagem das amostras para testes sorológicos e moleculares para definição de ausência da infecção pelo B19V ou histórico de infecção aguda ou recente	42
Figura 9	Amplificação dos genótipos de B19 V do painel de referência da OMS por PCR em tempo real SYBR Green	51
Figura 10	Amplificação dos genótipos de B19V do painel de referência da OMS por PCR em tempo real TaqMan	52
Figura 11	PCR em tempo real de diluições seriadas de DNA de B19V utilizando padrão OMS/NIBSC	54
Figura 12	PCR em tempo real TaqMan de diluições seriadas de DNA de B19V de padrões OMS/NIBSC	55
Figura 13	Distribuição etária das crianças com anemia falciforme divididas em quartis	58
Figura 14	Reatividade no ELISA para detecção de IgG anti-B19V em amostras de crianças com doença falciforme	60
Figura 15	Curva de sobrevida estimada pelo método de Kaplan-Meier	64
Figura 16	Frequência de eventos agudos que levaram a hospitalização no grupo	

de infectados e não infectados pelo B19V	66
--	----

1. INTRODUÇÃO

O eritrovírus B19 (B19V, antes denominado parvovírus B19) é um agente infeccioso comum em humanos e está associado a uma variedade de manifestações clínicas, dependendo do estado hematológico e imunológico do paciente. Em crianças imunocompetentes, a infecção pelo vírus está associada ao eritema infeccioso ou “quinta doença”, geralmente sem gravidade e de cura rápida. No entanto, o vírus pode estar associado a complicações na gravidez, à anemia crônica em indivíduos imunocomprometidos e à crise aplástica transitória em pessoas com doença hemolítica, como a doença falciforme. Nesses casos, a infecção pode levar à queda temporária, porém expressiva, da taxa de hemoglobina, ocasionando quadro de anemia intensa. O eritrovírus B19 tem sido encontrado em até 70% dos casos de crise aplástica. Esta situação geralmente requer transfusões sanguíneas para reverter o quadro de anemia grave. A infecção também pode estar associada a diversas complicações da doença falciforme, como dor, sequestro esplênico agudo, síndrome torácica aguda e acidente vascular cerebral. Considerando que a infecção por B19V é comum na infância, crianças com anemia falciforme constituem população especialmente vulnerável a essa complicação.

Apesar da significativa morbidade causada pela infecção por B19V em crianças com doença falciforme, poucos estudos têm sido realizados nesse grupo etário sobre a epidemiologia dessa infecção e as complicações a ela associadas. Dados de prevalência e incidência da infecção por B19 em pacientes com doença falciforme têm sido documentados por diversos pesquisadores em diferentes países. No Brasil, entretanto, essas taxas ainda são desconhecidas, bem como o grau de morbidade por ela causada.

O diagnóstico sorológico por meio da detecção de anticorpos IgG anti-B19V determina o *status* de infecção passada, enquanto a presença de IgM representa infecção atual ou recente. O desenvolvimento de testes de PCR em tempo real para detecção do DNA viral no soro ou

plasma do paciente vem permitindo identificar casos de infecção atual/recente sem resposta pela IgM, melhorando a sensibilidade do diagnóstico da infecção por B19V. Ao mesmo tempo, permite a identificação dos genótipos virais circulantes.

Tendo em vista a importância da infecção pelo eritrovírus B19 em pacientes com doença falciforme, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que forneçam dados epidemiológicos, moleculares e clínicos sobre esta infecção viral, permitindo assim avaliar seu impacto e se há necessidade da implementação de programas especiais de prevenção e/ou acompanhamento nessa população.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico:

O eritrovírus B19 (B19V), antes denominado parvovírus, foi identificado pela primeira vez em 1974, na Inglaterra, por Cossart e colaboradores durante a realização de testes para diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite B. A designação B19, universalmente conhecida, se refere ao rótulo do frasco que continha a amostra de plasma a partir da qual o vírus foi isolado (Anderson, 1987; Young, 1996). Análises por microscopia eletrônica revelaram tratar-se de partículas virais de 23 nm de diâmetro, semelhante aos parvovírus animais (Heegard & Brown, 2002). Posteriormente, estudos de biologia molecular identificaram no vírus a presença de DNA de fita simples, de aproximadamente 5,5 Kb, com sequências palindrômicas características da família *parvoviridae* (Berns, 1996).

A primeira associação entre o eritrovírus B19 e doença humana foi descrita em 1981, a partir da observação de crise aplástica transitória em pacientes com anemia falciforme. Em seguida, outros relatos foram publicados na literatura mundial relacionando esse mesmo evento clínico ao vírus, principalmente em pacientes portadores de anemia hemolítica crônica (Pattison *et al.*, 1981; Serjeant *et al.*, 1981). Estudos soropidemiológicos realizados por Anderson e colegas em 1983 comprovaram que o B19V é o agente etiológico do eritema infeccioso ou “quinta doença”. Outras consequências clínicas foram relatadas, como associação entre a infecção pelo B19V e hidropsia fetal em gestantes, devido à transmissão intrauterina. Quadros clínicos de artropatia aguda e crônica também foram observados (Reid *et al.*, 1985; White *et al.*, 1985), assim como de anemia crônica persistente em indivíduos imunocomprometidos (Kurtzman *et al.*, 1987).

Estudos recentes publicados na literatura científica mundial mencionam outras doenças eventualmente associadas à infecção pelo eritrovírus B19, pendentes de maior comprovação, envolvendo doenças do miocárdio (Munro *et al.*, 2003), lúpus eritematoso sistêmico (Diaz *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2001;), púrpura trombocitopênica idiopática (Martinez-Martinez & Maranon, 2000), doença neurológica, encefalite, meningite (Watanabe *et al.*, 1994; Barah *et al.*, 2001) e insuficiência hepática fulminante (Diaz & Collazos, 2000).

2.2. Classificação do vírus B19

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICVT), a família *Parvoviridae* está subdividida em duas subfamílias: *Densovirinae* e *Parvovirinae*, que infectam insetos e vertebrados, respectivamente (Berns, 1996). A subfamília *Parvovirinae* está por sua vez dividida em cinco gêneros: *Amdovirus*, *Bocavirus*, *Dependovirus*, *Erythrovirus* e *Parvovirus*. O B19V é considerado vírus autônomo à medida em que não requer a presença de vírus auxiliar para que ocorra sua replicação. Assim, estava classificado até recentemente no gênero *Parvovirus*. No entanto, considerando seu tropismo por células precursoras de eritrócitos, passou a ser classificado como membro do gênero *Erythrovirus*, criado para classificá-lo (Fauquet *et al.*, 2005).

2.3. Características do Eritrovírus B19

2.3.1. Estrutura viral

O B19V é um vírus DNA de fita simples não envelopado, com simetria icosaédrica e diâmetro de 20-25 nm (figura 1). A partícula completa ou *virion* possui peso molecular de 5,5 a 6,2 x 10⁶ daltons (aproximadamente 50% de massa viral é constituída de proteínas e o restante de DNA) e massa específica em gradiente de cloreto de céσιο de 1,39 a 1,42 g/cm³. O limitado conteúdo de DNA e a ausência de envelope lipídico conferem ao B19 grande resistência à inativação física. O vírus é estável até à temperatura de 56°C por 60 minutos e resiste

também à aplicação de solventes lipídicos. A inativação viral ocorre quando este é submetido à formalina, β -propionolactona e radiação gama (Cohen *et al.*, 1992).

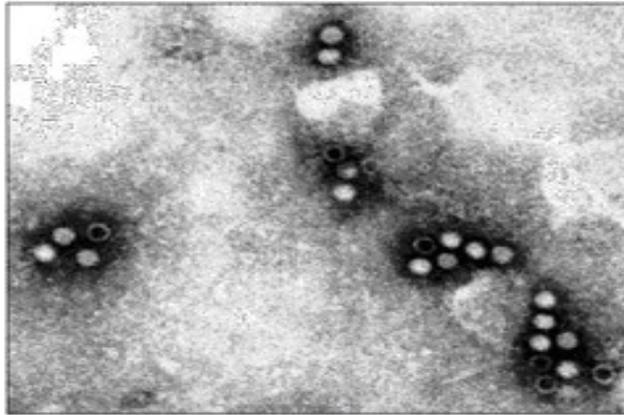


Figura 1 – Microscopia eletrônica de partícula de eritrovírus B19. Fonte: Wadsworth Center, NYS Department of Health.

2.3.2. Genoma viral

O genoma do B19V é constituído por um filamento de DNA linear de fita simples, de polaridade positiva ou negativa e tamanho de 5,6 kb (Cotmore & Tattersall, 1984).

As sequências terminais são palindrômicas e capazes de formar uma configuração similar a um grampo (*hairpin*), que serve como iniciador para síntese da fita complementar. Como na maioria dos parvovírus animais, o genoma do B19V possui duas grandes regiões de leitura (ORF). Uma que codifica para as proteínas estruturais VP1 e VP2, sendo que esta última perfaz aproximadamente 95% do capsídeo, e outra que codifica uma proteína não estrutural NS1 (figura 2).

As sequências das duas proteínas estruturais são colineares, e a VP2 tem a região carboxi-terminal idêntica à de VP1. No entanto, VP1 difere de VP2 pela adição de 227 aminoácidos na região amino-terminal, denominada região única de VP1 (VP1u). Considerando que os anticorpos neutralizantes IgM e IgG produzidos durante o curso da infecção são dirigidos contra epítomos desse domínio, presume-se que VP1u esteja exposta na superfície do vírus (Rosenfeld *et al.*, 1994).

A proteína NS1 se caracteriza como fosfoproteína importante, com funções regulatórias, incluindo controle da transcrição e replicação viral. A citotoxicidade da NS1 está estritamente relacionada à apoptose, resultando na ativação da caspase 3 que, por sua vez, pode alterar e degradar proteínas celulares vitais, como enzimas de reparo de DNA, induzindo à morte celular.

O vírus B19 usa um único promotor, p6, capaz de expressar diferencialmente os genes estruturais e não estruturais. Foi demonstrado que NS1 interage diretamente com o promotor p6 e com fatores de transcrição celulares Sp1/Sp3 para fazer a regulação transcricional. Outros dois polipeptídeos menores são codificados pelo genoma do B19V, um de 7,5 kDa e outro de 11 kDa, mas suas funções não são conhecidas (Berns, 1996; Moffatt et al., 1998; Corcoran & Doyle, 2004).

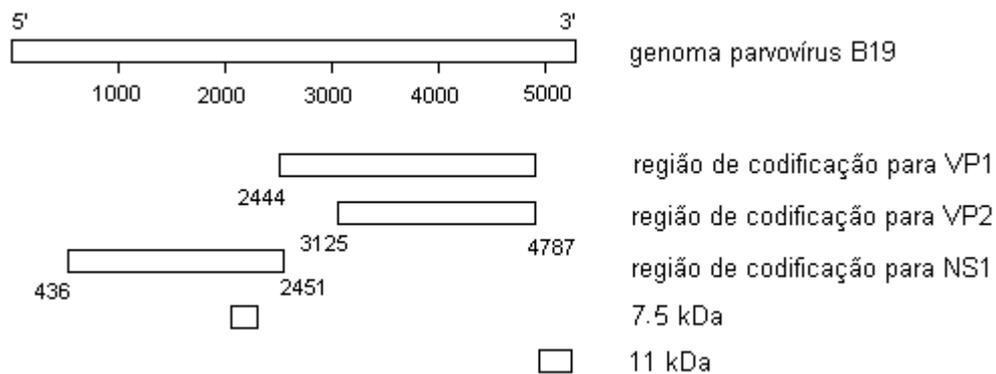


Figura 2 – Representação esquemática do genoma do eritrovírus B19 e as regiões de transcrição. Modificado de Corcoran & Doyle, 2004.

Estudos de epidemiologia molecular têm mostrado a existência de três genótipos distintos (1, 2 e 3) com sequências divergentes de aproximadamente 10%, porém sem aparentemente apresentar diferenças na patogenicidade (Servant *et al.*, 2002).

Todos os genótipos do vírus parecem co-circular, no entanto a frequência de cada um é diferente e sua distribuição espacial e temporal não é uniforme. O genótipo 1 é predominante e está presente em todas

as áreas geográficas. A variante genótipo 2 é rara, embora possa ser esporadicamente encontrada em regiões diversas, principalmente na Europa. A variante genótipo 3 pode ser detectada em maior frequência no oeste da África, onde é o genótipo mais prevalente, e em menor frequência em outras regiões (Liedfelt et al., 2005; Cohen et al., 2006; Hubschen et al., 2009)

2.4. Ciclo de replicação viral

O ciclo de vida do eritrovírus B19 é semelhante ao de outros vírus DNA e inclui a ligação do vírus com a célula hospedeira, internalização, translocação do genoma viral para o núcleo celular, replicação do DNA viral, transcrição do RNA viral, montagem do capsídeo e lise celular com a liberação das partículas virais (figura 3).

O vírus se replica em células humanas progenitoras da linhagem eritroide na medula óssea e sangue, inibindo a eritropoiese (Mortimer et al., 1983). O fator responsável por esse tropismo é o globosídeo, também chamado antígeno P, que atua como o principal receptor para ligação do vírus à célula. O vírus é adsorvido pela célula através da interação entre a proteína VP2 e o antígeno P, presente na superfície dos eritrócitos e seus progenitores, megacariócitos, células endoteliais, células da placenta, células miocárdicas e hepáticas fetais. Evidências sugerem que apenas a presença do antígeno P não é suficiente para garantir a entrada do vírus na célula, sendo importante a participação de β -integrinas como co-receptores (Weigel-Kelley *et al.*, 2001).

A replicação do DNA viral do B19 acontece no núcleo da célula hospedeira. A transcrição do DNA viral dá origem às proteínas estruturais VP1 e VP2 e à proteína não estrutural NS1, que retorna ao núcleo para regular a replicação e transcrição viral. No citoplasma da célula hospedeira acontece o empacotamento do genoma viral, com a formação do capsídeo e, finalmente, a lise celular e a liberação das

partículas virais (Anderson *et al.*, 1987; Berns, 1996; revisado por Slavov *et al.*, 2011).

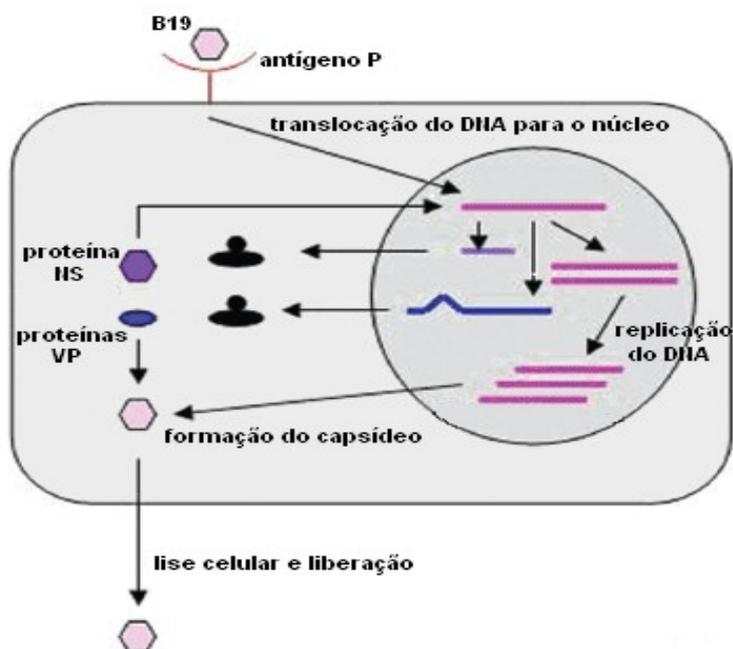


Figura 3 - Ciclo de replicação viral do eritrovírus B19. Modificado de Kasamatsu & Nakanishi, 1988.

No caso de infecção em células permissivas, tais como precursores de eritrócitos, as proteínas estruturais e não estruturais são produzidas e a infecção é produtiva (Ozawa *et al.*, 1987; Ozawa *et al.*, 1988; Moffat *et al.*, 1998; Gallinella *et al.*, 2003). A incapacidade de produção do vírus por algumas linhagens celulares se deve, provavelmente, à ausência de condições para a transcrição, presentes em precursores de eritrócitos (Raab *et al.*, 2001).

O efeito citopático da infecção pelo B19V em progenitores eritroides se traduz na presença de pronormoblastos gigantes ou “células de lanterna”, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (figura 4). Os pronormoblastos gigantes são células eritroides imaturas com diâmetro de 25 a 32 μm que apresentam alterações associadas à toxicidade do vírus tais como vacuolização citoplasmática com formação de

pseudópodes, marginalização da cromatina nuclear e presença dos corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos (Koduri *et al.*, 1998).

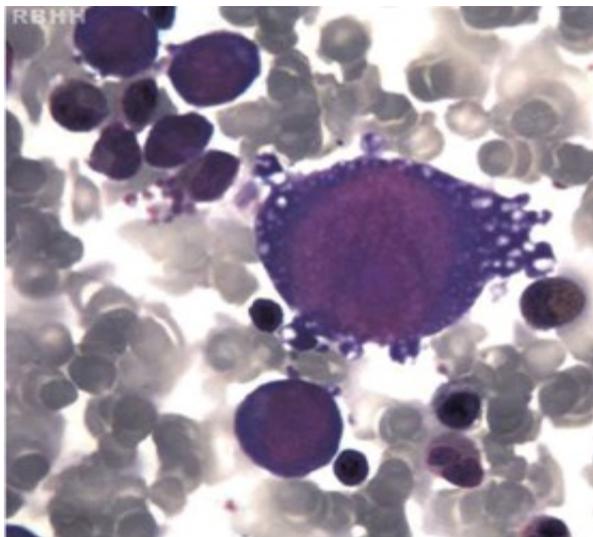


Figura 4 – Pronormoblasto gigante com inclusões citoplasmáticas sugerindo infecção pelo B19V. Medula óssea, coloração por Leishman, aumento 1000 x. (Garcia *et al.*, 2009).

2.5. Epidemiologia e curso da infecção

A infecção pelo eritrovírus B19 é comum e tem sido descrita em todas as partes do mundo onde foi pesquisada, manifestando-se primariamente como surtos de eritema infeccioso em escolas, creches, hospitais e no ambiente familiar (Anderson *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 1984; Gillespie *et al.*, 1990). A incidência do eritema infeccioso em países de clima temperado apresenta variação sazonal, ocorrendo principalmente durante os meses que correspondem ao período do final do inverno e início da primavera. Quando há aumento da taxa basal da infecção, configuram-se períodos epidêmicos que podem ser observados a cada tres ou quatro anos, denotando um caráter viral cíclico (Anderson *et al.*, 1984).

Estudos epidemiológicos conduzidos na Inglaterra por Anderson e colegas (1987), na vigência de epidemias de eritema infeccioso ou crise aplástica transitória associadas ao B19V, revelaram que 10% dos casos

ocorreram na faixa etária abaixo dos cinco anos, 70% em indivíduos entre cinco e 15 anos de idade, e 20% nos pacientes acima desta faixa etária.

A soroprevalência para o B19V aumenta com a idade e pode variar de 2 a 15% em crianças com até cinco anos de idade, 15 a 60% em crianças e adolescentes de seis a 19 anos, entre 30 e 60% em adultos e até 85% na população idosa (Anderson *et al.*, 1986; Cohen *et al.*, 1988; Kelly *et al.*, 2000).

Mulheres em idade fértil apresentam taxa anual de soroconversão para B19V de 1 a 2% (Koch & Adler, 1990), com alta taxa de infecção naquelas que trabalham em atividades de alto risco ocupacional, como contato com crianças em creches e escolas, chegando a até 30% em períodos epidêmicos, enquanto que mulheres que ocupam outros postos de trabalho têm risco reduzido, próximo de 4% (Anderson *et al.*, 1990; Gillespie *et al.*, 1990; Cartter *et al.*, 1991).

Dois estudos soropidemiológicos realizados nas áreas urbanas de Belém e Rio de Janeiro encontraram taxas de prevalência global da ordem de 43% e 72%, respectivamente (Freitas *et al.*, 1990; Nascimento *et al.*, 1990). Achados pertinentes às investigações soropidemiológicas em comunidades indígenas isoladas da região amazônica mostraram uma frequência de positividade quatro vezes menor (4,7 a 10,7%) que a registrada para a zona urbana de Belém do Pará (Freitas *et al.*, 1990).

A prevalência de cada genótipo do vírus B19 varia de acordo com a região geográfica, população e amostra biológica pesquisada (Servant-Delmas *et al.*, 2010). Estudo recente baseado na análise filogenética do eritrovírus B19 em amostras de pacientes de 11 diferentes países na Europa, Ásia e oeste da África, confirma a predominância mundial do genótipo 1, o desaparecimento do genótipo 2, e expansão do genótipo 3, que apesar de predominante no continente africano, tem sido encontrado também em países como França, Brasil, Reino Unido, Estados Unidos, Alemanha, Grécia e Bulgária (Servant *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2008; Hubschen *et al.*, 2009).

A transmissão do vírus B19 ocorre principalmente pelo contato pessoal, por meio de secreções respiratórias, mas pode também ocorrer pela administração de hemocomponentes e hemoderivados contaminados, verticalmente da mãe para o feto, via placenta, e por transplante de órgãos (Heegard & Brown, 2002).

A evolução da doença está bem documentada em um estudo de Anderson e colaboradores em 1985, no qual voluntários saudáveis se expuseram a uma inoculação por via intranasal conforme descrito a seguir:

Após inoculação intranasal do vírus, o mesmo foi detectado 1-7 dias depois em secreções respiratórias e sangue de indivíduos ainda soronegativos até esse momento. Em alguns foi registrada intensa viremia (aproximadamente 10^{11} cópias do genoma por mL de soro), durante 4-5 dias, coincidindo com a aplasia de medula e desaparecimento de células precursoras de eritrócitos. A seguir, foram relatados sintomas inespecíficos como febre, mal estar, mialgias, náuseas e cefaleia. Em alguns voluntários a infecção apresentou-se de forma assintomática.

Anticorpos IgM surgem a partir do 10º a 12º dia da infecção, enquanto os anticorpos de IgG só são detectados a partir de duas semanas após a infecção, e provavelmente permanecem por toda a vida (Figura 5), fornecendo imunidade duradoura (Anderson *et al.*, 1985).

A infecção é caracterizada por um curso clínico bifásico, onde a primeira fase está relacionada a manifestações clínicas inespecíficas, queda nos parâmetros hematológicos de hemoglobina e reticulócitos, e pico virêmico (Figura 5); a segunda fase é caracterizada pelo aparecimento de sintomas de artralgia e exantema (*rash*), elevação da produção de IgM e início da produção de anticorpos IgG, que se mantêm elevada por vários meses e persiste por toda a vida (Anderson *et al.*, 1985; Corcoran & Doyle, 2004).

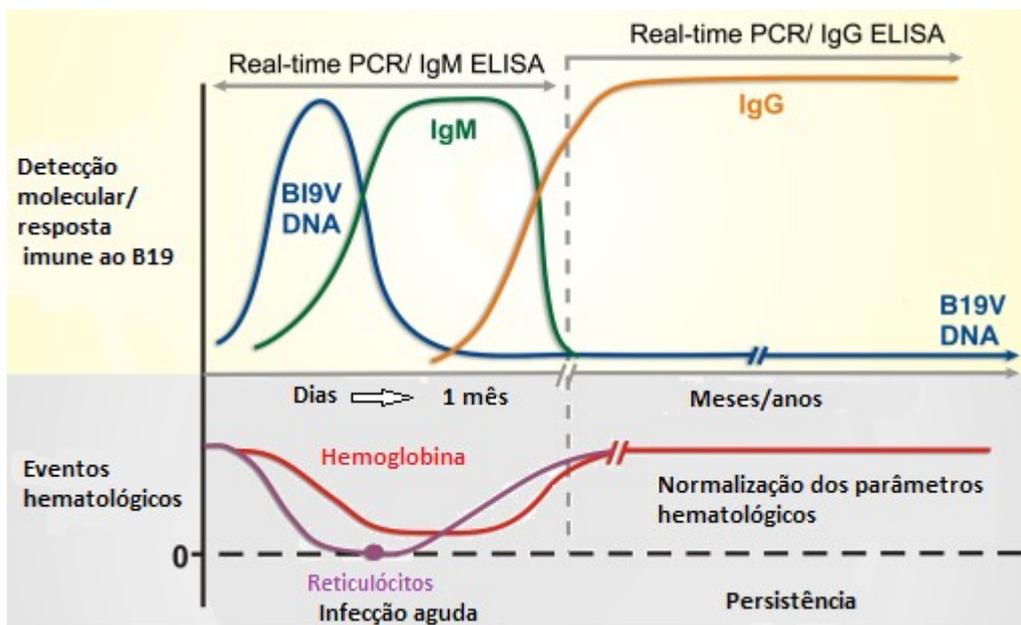


Figura 5: Principais eventos hematológicos, imunológicos e diagnósticos durante infecção aguda e persistente por B19V. Modificado de Slavov et al., 2011.

