SHEILA DE OLIVEIRA GARCIA

**O significado das variantes do eritrovírus em pacientes
com citopenias de origem desconhecida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos imunes e infecciosos

Orientadora: Ester Cerdeira Sabino

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Garcia, Sheila de Oliveira

O significado das variantes do eritrovírus em pacientes com citopenias de origem desconhecida / Sheila de Oliveira Garcia. -- São Paulo, 2010.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Imunes e infecciosos.

Orientadora: Ester Cerdeira Sabino.

Descritores: 1.Eritrovírus 2.Parvovírus B19 humano 3.Genótipo 4.Anemia
5.Leucopenia 6.Trombocitopenia

USP/FM/DBD-219/10

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

Sheila de Oliveira Garcia

O significado das variantes do eritrovírus em pacientes com citopenias de origem desconhecida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Processos imunes e infecciosos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profº Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Profº Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Profº Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Peço perdão aos nobres cientistas por dedicar este estudo a uma pessoa normal. Tenho um bom motivo: Essa pessoa normal é o melhor exemplo que possuo. Entretanto, tenho outro motivo: Essa pessoa normal é capaz de compreender todos os medos e inseguranças na vida de um cientista. Tenho ainda um terceiro: Essa pessoa normal é responsável pela formação de um pequeno, mas promissor cientista. Se todos esses motivos não bastam, eu dedico então este estudo a grande cientista que esta pessoa normal é todos os dias.

Corrijo, portanto, a dedicatória:

*À Adeita Angélica,
minha mãe.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a você!

Refiro-me “você”, porque cada partícula viral, cada anticorpo, cada célula e claro, cada uma dessas letras só foram sintetizadas por conta da sua ajuda.

Não me cabe listar, pois foram muitas.

E cada um que tem a oportunidade de ler estes agradecimentos sabe da sua indescritível importância para a conclusão desta obra.

A todos que estiveram comigo, o meu muito obrigada!

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as normas, em vigor, no momento desta
Publicação:

American Medical Association (AMA)

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)

Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por
Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli
Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria
Vilhena. 2^a ed. – São Paulo: Serviço de Biblioteca e documentação da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2005

International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

International Standardization Organization (ISO)

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
3	REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1	Histórico	5
3.2	Vírião.....	8
3.3	Variabilidade Genômica	10
3.4	Genótipos.....	12
3.5	Mecanismo de Replicação	14
3.6	Transcrição	16
3.7	Proteínas não estruturais	16
3.8	Proteínas estruturais	17
3.9	Receptor do vírus.....	18
3.10	Prevalência	19
3.11	Transmissão	20
3.12	Manifestações Clínicas	21
3.12.1	Eritema Infeccioso	24
3.12.2	Crise Aplástica Transitória.....	24
3.12.3	Aplasia Pura de Série Vermelha	25

3.12.4	Hidropisia Fetal	26
3.12.5	Artropatia.....	28
3.12.6	Síndrome “luvas e meias”.....	29
3.12.7	Síndrome hemofagocítica.....	29
3.12.8	Citopenias	30
3.12.9	Persistência do vírus em pessoas saudáveis.....	31
3.13	Diagnóstico do vírus.....	33
3.14	Tratamento.....	39
4	MÉTODO.....	41
4.1	Casuística e espécimes biológicos	41
4.2	Procedimentos específicos	43
4.2.1	Pré-analítico	43
4.2.2	Extração do DNA para amostras de sangue periférico	44
4.2.3	Extração do DNA para amostras de medula óssea.....	45
4.2.4	Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (“primers”)	47
4.2.5	Padronização da Reação de PCR e Semi-Nested PCR	49
4.2.6	Detecção do produto amplificado pela eletroforese em gel de agarose	52
4.2.7	Purificação do produto da amplificação das amostras de sangue periférico e medula óssea.....	53
4.2.8	Quantificação do produto purificado no espectrofotômetro .	53
4.2.9	Reação de seqüenciamento.....	54
4.2.10	Precipitação da Reação de seqüenciamento	55
4.2.11	Análises das seqüências.....	56

4.2.12	Ensaaios sorológicos	58
4.3	Armazenamento dos dados	62
4.4	Análise dos dados.....	63
5	RESULTADOS	64
5.1	Casuística e espécimes biológicos	64
5.2	Detecção do ácido nucléico viral e caracterização molecular	65
5.3	Detecção do “status” sorológico.....	70
5.4	Comparação entre prevalência de anticorpos e DNA viral.....	71
5.5	Prevalência e soroprevalência do eritrovírus entre os doadores saúdáveis de medula óssea.....	73
5.6	Prevalência e soroprevalência do eritrovírus entre os pacientes com neoplasias hematológicas crônicas.....	73
5.7	Correlação entre os genótipos do eritrovírus e a ocorrência de citopenias de causa não esclarecida	75
6	DISCUSSÃO	81
7	CONCLUSÕES	90
8	ANEXOS	91
9	BIBLIOGRAFIA	102
APÊNDICES		

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura do capsídeo do eritrovírus humano B19 (Kaufmann et al., 2005).....	6
Figura 2.	Proeritroblasto gigante com inclusões citoplasmáticas sugerindo infecção pelo eritrovírus B19. Medula óssea, coloração por Leishman, aumento X 1000 (Garcia et al.; 2009)	7
Figura 3.	Fotomicrografia das micropartículas do eritrovírus, com cerca de 20 nm, obtida por microscopia eletrônica (solicitado permissão de uso Linda Stannard em 16/11/2009).....	9
Figura 4.	Representação esquemática da replicação do eritrovírus dentro da célula hospedeira (final da fase S e início da fase G2 de mitose celular)	15
Figura 5.	Fotografia de uma corrida de DNA genômico, para controle da corrida foi usado um marcador (M) de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen®, USA).....	47
Figura 6.	Diagrama representativo da localização da região de amplificação das seqüências dos “primers” no genoma viral....	49
Figura 7.	Representação esquemática da microplaca com padronização do posicionamento dos controles, calibradores e amostras para cada corrida	59
Figura 8.	Banco de dados com informações demográficas, sociais e laboratoriais dos pacientes e doadores envolvidos no estudo, elaborado no programa <i>Microsoft Office Access®</i>	63

Figura 9.	Distribuição dos casos e controles em relação à citopenias, doenças hematológicas e assintomáticos dos indivíduos estudados na cidade de São Paulo- FMUSP - 2006-2009	64
Figura 10.	Distribuição de genótipos (1, 2 e 3) de acordo com o tipo de amostra (PL = Amostras de plasma obtidas de sangue periférico e MO = Amostras de medula óssea) analisada de pacientes da cidade de São Paulo infectados pelos eritrovírus no período de 2006 - 2009.....	66
Figura 11.	Distribuição temporal dos casos de indivíduos infectados pelo eritrovírus no HCFMUSP, coletados entre setembro de 2006 a maio de 2009 (%)......	68
Figura 12.	Relação entre a frequência dos genótipos encontrados do eritrovírus na cidade de São Paulo em relação à idade dos indivíduos infectados. HCFMUSP - 2006 a 2009.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Seqüências nucleotídicas dos “primers” para amplificação de fragmentos do eritrovírus e suas posições	48
Tabela 2.	Composição para preparação da solução “mix” para a PCR, Semi-Nested PCR para a detecção do eritrovírus e amplificação do gene Beta-globina.....	50
Tabela 3.	Concentrações finais dos reagentes utilizados nas reações de seqüenciamento	55
Tabela 4.	Casos e Controles em relação ao sexo e faixa etária dos indivíduos estudados - HCFMUSP - 2006 a 2009	65
Tabela 5.	Detecção de ácido nucléico viral do eritrovírus em amostras coletadas no HCFMUSP no período de 2006 a 2009	66
Tabela 6.	Casos e Controles em relação aos genótipos do eritrovírus dos indivíduos infectados - HCFMUSP - 2006 a 2009	67
Tabela 7.	Freqüência entre os genótipos do eritrovírus encontrados em pacientes do HCFMUSP – 2006 a 2009	69
Tabela 8.	Freqüência dos anticorpos anti IgG e anti IgM para eritrovírus em relação ao sexo e a idade, detectados na cidade de São Paulo - HCMUSP - Setembro de 2006 a maio de 2009.....	71
Tabela 9.	Prevalência dos anticorpos anti IgG e anti IgM contra o eritrovírus em relação a detecção do DNA viral - HCFMUSP - 2006 a 2009.....	72

Tabela 10.	Correlação da caracterização molecular do eritrovírus e a presença dos anticorpos anti IgG e anti IgM na cidade de São Paulo - 2006 a 2009	73
Tabela 11.	Frequência dos anticorpos anti IgG e anti IgM e DNA do eritrovírus em pacientes com neoplasias hematológicas atendidos no HCFMUSP entre o período de 2006 a 2009.....	74
Tabela 12.	Características dos casos e controles com relação à idade, tipo de amostra com resultado positivo, genótipo encontrado, sorologia e histórico clínico - HCFMUSP - 2006 a 2009.....	75
Tabela 13.	Frequência das manifestações clínicas comparadas ao genótipo do eritrovírus nos pacientes infectados no HCFMUSP, coletados entre o período de 2006 a 2009.....	78
Tabela 14.	Distribuição dos genótipos do eritrovírus de acordo com a citopenia, a partir de amostras DNA positivas de pacientes da cidade de São Paulo, coletadas no período de 2006 - 2009	80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

~	aproximadamente
®	marca registrada
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
°C	graus Celsius
101OR	oligonucleotídeo iniciador (“primer”) anti-sense
A	Adenina
APSV	Aplasia Pura de Serie Vermelha
A6	variante A6 grupo eritrovírus
B19	vírus B19
BioEdit®	Programa para análise de seqüenciamento
C	Citosina
<i>CAP</i>	gene que codifica proteínas estruturais
CAT	crise aplástica transitória
<i>Cut-off</i>	ponto de corte
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNAse	desoxirribonuclease
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetra acético
EI	eritema infeccioso
ELISA	ensaio imunoenzimático

FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
G	Guanina
Grupo1	Grupo de pacientes com citopenias de origem desconhecida
Grupo 2	Grupo de doadores saudáveis de medula óssea
Grupo 3	Grupo de pacientes com neoplasias hematológicas crônicas
HB	hemoglobina
HC	tricocitoleucemia (“Hairy Cell”)
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
kDa	kilodalton
LLC	leucemia linfóide crônica
LMC	leucemia mielóide crônica
mL	mililitro
n	número de indivíduos
nm	nanômetro
NS1	proteína não estrutural
nt	nucleotídeo
ORF	fase aberta de leitura (“open reading frame”)
P0	oligonucleotídeo iniciador (“primer”) sense
P5	oligonucleotídeo iniciador (“primer”) anti-sense
PAUP	“Phylogenetic Analysis Using Parsimony”

pb	pares de base
PBS	solução salina tamponada com fosfato (“Phosphate buffer solution”)
PCR	reação em cadeia da polimerase (“Polymerase Chain Reaction”)
pH	potencial hidrogeniônico
PLAQ	plaquetas
PK	proteínase K
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNAse	Ribonuclease
SMD	síndrome mielodisplásica
SMC	síndrome mielóide crônica
ssDNA	ácido desoxirribonucleico de cadeia simples
T	Timina
TBE	tris-boreto-EDTA
U	unidade
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
V9	variante V9 grupo eritrovírus
VP1	proteína estrutural do capsídeo viral
VP2	proteína estrutural do capsídeo viral
WBC	leucócitos (“white blood cells”)

RESUMO

Garcia SO. *O significado das variantes do eritrovírus em pacientes com citopenias de origem desconhecida* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 125p.