2.6. Transmissão do B19V por produtos do sangue

A transmissão do vírus B19 através de hemocomponentes e hemoderivados tem sido relatada em diversos estudos e está associada a determinadas características virais, como a relativa resistência do vírus a processos de inativação, infecção persistente em indivíduos assintomáticos e ao prolongado período de replicação do vírus após a infecção inicial (Cassinotti *et al.*, 1997; Santagostino *et al.*, 1997; Blumel *et al.*, 2002; Lefrere *et al.*, 2005).

A partir do desenvolvimento de novas metodologias para detecção do B19V tem sido demonstrado que a prevalência dessa infecção entre doadores de sangue é de aproximadamente 1%, e a maioria apresenta carga viral relativamente baixa (<100-1000 UI/mL) (Candotti *et al.*, 2004; Kleimann *et al.*, 2007). No entanto, em períodos epidêmicos, doadores assintomáticos frequentemente apresentam alta carga viral (>10⁶ UI/mL) sem que estejam presentes anticorpos neutralizantes que evitem a contaminação do receptor do hemocomponente (Kooistra *et al.*, 2011).

Atualmente não tem sido documentada a transmissão do vírus B19 a partir de produtos obtidos por *pool* de plasma para os quais tenha sido quantificada carga viral $<10^3$ - 10^4 UI/mL (Wu *et al.*, 2005; Parsyan *et al.*, 2007). Estudo conduzido por Kleinmann e colaboradores (2011) em doadores de sangue demonstrou ser improvável a transmissão do B19V através de componentes do sangue com níveis de carga viral $<10^6$ UI/mL. A razão para essa ausência de infectividade não está completamente esclarecida, porém parece estar relacionada à quantidade de partículas virais infundidas na transfusão, ao efeito neutralizante de anticorpos contra B19 presentes em unidades de plasma do *pool*, e a fatores do hospedeiro, como infecção prévia e, assim, o desenvolvimento de imediata imunidade anti-B19V (Parsyan *et al.*, 2007).

Frente aos possíveis riscos da infecção por B19V a partir de doações de plasma, foi proposto nos Estados Unidos pelo FDA (*Food and Drugs Administration*) a implementação de testes para determinar a carga viral do B19V, com o objetivo de garantir que os produtos derivados do plasma apresentem concentração de DNA viral $<10^4$ UI/mL (US FDA, 2008). Esse mesmo limite foi determinado pelo Conselho Europeu para preparações de imunoglobulina anti-D e tratamento do plasma visando à inativação viral (European Pharmacopea, 2009).

Enquanto aspectos relativos à transmissão do B19V a partir de *pools* de plasma têm resultado no rastreamento do DNA viral para uso de plasma pela indústria de hemoderivados, ainda não está bem documentado o potencial risco de transmissão do vírus B19 por transfusão de hemocomponentes, como hemácias e plaquetas, e mesmo plasma quando utilizado individualmente. Foram publicados apenas quatro casos clínicos com evidências da transmissão do B19 a partir da transfusão de componentes do sangue (três por concentrado de hemácias e um por plaquetas) (Yoto *et al.*, 1995; Zanella *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1997; Jordan *et al.*, 1998). Além desses, foi também relatado um caso assintomático descrito a partir de um estudo

prospectivo que avaliou infecções virais transmitidas pelo sangue (Yu *et al.*, 2007).

Visando à maior segurança transfusional, é importante que estejam disponíveis testes moleculares sensíveis (limite de detecção a 10^5 UI/mL) para que seja possível aos diversos serviços a definição de protocolos que determinem o limite da carga viral do B19V nos componentes do sangue, especialmente naqueles utilizados em pacientes com anemia hemolítica, gestantes e pacientes imunocomprometidos, e que, ao mesmo tempo, evitem o descarte desnecessário de hemocomponentes, uma vez que a maior parte deles possui carga viral relativamente baixa (Kleinmann *et al.*, 2009).

2.7. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo B19V pode ser realizado pela demonstração da presença do próprio vírus por meio de identificação direta ao microscópio eletrônico, detecção do DNA viral por hibridização direta ou PCR, ou métodos indiretos de diagnóstico, em que se detecta a presença de anticorpos do indivíduo contra o vírus.

A presença de pronormoblastos gigantes na medula óssea ou no sangue periférico pode ser sugestiva de infecção pelo B19V. No entanto, sua presença ou ausência não pode ser usada isoladamente para se fazer o diagnóstico, uma vez que essas células frequentemente não são visualizadas em amostras de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou outras doenças crônicas (Heegaard & Brown, 2002).

2.7.1. Diagnóstico direto

Durante o período virêmico, partículas virais podem ser visualizadas diretamente no soro usando a microscopia eletrônica e/ou imunomicroscopia eletrônica (Caul *et al.*, 1988; Chrystie *et al.*, 1990; Pilavdzic *et al.*, 1994). Antígenos virais podem ser detectados em amostras de soro pelos métodos de radioimunoensaio (Anderson *et al.*, 1982), ensaio imunoenzimático (Anderson *et al.*, 1986; Cubel *et al.*, 1996) ou através da detecção do genoma viral por métodos de hibridização *in situ* (Heegaard & Hornsleth, 1995).

2.7.2. Testes moleculares

A introdução de métodos de amplificação do genoma viral fez com que a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) se tornasse o método diagnóstico mais sensível para detecção do B19V em espécimes clínicos (Clewley *et al.*, 1989; Erdman *et al.*, 1991; Durigon *et al.*, 1993). Assim, muitos laboratórios atualmente complementam a triagem para anticorpos anti-B19V com diagnóstico por técnicas de PCR, uma vez que já está bem estabelecido que a PCR aumenta a sensibilidade na detecção da infecção por B19V (Skjoldebrand-Sparre *et al.*, 2000; Manaresi *et al.*, 2002).

O primeiro método de PCR para detecção do B19V em soro e tecido fetal surgiu em 1989 (Salimans *et al.*, 1989). Atualmente, há uma variedade de métodos moleculares comerciais ou desenvolvidos *in house* para detecção do vírus B19.

A aceitação da PCR como método diagnóstico e sua implementação na rotina laboratorial foram beneficiadas com o advento da PCR em tempo real, a partir do início da década de 90 (Niesters *et al.*, 2001). A PCR em tempo real permite que a detecção do produto amplificado (amplicons) ocorra simultaneamente à reação de

amplificação, em oposição aos métodos tradicionais de PCR, em que o produto da amplificação é detectado apenas no final da reação, com a utilização de uma segunda técnica, normalmente eletroforese em gel. O monitoramento da presença e acúmulo do amplicon em tempo real é possível pelo uso de sondas ou iniciadores marcados com moléculas fluorogênicas, ou de fluoróforos que se ligam ao próprio produto de PCR (Mackay *et al.*, 2002). A metodologia permite monitorar em tempo real, o momento da reação em que a fluorescência emitida pelo produto amplificado ultrapassa o limiar de detecção (Ct – Threshold cycle). As PCRs em tempo real mais comuns usam a molécula fluorescente SYBR Green ou sondas hidrolíticas (Taqman®) com diferentes marcações.

O fluoróforo SYBR Green usado na PCR se liga à fita dupla de DNA, e com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite uma fluorescência verde. A intensidade da fluorescência emitida é proporcional à quantidade de material amplificado na reação, ou seja, do material alvo no início da reação. Nesse método é necessário que após a etapa de amplificação seja feita uma análise da curva de dissociação do produto da PCR. Essa análise consiste na verificação do ponto correspondente à temperatura de dissociação do amplicon (T_m , *melting temperature*). Assim, a inclusão da curva de dissociação permite avaliar se houve formação de um único produto através da visualização de um único pico na curva de *melting*, indicando que ocorreu amplificação de apenas um alvo, eliminando assim amplificações inespecíficas. A vantagem da PCR usando SYBR Green é que ela é menos onerosa que aquelas usando sondas hidrolíticas.

A PCR em tempo real com sondas hidrolíticas (TaqMan®) usam, além de um par de iniciadores, uma sonda capaz de se ligar a uma sequência específica entre os iniciadores na região de DNA. Esta sonda apresenta em uma extremidade um corante repórter fluorescente e na outra extremidade uma molécula *quencher* (silenciador). Durante a PCR, se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anela logo após um dos *primers* e é clivada através da atividade nucleásica 5' da Taq DNA

polimerase, enquanto o primer é estendido, separando o *quencher* da molécula fluorescente após a extensão. A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em aumento da intensidade da fluorescência. Esse aumento ocorre apenas quando a sonda é clivada, ou seja, quando a amplificação da sequência-alvo é estabelecida (Heid et al., 1996; Novais & Pires-Alves, 2004). A PCR em tempo real usando sondas TaqMan é bastante sensível e específica, sendo cada vez mais usada no diagnóstico de infecções (Holland et al., 1991).

O desenvolvimento de técnicas de PCR em tempo real aumentou a sensibilidade e especificidade do diagnóstico de B19V. Vários métodos utilizando essa técnica vêm sendo descritos visando a identificação dos genótipos virais e a quantificação da carga viral (Aberham et al., 2001; Koppelman et al., 2007).

2.7.3. Diagnóstico indireto

A detecção da presença de anticorpos contra o vírus B19 é o método mais utilizado para diagnóstico de pacientes imunocompetentes com alterações clínicas sugestivas da infecção. A detecção de anticorpos IgM indica infecção atual ou recente, dado que estes anticorpos permanecem por até 3 meses na circulação (Schwarz et al., 1997; Heegaard & Brown, 2002).

O aparecimento de anticorpos da classe IgG ocorre a partir de 2 semanas após a infecção e coincide com o declínio de IgM. A reatividade de IgG persiste indefinidamente após a infecção.

Atualmente não existe padrão internacional para detecção de IgM anti-B19V e apenas um teste diagnóstico disponível está autorizado pelo FDA (*US Food and Drugs Administration*). Trata-se de um imunoensaio de captura que utiliza uma proteína recombinante de VP2 para detecção específica de IgM humana no soro ou plasma. Esse imunoensaio possui 89,1% de sensibilidade e 99,4% de especificidade

(Corcoran *et al.*, 2004) e está sendo amplamente utilizado no diagnóstico de infecção recente pelo eritrovírus B19 (Jordan, 2000).

2.8. Manifestações clínicas

Desde sua descoberta em 1975, o eritrovírus humano vem sendo relacionado a uma diversidade de quadros clínicos, que compreendem desde sintomas inespecíficos, como febre, mialgia, fadiga e mal-estar, até quadros clínicos característicos (Anderson & Cohen, 1987).

O aparecimento das diversas manifestações clínicas relacionadas à infecção pelo B19V é influenciado pela condição imunológica e hematológica do hospedeiro. Em crianças e adultos saudáveis, a infecção geralmente evolui de sem sintomas clínicos (Woolf *et al.*, 1989).

2.8.1. Eritema infeccioso

O eritema infeccioso (EI) ou quinta doença da infância é doença exantemática conhecida há mais de um século. A etiologia viral pelo B19V foi descrita por Anderson e colegas (1984), na Inglaterra. O eritema infeccioso é a manifestação clínica mais prevalente em crianças infectadas pelo B19V. Porém, também pode ocorrer em adultos (Pereira *et al.*, 2001; Hoebe *et al.*, 2002; Figueiredo *et al.*, 2005).

Sintomas prodrômicos frequentemente não são observados, mas quando estão presentes podem incluir febre, coriza, cefaléia e náusea. O eritema infeccioso caracteriza-se por eritema na face, de intensidade média progredindo com exantema máculo-papular eritematoso para o tronco, membros superiores e inferiores. A erupção cutânea típica pode ser pruriginosa ou urticariforme e estar acompanhada de febre baixa (Vuorinen *et al.*, 2002).

Acredita-se que a causa da formação do exantema seja a deposição de complexos formados entre antígenos e anticorpos, já que

existe concomitância entre o período de produção de anticorpos e o aparecimento do exantema (Anderson *et al.*, 1985).

2.8.2. Artropatia

A artrite associada ao B19V foi descrita pela primeira vez em 1985 (Reid *et al.*, 1985; White *et al.*, 1985). Artralgia e artrite são os sintomas mais comuns observados em adultos, acometendo 60% das mulheres e 30% dos homens infectados pelo vírus B19 (Anderson *et al.*, 1985; Woolf *et al.*, 1989). Em contraste, essa manifestação clínica em crianças tem incidência abaixo ou igual a 10% (Nocton *et al.*, 1993). A artralgia é geralmente simétrica, com envolvimento principalmente das articulações das mãos e pés e geralmente dura de uma a três semanas, mas pode persistir por meses (Woolf *et al.*, 1989; Freitas *et al.*, 2002).

O diagnóstico diferencial da infecção pelo B19V deve ser considerado em qualquer paciente que apresente artrite reumatoide juvenil. Em contraste com a artrite reumatoide, a infecção pelo B19V não tem sido relacionada à destruição de articulações em prazo mais longo.

2.8.3. Crise aplástica transitória

A Crise Aplástica Transitória (CAT) foi a primeira doença associada ao B19V, sendo originalmente descrita em pacientes portadores de anemia hemolítica crônica, como anemia falciforme, talassemia e esferocitose hereditária (Pattison *et al.*, 1981; Serjeant *et al.*, 1981; Kellerher *et al.*, 1983).

Trata-se de episódio transitório, autolimitado, caracterizado por parada repentina da eritropoiese por um período de 7 a 10 dias, com ausência de células precursoras de eritrócitos na medula óssea e ausência de reticulócitos na circulação (Heegaard & Brown, 2002). Geralmente leucócitos e plaquetas não são afetados, no entanto, às

vezes estão presentes leve leucopenia e/ou trombocitopenia (Borsato *et al.*, 2000).

2.8.4. Infecção fetal

A infecção pelo eritrovírus B19 durante a gestação pode comprometer o feto, levando à ocorrência de hidropsia fetal, anemia congênita, abortamento ou parto de natimorto (Vallada & Vallada, 2007).

O primeiro relato comprovado registrou a detecção de IgM anti-B19V no sangue de um natimorto e da sua mãe (Knott *et al.*, 1984). Num segundo relato, Brown e colaboradores (1984), durante um surto de eritema infeccioso, identificaram um caso de hidropsia fetal e detectaram a presença de DNA viral no tecido fetal.

A incidência de infecção primária por B19V durante a gravidez tem sido estimada em 1 a 5% (Kerr *et al.*, 1994; Harger *et al.*, 1998), e a subsequente transmissão transplacentária situa-se entre 24 e 33% (Enders & Biber, 1990; Yaegashi *et al.*, 1998).

Há maior comprometimento fetal quando a infecção materna acontece até a 20.^a semana de gestação. O risco de morte fetal é, em média, de 9%, e de hidropsia fetal varia de 2-9% (Vyse *et al.*, 2007). O aborto espontâneo e a morte intrauterina são mais frequentes no 1.^o e 3.^o trimestres da gestação, respectivamente (Nyman *et al.*, 2002). Entretanto, a infecção no feto pode ser resolvida espontaneamente, resultando em criança normal e sem complicações posteriores (Morey *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 2003).

Ao se comprovar a infecção de uma gestante, recomenda-se seu acompanhamento por ultrassonografias periódicas. Caso sejam observadas alterações, transfusão sanguínea fetal intrauterina pode amenizar o quadro. Ao se verificar presença de exantema em gestantes, o diagnóstico laboratorial é esclarecedor. No entanto, a infecção pelo B19V durante a gravidez passa geralmente despercebida, uma vez que a maioria das gestantes é assintomática ou apresenta manifestações

clínicas discretas. Por essa razão, seria importante a realização do diagnóstico sorológico por anti-IgG no pré-natal, e que os profissionais de saúde se mantivessem alertas para a possibilidade dessa infecção nas mães IgG negativas (Cubel, 1996; Wong *et al.*, 2002).

2.8.5. Infecção em pacientes imunodeficientes

Em pacientes imunocomprometidos, devido a doenças inatas ou adquiridas ou em decorrência do uso de drogas imunossupressoras, como em transplantados, a infecção pelo B19V pode levar à anemia crônica. Esses indivíduos não são capazes de produzir anticorpos neutralizantes em títulos protetores, cursando com viremia persistente ou recorrente acompanhado de anemia crônica devido à aplasia de série vermelha (Vallada & Vallada, 2007; Slavov *et al.*, 2011).

Nesses pacientes não é possível a formação de imunocomplexos para eliminar o vírus do organismo. Nesses casos, o diagnóstico laboratorial da infecção pelo B19V só é possível pela detecção do DNA viral (Clewley, 1989; Duringon *et al.*, 1993).

2.9. Tratamento e prevenção

Até o momento não foram desenvolvidos medicamentos antivirais, específicos no combate à infecção pelo eritrovírus humano. Desse modo, o tratamento é baseado em medicamentos de combate aos sintomas frente à infecção (Vallada & Vallada, 2007). Pacientes que desenvolvem eritema infeccioso não necessitam de nenhum tratamento. Os que evoluem para artralgia são tratados com analgésicos e anti-inflamatórios. Na maioria dos casos de crise aplástica transitória causada pelo B19V, faz-se necessária transfusão imediata de concentrado de hemácias, para reverter o quadro de anemia e seus sintomas clínicos, preservando assim a vida do paciente. Gestantes previamente soronegativas devem ter a gravidez monitorada, em caso

de soroconversão, por meio de ultrassonografia semanal. Em caso de risco de hidropsia fetal deve-se realizar a cordocentese e transfusão intrauterina de hemácias para diminuir a mortalidade fetal (Bousquet *et al.*, 2000).

Pacientes imunocomprometidos que apresentam infecção crônica pelo B19 e aplasia de células vermelhas devem submeter-se à terapia de infusão endovenosa de gamaglobulina (0.4g/Kg de peso corporal/dia durante 5 dias ou 1g/Kg/dia por 2 ou 3 dias). Esse tratamento pode ser curativo, levando ao aumento nos níveis de reticulócitos e hemoglobina (Heegaard & Brown, 2002).

Como não existe atualmente vacina disponível contra o vírus B19, a prevenção deve acontecer por meio de medidas que visem à interrupção da transmissão de um hospedeiro para outro, uma vez que se trata de doença disseminada por via respiratória. Outra estratégia é a implementação de testes que garantam maior controle da qualidade de hemocomponentes e hemoderivados, evitando assim a transmissão transfusional. É coerente que essas ações sejam direcionadas prioritariamente aos grupos mais susceptíveis a complicações clínicas, como pacientes com hemoglobinopatias, gestantes e pacientes imunocomprometidos. Apesar de não ser prática difundida no Brasil, o diagnóstico pré-natal pela pesquisa de IgM e IgG anti-B19V, indicativos de infecções recentes e passadas, respectivamente, poderia ser utilizado. O isolamento de pacientes que desenvolveram quadros exantemáticos não evita a transmissão do B19V, uma vez que o estágio virêmico já teria ocorrido.

2.10. Anemia falciforme

Os distúrbios das hemoglobinas humanas, ou hemoglobinopatias, constituem grupo heterogêneo de doenças geneticamente determinadas, de ampla distribuição e que apresentam morbidade significativa em todo o mundo (Weatherall & Clegg, 1999). Estima-se que aproximadamente 7% da população mundial seja portadora de doenças desse tipo. Apesar desses distúrbios ocorrerem com maior frequência nas regiões tropicais, eles são encontrados em todo o mundo, devido às migrações (Weatherall & Clegg, 2001; Weatherall, 2008).

As hemoglobinopatias são de importância fundamental na genética médica, pois são as doenças monogênicas mais comuns no mundo, causando morbidade substancial (Thompson & Thompson, 2002). Esses distúrbios constituem um grupo de doenças genéticas caracterizadas por alterações da porção proteica da molécula da hemoglobina. Podem ser classificadas como estruturais e de síntese (Bunn, 1994).

A hemoglobina S (Hb S) é uma variante estrutural decorrente de uma mutação pontual (GAG > GTG) no sexto códon no gene da globina β , levando à substituição do ácido glutâmico pela valina, na sexta posição da cadeia polipeptídica (figura 6) (Steinberg, 1995).

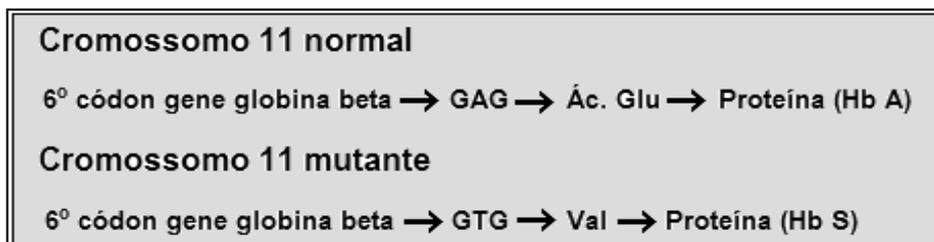


Figura 6. Mutação gênica responsável pela Hb S.

As doenças falciformes constituem um conjunto de desordens genéticas autossômicas recessivas, caracterizadas pela presença de, pelo menos, um alelo mutante β^S e o fenótipo com a concentração de Hb S superior a 50% (Ashley-Koch *et al.*, 2000; Naoum, 2000; Stuart e Nagel, 2004). Os genótipos mais comuns da doença falciforme em nosso meio são Hb SS, Hb SC, Hb S β^+ -tal, Hb S β^0 -tal e Hb SD-Punjab (Januário, 2002). O traço falciforme caracteriza o portador assintomático, ou heterozigoto falcêmico (Hb AS).

Os indivíduos heterozigotos para a hemoglobina S (AS), portadores do traço falcêmico, possuem hemácias com aproximadamente 20-45% da hemoglobina variante e são assintomáticos; os homozigotos (SS) possuem a anemia falciforme, com hemácias contendo 80% ou mais de Hb S, sendo portadores de anemia hemolítica grave, acompanhada por manifestações clínicas variáveis (Smith *et al.*, 1981; Embury, 1995; Chang *et al.*, 1997; Weatherall & Provan, 2000). Este genótipo apresenta maior gravidade clínica e hematológica, e maior morbidade e mortalidade que genótipos possuindo Hb S em conjunto com outra Hb variante (Naoum, 2000; Frenette & Atweh, 2007).

Quando um alelo β^S coexiste com um alelo causador de β -talassemia (β -tal), caracterizada por diversos alelos mutantes do gene da β -globina que resultam na não transcrição de mRNA para produção de cadeias beta ou na transcrição de níveis significativamente diminuídos, a gravidade da doença falciforme depende do tipo de mutação que causa a β -tal (Steinberg, 2008). Quando o alelo β -talassêmico coexistente causa a completa inativação do gene β , a doença falciforme resultante é conhecida como S β^0 -talassemia (S β^0 -tal) e a gravidade clínica tende a ser semelhante à da anemia falciforme (Hb SS) (Serjeant *et al.*, 1979).

2.11. Anemia falciforme no Brasil

A anemia falciforme é a doença hereditária monogênica mais comum no Brasil, ocorrendo predominantemente, mas não exclusivamente, em afrodescendentes (Di Nuzzo & Fonseca, 2004; Cançado & Jesus, 2007). O Ministério da Saúde estima a prevalência de 25.000 a 30.000 indivíduos com anemia falciforme no país e a incidência de 3.500 novos casos a cada ano (o nascimento de uma criança com anemia falciforme para cada 1.000 recém-nascidos vivos). Com relação ao traço falciforme, estima-se a prevalência de 7.200.000 casos, sendo 2% a 8% na população geral e 6% a 10% entre afrodescendentes. Estima-se a incidência de 200.000 novos portadores do traço falciforme a cada ano (Cançado & Jesus, 2007).

A distribuição do alelo β^S no Brasil é bastante heterogênea. A prevalência de heterozigotos (Hb AS) é maior nas regiões norte e nordeste (6% a 10%), enquanto nas regiões sul e sudeste a prevalência é menor (2% a 3%) (Silva & Shimauti, 2006; Cançado & Jesus, 2007).