O eritrovírus humano (parvovírus), gênero *Erytrovirus*, é o único representante da família *Parvoviridae* responsável por um amplo espectro de doenças. Estudos recentes têm demonstrado variações entre o eritrovírus e orientam a reclassificação destas variantes em três genótipos distintos: genótipos 1, 2 e 3. O papel do eritrovírus na etiopatogenia de doenças hematológicas em humanos permanece incerto. Este estudo teve como objetivo principal avaliar a relação etiopatogênica dos genótipos do eritrovírus e as citopenias de origem desconhecida. **Materiais e Métodos:** Participaram do estudo 285 indivíduos procedentes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Destes, 120 apresentavam citopenias de origem desconhecida (grupo 1 – Casos), 45 eram doadores de medula óssea (grupo 2 – Controles Saudáveis) e 120 eram pacientes com doenças oncohematológicas crônicas (grupo 3 – Controles com Neoplasias Hematológicas). A pesquisa do vírus foi realizada pelo método de semi-nested PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em amostras de medula óssea e de sangue periférico. As fitas complementares foram seqüenciadas diretamente do produto da PCR. Amostras de plasma de todos os indivíduos incluídos no estudo foram testadas para presença de anticorpos IgG e IgM específicos contra o eritrovírus por ensaio imunoenzimático. **Resultados:** Dos 40 indivíduos com resultado positivo na PCR em amostra da medula óssea, o genótipo 1 foi encontrado em 22 (55%), o genótipo 2 em 5 (12,5%), o genótipo 3 em 13 (32,5%). Quando comparadas as freqüências de positividade entre os casos e controles (Grupo 1 VS Grupos 2 e 3), não encontramos diferença significativa com relação ao genótipo 1 ($p=0,192$) nem com relação aos genótipos 2 e 3 ($p=0,143$). A soroprevalência encontrada na amostra foi de 71%. **Conclusão:** Concluímos que a infecção isolada pelo eritrovírus, independente do genótipo encontrado, não tem relação etiopatogênica com as citopenias de origem desconhecida, uma vez que o vírus foi encontrado com a mesma freqüência nos casos e nos controles estudados.

Descritores: 1.Eritrovírus 2.Parvovírus B19 humano 3.Genótipo 4.Anemia 5.Leucopenia 6.Trombocitopenia

SUMMARY

Garcia SO. *The significance of the variants of the erythrovirus in patients with cytopenias of unknown origins* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 125p.

The human erythrovirus (parvovirus), genus *Erythrovirus*, is the only representative of the family *Parvoviridae* responsible for a broad spectrum of diseases. Recent studies have shown variations within the erythrovirus and guide the classification of these variants in three distinct genotypes: genotypes 1, 2 and 3. The role of the erythrovirus in the etiopathogenesis of hematological diseases in humans remains uncertain. This study's main objective was to evaluate the etiopathogenic relationship between the genotypes of the erythrovirus and the cytopenias of unknown origins. **Methods and Materials:** 285 individuals coming from the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo participated in the study. Of these, 120 represented cytopenias of unknown origins (group one – Cases), 45 were bone marrow donors (group two - Healthy Controls), and 120 were patients with chronic oncohematological diseases (group three – Controls with Hematological Disorder). The research of the virus was done through the semi-nested PCR method (polymerase chain reaction) in bone marrow and peripheral blood samples. The complementary strands were sequenced directly from the product of the PCR. Plasma samples from all of the individuals included in the study were tested through immunosorbent assay for the presence of IgG and IgM antibodies specific to the eritrovírus. **Results:** Of the 40 individuals that had positive PCR bone marrow results, the genotype 1 was found in 22 (55%), the genotype 2 in 5 (12.5%), and genotype 3 in 13 (32.5%). When the frequency of positivity was compared between the cases and the controls (Group 1 vs. Groups 2 and 3), we did not find a significant difference in relation to genotype 1 ($p=0.192$), nor did we find a significant difference in relation to genotypes 2 and 3 ($p=0.143$). The overall seroprevalence found in the samples was 71%. **Conclusion:** We conclude that the infection isolated by the erythrovirus, independent of the genotype found, does not have a etiopathogenic relationship with the cytopenias of unknown origins, hence the virus was found with the same frequency in the cases and the controls studied.

Descriptors: 1.Erythrovirus 2.Human Parvovirus B19 3.Genotype 4.Anemia 5.Leukopenia 6.Thrombocytopenia

1. INTRODUÇÃO

O eritrovírus (anteriormente denominado Parvovírus B19) é um vírus que pertence ao gênero *Erytrovirus* da família dos *Parvoviridae* (Cossart et al., 1975). Em humanos, é responsável por um amplo espectro de doenças incluindo eritema infeccioso, artropatias, aplasia transitória da série eritróide, anemia em imunossuprimidos e complicações fetais quando a exposição e a infecção ocorrem durante a gestação (Young et al., 2004).

Assim como acontece com representantes de outras famílias virais, após a infecção primária, o eritrovírus pode permanecer em estado latente por longos períodos, sofrer reativação e novamente voltar ao estado de latência (Cassinotti et al., 1997; Coulombel et al., 1989; Sasaki et al., 1995). Já foi documentada a infecção persistente em indivíduos imunocompetentes através da detecção do DNA viral em medula óssea após muitos anos da infecção aguda (Kerr et al., 1995), porém sem repercussão clínica. Em indivíduos imunocomprometidos, a infecção persistente pode resultar em anemia crônica (Frickhofen et al., 1990).

O eritrovírus é um vírus não envelopado, com uma única fita de DNA de aproximadamente 5600 nucleotídeos com uma seqüência invertida de 383 bases em ambas as extremidades (Shade et al., 1986; Deiss et al., 1990). Possui duas estruturas principais abertas de leitura, do inglês “open reading frames” (ORFs) que codificam três principais proteínas. A primeira ORF codifica a proteína não estrutural NS1, essencial para a replicação do DNA viral e sabidamente causadora da citotoxicidade na célula hospedeira. A segunda ORF

expressa duas proteínas estruturais denominadas proteína viral 1 (VP1) e proteína viral 2 (VP2) (Shade et al., 1986).

O gênero *Erytrovirus* apresenta três genótipos: genótipo 1 (variante protótipo Pvbaua); genótipo 2 (variante protótipo Lali – A6) e genótipo 3 (variante protótipo V9) (Nguyen et al., 1999; Nguyen et al., 2002; Servant, et al., 2002).

Do ponto de vista hematológico, a infecção aguda pelo genótipo 1 do eritrovírus tem sido clinicamente associada à parada temporária da eritropoiese medular em pacientes imunocompetentes, à crise aplástica eritróide em pacientes com anemia hemolítica crônica e à aplasia pura da série vermelha de evolução crônica em pacientes imunodeprimidos. O aparecimento de outras citopenias, como leucopenia e trombocitopenia também já foram associadas à infecção aguda pelo eritrovírus. O bloqueio da eritropoiese ocorre devido ao tropismo que o vírus apresenta por células precursoras da linhagem eritróide da medula óssea. As outras citopenias, provavelmente ocorrem por estímulo do sistema histiocitário-macrofágico na medula óssea causado pelo vírus, levando à fagocitose de megacariócitos e de precursores granulocíticos (Risdall, 1979; Shirono, 1995; Hong, 1998).

Em decorrência desses achados hematológicos, a pesquisa de eritrovírus faz parte da investigação diagnóstica de pacientes com anemia reticulocitopenica, anemias em que há nítido bloqueio ou retardo da eritropoiese em estágios de precursores eritróides e nos casos de citopenias de origem não definida excluindo-se ou não outras doenças hematológicas e infecciosas (Handgretinger, 2000).

Conquanto já seja expressiva a contribuição dessas investigações no tocante à patogenicidade do genótipo 1 (Garcia et al,; 2009), ainda persistem aspectos de relevância inquestionável sobre o papel dos genótipos 2 e 3 no desenvolvimento de doenças em seres humanos. Nesse sentido se configuram como imperativos estudos orientados à genotipagem do eritrovírus. No Brasil são inexistentes informações oriundas de investigações sobre a relação das três variantes do eritrovírus com as citopenias de origem não esclarecida.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Correlacionar os genótipos do eritrovírus e a ocorrência de citopenias de causa não esclarecida.

2.2 Objetivos específicos

- a. Determinar a prevalência do DNA do eritrovírus em amostras de sangue periférico e medula óssea;
- b. Determinar os genótipos do eritrovírus na população sob estudo;
- c. Determinar a soroprevalência do eritrovírus na cidade de São Paulo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Histórico

O eritrovírus, anteriormente descrito como parvovírus B19, pertence ao gênero *Erythrovirus*. Em meados de 1970, Yvonne Cossart, uma virologista australiana, trabalhando em um laboratório em Londres, notou uma reação anormal na amostra de um doador saudável (em uma placa com a identificação B na posição 19), para a realização de um teste para detecção de hepatite B. Cossart descobriu o eritrovírus ao visualizar as micropartículas, que se mostraram diferentes da forma habitual nos casos de positividade para hepatite B. As características bioquímicas e moleculares demonstraram, subseqüentemente, que estas partículas eram o eritrovírus, no qual recebeu previamente o nome de parvovírus devido ao tamanho (*parvum*, do latim, pequeno) e B19 devido à localização e posição do espécime na placa de análise (Cossart et al., 1975).

No Brasil, a primeira menção à infecção por eritrovírus parece ter sido feita em 1983, no qual foram detectados anticorpos pela técnica de contraímunoeletroforese em alguns doadores de sangue do Rio de Janeiro. Em 1985, também no Rio de Janeiro, foram detectados anticorpos anti-B19 por radioimunoensaio em soros de três mulheres grávidas, avaliados para detecção de anticorpos contra rubéola. Aparentemente, nenhum destes autores publicou os seus achados sendo apenas citados em 1989 (Cruz et al., 1989).

Em 1984 foi relatado, na Inglaterra, o primeiro caso de infecção intra-uterina por B19. Tratava-se de um caso de hidropisia fetal durante um surto

epidêmico de eritema infeccioso. A partir deste relato, documentou-se a potencial toxicidade do eritrovírus B19 aos tecidos embrionários e fetais, agregando mais essa complicação ao grupo das doenças associadas a este agente (Brown et al., 1984). Desde então pode ser feita a associação do vírus com tropismo por células e tecidos com alta taxa de multiplicação celular.

A classificação na família *Parvoviridae* é feita por morfologia, função e material genético. A microscopia eletrônica revelou a presença de partículas de aproximadamente 23 nm, com estrutura icosaédrica (Figura 1), constituído por uma fita simples de DNA não envelopado (Kaufmann et al., 2004) semelhante ao parvovírus já conhecido. Após o seqüenciamento completo do genoma, foi definitivamente estabelecido que o vírus fosse um parvovírus, e o eritrovírus foi oficialmente aceito como membro da Família *Parvoviridae* pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) em 1985 (Brown, 2006).