Estudos realizados em diversas regiões do Brasil têm demonstrado essa distribuição heterogênea. No estado da Bahia, em populações do Recôncavo Baiano, a prevalência de portadores do traço falciforme (Hb AS) foi de 10,5% e de homozigotos (Hb SS) foi de 1,24% (Silva et al., 2006), sendo que na cidade de Salvador a prevalência estimada do traço falciforme foi de 9,8%, enquanto da anemia falciforme foi de 0,2% (Adorno et al., 2005). No Distrito Federal, a prevalência do traço falciforme em recém-nascidos foi de 3,23% e da anemia falciforme de 0,09% (Diniz et al., 2009). Na cidade de Natal (RN), a prevalência do traço falciforme em recém-nascidos foi de 1,5% e da anemia falciforme de 0,05% (Araújo et al., 2004). Na cidade de Porto Alegre (RS), em estudo piloto para triagem neonatal de hemoglobinopatias, foi encontrado frequência de apenas 1,2% para portadores do gene β^S , entre heterozigotos e homozigotos (Daudt et al., 2002). Em outro estudo,

envolvendo o estado do Rio Grande do Sul como um todo, a prevalência do traço falciforme foi de 1,14% (Sommer *et al.*, 2006). No estado de São Paulo, na cidade de Campinas, o programa de triagem neonatal encontrou frequência de 1,98% de portadores do traço falciforme e de 0,01% para anemia falciforme (Brandelise *et al.*, 2004). No Estado de Minas Gerais está estimado o nascimento de uma criança com anemia falciforme para cada 2.500 recém-nascidos vivos (Januário, 2002).

As diferentes prevalências desta hemoglobinopatia nas diferentes regiões brasileiras (figura 7) refletem a diversidade de origens raciais e os variados graus de miscigenação presentes no país (Sommer *et al.*, 2006).

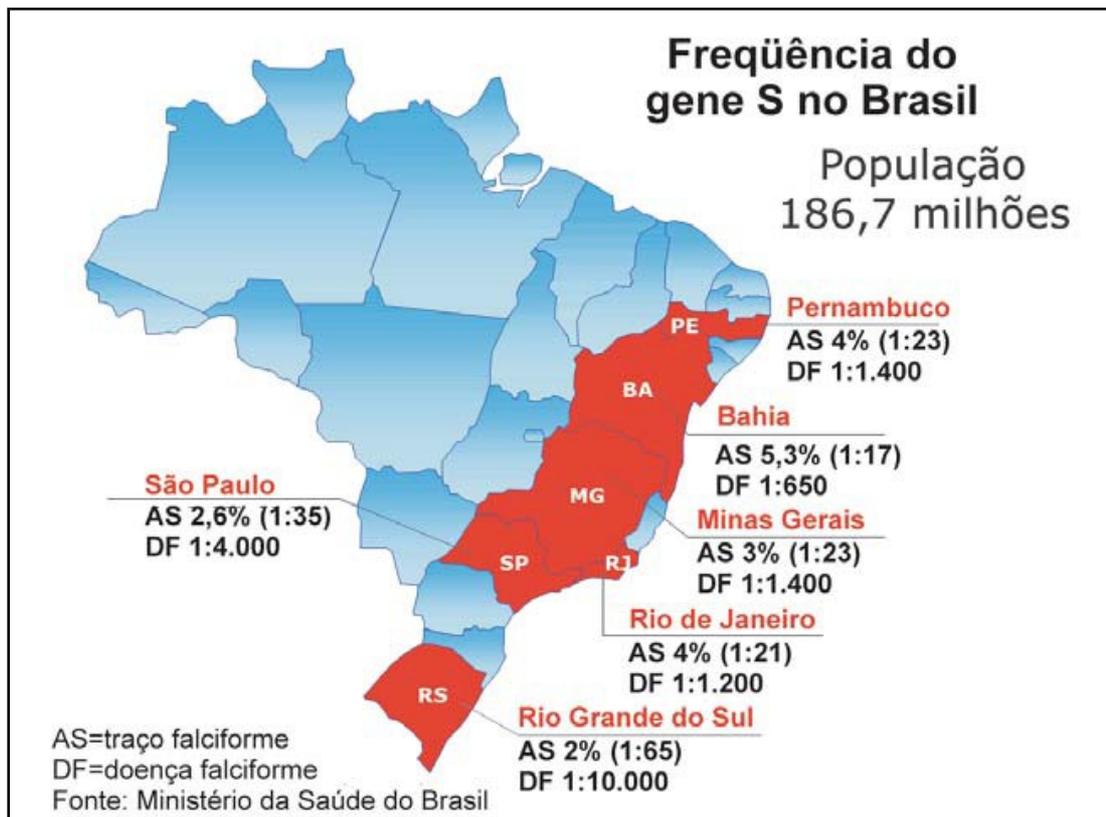


Figura 7. Frequência do gene β^S nas diferentes regiões do Brasil. Fonte: Cançado & Jesus, 2007.

2.12. Patogênese da anemia falciforme

A polimerização da hemoglobina S desoxigenada é o primeiro evento na patogênese molecular da doença falciforme. Ela resulta na distorção da forma da hemácia e na acentuada diminuição da sua deformabilidade (Bunn, 1997).

Quando a hemoglobina S é desoxigenada, a substituição do ácido glutâmico por valina resulta em uma interação hidrofóbica com outra molécula de hemoglobina, desencadeando a formação de grandes polímeros. A alteração celular que causa a deformação dos eritrócitos globulares em falcizados leva à falência da bomba de sódio e potássio. Os eritrócitos perdem potássio e água e tornam-se mais densos, favorecendo o aumento de polímeros da Hb S. Ocorre também aumento da concentração de cálcio intracelular e, conseqüentemente, aumento da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) da desoxiemoglobina. Essas alterações modificam a permeabilidade celular e provocam lesões crônicas na membrana celular, tornando os eritrócitos irreversivelmente falcizados e acentuando os problemas, não só ao nível molecular, mas também ao nível circulatório. A alteração do fluxo sanguíneo ocorre pelo aumento da viscosidade do sangue. Os eritrócitos falciformes irreversíveis têm a propriedade de adesão aumentada ao endotélio vascular, principalmente devido à alta viscosidade do sangue e também pela elevação dos níveis de fibrinogênio, que ocorre como resposta natural às infecções. A deposição desses eritrócitos na superfície endotelial reduz a luz dos capilares, provocando estase e, conseqüentemente, hipóxia tecidual, formando mais desoxiemoglobina, piorando a circulação e lesando os tecidos perfundidos por esses capilares. Pode ocorrer, ainda, a oclusão total dos capilares, o que causa trombose, formação de fibrina e, também, ativação dos mecanismos de coagulação. Os tecidos mal perfundidos podem sofrer infartos com

necrose e formação de fibrose, principalmente no baço, medula óssea e placenta (Naoum & Domingos, 1997).

2.13. Principais manifestações clínicas na infância

Os fenômenos vaso-oclusivos e a hemólise crônica são os principais determinantes das manifestações clínicas da anemia falciforme. Apesar da alteração principal estar restrita às hemácias, trata-se de doença sistêmica, cujos efeitos podem incidir sobre qualquer órgão (Reed & Vichinsky, 1998).

2.13.1. Vaso-oclusão

A grande quantidade de Hb S presente nas hemácias do paciente com anemia falciforme leva ao aumento da densidade celular, favorecendo a polimerização intracelular que diminui a maleabilidade da hemácia e leva à obstrução de vasos sanguíneos de médio e pequeno calibre (Wang e Lukens, 1998). Os fenômenos vaso-oclusivos acontecem principalmente em órgãos onde o fluxo sanguíneo é lento e a tensão de oxigênio e o pH são mais baixos, como rim, baço e medula óssea. Vários fatores estão associados a esse evento clínico, como a polimerização da Hb S, desidratação celular, aumento da rigidez do eritrócito e da viscosidade sanguínea, ativação e adesão das células endoteliais e de plaquetas, desequilíbrio do tônus vascular com elevação dos níveis de endotelina e redução do óxido nítrico (Wang & Lukens, 1998; Stuart & Nagel, 2004).

2.13.2. Crises de dor

Os eventos de dor aguda ocorrem em frequência bastante variável nos pacientes. Correspondem às manifestações clínicas mais comuns da anemia falciforme. De forma secundária às oclusões

intermitentes da microcirculação, as crises dolorosas são provocadas por danos nos tecidos e geralmente são de início agudo, durando em torno de 3 a 5 dias. A dor atinge mais frequentemente os ossos e as articulações, podendo atingir também o tórax, o abdômen e a região dorsal. Os episódios de dor e edema dos pés e das mãos (dactilite ou síndrome mão-pé) podem ser a primeira manifestação de dor nos lactentes. Esses episódios de dor geralmente são autolimitados e podem desaparecer espontaneamente. Devido à possibilidade de condutas equivocadas, sequelas crônicas ou mesmo risco de vida, merecem atenção especial. Infecções, febre, hipóxia, desidratação e exposição ao frio e níveis mais elevados de Hb são fatores que podem desencadear as crises álgicas (Wang & Lukens, 1998; Gualandro, 2001).

2.13.3. Sequestro esplênico

A crise de sequestro esplênico agudo (SEA) é mais frequente nos dois primeiros anos de vida, sendo caracterizada pelo aumento do baço, diminuição da concentração de hemoglobina ($\geq 2\text{g/dL}$ em relação aos níveis basais), sempre acompanhada de reticulocitose, podendo acarretar colapso circulatório que pode levar ao óbito por anemia e choque hipovolêmico (Stuart & Nagel, 2004; Rezende et al, 2009). Essa complicação é resultante da estase (estagnação) aguda das células falciformes nos sinusoides do baço, que aumenta de volume em 2 cm ou mais à palpação.

O tratamento imediato inclui a correção hipovolêmica com transfusão (Stuart & Nagel, 2004; Brasil, 2006). Como a taxa de reincidência é alta (cerca de 50%), o acompanhamento clínico é fundamental. Para crianças com mais de 2-3 anos de idade, a esplenectomia é recomendada logo após o episódio agudo (Stuart & Nagel, 2004). Mães e cuidadores devem ser orientados para fazer a palpação do baço desses pacientes, bem como reconhecer os sintomas desse evento potencialmente ameaçador à vida. Tais medidas têm

reduzido o número de mortes (Stuart & Nagel, 2004; Cançado & Jesus, 2007).

2.13.4. Síndrome Torácica Aguda

A síndrome torácica aguda (STA) é causa frequente de hospitalizações e a principal causa de morte em jovens adultos com doença falciforme (Platt et al., 1994). É caracterizada por dor torácica, tosse, febre, dispneia, infiltrados pulmonares e declínio no nível basal de hemoglobina. Afeta em torno de 40% dos pacientes com anemia falciforme (Steinberg, 1999).

Em estudo multicêntrico realizado nos EUA, do qual 30 centros participaram, as causas específicas dos episódios de STA foram identificadas em 38% dos pacientes. As infecções foram as principais causas (29%), seguidas da embolia gordurosa (9%) (Vichinsky et al., 2000). Os tipos de infecções são igualmente distribuídos entre bacteriana, micoplasma, vírus e infecções por clamídia (Stuart & Nagel, 2004). A infecção pelo eritrovírus B19 causa necrose na medula e uma forma grave de STA (Lowenthal et al., 1996).

Os fatores de risco para STA incluem o genótipo homocigoto (Hb SS), baixas concentrações de Hb F e níveis basais altos de hemoglobina e leucócitos (Castro et al., 1994).

2.13.5. Acidente Vascular Encefálico

O acidente vascular encefálico(AVE) é complicação grave que pode afetar pacientes com anemia falciforme e está associado a mortalidade elevada, principalmente em crianças entre 2 e 5 anos de idade, com redução de sua incidência entre 10 e 19 anos (Silva et al, 2011; Ohene-Frempong & Steinberg, 2001; Stuart & Nagel, 2004). Ela é recorrente em até 50% desses pacientes nos primeiros três anos após o AVC (Fabron, 1997).

Os dois principais mecanismos responsáveis pelo AVC em indivíduos com doença falciforme são: 1) arteriopatia oclusiva em que existe proliferação da camada íntima e aumento dos fibroblastos e das células musculares lisas na parede das artérias e, como consequência, estreitamento segmentar progressivo da porção distal da artéria carótida interna e ramos proximais das principais artérias intracranianas (polígono de Willis); 2) agregação das células falciformes e, conseqüentemente, oclusão do lúmen de pequenos vasos (Hillery & Panepinto, 2004). A terapia transfusional crônica pode reduzir em até 90% a recorrência destes episódios (Figueiredo, 2001). Em adultos, o AVC hemorrágico é o mais comum.

2.13.6. Infecções

As infecções são a maior causa de morbidade e mortalidade de crianças portadoras de anemia falciforme, sendo o *Streptococcus pneumoniae* o principal agente etiológico. O risco de infecção é maior nos primeiros anos de vida, especialmente para a meningite bacteriana causada por pneumococos (Costa, 2001; Ohene-Frempong & Steinberg, 2001).

A fisiopatologia que envolve a susceptibilidade elevada à infecção em indivíduos com anemia falciforme está relacionada à asplenia funcional que ocorre progressivamente e dificulta a opsonização de bactérias encapsuladas, favorecendo a infecção por patógenos como *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Klebsiella sp*, *Salmonella sp* e *Staphylococcus aureus* (Wang & Lukens, 1998; Costa, 2001; Di Nuzzo & Fonseca, 2004).

2.14. Anemia falciforme e infecção pelo eritrovírus B19

O eritrovírus B19 causa significativa morbidade e mortalidade em crianças com doença falciforme. No entanto, há poucos estudos publicados sobre a epidemiologia e as complicações clínicas associadas a esta infecção em pacientes pediátricos.

Estudos sorológicos em populações gerais, não falcêmicas, na cidade paulista de Caieiras e no Rio de Janeiro, apontam que a infecção pelo eritrovírus B19 ocorre predominantemente durante a infância (Amaku *et al.*, 2009; Nascimento *et al.*, 1990). Estudo realizado na Jamaica por Serjeant e colaboradores (2001) demonstrou que aos 15 anos de idade 61% das crianças com genótipo SS apresentaram soroconversão para B19V. Esse percentual é similar ao encontrado em outro estudo, realizado no Reino Unido, onde 50% apresentaram soroconversão na faixa etária de 11 a 15 anos (Brown, 1997).

Estudo americano com crianças e adolescentes entre um a 21 anos (média de 7,3 anos) com doença falciforme mostrou prevalência de 30% de B19V e incidência de 11,3 por 100 pacientes-anos (Smith-Whitley, 2004). Em outro estudo realizado na Tunísia com pacientes com doença falciforme (idade média de 9,2 anos) foi identificada infecção passada em 56,5% dos pacientes com anemia falciforme e 39% dos pacientes com β -talassemia. Já a infecção aguda foi detectada em 8,7% das crianças com anemia falciforme por meio da detecção de anticorpos IgM anti-B19V e/ou DNA viral (Regaya *et al.*, 2007). Estudo realizado na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, avaliou a soroprevalência de anticorpos IgG em uma população de pacientes com doença falciforme e talassemia beta (idade média 19,2 anos) e encontrou taxa de 55,3% Slavov *et al.*, 2011).

Como já referido anteriormente, o B19V infecta as células precursoras das hemácias na medula óssea, causando parada da

hematopoiese por aproximadamente uma semana. Isso, entretanto, não leva a anemia sintomática em indivíduos com concentração de hemoglobina dentro dos limites de referência, pois a vida média das hemácias de cerca de 100 dias está preservada. Em pessoas que apresentam anemia hemolítica crônica, ou seja, aquelas com baixas taxas de hemoglobina e hemácias com período de vida curto (aproximadamente 20 dias), a infecção pelo B19V acarreta queda progressiva e relativamente rápida na taxa de hemoglobina, ocasionando anemia intensa, sintomática. Assim, os achados laboratoriais comuns são queda abrupta da hemoglobina, queda dos reticulócitos e redução na medula óssea dos precursores eritroides com inclusões nucleares características nos proeritroblastos (Veríssimo, 2007). Este quadro grave, conhecido como crise aplástica transitória (CAT) é, sem dúvida, umas das principais complicações da anemia falciforme e de outras anemias hereditárias. Nos pacientes com anemia falciforme, a CAT é a condição de maior relevância associada à infecção pelo eritrovírus B19.

Em 1981, foi descrita pela primeira vez a associação entre a infecção pelo eritrovírus B19 e a CAT e desde então estudos têm mostrado que aproximadamente 70% das infecções pelo B19 nessa população resultam em crise aplástica transitória (Serjeant *et al.*, 2001).

Estudo longitudinal realizado por Rao e colaboradores (1992) em Nova Iorque mostrou que 68% dos casos de CAT em pacientes com anemia falciforme foram causados pela infecção por B19V.

O período de incubação viral na crise aplástica pode variar de 9 a 17 dias. Os sintomas prodrômicos possíveis são febre, mal-estar, dores e sintomas gastrointestinais e respiratórios leves. Exantema pode ocorrer em 23% dos pacientes, sendo de difícil visualização nos pacientes melanodérmicos (Cubel *et al.*, 1992; Di Nuzzo & Fonseca, 2004; Smith-Whitley *et al.*, 2004). Os sintomas prodrômicos são seguidos pela queda do hematócrito e da hemoglobina e detecção de reticulopenia acentuada, que duram em média 6 a 8 dias. O curso total

da doença, dos sintomas prodrômicos até o reaparecimento dos reticulócitos circulantes é de 10 a 12 dias (Saarinem *et al.*, 1986).

Embora alguns episódios de CAT em crianças com doença falciforme possam ter evolução benigna, muitos deles necessitam transfusão de concentrado de hemácias visando a reduzir o risco de colapso circulatório devido à anemia grave e súbita provocada pela infecção (Goldstein *et al.*, 1987; Serjeant *et al.*, 1993). No estudo coordenado por Smith–Withley e colegas (2004), a transfusão foi necessária em 72% dos pacientes portadores de doença falciforme, sendo que as crianças com Hb SS necessitaram de transfusão mais frequentemente que as com SC. Um outro estudo em crianças com doença falciforme mostrou que, após a infecção pelo B19V, a imunidade contra outros episódios de CAT parece ser duradoura, não sendo observada recorrência desse evento associada à infecção pelo vírus B19 (Serjeant *et al.*, 2001).

Além da crise aplástica, outras complicações têm sido relacionadas à infecção pelo eritrovírus B19. Eventos cerebrovasculares como acidente vascular cerebral e encefalite foram descritos em dez pacientes com anemia falciforme após confirmação de soroconversão para o vírus (Wierenga *et al.*, 2001). Outros eventos como meningite e ataxia cerebelar aguda foram observados em indivíduos normais em associação ao B19V (Okumura *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1999). Outro estudo realizado em pacientes com doença falciforme mostrou a ocorrência de sequestro esplênico (19,1%) e de síndrome torácica (11,8%), como eventos subsequentes à CAT em pacientes infectados pelo B19V (Smith-Whitley *et al.*, 2004). Do mesmo modo, Lowenthal e colaboradores (1996) relataram associação do vírus B19 com síndrome torácica aguda em pacientes com doença falciforme nos Estados Unidos.

Além desses eventos clínicos possivelmente associados à infecção pelo B19V, o vírus pode causar em indivíduos com doença falciforme necrose de medula óssea induzida pela infecção viral maciça,

podendo desencadear embolia sistêmica gordurosa e embolia fatal de medula óssea (Godeau et al.,1991; Fartoukh et al., 2006). No entanto, embolia gordurosa parece ser mais frequente em indivíduos com genótipo SC do que em SS (Shapiro et al., 1984).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Estimar a prevalência e incidência da infecção pelo eritrovírus B19 em crianças com doença falciforme atendidas no Hemocentro de Belo Horizonte e avaliar a morbidade da infecção.

3.2. Objetivos específicos

1. Padronizar um teste de PCR em tempo real para detecção dos três genótipos do eritrovírus B19 em amostras de soro ou plasma.
2. Investigar a frequência de infecção passada ou atual/recente pelo B19V por meio da detecção de anticorpos IgG e IgM anti-B19V, e DNA viral em amostras de soro ou plasma dos indivíduos participantes.
3. Definir o genótipo de B19V mais frequente na população estudada.
4. Avaliar retrospectivamente e prospectivamente as manifestações clínicas, exames hematológicos e a história transfusional dos indivíduos participantes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho e local de realização do estudo

Trata-se de um estudo transversal aninhado a uma coorte retrospectiva, realizado em crianças com doença falciforme, genótipos SS e S β^0 -talassemia, diagnosticadas pelo Programa Estadual de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PETN-MG), nascidas entre 1999 e 2009, acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação Hemominas.

4.2. Caracterização da população de estudo

Inicialmente foi realizada aleatorização estratificada de 385 pacientes, homogeneamente distribuídos em 35 crianças por ano de nascimento, nascidas no período compreendido entre 1999 e 2009, sendo que no ano de 2009 foram incluídas apenas crianças com pelo menos nove meses de idade. Essa amostra de 35 crianças por ano de nascimento representa aproximadamente 50% a 60% do total de crianças com doença falciforme matriculadas anualmente no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte, todas provenientes do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais.

Dessa seleção inicial, foram estudados e testados 239 pacientes com anemia falciforme, 122 do sexo feminino e 117 do masculino, com idade entre 9 meses e 12 anos, atendidos no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação Hemominas. Para o estudo de prevalência, amostras de soro ou plasma dessas 239 crianças foram colhidas. Dos pacientes que apresentaram resultados negativos para B19V em todos os exames realizados, foi possível realizar acompanhamento de 51 deles, os quais tiveram nova amostra colhida em intervalo médio de 0,9 anos a partir da data da coleta da primeira amostra.

A diferença de 146 casos entre a aleatorização inicial e os que foram efetivamente estudados (385-239=146) deveu-se à exclusão de crianças nas quais não foi possível a coleta de sangue, por variados motivos, e daquelas para as quais não houve assinatura do termo de consentimento dos responsáveis para participação na pesquisa. Também foram excluídas crianças com idade inferior a 9 meses devido a possível presença de anticorpos maternos anti-B19 circulantes. Três crianças foram excluídas porque, embora tendo o fenótipo FS ao nascimento, eram portadoras do genótipo S-Persistência hereditária de hemoglobina fetal (S-HPFH), provado por testes moleculares.

Os critérios de inclusão utilizados nesta pesquisa foram:

- Crianças triadas pelo PETN-MG, com perfil hemoglobínico compatível com doença falciforme (padrão neonatal FS, ou SS determinado por HPLC e eletroforese com focalização isoelétrica).
- Crianças incluídas pela aleatorização estratificada cujas famílias assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido referente à pesquisa e concordaram em realizar coleta de amostra de sangue ou consentiram na utilização de amostra já disponível no Hemocentro de Belo Horizonte.

Os critérios de exclusão foram:

- Crianças com perfil hemoglobínico compatível com outros subtipos de doença falciforme como FSC E FSA (S β^+ -talassemia) e as que apresentaram diagnóstico posterior de PHHF (Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal).
- Crianças que foram ao óbito antes do início do estudo.
- Crianças encaminhadas ao Hemocentro, que compareceram à primeira consulta e não deram seguimento ao acompanhamento clínico.
- Crianças transferidas para acompanhamento em outro hemocentro.

As informações utilizadas na seleção da população de estudo foram retiradas do banco de dados do PETN-MG (NUPAD/Faculdade de Medicina, UFMG).

Foram utilizadas amostras de soro ou plasma coletadas no Hemocentro de Belo Horizonte, no período de junho de 2010 a fevereiro de 2012. A maioria das amostras utilizadas no estudo foi obtida de coletas realizadas para exames de rotina, necessários ao acompanhamento clínico dos pacientes e, desse modo, não foi preciso realizar coleta de sangue exclusivamente para a pesquisa. Nesses casos, aproximadamente 1 a 4 mL de sangue foram coletados em tubo contendo EDTA e o plasma obtido por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos. Naqueles poucos pacientes para os quais não estava prevista coleta de amostras de rotina, o sangue foi colhido por punção venosa em tubo de 5 mL sem anticoagulante, para obtenção de soro.

4.3. Avaliação dos dados clínicos e hematológicos

As informações referentes ao acompanhamento clínico dos pacientes incluídos neste estudo foram retiradas dos prontuários médicos arquivados no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte e lançadas em planilha Microsoft Excel 2007 que serviu como base de dados para a pesquisa.

4.3.1. Dados hematológicos

As variáveis hematológicas avaliadas foram: concentração total de hemoglobina (Hb, g/dL), concentração de hemoglobina fetal (Hb F, %), leucometria total (LEU, $10^9/L$), plaquetometria (PLAQ, $10^9/L$), contagem de reticulócitos (Retic, %). Os valores de Hb total, LEU e PLAQ foram obtidos utilizando-se contador eletrônico de células (T-890 – Coulter). A quantificação da porcentagem de Hb F foi realizada utilizando-se o método de imunodifusão radial (HbF Quiplate, Helena

Laboratories). A contagem de reticulócitos foi realizada utilizando-se o método de azul de cresil brilhante em microscopia óptica.

A determinação dos valores basais das variáveis hematológicas seguiu o seguinte critério:

1. Para a Hb total basal, foi considerada a média de três valores de hemoglobina dos exames mais próximos à coleta da amostra, desprezando-se aqueles realizados após transfusões sanguíneas ou quando havia ocorrido eventos clínicos significativos, como o sequestro esplênico agudo, síndrome torácica aguda, aplasia transitória de medula ou infecção grave. Para as crianças que estavam em regime de transfusão crônica, foram considerados valores obtidos até o início do regime de hipertransfusão. Nas crianças que estavam em uso de hidroxiureia, o nível da Hb total basal foi determinado com base na média dos três valores anteriores ao início do tratamento.
2. O nível de Hb F foi determinado considerando-se o dado obtido em exame realizado na data mais próxima à da entrada do paciente no estudo.
3. Os níveis basais de plaquetas, leucócitos e reticulócitos foram determinados pelas médias dos valores obtidos em três exames consecutivos mais próximos à data da coleta, desprezando-se os exames realizados logo após a ocorrência de eventos clínicos significativos, como sequestro esplênico agudo, síndrome torácica aguda, aplasia transitória de medula ou infecção grave.

4.3.2. Eventos clínicos da anemia falciforme

Os eventos clínicos avaliados foram crise aplástica transitória (CAT), síndrome torácica aguda (STA), sequestro esplênico agudo (SEA) e acidente vascular cerebral (AVC). Todos eles foram definidos a partir da ocorrência do evento registrado em prontuário médico pelo

hematologista responsável pelo acompanhamento da criança ou por médico que prestou atendimento no serviço de urgência, caso tenha sido necessário.

A associação de eventos clínicos com a infecção pelo B19V foi avaliada em função dos resultados obtidos nos testes diagnósticos. Assim, para os pacientes com resultados positivos para IgM ou DNA, ou com as combinações IgG + IgM ou IgM + IgG + DNA, foram analisados os eventos clínicos que ocorreram até 6 meses antes e 3 meses após a data da coleta da amostra. Esse mesmo período foi avaliado para os que apresentaram resultados negativos em todos os testes. Já para os pacientes com resultado positivo apenas para IgG, os eventos clínicos não foram analisados, pois não há possibilidade de se saber quando a infecção ocorreu.

4.4. História transfusional e exames hematológicos basais

Foram registradas todas as transfusões de sangue recebidas pelos pacientes e documentadas nos respectivos prontuários até a data da coleta da primeira amostra sanguínea do estudo. Testou-se se haveria associação da infecção pelo B19V, definida como positividade para um ou mais testes, inclusive IgG detectado isoladamente (infecção pretérita), com o número de transfusões sanguíneas e com os exames hematológicos basais, como acima definidos.

4.5. Diagnóstico da infecção pelo Eritrovírus B19

Foram realizados testes sorológicos e moleculares para determinação do *status* sorológico e presença de DNA viral, respectivamente, nas amostras testadas. Assim, foi estabelecido um algoritmo (figura 8) para orientação do fluxo de testagem das amostras e interpretação dos resultados encontrados.

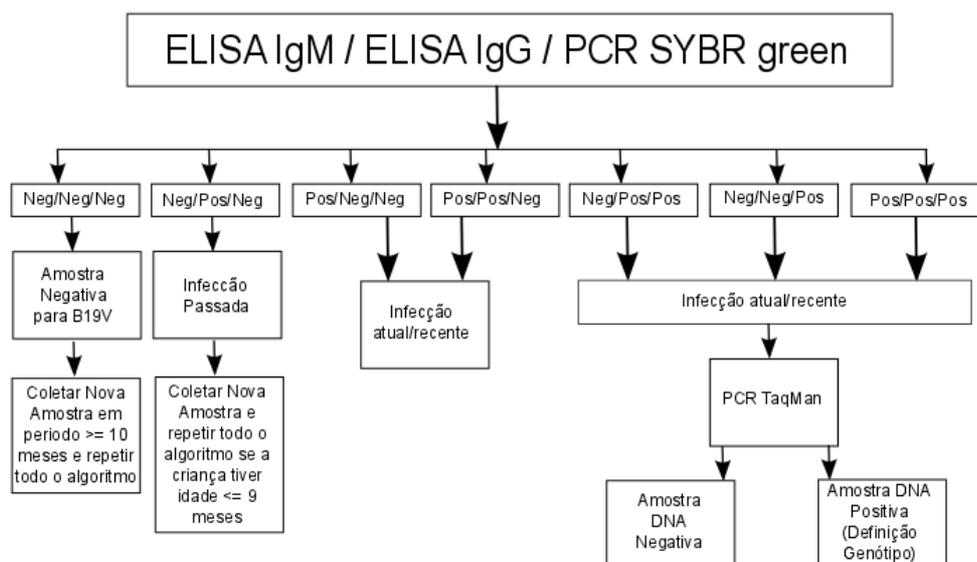


Figura 8: Algoritmo de testagem das amostras por testes sorológicos e moleculares para definição de ausência de infecção pelo eritrovírus B19 ou, alternativamente, histórico de infecção passada ou atual/recente.

4.6. Preparação das amostras

O tubo contendo o sangue coletado foi centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos. Após a separação do soro ou plasma, as amostras foram armazenadas em alíquotas de 200 µL e estocadas à -80°C até o momento da sua utilização para extração do DNA viral ou para os testes sorológicos.

4.7. Teste Imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-B19V

Os testes imunoenzimáticos para detecção de anticorpos IgM ou IgG anti-B19V no plasma ou soro foram realizados de acordo com as especificações indicadas pelo fabricante (Biotrin™ Internacional, Dublin, Irlanda), sendo sua sensibilidade e especificidade de 100% comparado ao radioimunoensaio que é considerado o teste padrão-ouro.

As amostras e reagentes foram deixados à temperatura ambiente (20-25°C). Nos primeiros oito poços foram distribuídos os controles positivo

e negativo, e o calibrador, todos em duplicata. Em seguida foram distribuídas as amostras pré-diluídas em tampão PBS. A placa foi então deixada à temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, cada poço foi lavado quatro vezes com solução de lavagem (300 μ L), a qual foi desprezada por inversão da placa. Foram adicionados 100 μ L de anticorpo de coelho anti-IgG ou IgM humano conjugado com peroxidase e a placa foi incubada à 37°C por 30 minutos. Após essa etapa, a placa foi lavada como antes. Foram distribuídos 100 μ L do substrato por poço, seguindo-se incubação a 37°C durante 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 100 μ L de solução de bloqueio a cada poço. A leitura da densidade óptica (D.O.) foi realizada em leitora de ELISA (Autoreader II, Ortho Diagnostic Systems, Milan, Itália) utilizando duplo comprimento de onda a 450 nm e 630 nm, como referência.

A presença ou ausência de anticorpos IgM ou IgG anti-B19V foi determinada em relação a um valor de referência (COV, *cut off value*) calculado como a média da densidade óptica do calibrador (controle de *Cut off*).

A reação foi interpretada como:

Positiva: se $DO > [COV \times 1,1]$

Negativa: se $DO < [COV \times 0,9]$

Indeterminada $[COV \times 0,9] < DO < [COV \times 1,1]$

As amostras com resultado indeterminado foram retestadas em duplicata, com nova diluição da amostra.

4.8. Extração do DNA viral

A extração do DNA viral das amostras de soro ou plasma foi realizada utilizando dois kits comerciais, Axy PrepTM Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit (Axygen, USA) e Qiamp DSP virus spin kit (Qiagen, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante descritas a seguir.

Kit Axygen

Inicialmente uma alíquota de 200 µL de soro ou plasma em temperatura ambiente foi centrifugada por 5 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 200 µL de tampão V-L. A mistura foi agitada vigorosamente em vórtex e incubada à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 75 µL do tampão V-N e esta mistura foi agitada vigorosamente em vórtex e centrifugada a 12.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 2 mL, sendo adicionados 250 µL da mistura de isopropanol e ácido acético (99 mL de isopropanol 95-100% + 1mL de ácido acético glacial), previamente preparada. A coluna de miniprep foi colocada em novo tubo de 2 mL para onde foi transferida a mistura do passo anterior. A coluna foi centrifugada a 6.000 x g por 1 minuto. A seguir, o filtrado foi descartado e a coluna de miniprep foi colocada de volta ao tubo de 2 mL. Foram adicionados 500 µL de tampão W1A à coluna, que foi deixada à temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida, a coluna foi centrifugada a 12.000 x g por 1 minuto e o filtrado foi descartado, sendo a coluna colocada em novo tubo de 2 mL. Foram adicionados 800 µL do tampão W2 à coluna e seguiu-se centrifugação a 12.000 x g por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna foi colocada de volta ao mesmo tubo de 2 mL, seguindo-se nova centrifugação para remoção do tampão de lavagem residual. A coluna de miniprep foi transferida para um tubo de 1,5 mL limpo, sendo adicionados 50 µL de tampão de eluição (nuclease *free*) no centro da coluna. Após incubação por 1 minuto à temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada a 12.000 x g por 2 minutos. O DNA eluído foi estocado à -80°C até o momento do uso.

Kit QIAGEN

Esse kit foi usado para avaliar se haveria aumento da sensibilidade de detecção do DNA do B19V na PCR em tempo real desenvolvida no presente estudo. Usando-se padrões internacionais do National Institute of Biological Standards and Controls (NIBISC) para

detecção de DNA do B19V, verificou-se que houve melhor recuperação do DNA viral nas amostras, alcançando-se os resultados para validação de acordo com os critérios NIBISC (ver adiante). Desse modo, para toda amostra submetida à extração de DNA com o kit Axygen que apresentou resultado negativo na PCR em tempo real para B19, foi utilizada nova alíquota de soro ou plasma para extração de DNA usando esse kit e novo teste de PCR.

Para realizar a extração de DNA viral, foi utilizado um volume de 200 µL de plasma ou soro do paciente. A este volume foram adicionados 25 µL de protease Qiagen® e 200 µL de tampão AL já previamente preparado com a adição de RNA carreador, conforme instruções do fabricante. Essa mistura foi agitada em vórtex por 15 segundos e em seguida foi brevemente centrifugada para remover resíduos presentes na tampa e na parede do tubo. Após centrifugação, a mistura foi incubada a 56°C em banho seco. Em seguida foram adicionados 250 µL de etanol (90-100%) e, novamente, a mistura foi agitada em vórtex durante 15 segundos e deixada em repouso à temperatura ambiente por 5 minutos, seguindo-se breve centrifugação. Todo o conteúdo foi transferido para uma coluna Qiamp minelute® acondicionada em tubo de 1,5 mL que foi centrifugado à 6.000 x g por 2 minutos. O filtrado obtido foi descartado e a coluna foi inserida em novo tubo de 1,5 mL limpo. Foram adicionados à coluna 500 µL do tampão AW1 e em seguida a mistura foi centrifugada a 6.000 x g por 2 minutos. Após a centrifugação, o filtrado foi novamente descartado e a coluna transferida para novo tubo. Foram adicionados 500 µL do tampão AW2, seguindo-se centrifugação a 6.000 x g por 2 minutos. Foram adicionados 500 µL de etanol e realizada nova centrifugação a 6.000 x g por 2 minutos. A coluna foi então transferida para um tubo de 2 mL que foi centrifugado a 20.000 x g durante 3 minutos, sendo então a coluna transferida para outro tubo. A coluna foi incubada à temperatura de 56°C em banho seco por 3 minutos. Finalizada a incubação, foram adicionados 60 µL de tampão AVE, seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida o tubo contendo a coluna foi centrifugado a 20.000 x

g por 2 minutos. Após a centrifugação, a coluna foi descartada e o DNA eluído foi estocado à -80°C.

4.9. Teste de PCR em tempo real para B19V

Para detectar de forma rápida e específica o B19V nas amostras de soro ou plasma dos pacientes do estudo, foram padronizados dois testes de PCR em tempo real, o primeiro utilizando um par de iniciadores capaz de amplificar os três genótipos virais adicionando-se o fluoróforo *SYBR Green*, e o outro utilizando o mesmo par de iniciadores e três sondas de hidrólise marcadas com fluoróforos diferentes (sistema *TaqMan*), sendo cada uma específica para os genótipos virais 1, 2 ou 3. Todas as amostras foram inicialmente testadas no sistema SYBR Green e apenas aquelas com resultado positivo ou duvidoso nessa PCR foram submetidas à PCR utilizando o sistema *TaqMan* para confirmação da infecção e definição do genótipo viral.

4.9.1. PCR em Tempo Real utilizando *SYBR green*

Inicialmente foi padronizada uma reação de PCR em tempo real, utilizando o sistema *SYBR Green* que permitiu a detecção do DNA viral extraído das amostras de soro ou plasma dos indivíduos testados, utilizando-se os iniciadores PA-1 e PA-2 (Knoll et al, 2002) para amplificação (81 pb) da região NS1 do genoma do eritrovírus B19 (Tabela 1).

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na amplificação da região NS1 do B19V através de PCR em tempo real com *SYBR Green*.

Iniciador	Localização	sequência (5'-3')
PA-1	1892-1913 (genótipo 1)	TCCCTGGAATTAATGCAGATGC
	1833 -1854 (genótipo 2)	
	1784-1805 (genótipo3)	
PA-2	1972-1950 (genótipo 1)	CACTGCTGCTGATACTGGTGTCT
	1913-1891 (genótipo 2)	
	1864-1842 (genótipo 3)	

A reação foi feita usando-se 12,5 µL de *Power SYBR Green® PCR Master Mix* (Applied Biosystems, CA, EUA), 100 nM de cada iniciador e 5 µL de DNA, com volume final de 25 µL. A reação de amplificação foi feita em um instrumento de PCR em Tempo real (modelo 7300, Applied Biosystems, CA, EUA) nos seguintes ciclos de temperatura: 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 90 segundos. Após os ciclos de amplificação, foi feita curva de dissociação (*melting curve*) com aumento de temperatura de 60°C até 95°C.

Como controle positivo dos ensaios de PCR, foi utilizada uma amostra de DNA fornecida pela Fundação Pró-Sangue (São Paulo), confirmada como positiva para B19V por aquela Instituição, ou, então, outra fornecida pelo Hospital Infantil João Paulo II (Belo Horizonte). Esta última era uma amostra de sangue de um paciente com história clínica compatível com a infecção por B19V e que teve a infecção confirmada por testes sorológicos e moleculares realizados no Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas.

As amostras foram consideradas positivas se apresentavam C_T (*threshold cycle*) < 40.

4.9.2. PCR em tempo real pelo sistema *TaqMan*

Uma segunda reação de PCR em tempo real baseada em sondas de hidrólise foi padronizada para confirmar a positividade de DNA viral detectado no sistema SYBR Green e para identificação dos três genótipos virais de B19V.

A reação de PCR foi feita utilizando 12,5 µL de *TaqMan PCR Master Mix* (Applied Biosystems, CA, EUA), 250 nM de cada um dos iniciadores PA-1 e PA-2, 150 nM de cada sonda (Liefeldt et al, 2005) e 5 µL de DNA. As sondas P1, P2 e P3 eram do tipo MGB, marcadas respectivamente com os fluoróforos FAM, VIC e NED, e com sequência específica para diferenciar os genótipos 1, 2 e 3 (Tabela 2).

Tabela 2 - Sondas *TaqMan* utilizadas na reação de PCR em tempo real.

Sonda	Especificidade	Sequência (5'→3')	Fluoróforo
P1	genótipo 1	ACCTCCAAACCACCCCAATTGTCACA	FAM
P2	genótipo 2	ACCTCCAAACC GT CCCC C ATTGT C GCA	VIC
P3	genótipo 3	A TCTCCAAACCACCC C ATTGT C CCA	NED

Os nucleotídeos marcados em negrito e sublinhados indicam as diferenças nas sondas P2 e P3 observadas nos genótipos 2 e 3 do eritrovírus B19, quando comparadas à sonda P1, específica para o genótipo 1.

A reação de amplificação foi feita em um instrumento de PCR em tempo real, modelo 7300 (Applied Biosystems, CA, EUA), nos seguintes ciclos de temperatura: 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 90 segundos. Os controles positivos foram como na PCR SYBR Green. As amostras foram consideradas positivas se apresentavam um C_T (*threshold cycle*) < 40.

4.9.3. Validação dos testes de PCR em tempo real

Para desenvolver um protocolo de diagnóstico molecular da infecção pelo eritrovírus B19, baseado na técnica de PCR em tempo real, foram realizados experimentos de padronização e validação para os sistemas SYBR Green e TaqMan®, utilizados como teste de triagem e de definição da infecção, respectivamente.

Foram utilizados como controles positivos nesta etapa um painel de referência internacional dos genótipos 1, 2 e 3 de eritrovírus B19 para testes de detecção do ácido nucleico, obtidos junto ao NIBSC (*National Institute of Biological Standards and Controls*), que é órgão da Agência de Proteção da Saúde (*HPA*) do Reino Unido.

Segundo Baylis & Buchheit (2009), em estudo realizado pelo NIBSC que avaliou a eficiência na detecção de B19 utilizando técnicas baseadas na amplificação do DNA viral, uma eficiência satisfatória nos ensaios de PCR em tempo real para identificação dos genótipos virais pode ser determinada em função do C_T (*threshold cycle*). Durante a etapa de padronização das PCRs, foi testada uma série de diluições do padrão NIBSC de B19V com o objetivo de estabelecer um limite para detecção do DNA viral e estimar a eficiência dos testes. O critério de aceitabilidade definido para detecção eficiente dos três genótipos virais foi uma variação menor que 3,3 (equivalente a $1 \log_{10}$) entre os C_{Ts} correspondentes à amplificação de cada um dos genótipos.

4.9.3.1 Capacidade de detecção dos genótipos 1, 2 e 3 das PCR em tempo real utilizando SYBR Green e sondas TaqMan

A realização de um teste molecular de triagem para identificação de amostras positivas utilizando PCR em tempo real com uso do fluoróforo *SYBR Green* foi adotada considerando-se menor custo da reação e a sensibilidade do método.

Os iniciadores PA1 e PA2 utilizados, descritos por Liefeldt e colaboradores (2005), foram avaliados quanto à concentração ótima em função da capacidade de amplificação específica do DNA alvo e menor formação de dímeros de iniciadores. Assim, a partir da análise de reações em que a concentração dos iniciadores variou de 50 nM a 300 nM, foi estabelecida a concentração de 100 nM para o protocolo do teste.

Foi verificado que amplificações com $C_t > 40$ apresentavam perfil de amplificação duvidoso e que não tinham a positividade confirmada no teste mais específico, utilizando sondas TaqMan®. Este valor de C_t foi, portanto, definido como ponto de corte para o primeiro teste. Assim, amostras que tiveram $C_t \leq 40$ foram testadas também na PCR em tempo real pelo sistema TaqMan®.

Na PCR usando sondas hidrolíticas (TaqMan), após testes com diferentes concentrações de iniciadores e sondas, definiu-se pela concentração de 250 nM de cada um dos iniciadores e 150 nM de cada uma das sondas.

Foi utilizado na validação dos testes moleculares o primeiro painel de referência para genótipos de B19V da OMS, obtidos junto ao NIBSC, contendo DNA dos genótipos virais.

Na PCR *SYBR Green* houve detecção dos três genótipos virais, com diferença de amplificação menor que um log entre os três tipos (Figura 9A).

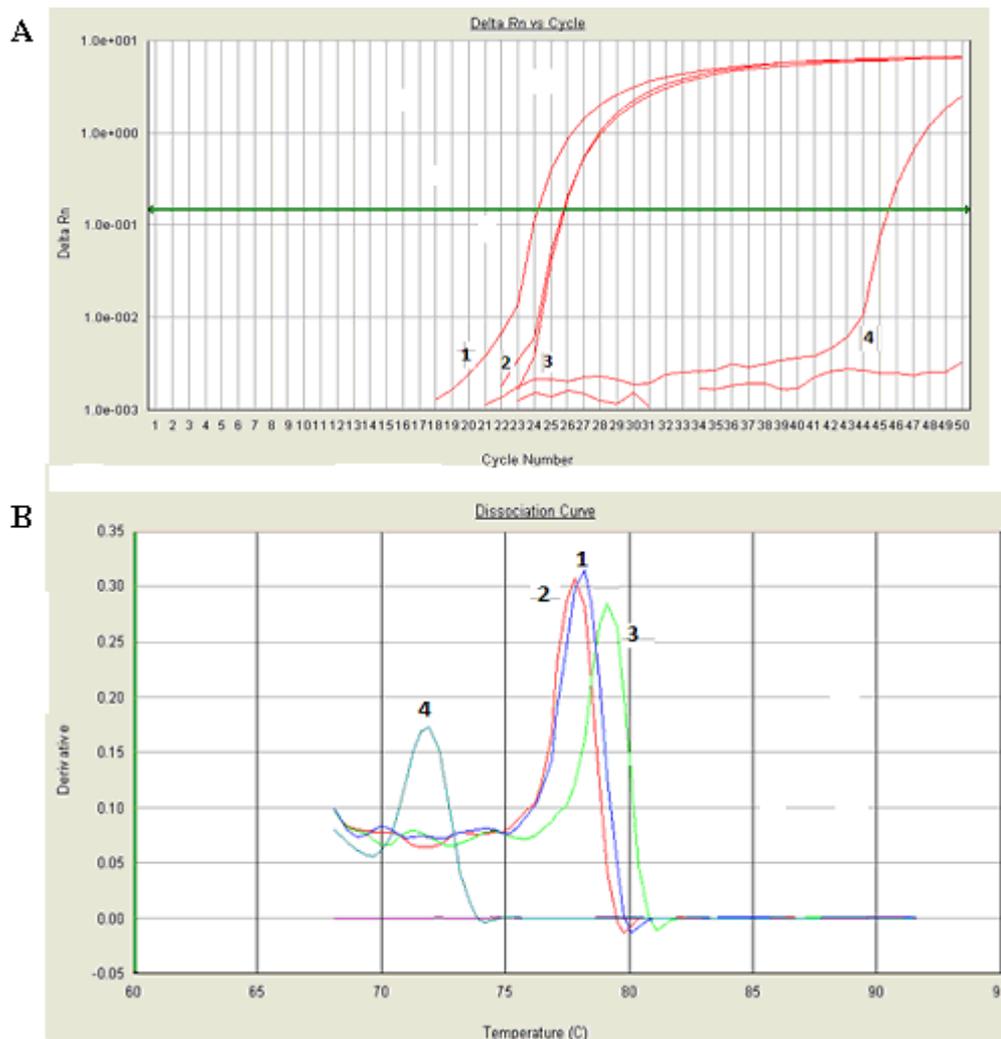


Figura 9 – Amplificação dos genótipos de B19V do painel de referência da OMS por PCR em tempo real usando *SYBR Green*. (A) Os genótipos 1, 2 e 3 foram amplificados, com uma diferença máxima de Ct entre os três membros de 1,56 ciclos. Água (4) foi usada como controle negativo. (B) A curva de dissociação da PCR mostra que o sinal de amplificação do controle negativo (4) foi devido à formação de dímeros de iniciadores.

A especificidade da amplificação foi mostrada pela curva de dissociação, que evidenciou que o sinal de amplificação do controle negativo (4) foi devido à formação de dímeros de iniciadores (Figura 9B). Como os picos de produtos específicos e dímeros de iniciadores foram bem distintos, a formação eventual desses dímeros nos testes das amostras não atrapalhou a interpretação dos resultados.

Na PCR TaqMan houve detecção dos três genótipos virais, com uma diferença de amplificação menor que um log entre os três tipos (Figura 10).

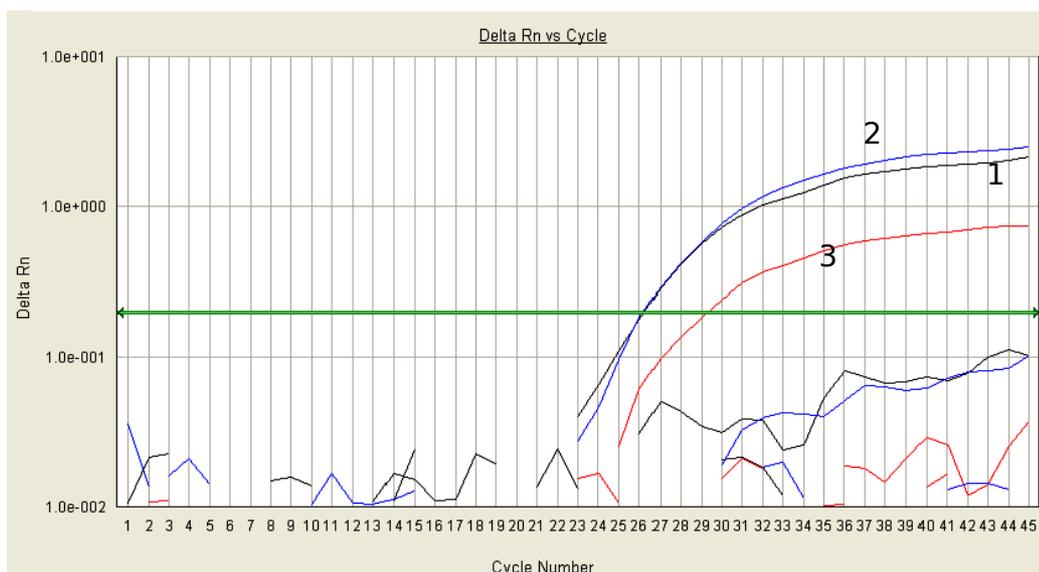


Figura 10 – Amplificação dos genótipos de B19V do painel de referência da OMS por PCR em tempo real usando sondas para detecção dos genótipos 1, 2 e 3. Todos os três genótipos foram amplificados, com uma diferença máxima de Ct entre os três membros de 3,07 ciclos.