Figura 1. Estrutura do capsídeo do eritrovírus humano

(Kaufmann et al., 2005)

O genoma do eritrovírus apresenta algumas características originais: as extremidades com seqüências palindrômicas são idênticas e consideravelmente mais longas do que as dos outros parvovírus (Deiss et al., 1990) e com apenas um promotor (Doerig et al., 1987). Finalmente, a análise filogenética demonstrou que o eritrovírus não poderia ser uma espécie do gênero Parvovirus ou Dependovirus. Portanto, um novo gênero foi criado e, devido ao tropismo do vírus para as células da linhagem eritróide (Figura 2), foi nomeado eritrovírus. No início, o eritrovírus foi o único membro do gênero, posteriormente, alguns vírus relacionados foram incluídos no gênero: os simian parvovírus (SPV) isolados de macacos *Cynomolgus*, (O'Sullivan et al., 1994), os chipmunk parvovírus, isolados de esquilos da Manchúria (Yoo et al., 1999), e os macacue parvoviruses, isolados em macacos rhesus e em uma espécie de porco-espinho (Green et al., 2000), estes são classificados como eritrovíroses (ICTVdB - The Universal Vírus Database).

Figura 2. Proeritroblasto gigante com inclusões citoplasmáticas sugerindo infecção pelo eritrovírus B19. Medula óssea, coloração por Leishman, aumento X 1000 (Garcia et al.; 2009)

3.2 Virion

A caracterização do DNA mostrou que o genoma do eritrovírus é constituído por um filamento de DNA linear de fita simples (ssDNA) com polaridades positiva e negativa equivalentes na partícula viral, e peso molecular de 5,5 a 6,2 x 10⁶ Daltons. O DNA possui 5.596 nucleotídeos, sendo cerca de 43% G+C (Anderson et al., 1990a).

O genoma do eritrovírus apresenta duas regiões abertas de leitura. As da extremidade direita (ORF2, ORF3, ORF4) - *gene CAP* - codificam as proteínas estruturais, como a VP1, que é uma proteína que compreende cerca de 4% da estrutura do vírion com 84 kDa e a VP2, que é a principal proteína do capsídeo com 58 kDa, composta por cerca de 96% da estrutura do vírion. Sugere-se que a proteína VP1 não é essencial para a formação do capsídeo (Ozawa et al., 1987). A região aberta de leitura da extremidade esquerda (ORF1) - *gene REP* - codifica uma proteína não estrutural, que é um polipeptídeo citotóxico, (Moffatt et al., 1998) chamada de proteína NS1 sendo composta por 671 aminoácidos (Ozawa et al., 1987).

Após a clonagem das extremidades do genoma, foi observado que as seqüências palindrômicas terminais 5' e 3', contém aproximadamente 330 nucleotídeos, elas dobram-se sobre si, formando uma estrutura similar a um grampo (*hairpin*) que funciona como “iniciador” da polimerização pela DNA-polimerase celular. Nestas regiões de dupla fita, formadas principalmente de pares GC, com o estabelecimento de uma cadeia complementar de aproximadamente 380 nucleotídeos, (Zhi et al., 2004) considerada uma estrutura essencial para o início da replicação viral. Posteriormente, estas

duplas fitas são clivadas por enzimas, gerando DNA de fita simples (Young, 2004).

O eritrovírus é caracterizado por uma baixa variabilidade genética, quando isolados apresentam pequenas diferenças nucleotídicas, (Hokynar et al., 2002), com exceção das seqüências de duas variantes a V9 e a A6 (Nguyen et al., 2002).

Pelo fato de ser um vírus pequeno (Figura 3), com cerca de 20 a 25 nm de diâmetro e sem invólucro lipídico, o eritrovírus possui grande resistência à inativação físico-química (Brown e Young, 1996). A ausência de um envelope lipídico faz com que o eritrovírus seja extremamente resistente, apresenta termo-estabilidade, é capaz de sobreviver até 60 °C por até 12 horas, tolera grandes variações de pH (estável no intervalo de 3 a 9) (Centers for Disease Control, 1989) e solventes lipídicos, mas pode ser inativado por formalina, β -propiolactona, irradiação γ e agentes oxidantes (Brown e Young, 1996 e Kerr, 1996).

Figura 3. Fotomicrografia das micropartículas do eritrovírus, com cerca de 20 nm, obtida por microscopia eletrônica (solicitado permissão de uso Linda Stannard em 16/11/2009)

3.3 Variabilidade Genômica

A sequência do DNA do eritrovírus B19 é extremamente estável, com uma variação que atinge de 1 a 2%. No entanto, após o reconhecimento das variantes A6 (Nguyen et al., 2002), V9 (Nguyen et al., 1999) e Lali (Hokynar et al., 2002), o eritrovírus foi classificado em três genótipos: genótipo 1 (variante protótipo Pvbaua), genótipo 2 (variante Lali protótipo) e genótipo 3 (variante V9 protótipo), análises filogenéticas revelaram 2 subgrupos no genótipo 1 e do genótipo 3, a divergência de nucleotídeos entre os genótipos é de aproximadamente 10%, a variação mais marcante foi observada na região promotora (Nguyen et al., 1999; Nguyen et al., 2002; Servant, et al., 2002).

Dentro do gene NS1, a sequência de divergências entre os genótipos 2 e 3 em relação ao genótipo 1 são de 13% no nível de nucleotídeos e de 6% nos aminoácidos. Na região aberta de leitura que codifica as proteínas VP1 e VP2, a maioria das substituições de nucleotídeos é sinônima: nos nucleotídeos, os genótipos 2 e 3 diferem do protótipo de 9 e 12%, respectivamente, mas em relação aos aminoácidos diferem apenas 1,1 e 1,4% (Servant, et al., 2002).

Vários trabalhos tentaram estabelecer uma possível correlação entre as variações nas sequências no genoma do eritrovírus com resultados de diferentes infecções. Embora tenha sido demonstrada certa concentração geográfica da presença do vírus, as diferenças genéticas foram menores, e nenhuma associação da doença com a variação genética do vírus foi detectada até à luz dos conhecimentos de hoje. A comparação das sequências de amostras de soro de pacientes com infecção aguda ou persistente pelo eritrovírus revelou um maior grau de variação nucleotídica

nos pacientes com infecção persistente do que em aqueles com infecção aguda, tanto na seqüência do DNA quanto aos aminoácidos (Hemauer et al., 1996).