4.9.4 Avaliação do limite de detecção mínima da PCR em tempo real para B19V utilizando *SYBR Green*

Para determinar o limite de detecção do DNA de B19V na PCR usando *SYBR Green*, foi testado também o segundo padrão internacional de DNA de B19V da OMS para ensaios baseados na detecção do ácido nucleico (NAT), fornecidos também pelo NIBSC.

Esse padrão é composto por material liofilizado de DNA dos três genótipos de B19V diluído em plasma humano, quantificado em 5×10^5 unidades internacionais (UI) por frasco, podendo haver variação de 0,64%.

O material liofilizado foi dissolvido em 500 µL de água, ficando portanto com concentração de 1×10^3 UI/µL. A partir de uma alíquota de 200 µL, foi realizada a extração do DNA viral utilizando *QIAamp DSP virus spin kit* (Qiagen, Alemanha). Ao final dos procedimentos de extração, o DNA recuperado foi eluído em um volume de 100 µL, ficando em concentração final de 2×10^3 UI/µL. Partindo-se dessa concentração, foram realizadas diluições seriadas (1:10) do DNA viral, correspondendo às concentrações de 1×10^4 UI, 1×10^3 UI, 1×10^2 UI, 10 UI e 1 UI (em triplicata).

A PCR *SYBR Green* (Figura 11) apresentou um único produto de amplificação em todas as diluições utilizadas, sem formação de dímeros de iniciadores, cuja eficiência foi de 103%, como calculada pelo valor do *slope* (-3,26), onde:

$$\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

A PCR com sondas apresentou amplificação do genótipo 1 em todas as diluições usadas, também com uma eficiência de 103% (Figura 12).

Assim, considerando o protocolo experimental utilizado no teste das amostras, o fator de correção para UI/mL será de 60x (5x para a correção do volume de 200 µL de plasma ou soro utilizado para a purificação do DNA e 12x para a correção do volume de 5 µL de DNA utilizado na PCR dos 60 µL de DNA eluído no final da purificação). Portanto, pode-se considerar que o limite de detecção mínima é de 60 UI/mL nos protocolos estabelecidos.

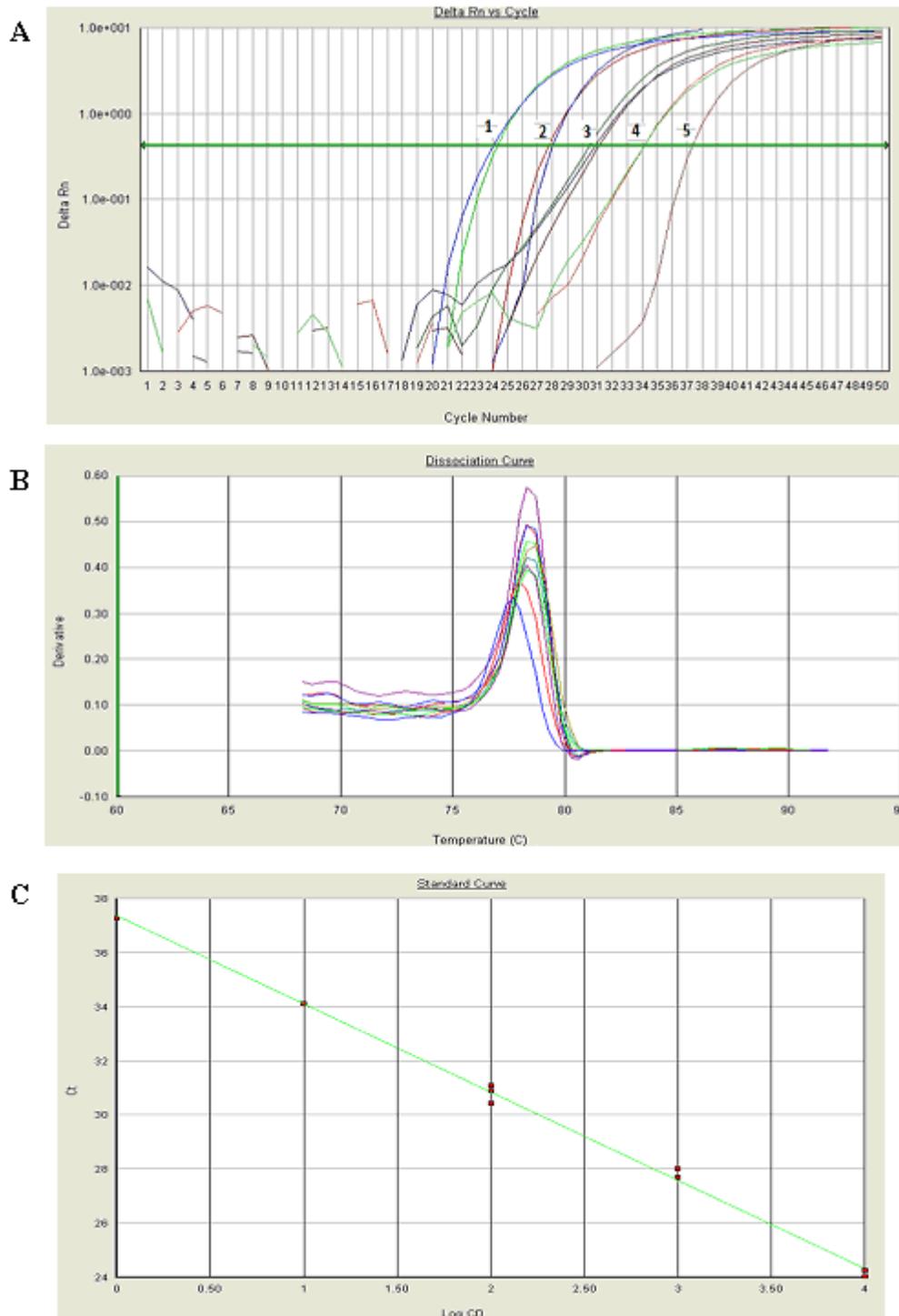


Figura 11 – PCR em tempo real de diluições seriadas de DNA de B19V (padrão NIBSC). (A) Curva de amplificação das diluições nas concentrações de 1×10^4 UI ($C_t=24,26$), 1×10^3 UI ($C_t=26,61$), 1×10^2 UI ($C_t=31,11$), 10 UI ($C_t=34,11$) e 1 UI ($C_t=37,28$), corridas em triplicata. (B) Curva de dissociação, mostrando um único pico. (C) Curva padrão, com

um r^2 de 0,99 e um slope de $-3,26$, e eficiência de amplificação de 103%.

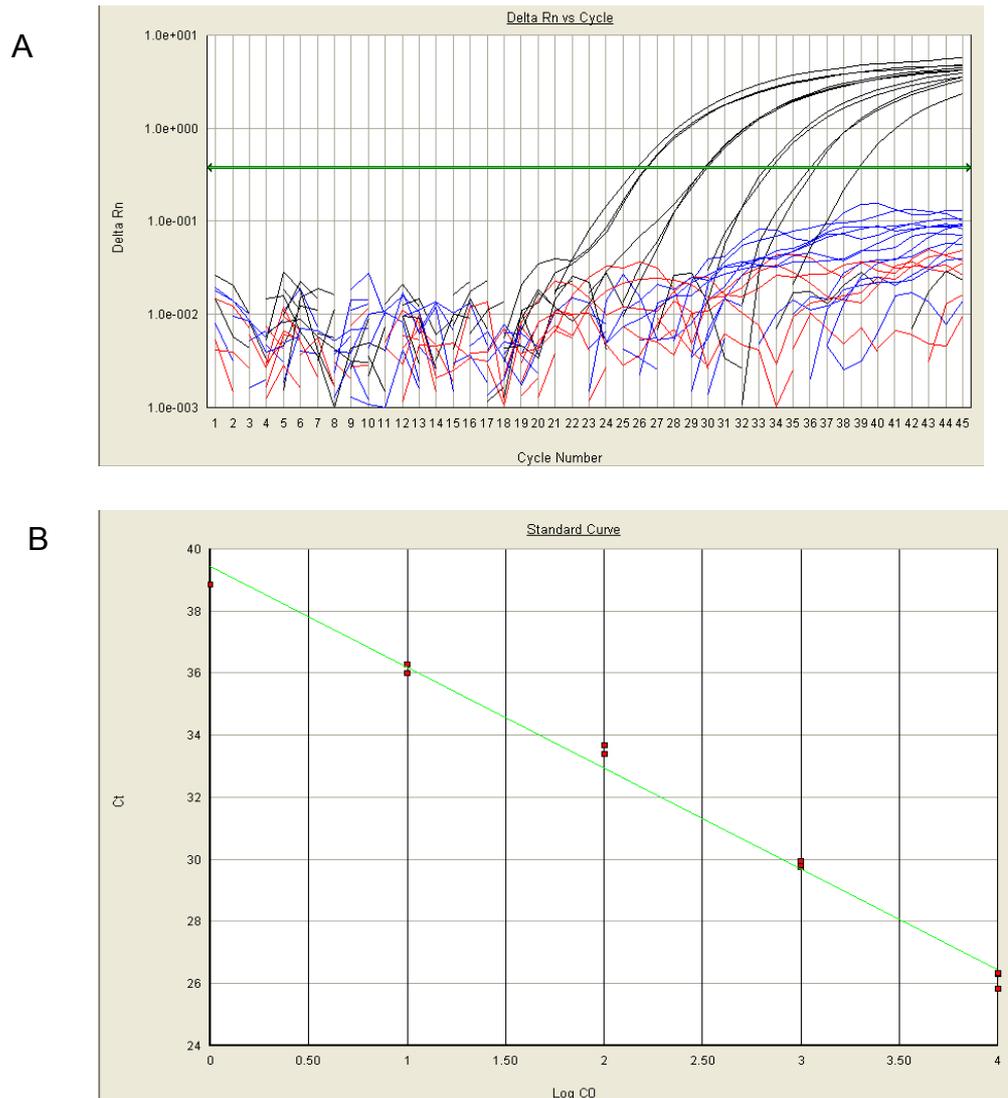


Figura 12 – PCR em tempo real *TaqMan* de diluições seriadas de DNA de B19V (padrão NIBSC). (A) Curva de amplificação das diluições nas concentrações de 1×10^4 UI ($C_t=26,16$), 1×10^3 UI ($C_t=29,83$), 1×10^2 UI ($C_t=33,54$), 10 UI ($C_t=36,13$) e 1 UI ($C_t=38,85$), corridas em triplicata. (B) Curva padrão, com um r^2 de 0,99 e um slope de $-3,25$, e eficiência de amplificação de 103%.

4.10. Aspectos éticos

Em consonância com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, foi apresentado ao responsável legal da criança selecionada para o estudo, e no caso de participantes maiores de sete anos, também para a própria criança, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) conforme consta no anexo 9.1. As informações contidas no TCLE foram explicadas verbalmente pelos pesquisadores aos participantes enquanto aguardavam atendimento médico para as consultas de rotina do acompanhamento clínico. Quando foi autorizada a participação da criança na pesquisa, o responsável legal e, quando necessário, a própria criança, assinaram o TCLE, ficando em seu poder uma cópia e outra cópia com a equipe de pesquisa para arquivamento.

A consulta aos prontuários foi realizada de modo a garantir o sigilo das informações pessoais e clínicas de cada sujeito de pesquisa.

Este estudo foi aprovado pela Câmara do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG) processo número 0287.0.203.000-10, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas (Protocolo 257 - CEP – Hemominas).

4.11. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo *software* SPSS, versão 17.0. Testes de qui-quadrado foram utilizados para testar a associação da positividade ou negatividade de infecção pelo vírus B19 com variáveis categóricas, como genótipo da doença falciforme e gênero.

Valores de variáveis contínuas e não paramétricas, como idade e número de transfusões recebidas, foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. A taxa de incidência da infecção foi calculada pelo número de casos novos detectados nas 51 crianças nas quais houve

coleta de duas amostras sucessivas com intervalo médio de cerca de um ano entre elas, em relação à soma de pacientes-ano sob exposição. A probabilidade acumulada de aquisição da infecção com o passar do tempo foi estimada pelo método de Kaplan-Meier [função (1- sobrevida)]. Foi considerado para essa estimativa que a soroconversão tenha ocorrido na data de realização do teste positivo, mesmo nos casos com IgG positiva, isoladamente. As crianças com testes imunológicos e moleculares negativos na primeira amostra foram “censuradas” na data da primeira coleta.

Para avaliar se eventos clínicos característicos da doença falciforme associaram-se com a infecção pelo B19V e com episódios de internação hospitalar, foram analisados, retrospectiva e prospectivamente, prontuários de 201 pacientes. Foram comparados, nessa análise, os que apresentaram resultados negativos (sem a infecção pelo B19V) com os pacientes com resultados laboratoriais compatíveis com perfil de infecção atual/recente (detecção de anticorpos da classe IgM sem positividade para IgG ou positividade apenas para o DNA viral). Para ambos os grupos o tempo de registro dos eventos foi o mesmo: seis e três meses antes e depois, respectivamente, da data da coleta inicial de sangue para os exames sorológicos e virais de cada criança. A eventual associação foi testada com o teste exato de Fisher.

Os testes foram considerados estatisticamente significativos se a probabilidade de erro alfa foi igual ou inferior a 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Características da população de estudo

A população estudada foi composta por 239 crianças, sendo 122 (51%) do sexo feminino e 117 (49%) do masculino. A maioria (93,7%) apresentava genótipo SS; apenas 15 pacientes (6,3%) tinham genótipo S β^0 -tal. Em relação ao local de residência, 137 (57,3%) residiam na região metropolitana de Belo Horizonte e 102 (42,7%) em outras localidades do Estado de Minas Gerais.

A mediana da idade foi de 5,8 anos, variando de 1 a 12,2 anos. Foram excluídas do estudo quatro crianças com idade inferior a 9 meses no momento da coleta da amostra, evitando-se resultado falso positivo pela detecção de anticorpos maternos. A distribuição etária em quatro quartis é mostrada na Figura 13.

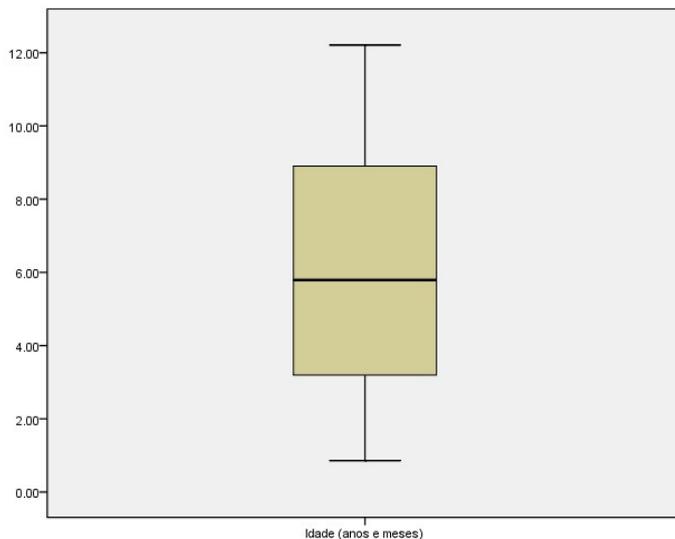


Figura 13 - Distribuição etária das crianças com anemia falciforme, divididas em quatro quartis: 1º, de 1 a 3,3 anos; 2º, de 3,4 a 5,9 anos; 3º, de 6,0 a 8,9 anos; e 4º, de 9,0 a 12,2 anos.

5.2 Análises das amostras clínicas

Um total de 290 amostras de soro ou plasma foram testadas nos ensaios ELISA para detecção de anticorpos das classes IgM e IgG e PCR em tempo real, sendo 239 referentes a coletas realizadas no momento da entrada dos pacientes no estudo (**grupo 1**). Dos 176 indivíduos que apresentaram resultados laboratoriais negativos na entrada do estudo foi possível realizar nova coleta em 51 pacientes (**grupo 2**) para cálculo da incidência da infecção pelo B19V, assim como para avaliar prospectivamente a ocorrência de eventos clínicos associados. O intervalo médio entre a primeira e segunda coleta foi de um ano, variando de cinco meses a 1,7 anos. Os resultados de diagnóstico da infecção pelo B19V para os indivíduos do grupo 1 e 2 são mostrados na Tabela 4. A positividade para o DNA de B19V se refere a sua detecção no ensaio de PCR em tempo real pelo sistema TaqMan. Todas as amostras DNA positivas pertenciam ao genótipo 1, exceto uma, na qual foram identificados os genótipos 1 e 3, concomitantemente.

Tabela 3 - Resultados sorológicos e moleculares para B19V em amostras de crianças com doença falciforme acompanhadas pelo Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação Hemominas

Coletas	Positivos						Negativos	Total
	DNA	IgM	DNA+IgM	DNA+IgG	DNA+IgM+IgG	IgG		
1ª coleta	6	2	1	16	1	37	176	239
2ª coleta	5	1	0	3	1	4	37	51

A reatividade no ELISA para detecção de IgG anti-B19V mostrou grande variação nas amostras que eram positivas apenas para esse anticorpo. As amostras IgG positivas que apresentaram positividade concomitante para IgM e/ou para DNA viral apresentaram alta

5.3 Análise das características clínicas da população

Foram avaliados para todos os pacientes do estudo, independente dos resultados encontrados quanto à parvovirose, dados referentes aos parâmetros hematológicos de Hb basal, Hb fetal basal, número basal de leucócitos, número basal de plaquetas e número basal de reticulócitos, além do número de transfusões recebidas até quando da entrada no estudo, conforme mostrado na Tabela 5.

Tabela 4 – Características hematológicas e número de transfusões recebidas em 239 crianças com doença falciforme acompanhadas pelo Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação Hemominas.

Dados	média	mediana	Desvio Padrão	mín	máx
hematológicos					
Hb basal (g/dL)	8,0	8,0	1,04	5,7	11,8
Hb F basal (g/dL)	19,6	19,0	9,99	1,4	65,0
LEU basal (10⁹/L)	16,2	15,8	4,6	5,3	32,0
PLAQ basal (10⁹/L)	394,1	382,0	120,1	135,3	780,3
RET basal (%)	14,2	14,3	5,1	0,7	25,6
Nº transfusões	5,69	2,0	13,4	0	117

Quando essas variáveis foram analisadas em relação à infecção pelo B19V, não foi verificada associação estatisticamente significativa com nenhum dos parâmetros hematológicos. O contrário, no entanto, ocorreu na análise do número de transfusões recebidas, que mostrou associação estatisticamente significativa entre o número de transfusões e crianças com infecção pelo B19V (Tabela 6).

Para os 34 pacientes com resultado sorológico e/ou molecular compatível com perfil de infecção atual ou recente foi também avaliado o intervalo entre o registro da última transfusão sanguínea e a data em que foi coletada amostra para o estudo. Foi observado que desse total,

sete haviam recebido hemocomponentes entre 1 e 3 meses antes da coleta da amostra. Dos sete pacientes que receberam transfusão, três apresentaram crise aplástica transitória, evento clínico característico dessa infecção viral.

Tabela 5 – Número de transfusões recebidas por crianças com doença falciforme e *status* de infecção pelo B19V.

Nº de transfusões	Infecção pelo B19V		Total (%)	P*
	Sim (%)	Não (%)		
0	10 (15,6)	54 (84,4%)	64	0,0004
1 ou 2	14 (20,3)	55 (79,7%)	69	
3 a 5	13 (29,5)	31 (70,5%)	44	
≥ 6	26 (41,9)	36 (58,1%)	62	
Total	63 (26,4)	176 (73,6%)	239	

- Qui-quadrado de tendência ou de associação linear igual a 12,56 (1 grau de liberdade), corrigido por idade.

Outras características da população de estudo foram analisadas, conforme mostrado na Tabela 6. Diferenças quanto ao genótipo da doença falciforme, gênero, ser portador ou não de alfa talassemia (dado disponível para 191 indivíduos), estar ou não em tratamento com hidroxiureia (dado disponível para os 239 indivíduos) e ser ou não esplenectomizado não foram fatores associados com a infecção pelo B19V. Por outro lado, a idade mais elevada associou-se significativamente com o histórico de infecção pelo B19V (Tabela 7 e Figura 15). A prevalência acumulada da infecção viral aos 5 anos foi de 9,3%, aos 7,5 anos, de 24,8% e aos 10 anos ela foi de 46%.

Tabela 6 - Características das crianças com doença falciforme de acordo com o *status* de infecção pelo eritrovírus B19.

	Infectados	Não infectados	p
Genótipo DF			NS
SS	60 (26,8%)	164 (73,2%)	
Sβ ⁰ -tal	3 (20%)	12 (80%)	
Gênero			NS
Masculino	30 (25,6%)	87 (74,4%)	
Feminino	33 (27%)	89 (73%)	
Idade (anos)			<0,001
1 – 3,3	7 (11,9%)	52 (88,1%)	
3,4 – 5,9	9 (15,3%)	50 (84,7%)	
6,0 – 8,9	23 (39,7%)	35 (60,3%)	
9,0 – 12,2	23 (39%)	36 (61%)	
Alfa talassemia			NS
Sim*	18 (34%)	35 (66%)	
Não	39 (28,3%)	99 (71,7%)	
Tratamento hidroxiureia			NS
Sim	13 (38,2%)	21 (61,8%)	
Não	50 (24,4%)	155 (75,6%)	
Esplenectomizado			NS
Sim	11 (28,2%)	28 (71,8%)	
Não	52 (26%)	148 (74%)	

* Dos portadores de alfa talassemia co-herdada com a mutação β^s, 50 (20,9%) apresentam uma deleção e três (1,3%) apresentam duas deleções do gene alfa globina;

NS: não significativo.

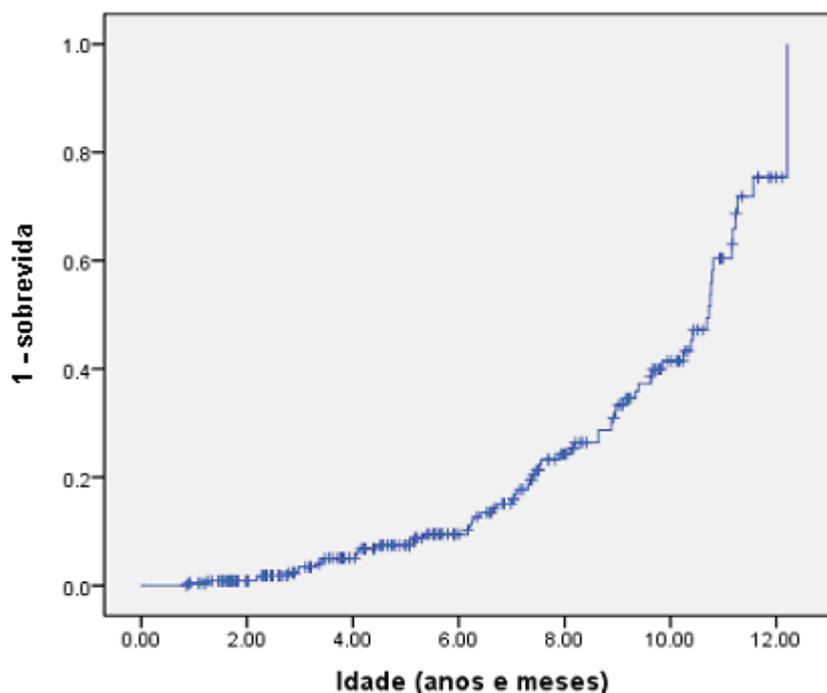


Figura 15 – Curva de sobrevivência estimada pelo método de Kaplan-Meier [função (1-sobrevivida)], demonstrando que quanto mais elevada a idade, mais elevada a probabilidade de infecção passada ou recente pelo B19V.

5.4 Análise dos eventos clínicos

De todos os eventos clínicos pesquisados, o de maior frequência entre os pacientes infectados pelo B19V foi crise aplástica transitória, ocorrendo apenas nesse grupo, com frequência de 32%, seguido por síndrome torácica aguda (24%) e sequestro esplênico agudo (16%). Entre os não infectados, o evento mais frequente foi síndrome torácica aguda (63,8%) (Tabela 8). No presente estudo, nenhuma criança apresentou púrpura trombocitopênica imune ou quadro exantemático característico de eritema infeccioso. Quando comparados os eventos clínicos observados com a ocorrência da infecção pelo B19V, não foi encontrada associação significativa, exceto para crise aplástica transitória ($p < 0.001$). Dados sobre o período de internação por essa

causa estava disponível apenas para seis pacientes, entre os quais a duração da internação foi, em média, de quatro dias.