Existe um maior grau de divergência de aminoácidos dentro da região amino-terminal, denominada região única de VPI (VP1u), cerca de 4%. Os genótipos 2 e 3 diferem de genótipo 1 por 4,4 e 6,6%, respectivamente. Nesta região estão localizados importantes epítomos com funções neutralizantes, o reconhecimento de diferenças na resposta de anticorpos pode estar relacionado a esta característica. Embora um alto grau de reatividade antigênica cruzada tenha sido demonstrado entre os genótipos 1 e 3, quase não existem dados disponíveis sobre a relação imunológica correspondente entre os genótipos 1 e 2. Este achado sugeriu que a variação se deve a replicação contínua do vírus (Servant, et al., 2002).

O genótipo V9 foi isolado pela primeira vez em 1995, na França, no sangue de uma criança com crise eritroblastopênica causada por uma infecção pelo eritrovírus (Nguyen et al., 1998). Foi realizado o teste pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostra de medula óssea, o teste mostrou-se inconclusivo, pois a banda observada em gel não foi confirmada por hibridização com uma sonda específica comumente usada para a detecção do eritrovírus. O estudo filogenético da seqüência obtida apresentou mais de 11% de diferenças nucleotídicas na região VP1u, entre a amostra estudada e o eritrovírus conhecido, enquanto que, para as cepas do genótipo 1, o grau de variabilidade não excede 7% (Servant, et al., 2002).

3.4 Genótipos

Vários estudos para demonstrar as variantes do eritrovírus foram realizados em diferentes populações (doadores saudáveis, pacientes com sintomas sugestivos de infecção pelo eritrovírus, portadores de leucemias, pacientes imunodeficientes, portadores de cardiopatias, neuropatias, entre outros). Os resultados mostram que a frequência dos genótipos está diretamente relacionada com a região estudada. (Heegaard et al., 2002), e (Kaikkonen et al., 2001). No Brasil, na cidade de São Paulo, na região Sudeste, foi relatada a presença do genótipo 2 (Sanabani et al., 2006), enquanto que um estudo realizado também no Brasil, não foi encontrado o genótipo 2, e foi demonstrada a predominante circulação do genótipo 1, comparada à baixa frequência do genótipo 3 na Amazônia (Freitas et al., 1990).

O genótipo 1 é predominante em muitos países, com exceção de Gana, onde todos os genótipos isolados foram o 3 (Servant-Delmas et al., 2009). Este último genótipo do eritrovírus foi mostrado ser endêmico em Gana e na África Ocidental, (Candotti et al., 2004) e ocasionalmente apareceu em dois países ocidentais da França e na região sudeste do Brasil (Sanabani et al., 2006), com uma significativa afluência de origem do povo africano (Servant et al., 2002). Além destas áreas, só alguns casos esporádicos de infecção virêmicas foram relatadas na França (Nguyen et al., 1998) apenas um caso foi identificado no Reino Unido (Cohen et al., 2006) e em uma pesquisa no EUA, o DNA do genótipo 3 foi encontrado em uma pequena porcentagem de amostras de tecido (Wong et al., 2003).

Em amostras de pacientes sintomáticos, em um estudo realizado na Europa, o genótipo 2 têm aparecido esporadicamente (Enders et al., 2007). No Brasil, nosso projeto piloto foi o primeiro estudo que detectou a presença dos genótipos 2 e 3 do eritrovírus na cidade de São Paulo, região Sudeste (Sanabani et al., 2006). Na Amazônia, (Freitas et al., 1990) demonstraram uma predominante circulação do genótipo 1 (91%), comparada à baixa frequência do genótipo 3 na região de São Paulo. Em 2006, Toan et al., e colaboradores observaram tal fato previamente para o genótipo 1 (97%) e Servant et al. em 2002, quanto ao 3 (11.4%) no Vietnã e França, respectivamente. Freitas e colaboradores, em 2007 sugeriram que essa alta frequência do genótipo 1 pode estar relacionada a uma introdução mais antiga das linhagens do eritrovírus B19 na região amazônica, com média de 45 anos. Esta situação tem apoio na mais recente introdução do genótipo 3 na região de São Paulo, há 19 anos em média, e, ao redor de 36 anos para outras localidades. Além disso, estudos realizados por Freitas et al. (1990) já haviam registrado a circulação do eritrovírus em espécimes clínicos colhidos de comunidades indígenas isoladas da Amazônia, bem como de áreas urbanas (1988, 1990, 1993). O nosso projeto piloto, realizado no ano de 2006 foi o pioneiro na detecção dos genótipo 2 e 3. O genótipo 2 foi relatado, até o momento, no Brasil apenas em nosso estudo (Sanabani et al., 2006).

Os indivíduos podem ser infectados com dois genótipos diferentes, o DNA do eritrovírus pode persistir como uma população de genomas diferentes (Schneider et al., 2008).

3.5 Mecanismo de Replicação

As células-tronco hematopoiéticas são células multipotentes e representam de 0,05 a 0,1% da população de células hematopoiéticas da MO (Metcalf et al., 1989). A replicação do eritrovírus é limitada a células progenitoras eritróides humanas presentes na medula óssea e em sangue periférico, somente quando estas células migram para a periferia onde é diretamente citotóxico para as células progenitoras (Carper e Kurtzman, 1996).

Os eritrovírus multiplicam-se no núcleo das células em divisão ativa, em decorrência de seu tamanho diminuto e a restrita capacidade de codificação do genoma, o eritrovírus não possui sua própria maquinaria de replicação, e, portanto é completamente dependente da célula hospedeira. O mecanismo de replicação envolve a formação de uma fita de senso negativo que serve de molde para a síntese de fitas positivas, em estreita dependência das funções celulares (como as DNA-polimerases) realizadas durante a fase final S ou no início da fase G2 (Figura 4) do ciclo celular da célula hospedeira (Berns et al., 1990).

Figura 4. Representação esquemática da replicação do eritrovírus dentro da célula hospedeira (final da fase S e início da fase G2 de mitose celular)

Nestas regiões de dupla fita tem início a replicação, com o estabelecimento de uma cadeia complementar do DNA da célula do hospedeiro. Posteriormente, estas duplas fitas são clivadas por enzimas gerando DNA de fita simples, inicialmente ocorre a transcrição para a proteína não estrutural NS1, seguida pela transcrição tardia das proteínas estruturais VP1 e VP2 (Gareus et al., 1998). Uma característica única do eritrovírus é a apresentar o DNA linear. Como o DNA-polimerase sintetiza apenas na direção 5' a 3' é necessário um iniciador da polimerização pela DNA-polimerase celular, que é uma cópia da molécula de DNA linear da extremidade 3', ou seja, as seqüências palindrômicas (que são seqüências lidas da mesma forma em ambos os sentidos) terminais 5' e 3', dobram-se sobre si mesmas, formando uma estrutura similar a um grampo (Young, 2004).

3.6 Transcrição

O processo de transcrição inicia-se no promotor (P6), presente na extremidade esquerda 5' da fita negativa. A partir deste promotor são transcritos 9 RNAs mensageiros (RNAs) dependentes do mesmo processo. No genoma do eritrovírus a ORF está presente apenas sobre a extremidade de polaridade negativa, com arranjo comum a todos os parvovírus: a extremidade 3' do genoma codifica a proteína NS1 (proteína não estrutural) e a extremidade 5' codifica as duas proteínas estruturais do capsídeo VP1 e VP2 (Cotmore et al., 1986; Ozawa et al., 1987; Ozawa et al., 1988b). Assim como com outros parvovírus, as duas proteínas estruturais do eritrovírus VP1 e VP2, são codificadas pela mesma região de leitura, e são idênticas, exceto pela adição de 227 aminoácidos na proteína VP1, na região VP1u (Bansal et al., 1993).

Duas proteínas não-estruturais adicionais de 7,5 e 11-kDa, com funções pouco estabelecidas, estão presentes no centro e na extremidade 5' do genoma (Cotmore et al., 1986; Ozawa et al., 1987; Ozawa et al., 1988b; St Amand et al., 1991; St Amand e Astell, 1993). Em 2006 Zhi et al., demonstrou que o bloqueio da expressão da 11-kDa reduziu significativamente o potencial de infecção viral do eritrovírus.

3.7 Proteínas não estruturais

As funções bioquímicas de algumas proteínas não-estruturais presentes no eritrovírus ainda não estão bem caracterizadas. Os genes dessas proteínas são bastante homólogos e com a região bem conservada. As proteínas não

estruturais do eritrovírus induzem apoptose das células de linhagem eritróide (Moffatt et al., 1998).

As proteínas não estruturais são codificadas pelo vírus e não são empacotadas na partícula viral madura, elas são proteínas regulatórias. Uma proteína não estrutural de grande importância no eritrovírus é a proteína NS1, que é um polipeptídio citotóxico (Moffatt et al., 1998). A proteína não-estrutural NS1 é composta de 671 aminoácidos, com peso molecular de 77 kDa (Ozawa et al., 1987), está localizada entre a posição 615 e 2630 do genoma do vírus. Esta proteína tem importantes funções, elas agem como um ativador da transcrição, tanto pela ligação do promotor p6 ao DNA, bem como através de fatores de transcrição celular (Raab et al., 2002). A NS1 está localizada no núcleo da célula infectada (Ozawa e Young, 1987), além ter a capacidade de bloquear a proliferação celular ela tem função citotóxica, que causa a lise celular (Ozawa et al., 1988a; Srivastava et al., 1990).

3.8 Proteínas estruturais

O capsídeo do eritrovírus é composto por duas importantes proteínas estruturais, a VP1 que compreende 5% e a VP2, com 95%, sua massa molecular é de 84kDa e 58kDa. As proteínas do capsídeo VP1 e VP2 são compostas de 781 e 554 aminoácidos, e estão localizadas entre as posições: 2623 a 4968 e 3304 a 4968, respectivamente (Ozawa et al., 1987).

A proteína VP2 é a principal componente do capsídeo, responsável pela mediação de ligação do vírus ao receptor, o antígeno p (Brown et al., 1993). Nas células infectadas ambas as proteínas do capsídeo são localizadas no

citoplasma e no núcleo (Pillet et al., 2003). Essas proteínas contêm epítomos de anticorpos neutralizantes (Kajigaya et al., 1991 e Sato et al., 1991).

3.9 Receptor do vírus

A replicação do eritrovírus foi mostrada em uma linhagem de célula altamente diferenciada, as células precursoras eritróides. A base do tropismo do vírus por este tipo de célula foi demonstrada após a descrição do receptor celular para o eritrovírus (Brown et al., 1996). Em contraste com a maioria dos vírus, o eritrovírus tem tropismo para as células precursoras eritróides, este tropismo é mediado por um receptor celular, o antígeno P, também conhecido como globosídeo. A capacidade de replicação do vírus e o tropismo celular também são regulados por fatores de transcrição específicos (Liu et al., 1992).