Tabela 7 – Associação da frequência de eventos clínicos e internação hospitalar e a infecção pelo vírus B19.

Evento clínico	Infectados	Não infectados	P*	OR
CAT			<0,00	
Sim	8 (100%)	0	1	11,35 ^Δ
Não	17 (8,8%)	176 (91,2%)		
SEA			NS	
Sim	4 (28,6%)	10 (71,4%)		3,16
Não	21 (11,2%)	166 (88,8%)		
STA			NS	
Sim	6 (20,7%)	23 (79,3%)		2,10
Não	19 (11%)	153 (89%)		
AVC			NS	
Sim	0	4 (100%)		0,75
Não	25 (12,7%)	172 (87,3%)		
Internação hospitalar			<0,00	
Sim	18 (38,3%)	29 (61,7%)	1	8,42
Não	7 (4,5%)	147 (95,5%)		

* Teste exato de Fisher; NS: não significativo. Δ Risco Relativo

CAT: crise aplástica transitória; STA: síndrome torácica aguda; SEA: sequestro esplênico agudo; AVC: acidente vascular cerebral.

Quando analisada a ocorrência de internação hospitalar em relação ao *status* de infecção pelo eritrovírus B19, foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$) no grupo dos positivos, o que sugere que o vírus pode ter contribuído para o agravamento do estado geral de saúde da criança, levando à hospitalização. Dos 47 pacientes que necessitaram de hospitalização durante o período avaliado no estudo, 18 apresentavam infecção aguda e 29 eram não-infectados. Conforme mostrado na figura 16, a causa mais frequente de internação foi CAT, seguida por STA e SEA, entre os infectados. Foi

ainda registrada nesse grupo internação por infecção não definida. Entre os negativos, foi registrado maior número de internações por STA e SEA. Houve também um caso de internação por motivo de AVC e outro por causa desconhecida. A duração da internação foi semelhante para o grupo de infectados e de não infectados pelo vírus, com média de 10,5 e 10,9 dias, respectivamente.

n

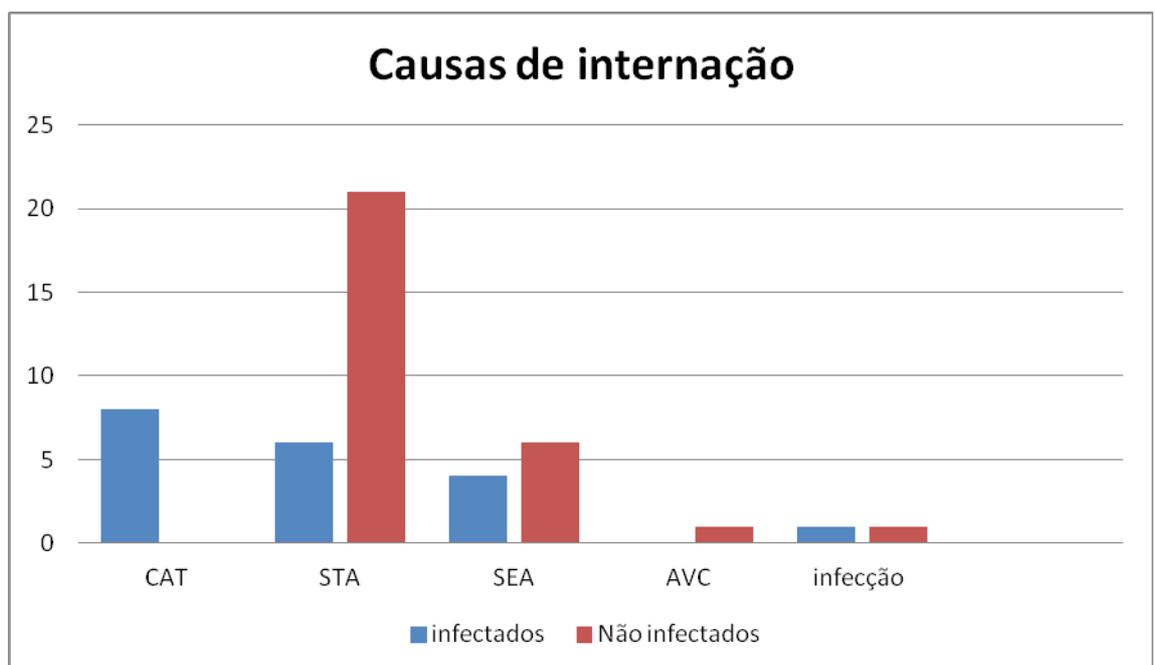


Figura 16 – Frequência de eventos agudos que levaram à hospitalização nos grupos de crianças infectadas e não-infectadas pelo vírus B19.

5.5 Relato de evidência de transmissão intrafamiliar do B19V com agravo clínico

Durante o período desse estudo foi possível acompanhar um caso de transmissão intrafamiliar do eritrovírus B19. O caso índice foi de uma criança que ao entrar para o estudo apresentou resultados laboratoriais negativos para a infecção pelo B19V, mas que quatro meses depois foi internada por cinco dias no Hospital Infantil João Paulo II, em Belo Horizonte, com diagnóstico de CAT. À admissão hospitalar estava anictérico, com queixa de dor lombar há dois dias, cefaleia e febre de até 38,5°C nas últimas 24 horas e vômitos no dia da internação, além de evacuação semi-líquida. Não tinha sintomas respiratórios. A dor lombar cedeu no mesmo dia e a cefaleia tornou-se intermitente, sem novos vômitos ou diarreia. Estava com frequência cardíaca de 90 bpm (batimentos por minuto) e fígado a 3 cm do reborda costal direita. Baço não palpável. Foi iniciada ampicilina, suspensa no dia seguinte, quando a febre já tinha cedido e também pela ausência de sintomas de infecção bacteriana; radiografia de tórax e de seios da face normais. Entre os achados hematológicos foram verificados valores de hemoglobina de 5,8 g/dL e reticulócitos de 0,3%. Foi necessária administração de duas unidades de concentrado de hemácias para reverter o quadro de anemia grave. No momento da internação, não foi possível coletar amostra de sangue desse paciente, e o mesmo só retornou ao Hemocentro de Belo Horizonte para acompanhamento ambulatorial cinco meses após a alta hospitalar. Nessa ocasião, foi possível realizar a coleta de amostra de sangue do paciente para realização de testes laboratoriais para detecção do B19V, que revelou a presença de anticorpos IgG anti-B19V. Em um intervalo de 12 dias da internação do caso índice, foi notificada a hospitalização de seu irmão, também de genótipo SS, porém não participante do estudo. A história clínica era de cefaleia e coriza uma semana antes, sem febre. Melhorou espontaneamente e, três dias depois, a cefaleia voltou, acompanhada de um episódio de vômito e pico febril de 38,7°C. Procurou atendimento médico em uma unidade básica de saúde, onde recebeu anti-inflamatório e apresentou melhora. Na

véspera da internação, estava novamente com cefaleia e vômitos, além de dor na coluna cervical. A mãe notou aumento de sua palidez habitual. Chegou ao hospital levemente desidratado, pálido (+++/4+), icterício (+/4+), com frequência cardíaca de 110 bpm, frequência respiratória de 26, pressão arterial de 110/70 mm/Hg, fígado a 7 cm da reborda costal direita e baço não palpável. Manteve cefaleia e vômitos no primeiro dia de internação e os exames hematológicos mostraram valores de hemoglobina de 3,4 g/dL e reticulócitos de 0,1%. Durante os três dias em que esteve internado, recebeu duas unidades de concentrado de hemácias. Para este paciente foi possível realizar coleta de amostra de sangue para realização de testes laboratoriais para diagnóstico da infecção pelo B19V, enquanto o mesmo ainda estava hospitalizado. A infecção foi confirmada pela detecção de anticorpos IgM anti-B19V e do DNA viral.

6. DISCUSSÃO

O eritrovírus B19 causa significativa morbidade em crianças com anemia falciforme. Apesar dos estudos que vem sendo conduzidos sobre o assunto, ainda há escassez de dados sobre a epidemiologia dessa infecção, assim como das complicações a ela associadas.

No presente estudo foi realizado levantamento de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais em 239 crianças com anemia falciforme com o objetivo principal de estimar a prevalência e a incidência da infecção pelo B19V em pacientes com anemia falciforme atendidos no Hemocentro de Belo Horizonte. Encontrou-se prevalência da infecção pelo eritrovírus B19 de 26,4%, em população com idade média de seis anos. Taxas similares foram relatadas em estudo jamaicano (Serjeant *et al.*, 1993), ao avaliar uma coorte de crianças com anemia falciforme (37%), e em outros dois estudos realizados nos Estados Unidos, também com crianças com doença falciforme. No primeiro (Rao *et al.* 1992), foi acompanhada pequena coorte em Nova Iorque e a prevalência foi de 34,5%. No segundo (Smith-Whitley *et al.*, 2004), foi feito o acompanhamento de 633 pacientes pediátricos do Children's Hospital of Philadelphia, tendo sido encontrada uma prevalência de 29,8% da infecção viral. Outro estudo realizado na Tunísia, em pacientes com doença falciforme e outras hemoglobinopatias, mostrou prevalência mais elevada, de 56,5%. No Brasil, estudo conduzido por Slavov e colaboradores (2012) encontrou soroprevalência de 55,3% entre 47 pacientes com doença falciforme e talassemia beta. As diferenças observadas entre os estudos nas taxas de prevalência podem estar relacionadas principalmente com a idade média dos participantes de cada estudo, que variou de 7,3 a 19,2 anos. Além da idade dos participantes, os métodos de diagnóstico empregados e as diferenças geográficas e sócio-econômicas também podem contribuir para essa variação.

No Brasil, a soroprevalência de B19V em diferentes populações já foi relatada em diversos estudos. Em 1990, estudo realizado por Freitas e colegas mostrou prevalência de 72% no estado do Pará em pacientes com sintomas clínicos sugestivos da infecção pelo B19V, como doenças exantemáticas, desordens hematológicas e artropatias agudas. No mesmo ano, Nascimento e colaboradores encontraram prevalência de 90% em indivíduos acima de 50 anos residentes na cidade do Rio de Janeiro, acompanhados pelo programa de vigilância em influenza, conduzido pela Fiocruz no período de 1985 a 1986. Estudos realizados na cidade de São Paulo em 2008, em população de indivíduos saudáveis, e em 2010, em indivíduos com citopenias desconhecidas e doenças onco-hematológicas, registraram prevalência de 72% e 71%, respectivamente (Huatuco *et al.*, 2008, Garcia *et al.*, 2010). Esses dados demonstram variação na prevalência nas diversas regiões do Brasil e confirmam a importância da realização de estudos regionais para obtenção de dados em populações específicas. No presente trabalho, a taxa de prevalência do B19V acumulada aos cinco, 7,5 e 10 anos de idade foi de 9,3%, 24,8% e 46%, respectivamente. Nota-se que a ocorrência da infecção até os cinco anos de idade é relativamente baixa e aumenta significativamente a partir dessa idade, coincidindo com o ingresso escolar formal, momento em que há favorecimento ao contato entre indivíduos susceptíveis e os infectados.

O acompanhamento de crianças previamente negativas que apresentaram conversão nos testes laboratoriais durante o período do estudo permitiu estimar a incidência da infecção em 29 casos novos por 100 pacientes-ano. Esse achado difere da incidência estimada por Smith-Whitley e colaboradores (2004), que registraram a ocorrência de 11,3 casos novos por 100 pacientes-anos. Essa diferença pode ser explicada pelo número relativamente baixo de pacientes acompanhados prospectivamente em nosso estudo, apenas 51. Por outro lado, por tratar-se de agente viral transmitido por secreções respiratórias ao contato pessoal, é possível que taxas mais elevadas estejam relacionadas ao nível sócio-econômico mais baixo da população

brasileira, quando comparada à população americana. Um fator que seguramente está relacionado à incidência mais elevada no presente estudo, em relação ao americano, foi o método de detecção da infecção viral, apenas por sorologia naquele estudo e, neste, por sorologia e PCR em tempo real.

A utilização de métodos de alta sensibilidade e especificidade para determinar a soroprevalência e a presença de DNA do eritrovírus B19 em plasma permitiu, na maioria das vezes, inferir sobre o estágio da viremia, de acordo com a história natural da infecção, especialmente quando relacionado à ocorrência de eventos clínicos associados a esse agente infeccioso, como a crise aplástica transitória. Dos 11 pacientes em cujas amostras foi detectado apenas o DNA viral, dois tinham história recente de CAT. A detecção do DNA viral isoladamente foi considerada, para fins do estudo, indicativa de período virêmico inicial e, portanto, foi interpretada como quadro de infecção atual ou recente. Apesar de a detecção do DNA viral isoladamente ser controversa para caracterização de infecção aguda, sabe-se que em pessoas saudáveis a persistência viral é mais frequente em tecidos como pele, miocárdio e líquido sinovial, e menos frequente em medula óssea e sangue (Cassinotti *et al.*, 1998; Heegaard *et al.*, 2002, Corcioli *et al.*, 2008). Assim, a detecção de DNA de B19V circulando no sangue periférico seria indicativa de infecção ativa. Vários estudos têm descrito a presença de baixos níveis de DNA viral por mais de seis meses após a infecção aguda. Essa situação, no entanto, é geralmente associada com algum grau de imunodeficiência do paciente infectado (Moudgil *et al.*, 1997; Fattet *et al.*, 2004; Blaeser *et al.*, 2005). Essa situação poderia ser considerada para indivíduos em cujas amostras se detecte apenas o DNA viral e que, apesar de história clínica compatível com a infecção pelo vírus B19, não foram capazes de produzir anticorpos específicos anti-B19V de classe IgM ou IgG, caracterizando resposta imune inadequada. Para esses indivíduos, o diagnóstico molecular se apresenta como importante ferramenta para o esclarecimento da infecção pela detecção do DNA viral.

A análise do grau de reatividade no ELISA para detecção de IgG anti-B19V no presente estudo mostrou que níveis mais altos de IgG foram observados nas amostras também positivas para IgM ou DNA viral, sugerindo tratar-se de infecção recente. Por outro lado, como os níveis de IgG foram variáveis para aquelas amostras em que foi identificada apenas a presença desse anticorpo, não é possível afirmar que naqueles que apresentaram níveis elevados de IgG estava em curso uma infecção primária e recente, pois a possibilidade de re-exposição ao vírus, levando ao aumento dos níveis de IgG já expressos anteriormente, deve ser considerada.

Devido a essas diferenças de respostas e do período de viremia, fica claro que o diagnóstico de infecção pelo eritrovírus B19 deve, portanto, incluir testes sorológicos e moleculares que, combinados, podem melhorar significativamente a sensibilidade na caracterização da infecção, especialmente em indivíduos com atributos clínicos especiais.

Uma vantagem dos testes moleculares sobre os testes sorológicos atualmente disponíveis é que eles podem identificar os genótipos do B19V. Isso seria importante na avaliação epidemiológica e clínica da infecção pelo eritrovírus B19, uma vez que diversos estudos sugerem a associação de diferentes genótipos a quadros clínicos específicos, assim como demonstram a circulação dos tipos virais em diferentes regiões geográficas. Em estudo realizado no estado do Pará, Freitas (2008) verificou maior frequência de eritema infeccioso em crianças infectadas pelo genótipo 3, quando comparadas àquelas infectadas com o genótipo 1. Observou ainda, baixa frequência do genótipo 3 em adultos com doenças hematológicas. Nesse mesmo estudo também foi demonstrado que o genótipo 1 era o mais frequente em mulheres, assim como já descrito por Freitas e colaboradores em 2002, a partir de dados analisados de indivíduos dessa mesma região. Em estudo realizado na cidade de São Paulo, Garcia (2009) observou maior frequência de sintomas gastrointestinais (vômito e diarreia) e gripe em indivíduos infectados pelo genótipo 2, não encontrando no entanto, diferenças entre os genótipos em relação à frequência de artralgia. O

número de casos de eritema infeccioso foi semelhante entre os infectados pelos genótipos 1 e 2, e menos frequente na infecção pelo genótipo 3. Em outro estudo realizado na cidade de São Paulo, Sanabani e colegas (2006) caracterizaram o genótipo 3 como o mais prevalente entre pacientes com endometriose, transplantes hepáticos, leucemia de célula T e diabetes, enquanto os genótipos 1 e 2 foram também encontrados, porém em menor frequência. O fato de não haver consenso na literatura sobre a relação entre os genótipos de B19V e a ocorrência de manifestações clínicas sugere que a relevância clínica dos genótipos ainda está por ser estabelecida. Foi evidenciada no presente estudo a predominância marcante do genótipo 1 (96,9%) e apenas um caso em que foi identificada a infecção concomitante pelos genótipos 1 e 3. O genótipo 1 é o mais comumente descrito, porém amostras do genótipo 2 já foram detectadas na Itália (Nguyen *et al.*, 2002), Finlândia (Hokynar *et al.*, 2002), Alemanha (Schneider *et al.*, 2004), França (Servant *et al.*, 2002) e Brasil (Sanabani *et al.*, 2006, Garcia, 2010). Gana tem sido descrita como região endêmica para o genótipo 3, embora este tipo tenha sido descrito em outras partes do mundo (Candotti *et al.*, 2004, Parsyan *et al.*, 2007). Freitas e colaboradores (2008), em estudo realizado no estado do Pará, encontraram os genótipos 1 e 3, sendo o primeiro o mais predominante (91%). No entanto, estudo realizado por Garcia e colaboradores no período de 2006 a 2009, identificaram a circulação dos genótipos 1 (55%), 2 (12,5%) e 3 (32,5%) na cidade de São Paulo. A alta frequência do genótipo 1 encontrada nesse estudo pode estar relacionada à introdução primária deste tipo viral em relação aos demais no estado de Minas Gerais.

Além da variação quanto à frequência dos genótipos de B19V circulando nas diferentes populações, a ocorrência dos casos de infecção também pode mostrar variação quanto aos períodos de incidência mais elevada. Diversos estudos têm descrito a ocorrência de variação sazonal na incidência do eritema infeccioso pelo B19V em países de clima temperado, com picos de ocorrência nos meses que

coincidem com o final do inverno e início da primavera. Observa-se caráter cíclico da infecção, com períodos de 3-5 anos em que se registra maior atividade viral e conseqüente epidemia de eritema infeccioso e CAT (ANDERSON *et al.*, 1984; CHORBA *et al.*, 1986; PILLAY *et al.*, 1992). No presente estudo, entretanto, não foi possível estabelecer tal padrão de sazonalidade. Apesar de ter sido observado número mais elevado de casos de aplasia transitória no final do inverno e início da primavera no ano de 2011, a irregularidade da coleta das amostras ao longo dos meses, somada às condições climáticas da cidade de Belo Horizonte, onde as estações do ano não são bem definidas pela variação de temperatura, não permitiram estabelecer períodos endêmico e epidêmico para a infecção pelo eritrovírus B19 nessa região. Certamente seria necessário um período prolongado de acompanhamento para que fosse possível avaliar se há um caráter cíclico na ocorrência da infecção.

O vírus B19 tem sido associado a uma variedade de manifestações clínicas desde que foi primeiramente identificado como agente causador do eritema infeccioso. Entre indivíduos com doença falciforme está bem estabelecida a associação do vírus com a ocorrência de crise aplástica transitória (CAT), enquanto outras complicações da doença falciforme ainda necessitam de maiores estudos para o estabelecimento da relação de causalidade com o B19V. O presente estudo investigou a associação da infecção pelo B19V com diferentes manifestações clínicas da doença falciforme, uma vez que uma infecção viral pode gerar um estado inflamatório com liberação de citocinas e quimiocinas que afetam a adesão das células falciformes, favorecendo uma disfunção endotelial e eventos de vaso-oclusão (Mousa *et al.*, 2010).

Ao analisar os dados referentes às manifestações clínicas, ficou clara a associação significativa de CAT com a infecção pelo B19V, em concordância com dados da literatura (Serjeant *et al.*, 1981; Anderson *et al.*, 1984; Rao *et al.*, 1992; Serjeant *et al.*, 2001). Foi possível determinar que dos 60 pacientes dos grupos 1 e 2 que apresentaram

infecção atual ou recente, 16,6% evoluíram com episódios de CAT. Este número foi bastante inferior ao encontrado em estudo de Serjeant e colaboradores (2001) no qual 67% dos indivíduos de genótipo SS, positivos para o vírus B19, desenvolveram episódio de aplasia transitória. O percentual de associação entre a infecção viral e CAT pode estar subestimado no presente estudo, uma vez que informações referentes à internação hospitalar frequentemente não são preenchidas de forma adequada no prontuário de acompanhamento ambulatorial do paciente. O fato de não haver serviço para atendimento de urgências integrado ao ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte para pacientes residentes nesta cidade contribui para a perda de informações sobre intercorrências clínicas. Pacientes residentes em cidades do interior que procuram serviços de urgência locais muitas vezes não encontram profissional de saúde capacitado para prestar atendimento adequado ao paciente com anemia falciforme, contribuindo para diagnósticos equivocados e preenchimento de relatórios de alta com dados inconsistentes.

Nenhuma outra complicação da doença falciforme analisada neste estudo mostrou-se associada à infecção pelo B19V na população estudada. No entanto, estudos que incluam pacientes com outros genótipos da doença falciforme podem ser úteis para melhor avaliar a existência dessa associação. Pacientes com genótipo da doença falciforme associado a manifestações mais brandas da doença, como a hemoglobinopatia SC, podem desenvolver quadros clínicos graves frente à infecção por B19V, favorecendo o surgimento de complicações da doença falciforme. Smith-Whitley e colaboradores (2004) observaram que metade das crianças SC e $S\beta^+$ -talassemia que se infectaram com o vírus B19 desenvolveram CAT. Em indivíduos com genótipo SC tem sido evidenciada associação entre a infecção pelo eritrovírus B19 e a ocorrência de STA (Lowenthal et al., 1996). Nos pacientes SC o valor do hematócrito é mais elevado (30-40%), aumentando a viscosidade sanguínea e, desse modo, haveria maior propensão para a oclusão vascular pulmonar (Bromberg, 1974). Estudos que incluam indivíduos

com outros genótipos da doença falciforme fazem-se necessários para elucidar se há associação da infecção pelo B19V com outras complicações da doença falciforme e se tal associação seria influenciada pelo genótipo da doença.

Embora o eritema infeccioso seja uma manifestação clínica relativamente comum na infância, não foram identificados casos dessa manifestação entre as crianças estudadas. Esse fato pode ser atribuído à dificuldade em se identificar o *rash* cutâneo em crianças de pele negra, situação comum entre pacientes com anemia falciforme, dada à origem do gene S. Por outro lado, é possível que a resposta imune à infecção pelo B19V seja diferenciada nessa população, ocorrendo a produção de subclasses de anticorpos que não contribuem para a formação de imunocomplexos e, conseqüentemente, para o surgimento de fenômenos a eles relacionados, como o *rash* cutâneo.

Embora manifestações clínicas características da doença falciforme não tenham sido associadas com a infecção pelo B19V, foi bastante interessante a observação de um número significativamente mais elevado de internações entre os pacientes infectados pelo B19V, por diversas complicações da anemia falciforme, o que sugere que a infecção pelo B19V pode contribuir para o agravamento do estado geral do paciente, levando à hospitalização. Assim, havendo agravamento do quadro de anemia, ocasionado por essa infecção viral, é esperada maior frequência de complicações da doença falciforme. No entanto, é importante enfatizar que proporção considerável de crianças que apresentaram resultados laboratoriais indicativos de infecção atual ou recente não buscou atendimento médico devido a algum tipo de evento agudo, denotando infecção assintomática. Para essas 13 crianças (32,5%) não havia registro de exacerbação da anemia ou de atendimento em serviço de urgência. A mesma situação foi observada por Smith-Whitley e colegas (2004) que relataram que 34,5% das crianças com infecção aguda não apresentaram evento agudo.

A transmissão intrafamiliar da infecção pelo B19V é considerada evento importante na disseminação viral. O contato muito próximo com um irmão agudamente infectado pelo vírus representa fator de risco para aquisição da infecção em indivíduos ainda susceptíveis, uma vez que a principal via de transmissão do vírus é pelo contato com secreções respiratórias. Embora o modo de seleção dos participantes do estudo não tenha favorecido a identificação de crianças de um mesmo núcleo familiar, foi possível identificar a transmissão do vírus entre dois irmãos de genótipo SS, conforme relatado na seção de Resultados. Esse caso evidencia o impacto que a infecção pelo eritrovírus B19 pode ter na evolução clínica das crianças com anemia falciforme e dada a dificuldade de se estabelecerem medidas para conter a disseminação da infecção entre crianças aparentadas e que residam no mesmo domicílio, torna-se importante realizar o diagnóstico das crianças com suspeita dessa infecção, visando alertar familiares e profissionais de saúde para o risco elevado de contaminação de outros membros da família, principalmente crianças, de modo que se possa tomar os devidos cuidados. Dessa forma, prevê-se, antecipadamente, a necessidade do suporte clínico adequado frente aos principais sintomas da infecção e suas complicações eventuais.

Embora a transmissão do vírus B19 se dê principalmente pelo contato com secreções respiratórias de indivíduo infectado, outras formas de contaminação vêm sendo investigadas, como transplante de órgãos e transfusão sanguínea. Considerando-se o impacto que a contaminação por via transfusional poderia ter em pacientes com anemia falciforme, foi avaliado o número de transfusões em relação à infecção pelo B19V. Verificou-se que o grupo de crianças com sorologia ou DNA viral positivos recebeu número significativamente mais elevado de transfusões em relação ao grupo negativo ($p = 0,0004$) durante período equivalente de registro de transfusões. Mas o que se constatou no presente estudo foi uma associação e não uma relação de causa-efeito. É possível que tal associação tenha ocorrido porque pacientes com dado laboratorial positivo para B19V receberam número mais elevado de

transfusões em consequência dos efeitos clínicos da infecção e não o contrário.

Embora o risco de transmissão do vírus B19 através de produtos do plasma, obtidos em *pool*, esteja bem documentado na literatura, pouco é conhecido sobre a transmissão do vírus por transfusão de hemocomponentes específicos, como hemácias, plaquetas e o próprio plasma. Existem apenas quatro casos na literatura que documentam a transmissão por componentes do sangue, sendo três por hemácias e um por plaquetas (Yoto *et al.*, 1995; Zanella *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1997; Jordan *et al.*, 1998). Kleinmann e colaboradores (2009) avaliaram o risco de transmissão do vírus B19 pela transfusão de componentes do sangue com níveis baixos ou muito baixos de DNA viral ($<10^6$ UI/mL) e não observaram transmissão do vírus B19, uma vez que não foram detectados anticorpos IgM ou IgG anti-B19V ou DNA viral nas amostras de receptores susceptíveis. Foi verificado, no entanto, que em todos os hemocomponentes nos quais foi detectado DNA viral foram também detectados anticorpos IgG anti-B19V, fato que pode ter contribuído para a neutralização do vírus. Esses dados demonstram que o risco de infecção pelo vírus B19 a partir de transfusão de hemocomponentes com baixa carga viral deve ser extremamente baixo, senão nulo. No entanto, para unidades de hemocomponentes com carga viral superior a 10^6 UI/mL, o risco seria de 1:6000 (Kleinmann *et al.*, 2009). O risco de transmissão do B19V pela via transfusional dependeria, portanto, da carga viral presente no hemocomponente. É claro que esse risco também tem relação com a frequência de doadores de sangue que apresentem viremia durante a doação. Foi demonstrada positividade para DNA de B19V próxima de 1% em doadores de sangue (Yoto *et al.*, 1995, Candotti *et al.*, 2004, Parsyan *et al.*, 2007), indicando a probabilidade de contaminação por essa via. Considerando o tropismo do vírus e seus possíveis efeitos patofisiológicos, justifica-se a preocupação sobre essa possível via de transmissão, especialmente para pacientes hematológicos que necessitam de transfusão com frequência, como indivíduos com doença falciforme. Assim, dada a alta

prevalência dessa infecção viral na população adulta, o desenvolvimento de métodos sensíveis para quantificação da carga viral, como a PCR em tempo real, constitui importante ferramenta para o rastreamento do eritrovírus B19 em hemocomponentes, a fim de garantir que o sangue utilizado, especialmente por pacientes considerados vulneráveis a esta infecção, não exceda 10^4 UI/mL, conforme já está estabelecido para *pools* de plasma utilizados na indústria de hemoderivados. A exposição a múltiplas transfusões como fonte de contaminação pelo vírus deve ser melhor investigada em estudos subsequentes que tenham desenho de pesquisa adequado para tal.

Este é o primeiro estudo sobre a infecção pelo eritrovírus B19 em crianças com doença falciforme realizado no Brasil, uma vez que estudos anteriores abordaram, de forma majoritária, adolescentes ou adultos. A determinação da prevalência e a estimativa da incidência dessa infecção em crianças com doença falciforme em Minas Gerais, antes desconhecidas, fornecem dados que permitem avaliar o impacto dessa infecção viral nessa população e apontam para a necessidade do desenvolvimento de medidas de prevenção e/ou monitorização do diagnóstico viral, visando proteger essas crianças dos riscos associados à infecção pelo eritrovírus B19.

7. CONCLUSÕES

Este estudo estabeleceu prevalência da infecção pelo eritrovírus B19 de 26,4% e incidência de 29,1 casos por 100 pacientes/ano na população de crianças com doença falciforme acompanhadas no Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação Hemominas. Foi verificado o impacto da morbidade associada a esta infecção viral na população estudada. A associação da infecção com CAT enfatiza a necessidade do desenvolvimento e disponibilização de métodos diagnósticos sensíveis que permitam o correto diagnóstico e acompanhamento dessa infecção viral em pacientes com doença falciforme, assim como medidas de prevenção de novos casos. A associação de elevado número de internações e transfusões com a infecção por B19V também indica que a infecção viral pode levar ao agravamento da doença falciforme.

O uso de testes de PCR em tempo real que permitam a detecção dos três genótipos virais com alta sensibilidade como os desenvolvidos neste estudo, mostrou-se técnica e economicamente viáveis e poderiam ser utilizados, em larga escala, para pacientes, doadores de sangue e teste de hemocomponentes e hemoderivados utilizados em hemoterapia. No entanto, deve ser ressaltada a importância da realização de testes sorológicos e moleculares em conjunto, para melhor eficácia do diagnóstico da infecção.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aberham C, Pendl C, Gross P, Zerlauth G, Gessner M. A quantitative, internally controlled real-time PCR assay for the detection of parvovirus B19 DNA. *J. Virol. Methods.* 200;1 92: 183-191.

Adorno EV (2005) Anemia falciforme em Salvador – BA: Caracterização fenotípica, molecular e de sequências gênicas potencialmente importantes na expressão de genes gama da hemoglobina fetal., Universidade Federal da Bahia. Tese (Doutorado em Patologia):142

Amaku M, Azevedo R S, Castro R M, Massad E, Coutinho F A. Relationship among epidemiological parameters of six childhood infections in a non-immunized Brazilian community. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2009;104(6):897-900.

Anderson L J. Human parvovirus B19. *Pediatr. Ann.* 1990. 19 (9) p. 509-510.

Anderson L J. Role of parvovirus B19 in human disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1987; 6 (8):711-718.

Anderson L J, Tso C, Parker R A, Chorba T L, Wulff H, Tattersall P, Mortimer P P. Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24 (4): 522-526.

Anderson M J. Human parvovirus infection. *J. Virol. Methods.* 1987; 17, (1/2):175-181.

Anderson, M. J.; Lewis, E.; Kidd, I. M.; Hall, S. M.; Cohen, B. J. An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. *J. Hyg.,* 1984 v. 93, n.1, p. 85-93, 1984.

Anderson MJ, Davis LR, Jones SE, Pattison JR, Serjeant GR. The development and use of an antibody capture radioimmunoassay for specific IgM to a human parvovirus-like agent. **J Hyg.** 1982;88(2):309-24.

Ashley-Koch A, Yang Q, Olney RS. Sickle Hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: A HuGE Review. *American Journal epidemiol.* 2000; 151(9):839-845

Barah F, Vallery P J, Chiswick M L, Cleator G M Kerr, J R. Association of human parvovirus B19 infection with acute meningoencephalitis. *Lancet*. 2001; 358 (9283): 727-730.

Baylis AS, Buchheit KH. A proficiency testing study to evaluate laboratory performance for the detection of different genotypes of parvovirus B19. *Vox Sang*. 2009; 97:13-20.

Berns, K.L. Parvoviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology* 3ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1995, p. 2199–2220, vol 2.

Blaeser F, Kelly M, Siegrist K, Storch GA, Buller RS, Whitlock J, Truong N, Chatila TA. Critical function of the CD40 pathway in **parvovirus** B19 infection revealed by a hypomorphic CD40 ligand mutation. **Clin Immunol**. 2005;117(3):231-7.

Blumel J, Schmidt I, Willkommen H & Lower J. Inactivation of Parvovirus B19 during pasteurization of human serum albumin. *Transfusion*. 2002; 42: 1011–1018.

Borsato ML, Bruniera P, Cusato MP, Spewien KE, Durigon EL, Toporovski J. Crise aplástica da anemia falciforme condicionada pelo parvovirus B19. *J. Pediatr*. 2000; 76: 458-460.

Bousquet F, Segondy M, Faure J-M, Deschamps F, Boulot P. B19 parvovirus-induced fetal hydrops: good outcome after intrauterine blood transfusion at 18 weeks of gestation. *Fetal Diagn. Ther*. 2000;15: 132-133.

Brandalise S, Pinheiro V, Gabetta CS, Hambleton I, Serjeant B, Serjeant G. Newborn screening for sickle cell disease in Brazil: the Campinas experience. *Clin. Lab. Haematol*. 2004; 26:15-19.

Bromberg P A. Pulmonary Aspects of Sickle Cell Disease. *Arch Intern Med*. 1974;133(4):652-657.

Brown KE. Parvovirus B19. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. New York, NY:Churchill Livingstone Inc; 2004:1891–1898.

Brown KE, Young NS. Human parvovirus_B19_infections in infants and children. *Adv Pediatr Infect Dis.* 1997;13:101-26

Brown, T.; Anand, A.; Ritchie, L. D.; Clewley, J. P.; Reid, T. M. Intrauterine parvovirus infection associate with hydropes fetalis. *Lancet* 1984 v. 2, n. 8410, p. 1033-1034.

Bunn H F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* 1997;.337 (11): 762-769.

Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2007;.29: 204-206.

Candotti D, Etiz N, Parsyan A, Allain J P. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donors samples. *J Virol.* 2004; 78:12169-78.

Cartter M L, Farley T A, Rosengren S, Quinn D L, Gillipsie S M, Gary G W, Hadler J L. Occupational risk factors for infection with parvovirus B19 among pregnant women. *J. Infect. Dis.* 1991; 163(2): 282-285.

Cassinotti P & Siegl G. Quantitative evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in an immunocompetent individual. *Eur J Clin Microbiol.* 2000; 19:886–887.

Cassinotti P, Burtonboy G, Fopp M, Siegl G Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. *J Med Virol.* 1997;53(3):229-32.

Cassinotti P, Siegl G, Michel BA, Brühlmann P. Presence and significance of human parvovirus B19 DNA in synovial membranes and bone marrow from patients with arthritis of unknown origin. *J Med Virol.* 1998;56(3):199-204.

Castro O, D J Brambilla. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. *The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Blood.* 1994; 84(2): 643-9.

Caul E O, Usher M J, Burton P A. Intrauterine infection with human parvovirus B19: a light and electron microscopy study. *J. Med. Virol.* 1988; 24 (1): 55-66.

Chang FY, Singh N, Gayowski T, Marino IR. Parvovirus B19 infection in a liver transplant recipient: case report and review. *Clin Transplant.* 1996; 10(3): 243-7.

Chorba T, Coccia P, Holman RC, Tattersall P, Anderson LJ, Sudman J, Young NS, Kurczynski E, Saarinen UM, Moir R, et al. The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease). *J Infect Dis.* 1986;154(3):383-93

Chrystie IL, Almeida JD, Welch J. Electron microscopic detection of human parvovirus (B19) in a patient with HIV infection. *J med virol.* 1990; 30 (4):249-52.

Clewley J P. Polymerase chain reaction assay of parvovirus B19 in clinical species. *J.Clin. Microbiol.* 1989 ;27(12): 2647-2651.

Cohen B J, Beard S, Knowles W A, Ellis J S, Joske D, Goldman J.M, Hewitt T, Ward K.N. Chronic anemia due to parvovirus B19 infection in a bone marrow transplant patient after platelet transfusion. *Transfusion.* 1997; 37(9): 947-952.

Cohen B J, Brown K E. Laboratory infection with human parvovirus B19. *J. Infect.* 1992;24(1): 113-114.

Cohen B J, Buckley M M. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. *J. Med. Microbiol.* 1988;25(2): 151-153.

Cohen B J, Gandhi J, Clewley J P. Genetic variants of parvovirus B19 identified in the United Kingdom: implications for diagnostic testing. *J. Clin. Virol.* 2006; 36 (2):152-155.

Corcioli F, Zakrzewska K, Rinieri A, Fanci R, Innocenti M, Civinini R, De Giorgi V, Di Lollo S, Azzi A. Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. *J Med Virol.* 2008;80(11):2005-11.

Corcoran A, Mahon BP & Doyle S. B cell memory is directed toward conformational epitopes of parvovirus B19 capsid proteins and unique region of VP1. *J Infect Dis.* 2004; 189:1873–1880.

Corcoran A, Doyle S. Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions do parvovirus B19. *J. Med. Microbiol.* 2004; 53: 459-475.

Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D. Parvovirus Like particle in human sera. *Lancet.* 1975; 1: 72-73.

Costa F F. Anemia falciforme In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia, fundamentos e práticas.* São Paulo:Atheneu, 2001. Cap7. P.289-308.

Cotmore SF, Tattersall P. Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome. *Science* 1984 226: 1161-1151.

Cubel R C, Garcia A G, Pegado C S, Ramos H I, Fonseca M E, Clewley J P, Cohen B J, Nascimento J P. Human parvovirus B19 infection and hydrops fetalis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1996; 91(2): 147-151.

Cubel RC, Valadão MC, Pereira WV, Magalhães MC, Nascimento JP. Aplastic crisis due to human parvovirus B19 infection in hereditary hemolytic anaemia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1992;34(5):479-82.

Daudt L E, Zechmaister D, Portal L L, Neto E C, Rocha S L M, Giugliani R. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad. Saúde Pub.* 2002; 18(3): 833-841.

De Araujo M C P E, Serafim E S S, Junior W A P C, De Medeiros T M D. Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. *Cad. Saúde Pub.* 2004; 20(1): 123-128.

Di Nuzzio D V P, Fonseca S F. Anemia falciforme e infecções. *Jornal de Pediatria.* 2004;80(5):347-54.

Diaz F, Collazos J. Glomerulonephritis and Henoch-Schoenlein purpura associated with acute parvovirusB19 infection. *Clin. Nephrol.* 2000;53(3): 237-238.

Diaz F, Collazos J, Mendonza F, De La Viuda J M, Cazallas J, Urkijo J C, Flores M. Systemic lupus erythematosus associated with acute parvovirus B19 infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 2002; 8(2): 115-117.

Diniz D C, Guedes *et al.* Prevalência do traço e da anemia falciforme em recém nascidos do Distrito Federal, Brasil, 2004 a 2006. *Cad. Saude Publica.* 2009 25(1): 188-194.

Durigon E L, Erdman D D, Gary G W, Pallansch M A, Torok T J, Anderson L. J. Multiple primer pairs for polymerase chain reaction (PCR) amplification of human parvovirus B19 DNA. *J. Virol. Methods.* 1993 44(2/3):155-165.

Embury SH. Advances in the prenatal and molecular diagnosis of the hemoglobinopathies and thalassemias. *Hemoglobin.* 1995 ;19(5):237-61

Enders G, Biber M. Parvovirus B19 infections in pregnancy. *Behring inst. Mitt.* 1990; 85:74-8.

Erdman D D, Usher M J, Tsou C, Caul E O, Gary G W, Kajigaya S, Young N S, Anderson L J. Human parvovirus B19 specific IgG, IgA, and IgM antibodies and DNA in serum specimens from persons with erythema infectiosum. *J. Med. Virol.* 1991;35(2): 110-115.

European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia monographs of human anti-D immunoglobulin [557], human anti-D immunoglobulin for intravenous administration [1527], and human plasma (pooled and treated for virus inactivation) [1646]. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 2009; pp 2059, 3757, and 4168. <http://online.edqm.eu/entry.htm>

Evans J P, Rossiter M A, Kumaran T O, Marsh G W, Mortimer P P. Human parvovirus aplasia: case due to cross infection in a ward. *Br. Med. J.* 1984 288(6418): 681.

Fabron JR., A. Clínica e tratamento das doenças falciformes. In: NAOUM, P. C. Hemoglobinopatias e talassemias. São Paulo: Sarvier, 1997. p.48-60.

Fartoukh M, Prigent H, Thioliere B, Enache-Angoulvant A, Garbarg-Chenon A & Girot R. Fatal fungal superinfection complicating B19-virus

induced massive bonemarrow necrosis in sickle-cell disease. *Haematologica*. 2006; 91:ECR18.

Fattet S, Cassinotti P, Popovic MB. Persistent human parvovirus B19 infection in children under maintenance chemotherapy for acute lymphocytic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004;26(8):497-503.

Fauquet C M, Mayi M A, Maniloff J, Desselberger U, Ball L. 2005 Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV, Elsevier/Academic Press, London.

Figueiredo RM, Lima ML, Almeida TM, Bastos S. Ocurrence of Parvovirus B19 in Manaus, AM. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop* 2005 38(5):396-8.

Figueiredo M. S. Situações de emergência. In: ANVISA. Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Brasília: ANVISA, 2001. p.71-77.

Freitas R B, Monteiro T A F, Silva Filho M G, Linhares A C. Association between human parvovirus B19 and arthropathy in Belém, Pará, North Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop*. 2002;44(1)17-22.

Freitas R B, Wong D, Boswel F, Miranda M F R, Linhares A C, Shirley J, Desselberger U. Prevalence of Human Parvovirus (B19) and rubella virus infections in urban and remote rural areas in Northern Brazil. *J. Med. Virol*. 1990;32(4)203-208.

Freitas RB, Melo FL, Oliveira DS, Romano CM, Freitas MR, Macêdo O, Linhares AC, de A Zanotto PM, Durigon EL. Molecular characterization of human erythrovirus **B19** strains obtained from patients with several clinical presentations in the Amazon region of Brazil. **J Clin Virol**. 2008;43(1):60-5.

Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts and future promise. *J clin invest*. 2007;117 (4):850-8.

Gallinella G, Venturoli S, Manareze E, Musiani M., Zerbini N. B19 virus genome diversity: epidemiological and clinical correlations. *J. Clin. Virol.* 2003; 28(1): 1- 13.

Garcia SO, Sabino EC, Martinez GM. Células infectadas pelo eritrovírus B19. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2009 31 (1): 54.

Garcia SO. O significado das variantes do eritrovírus em pacientes com citopenias de origem desconhecida. Faculdade de medicina. Universidade de São Paulo. 2010. Dissertação de mestrado: 169.

Gillespie S M, Cartter M L, Asch S, Rokos J B, Gary G W, Tsou C, Hall D B, Anderson L J, Hurwitz E. S. Occupational risk of human parvovirus B19 infection for school and day care personnel during an outbreak of erythema infectiosum. *JAMA.* 1990; 263(15): 2061-2065.

Godeau B, Galacteros F, Schaeffer A, Morinet F, Bachir D, Rosa J & Portos JL. Aplastic crisis due to extensive bonemarrow necrosis and human parvovirus infection in sickle cell disease. *Am J Med.* 1991; 91: 557–558.

Goldstein AR, Anderson MJ, Serjeant GR. Parvovirus associated aplastic crisis in homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child.* 1987; 62:585-588.

Gualandro S F M. Lesões osteoarticulares na doença falciforme. In: ANVISA. Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Brasília: ANVISA, 2001. p.92-97.

Harger JH, Adler W, Koch WC, Harger GF. Prospective evaluation of 618 pregnant women exposed to parvovirus B19: risks and symptoms. *Obstet, Gynecol.* 1998; 91: 413-420.

Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clin. Microbiol. Rev* 2002 15: 485-505.

Heegaard, E. D.; Hornsleth, A. Parvovirus: the expanding spectrum of disease. *Acta Paediatr* 1995 v. 84, n. 2, p. 109-117.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1999;6: 986-94.

Hillery CA, Panepinto JA. Pathophysiology of stroke in sickle cell disease. *Microcirculation.* 2004. 11 (2): 195-208.

Hoebe C J, Claas E S, Van Steenberghe J. E, Kroes A C M. Confirmation of an outbreak of parvovirus B19 in a primary school using IgM ELISA and PCR on thumb prick blood samples. *J. Clin. Virol.* 2002; 25(3) 303-307.

Hokynar K, Söderlund-Venermo M, Pesonen M, Ranki A, Kiviluoto O, Partio EK, Hedman K. 1. A new parvovirus genotype persistent in human skin. *Virology.* 2002. 25;302(2):224-8.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7276-7280.

Hsu T C, Tsay G J. Human parvovirus B19 infection in patients with systems lupus erythematosus. *Rheumatology.* 2001; 40(2): 152-157.

Huatuco EM, Durigon EL, Lebrun FL, Passos SD, Gazeta RE, Azevedo Neto RS, Massad E. Seroprevalence of human parvovirus B19 in a suburban population in São Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica.* 2008;42(3):443-9.

Hubschen J M Z, Mihneva A F, Mentis F, Schneider Y, Aboudy Z, Grossman H, Rudich K, Kasymbekova I, Sarv J, Nedeljkovic M C, Tahita Z, Tarnagda J B, Ouedraogo A G, Gerasimova T N, Moskaleva N T, Tikhonova N, Chitadze J C, Forbi A O, Faneye J A, Otegbayo E, Charpentier C P, Mülle P. Phylogenetic analysis of human parvovirus B19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47:3735–3738.

Januario, J. N. (2002). Incidência da doença falciforme em um milhão de nascidos vivos em Minas Gerais (1998-2001). Faculdade de Medicina. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado: 124.

Jordan J A. Comparison of a baculovirus-based VP2 enzyme immunoassay (EIA) to an *Escherichia coli*-based VP1 EIA for detection of human parvovirus B19 immunoglobulin M and immunoglobulin G in sera of pregnant women. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 1472–1475.

Kasamatsu H, Nakanishi A. How do animal DNA viruses get to the nucleus? Annu. Rev. Microbiol. 1998; 52: 627-686.

Kelleher J F Jr, Luban N L C, Cohen B J & Mortimer P P. Human serum parvovirus as the cause of aplastic crisis in sickle cell disease. Am J Dis Child. 1984; 138, 401–403.

Kelly H A, Siebert D, Hammond R, Leydon J, Kiely P, Maskill W. The age-specific prevalence of human parvovirus immunity in Victoria, Australia compared with other parts of the world. Epidemiol infect. 2000; 124:449-457.

Kerr J R, Curran M D, Moore J E, Murphy P G. Parvovirus B19 infection persistence and genetic variation. Scand. J. Infect. Dis 1995; 27(6): 551-557.

Kleinman SH, Glynn SA, Lee TH, et al. Prevalence and quantitation of Parvovirus B19 DNA levels in blood donors with a sensitive polymerase chain reaction screening assay. Transfusion. 2007; 47(10):1756-1764.

Kleinman S, Glynn A S, Lee T, Tobler L H, Schulumpf K S, Todd D S, Qiao H, Yu M Y, Busch M P. A linked donor-recipient study to evaluate parvovirus B19 transmission by blood component transfusion. Blood. 2009; 114(17): 3677-83.

Knoll A, Lowen F, Kochanowski B, Plentz A, Stussel J, Beckenlehner K, Jilg W, Modrow S. Parvovirus B19 infection in pregnancy: quantitative

viral DNA analysis using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). *J Med Virol.* 2002;67(2):259-66.

Knott P D, Welply G A C, Anderson M J. Serologically proved intrauterine infection with parvovirus. *Br. Med. J.* 1984;289(6459): 1660.

Koch WC & Adler SP. Detection of Human Parvovirus B19 DNA by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:65-9.

Koduri P R. Novel cytomorphology of the giant proerythroblasts of parvovirus B19 infection. *Am. J. Hematol.* 1998; 58 (2):95-99.

Kooistra K, Mesman H, de Waal M, Koppelman M & Zaaijer H . Epidemiology of high-level parvovirus B19 viraemia among Dutch blood donors, 2003–2009. *Vox Sang.* 2011; 100: 261–266.

Koppelman MH, Rood IG, Fryer JF, Baylis SA, Cuyper HT. Parvovirus B19 genotypes 1 and 2 detection with real-time polymerase chain reaction assays. *Vox Sang.* 2007; 93: 208-215.

Kurtzman G J, Cohen B, Ozawa K, Hanson G, Oseas R, Young N S: Chronic bone marrow failure due to persistent parvovirus B19 infection. *N. Engl. J. Med.* 1987; 317: 287-294.

Lefrère J J, Servant-Delmas A, Candotti D, Mariotti M, Thomas I, Brossard Y. Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety. *Blood.* 2005;106(8): 2890-5.

Liefeldt L, Plentz A, Klempa B, Kershaw O, Endres A-S, Raab U, Neumayer H-H, Meisel H, Modrow S. Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by Real-Time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. *J. Med. Virol.* 2005; 75: 161-169.

Lowenthal EA, Wells A, Emanuel PD, Player R, Prchal JT. Sickle cell acute chest syndrome associated with parvovirus B19 infection: case series and review. *Am. J. Hematol.* 1996; 51: 207-213.

Mackay I M, Arden K E, Nitsche A. A real time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002;15;30(6):1292-305.

Manaresi E, Zuffi E, Gallinella G, Gentilomi G, Zebrini M & Musiani M . Differential IgM response to conformational and linear epitopes of parvovirus B19 VP1 and VP2 structural proteins. *J Med Virol.* 2001; 64: 67–73.

Martinez-Martinez P, Maranon A. Infection by human parvovirus B19: “Gloves and socks” popular purpuric syndrome. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2000; 36(3):209-310.

Moffatt S, Yaegashi N, Tada K, Tanaka N, Sugamura K. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cell. *J. Virol.* 1998;72(4):3018-3028.

Morey A L, Nicolini U, Welch C R, Economides D, CHAMBERLAIN P F, Cohen B J. Parvovirus B19 infection and transient fetal hydrops. *Lancet.* 1991; 337(. 8739):496.

Mortimer P P, Humphries R K, Moore J G, Purcell R H, Young NS. A human parvovirus-like virus inhibits haematopoietic colony formations in vitro. *Nature.* 1983; 302: 426-429.

Moudgil A, Shidban H, Nast CC, Bagga A, Aswad S, Graham SL, Mendez R, Jordan SC Parvovirus B19 infection-related complications in renal transplant recipients: treatment with intravenous immunoglobulin. *Transplantation.* 1997; 27;64(12):1847-50.

Mousa S A A I, Momen A A I, Sayegh F A I, Jaouni S, Nasrullah Z, Al Saeed H. Management of painful vaso-occlusive crisis of sickle-cell anemia. Consensus opinion. *Clinical and Applied Thrombosis Hemostasis.* 2010; 16 (4), 365-376.

Munro K., Croxson M C, Thomas S, Wilson N J. Three cases of myocarditis in childhood associated with human parvovirus (B19 virus). *Pediatr. Cardiol.* 2003;24(5):473-475.

Naoum PC, Domingos CRB. Hemoglobina S (Hb S) e as síndromes falcêmicas. In: Naoum, PC. Hemoglobinopatias e talassemias. São Paulo: Sarvier,1997. p.36-47.

Naoum PC. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2000; 22: 5-22.

Nascimento JP, Buckley MM, Brown KE, Cohen BJ. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in Rio de Janeiro, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. 1990;32: 41-45.

[Nguyen QT](#), Wong S, Heegaard ED, Brown KE. Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. **Virology. 2002; 30;301(2):374-80**

Niesters H G. Standardization and quality control in molecular diagnostics. Expert Rev Mol Diagn. 2001; 1(2): 129-31.

Nocton J J, Miller L C, Tucker L B, Schaller J G. Human parvovirus B19-associated arthritis in children. J. Pediatr. 1993;122(2)186-190.

Novais, C M, Pires-alves, M. PCR em Tempo Real. Biotecnologia, Ciências & Desenvolvimento;2004 (33): 10-13.

Nyman M, Tolfvenstam T, Petersson K, Krassny C, Skjöldebrandsparré L, Broliden K. Detection of human parvovirus B19 infection in first-trimester fetal loss. Obstet. Gynecol. 2002;99(5): 795-798.

Ohene-Frempong K, Steinberg M H: Clinical aspects of sickle cell anemia in adults and children. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel R. Disorders of hemoglobin - genetics, pathophysiology and clinical management. Cambridge: Cambridge University Press, 2001, p.642-4.

Okumura A, Ichikawa T. Aseptic meningitis caused by human parvovirus B19. Arch. Dis. Child .1993;68(6):784-785.

Ozawa K, Ayub J, Hao Y S, Kurtzman G, Shimada T, Young N. Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. J. Virol. 1987;61(8):2395-2406.

Ozawa K., Ayub J, Kajigaya S, Shimada T, Young N. The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells. *J.Virol.* 1988;62, (8):2884-2889.

Parsyan A, Szmaragd C, Allain J P, Candotti D. Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. *J. Gen. Virol.* 2007; 88:428-431.

Pattison JR, Jones SE, Hodgson J, Davis LR, White JM, Stroud CE, Murtaza L. Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle cell anaemia. *Lancet.* 1981; 1: 664-665.

Pereira A C, Barros R A, Nascimento J P, Oliveira S A. Two family members with a syndrome of headache and rash caused by human parvovirus b19. *Braz. J.Infect. Dis.* 2001; 5(1): 37-39.

Pilavdzic D, Lines L D, Petric M, Silver M M. Immunoelectron microscope identification of human parvovirus B19. *Ultrastruct. Pathol.* 1994; 18(4): 417-422.

Pillay D, Patou G, Hurt S, Kibbler C C, Griffiths P D. Parvovirus **B19** outbreak in a children's ward. 2001; 10;322(7286):566-7.

Platt O S, D J Brambilla et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med.* 1994; 330(23): 1639-44.

Raab U, *et al* Recurrent high level parvovirus B19 and hematological symptoms. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 44(2): 604–606.

Rao SP, Miller ST, Cohen BJ. Transient aplastic crisis in patients with sickle cell disease. **B19** parvovirus studies during a 7-year period. **Am J Dis Child.** 1992; 146(11):1328-30.

Reed W, Vichinsky E. P. New considerations in the treatment of sickle cell disease. *Annu. Rev. Medicine.* 1998;49:461-474.

Regaya F, Oussaief L, Bejaoui M, Karoui M, Zili M, Khelifa R. Parvovirus B19 infection in Tunisian patients with sickle-cell anemia and acute erythroblastopenia. *BMC Infect Dis.* 2007; 25;7:123.

Reid D M, Reid T M, Brown T Rennie J A, Eastmond C J. Human parvovirus associated arthritis: a clinical and laboratory description. *Lancet.* 1985; 1(8426):422-425.

Resende PV, Viana MB, Murao M, Chaves AC, Ribeiro AC. Acute splenic sequestration in a cohort of children with sickle cell anemia. *J Pediatr.* 2009; 85:163-9.

Rosenfeld S J, Young N S, Alling D, Ayub J, Saxinger C. Subunit interaction in B19 parvovirus empty capsids. *Arch. Virol.* 1994;136,(1/2): 9-18.

Saarinen U M, Chorba T L, Tattersall P, Young N S, Anderson L J, Palmer E, Coccia P F. Human parvovirus B19-induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood.* 1986; 67: 1411-1417.

Saldanha J, Lelie N, Yu MW & Heath A . Collaborative study group. Establishment of the first World Health Organization International Standard for human Parvovirus B19 nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* 2002 82: 24–31.

Salimans M M M, Van de Rijke F M, Raap A K, Van Elsacker-Niele A M W. Detection of parvovirus B19 DNA in fetal tissues by *in situ* hybridisation and polymerase chain reaction. *J Clin Pathol.* 1989; 42: 525-530.

Sanabani S, Neto WK, Pereira J, Sabino EC. Sequence variability of human erythroviruses present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus **B19**-related hematological symptom. **J Clin Microbiol.** 2006;44(2):604-6.

Santagostino E, Mannucci PM, Gringeri A, Azzi A, Morfini M, Musso R, Santoro R & Schiavoni M. Transmission of parvovirus B19 by coagulation

factor concentrates exposed to 100°C heat after lyophilization. *Transfusion*. 1997; 37: 517–522.

Schneider B, Becker M, Brackmann H H, Eis-Hübinger A M. Contamination of coagulation factor concentrates with human parvovirus B19 genotype 1 and 2. *Thromb Haemost*. 2004;92(4):838-45.

Schwarz T F, Jäger G, Gilch S. Comparison of seven commercial tests for the detection of parvovirus B19-specific IgM. **Zentralbl Bakteri**. 1997;285(4):525-30.

Serjeant G R, A M Sommereux, et al. Comparison of sickle cell-beta0 thalassaemia with homozygous sickle cell disease. *Br J Haematol*. 1979; 41(1): 83-93.

Serjeant G R A, Singhal et al. Sickle cell disease and age at menarche in Jamaican girls: observations from a cohort study. *Arch Dis Child*. 85 2001; (5): 375-8.

Serjeant G R, B E Serjeant, et al. Human parvovirus infection in homozygous sickle cell disease. *Lancet*. 1993; 341(8855): 1237-40.

Serjeant G R, Mason K., Topley J M, Serjeant B E, Pattison J L, Jones S E, Mohamed R. Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with parvovirus-like agent. *Lancet*. 1981; 2(8247): 595-597.

Servant A, Laperche S, Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Meritet JF, Garbarg-Chenon A. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J. Virol*. 2002; 76: 9124-9134.

Servant-Delmas A, Léfrère JJ, Morinet F, Pillet S. Advances in Human B19 Erythrovirus biology. *Journal of virology*. 2010; 84 (19): 9658-9665.

Shapiro M P, Hayes: Fat embolism in sickle cell disease. *Arch Intern Med*. 1984; 144:181-182.

Shimizu Y, Ueno T, Komatsu H, Takada H, Nunoue T. Acute cerebellar ataxia with human parvovirus B19 infection. *Arch Dis Child*. 1999; 80(1):72-3.

Silva A R A, Nogueira AS, Alzeguir J C L, Costa M C F L, Nascimento J P. Prevalencia de anticorpos IgG anti parvovirus B19 em gestantes durante o atendimento pré-natale casos de hidropisia fetal não imune atribuídos ao parvovirus, na cidade do Rio de Janeiro. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop*. 2006; 39 (5): 467-72.

Silva C M, Giovani P, Viana M B. High reticulocyte count is an independent risk factor for cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Ped Blood Can*. 2011; 56 (1): 116-121.

Silva, M. C. and E. L. T. Shimauti. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2006; 28(2): 144-148.

Skjoldebrand-Sparre L, Tolfvenstam T, Papadogiannakis N, Wahren B, Broliden K, Nyman, M. Parvovirus B19 infection: association with third-trimester intrauterine fetal death. *Br Obstet Gynaecol*. 2000; 107: 476-480.

Slavov S N, Kashima S, Silva-Pinto A C, Covas D T. Genotyping of human parvovirus B19 among Brazilian patients with hemoglobinopathies. *Can. J. Microbiol*. 2012; 58:1-6.

Slavov S N, Kashima S, Pinto A C and Covas, D T. Human parvovirus B19: general considerations and impact on patients with sickle-cell disease and thalassemia and on blood transfusions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 2011; 62(3): 247–262.

Smith II, Kuettner J F, Turrey D P, Burris S M, White J G. Variable deformability of irreversibly sickled erythrocytes. *Blood*. 1981; 58: 71-77.

Smith-Whitley K, Zhao H, Hodinka R L, Kwiatkowski J, Cecil R, Cecil T, Cnaan A, Ohene-Frempong K. Epidemiology of human parvovirus B19 in children with sickle cell disease. *Blood*. 2004; 103: 422-427.

Sommer C K, Goldbeck A S, Wagner S C, Castro S M. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul, Brasil. Cad. Saúde Pública. 2006;22(8): 1709-1714.

Steinberg MH, Mitchell TE. Novel approaches to treatment of sickle cell anaemia. Expert Opin Investig Drugs. 1999;8 (11):1823-1836.

Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. Scientific World Journal. 2008 25;8:1295-324.

Steinberg MHH, Hsu *et al.* Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. Am J Hematol. 1995; 48(3): 175-81.

Stuart M J and R L Nagel. Sickle-cell disease. Lancet. 2004; 364(9442): 1343-60.

Thompson J, Thompson M. Genética médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 387p.

Toan NL, Duechting A, Kremsner PG, Song le H, Ebinger M, Aberle S, Binh VQ, Duy DN, Torresi J, Kandolf R, Bock CT. Phylogenetic analysis of human parvovirus B19, indicating two subgroups of genotype 1 in Vietnamese patients. J Gen Virol. 2006;87(Pt 10):2941-9.

US Food and Drug Administration (2008) Nucleic Acid Testing (NAT) to reduce the possible risk of parvovirus b19 transmission by plasma-derived products. FDA Center for Biologics Evaluation and Research, FDA Draft Guidance for Industry Rockville, MD.

Vallada MG, Vallada PR. Parvoviroses humanas (eritema infeccioso). In: Foccaccia, R.; Veronesi, R. Tratado de infectologia. 3ed. São Paulo: Atheneu; 2007; p.629 – 634; Vol.1.

Veríssimo MPA. Aplasia transitória da série vermelha na anemia falciforme. Rev. Bras. Hematol. e hemot. 2007; 29(3): 268 – 270.

Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, Nickerson B, Orringer E, McKie V, Bellevue R, Daeschner C, Mancini EA. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. N Engl J Med. 2000;22;342(25):1855-65

Vuorinen T, Lammintausta K, Kotinainen P, Nikkari S. Presence of parvovirus B19 DNA in chronic urticarial and healthy human skin. J. Clin. Virol. 2002; 25 (2):217-21.

Vyse AJ, Andrews NJ, Hesketh LM et al. The burden of parvovirus B19 infection in women of childbearing age in England and Wales. Epidemiol infect. 2007; 135:1354-1362.

Wang WC, Lukens JN. Sickle cell anemia and other sickling syndromes. In: Lee CR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM editors. Wintrobe's clinical hematology. Baltimore(MD): Williams & Wilkins. 1999 p.1346-1397.

Watanabe T, Satoh M, Oda Y. Human parvovirus B19 encephalopathy. Arch. Dis. Child. 1994; 70(1):71.

Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited hemoglobin disorders: an increasing global health organ. 2001; 79 (8): 704-712.

Weatherall DJ, Provan AB. Red cells in inherited anaemias. Lancet. 2000; 355: 1169-1175.

Weatherall D J and J. B. Clegg. Genetic disorders of hemoglobin. Semin Hematol. 1999; (4 Suppl 7): 24-37.

Weatherall D J. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. Curr Mol Med. 2008; 8(7): 592-9.

Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not

sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. *J Virol.* 2001; 75: 4110-4116.

White D, Woolf A, Mortimer P, Cohen B, Blake D & Bacon P. Human parvovirus arthropathy. *Lancet.* 1985; i: 419–421.

Wierenga KJ, Serjeant BE, Serjeant GR. Cerebrovascular complications and parvovirus infection in homozygous sickle cell disease. *J. Pediatr.* 2001; 139: 438-442.

Wong S F, Chan F Y, Cincotta R B, Tilse M. Human parvovirus B19 infection in pregnancy: should screening be offered to low-risk population? *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 2002; 42(4):347-351.

Woolf A D, Champion G V, Chishick A, Wise S, Cohen B J, Klouda PT, Caul O, Dieppe P A. Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Arch. Intern. Med.* 1989;149 (5):1153-1156.

Wu CG, Mason B, Jong J, et al. Parvovirus B19 transmission by a high purity factor VIII concentrate. *Transfusion.* 2005; 45: 1003-10.

Xu J, Raff TC, Muallem N S, Neubert A G. Hidrops fetalis secondary to parvovirus B19 infections. *J. Am. Board Fam. Pract.* 2003;16(1): 63-68.

Yaegashi N, Niinuma T, Chisaka H et al. Serologic study of human parvovirus B19 infection in pregnancy in Japan. *J infect.* 1999; 38: 30-35.

Yoto Y, Kudoh T, Haseyama K, Suzuki N, OdaT, Katoh T, Takahashi T, Sekiguchi S, Chiba S. Incidence of human parvovirus B19 DNA detection in blood donors. *Br. J. Haematol.* 1995; 91(4):1017-1018.

Young NS. Parvovirus infection and its treatment. *Clin Exp Immunol.* 1996; 104 (Supl1): 1:26-30.

Yu MW, Virata-Theimer ML, Geng Y, *et al.* Transmission of parvovirus B19 by blood transfusion confirmed by DNA sequencing. *Transfusion.* 2007;47suppl 3s:16a.

Zanella A, Rossi F, Cesana C, Foresti A, Nador F, Binda A, Lunghi G, Cappellini M, Furione M & Sirchia G Transfusion transmitted human parvovirus B19 infection in a thalassemic patient. *Transfusion*. 1995; 35: 769–772.

9. ANEXOS

9.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96

Pesquisa: Estudo da prevalência e incidência da infecção pelo parvovírus B19 em crianças e adolescentes com doença falciforme: manifestações clínicas e análise dos genótipos virais.

O parvovírus B19 é responsável por uma infecção comum na infância, geralmente sem gravidade e de rápida cura, mas pode causar problemas mais sérios em pacientes com doença falciforme. Nesses pacientes, a infecção por B19 pode levar à crise aplástica transitória, com queda temporária na produção das hemácias e agravamento da anemia. Este quadro geralmente requer transfusões sanguíneas. Em pacientes com doença falciforme, o grau de gravidade da infecção pelo B19 pode ser variável, podendo estar associado com o desenvolvimento de complicações como febre, dor e sequestro esplênico agudo (aumento do baço).

A doença falciforme é uma doença do sangue causada pela alteração na forma das hemácias, as células vermelhas do sangue, que ficam parecidas com foice, ao invés de ter a forma normal arredondada. Ela é uma doença genética, ou seja, o pai e a mãe podem transmitir para os filhos o gene alterado (hemoglobina S) que leva à doença. A doença falciforme causa diferentes sintomas nos pacientes, com casos mais leves e outros mais graves.

Nosso objetivo nesta pesquisa é estudar a infecção pelo parvovírus B19 em crianças com doença falciforme atendidas no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte, para determinar as taxas de prevalência (quantas crianças já tiveram a infecção viral) e de incidência (detectar os casos novos de infecção viral), e verificar se a infecção viral piora alguns sintomas clínicos da doença falciforme.

É por isso que nós pedimos sua autorização para incluir seu(sua) filho(a) nestes estudos. Caso você autorize, você não terá nenhum custo.

Iremos colher um pouco de sangue da veia (10 mL) da criança para realizar os testes para diagnóstico de infecção passada ou atual pelo parvovírus B19.

A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas, em alguns casos pode acontecer um hematoma (cor roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clínico, esta mesma amostra poderá ser usada para nossa pesquisa, sem necessidade de nova coleta. O material coletado ficará guardado no Laboratório de Pesquisa da Fundação Hemominas e será usado apenas para os fins propostos nesta pesquisa. Será necessário coletar dados no prontuário do seu (sua) filho(a). Os resultados dos testes laboratoriais serão anexados ao prontuário do participante. Na divulgação dos resultados, o nome do participante não será mostrado, garantindo sigilo e privacidade. Também é importante esclarecer que você tem toda a liberdade para decidir se quer ou não autorizar a participação do seu (sua) filho(a) nesta pesquisa. Se você não autorizar, ele não será prejudicado no atendimento, e se desistir durante a pesquisa não sofrerá nenhum prejuízo.

Qualquer dúvida que você tiver, entre em contato através do telefone 3248-4535, nos horários de 9:00 às 16:00h, ou com os médicos do ambulatório participantes dessa pesquisa, para esclarecimentos.

Eu, _____, responsável pelo menor _____, após esclarecimentos, autorizo o pesquisador a incluí-lo(a) nestes estudos.

Assinatura do responsável: _____

Assinatura da criança (8 a 12 anos): _____

Endereço Residencial

Rua:

Bairro:

Cidade:

CEP:

Telefone:

Assinatura do pesquisador: _____

Belo Horizonte, ____/____/____

Serviço de Pesquisa – Fundação HEMOMINAS: 3248-4535/4328-4569

Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas: 3248-458

9.2 Parecer do Departamento de Pediatria da UFMG

PROCOLO DE PESQUISA

PROT002.000.00/ETIC/PROT.001/03

I.1. TÍTULO DO PROJETO:

ESTUDO DA PREVALÊNCIA E INCIDÊNCIA DA INFECÇÃO PELO PARVOVIRUS B19 EM CRIANÇAS COM ANEMIA FALCIFORME: MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E ANÁLISES DOS GENÓTIPOS VIRAIS

I.2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL*

Nome: Marcos Borato Viana Identidade: M-1.251.851 SSPMG Endereço: Al. Guilherme Henriques Daniel, 94/206 - Serra - BH - CEP 30220-200 Correspondência: o mesmo Telefone: (31) 3409-9772	CPF: 141.454.136-87 Fax: 3409-9770 Correio eletrônico: v.anamb@gmail.com
Nome: Marina dos Santos Brito Silva Furtado Identidade: MG14257194 - SSP MG Endereço: Rua Cura D'Al's, 1298/201 - Barroca - Belo Horizonte - MG CEP. 30431-083 Correspondência: o mesmo Telefone: (31) 3332-3537/(31) 3248-4569	CPF: 088854117-11 Fax: ----- Correio eletrônico: marina.brito@hemominas.mg.gov.br

* Orientador(a) e Aluno(a) em caso de programas de mestrado ou doutorado. O princípio da co-responsabilidade é válido. Para alunos(as) de graduação, somente o(a) orientador(a).

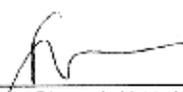
I.3. INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL:

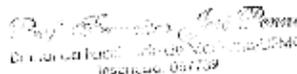
FUNDAÇÃO CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE MINAS GERAIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

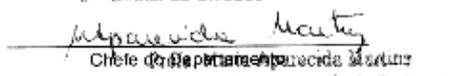
I.4. PROJETO APROVADO EM

"Ad Referendum"

Congregação da Faculdade de Medicina


Diretor da Unidade


Chefe do Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG
Inscrição: 097739


Chefe do Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG
Recebido na Comissão de Ética da UFMG
em

Para o relator em

Parecer avaliado em reunião de

Aprovado: _____ Diligência/pendências:
Não aprovado: _____

O presente projeto já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOMINAS, sob registro 257.



9.3 Parecer do COEP – UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Processo No 0287.0.203.000-10

Projeto: "Estudo da prevalência e incidência da infecção pelo parvovirus B19 em crianças com anemia falciforme: manifestações clínicas e análise dos genótipos virais"

Data de recebimento no COEP: 12/07/2010

Data de recebimento pelo parecerista: 04/08/2010

Área do conhecimento: Ciências da Saúde – Medicina

Pesquisador (a) responsável: Marcos Borato Viana

Instituição responsável: Faculdade de Medicina – UFMG

Instituição onde será realizado o estudo – Fundação Hemominas

Documentação:

Folha de rosto CONEP devidamente datado e assinado

Protocolo COEP devidamente datado e assinado

Declaração de apoio institucional

Termo de compromisso

TCLE

Parecer da Câmara Departamental

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas

Curriculo do pesquisador

Orcamento financeiro

Concordância da instituição onde será realizada a pesquisa

Resumo do projeto: Trata-se de estudo que contará com 420 pacientes com doença falciforme, com idade entre 9 meses e 12 anos, recrutados durante a rotina de atendimento. Estas crianças serão testadas para detecção de infecção atual ou passada por parvovirus B19, sendo verificada a presença de anticorpos e do DNA viral em amostra de soro destes pacientes. Será também realizada a análise filogenética e do genótipo do parvovirus B19. O estudo fornecerá dados epidemiológicos e moleculares sobre esta infecção viral e seu impacto nos pacientes com doença falciforme.

Aspectos éticos: São respeitados os princípios éticos de sigilo das informações coletadas e não há riscos relevantes aos participantes do projeto, além daqueles inerentes à coleta de amostras de sangue. O projeto já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas. Em relação ao TCLE, é apresentado um único TCLE destinado aos responsáveis pelas crianças, com um campo para assinatura dos pacientes com idade entre 7 e 12 anos. Além disso, a linguagem utilizada no TCLE é, por vezes, muito técnica e de difícil compreensão pelos responsáveis dos pacientes. O TCLE também não esclarece que as dúvidas em relação à pesquisa poderão ser esclarecidas no Comitê de Ética em Pesquisa.

1. **Mérito e voto:** O projeto está bem delineado e atende aos objetivos propostos pelo pesquisador. O estudo não oferece riscos significativos e proporcionará maior conhecimento das infecções pelo parvovirus B19 em crianças com doença falciforme. Somos, snj, pela aprovação do projeto



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0287.0.203.000-10

Interessado(a): Prof. Marcos Borato Viana
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 18 de agosto de 2010, o projeto de pesquisa intitulado "Estudo da prevalência e incidência da infecção pelo parvovírus B19 em crianças com anemia falciforme: manifestações clínicas e análises dos genótipos virais" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