O globosídeo é um membro do grupo sangüíneo humano ABH, contém dois antígenos comuns, o P_1 e o P, raramente pode apresentar o antígeno P_k (Marcus et al., 1981). O antígeno P está presente não só em eritrócitos como também em megacariócitos, células endoteliais e da placenta, hepatócitos e coração fetal. O vírus invade a célula através da sua ligação ao receptor, o antígeno P nas células progenitoras eritróides na medula óssea ou nas hemácias no sangue periférico (Brown et al., 1993), que é comum na superfície de diferentes tipos celulares (hepatócitos, células endoteliais, células de coração fetal e megacariócitos) (Weigel-Kelley et al., 2003), a adsorção ocorre na região que contém carboidrato do globosídeo ou antígeno eritrocitário p (tetrahexoseramida) (Brown et al., 1993).

As principais células que possuem o antígeno para o tropismo do vírus são as células progenitoras eritróides: representadas pelas Unidades Formadoras de “burst” Eritróides (BFU-E) e as unidades formadoras de colônias eritróides (CFU-E) (Mortimer et al., 1983). Além do tropismo viral, a acessibilidade das células tronco hematopoiéticas nas infecções *in vivo* pode ser restringida por seu estado normal na fase G0 do ciclo celular (Bradford et al., 1997). O vírus pode persistir em algumas células-tronco multipotentes primitivas no estágio quiescente, destruindo finalmente as envolvidas na atividade proliferativa (Segovia et al., 1999).

O antígeno P pode estar ausente numa rara população. As estatísticas demonstram que esta ocorrência é razoavelmente rara (1/200.000). Uma vez que não há a presença desta molécula que propicia a ligação e adsorção do vírus para o interior da célula, os indivíduos desprovidos da expressão deste antígeno são naturalmente imunes à infecção por eritrovírus (Araujo et al., 1999).

3.10 Prevalência

A incidência de infecção pelo eritrovírus mostra uma variação sazonal. Em clima temperado sendo mais freqüente no final do inverno, na primavera e em muitos casos perduram até o início do verão. As taxas de infecção podem também aumentar a cada três ou quatro anos (Koch e Adler, 1989). Surtos de infecção pelo eritrovírus em climas temperados foram mais comuns no final do inverno e na primavera, embora haja casos registrados em outros meses (Cohen et al., 1995).

Em um estudo realizado no Brasil, no Estado do Rio de Janeiro, foi relatada a presença de 92,4% dos casos durante essa mesma época (Oliveira et al., 2002); os resultados foram similares a este em um estudo realizado com indivíduos do estado do Espírito Santo e outro estudo também no Estado do Rio de Janeiro (Cubel et al., 1997).

A prevalência de anticorpos IgG contra o eritrovírus é de 2 a 15% em crianças, 30 a 60% em adultos, e 85% em idosos com mais de 70 anos de idade (Heegaard et al., 2002). Em 2005, Figueiredo et al., mostraram uma frequência de 17% de positividade para IgM contra o eritrovírus no Estado do Amazonas. (Figueiredo et al., 2005). No Estado do Rio de Janeiro (2002), Oliveira et al., demonstraram que a frequência de IgM positivo para eritrovírus era de 31,8% em amostra de sangue periférico. Este estudo demonstrou uma clara variação sazonal, a infecção foi mais frequente no inverno e primavera, cerca de 92% dos casos ocorridos no segundo semestre do estudo (entre os meses de julho a dezembro). No ano de 2003, em um estudo soro epidemiológico realizado na cidade de Ribeirão Preto, Gonçalves et al., demonstraram uma prevalência de 72,5% do eritrovírus em gestantes.

Utilizando a técnica de PCR, um estudo realizado em Petersburgo na Flórida, demonstrou 18% de frequência do vírus em mulheres com hidropisia fetal não imune (Jordan et al., 1996).

3.11 Transmissão

O eritrovírus pode ser transmitido pela via respiratória ou por transmissão vertical (Brown et al., 1984). O eritrovírus pode ser encontrado

em amostras de soro, embora a viremia seja rara, o vírus pode ser transmitido também por sangue ou pelos componentes sanguíneos (Prowse et al., 1997).

Em um estudo com voluntários, foi realizada a inoculação nasal do eritrovírus em doadores saudáveis. Anticorpos tipo IgM contra o eritrovírus foram detectados cerca de 10 a 14 dias após a inoculação e puderam ser encontrados em amostras de soro por diversos meses após a exposição. Os anticorpos IgG contra o eritrovírus também aparecem duas semanas após a infecção e podem persistir por toda a vida (Young, 1995). Esse fato se constitui numa evidência de que a via respiratória está associada ao mecanismo de transmissão (Anderson et al., 1985).

3.12 Manifestações Clínicas

O eritrovírus está associado a uma ampla gama de manifestações da doença, a gravidade está diretamente relacionada ao estado imunológico e hematológico do indivíduo infectado (Brown e Young, 1996). A maioria das pessoas com eritrovírus são assintomáticas ou apresentam sintomas leves, inespecíficos, que são manifestações frustras e não patognomônicas de um quadro relacionado à infecção pelo vírus. Entretanto, os pacientes podem ter manifestações clínicas mais exuberantes, tais como o eritema infeccioso, a artropatia, a crise aplástica transitória, a aplasia pura de células vermelhas, a erupção papular purpúrica em mãos e pés e hidropisia fetal. Algumas manifestações são relacionadas à maior morbimortalidade e são a encefalite, epilepsia, meningite, miocardite, cardiomiopatia dilatada e hepatite auto-imune.

O eritrovírus tem sido sugerido por vários autores como agente causal em várias síndromes clínicas, o que, por vezes, é de difícil comprovação.

A infecção por eritrovírus adquire importância quando acomete portadores de doenças hematológicas hereditárias, tais como as anemias hemolíticas. Nestas doenças, em que o *turnover* celular é alto, a manifestação clínica, no caso a anemia, se torna mais exuberante em função da meia vida reduzida das hemácias destes pacientes. Como exemplos destacam-se as síndromes falcêmicas, as talassemias, enzimopatias, ou defeitos da membrana eritrocitária, pelo risco de desencadear crise aplástica, (Young, 1988) e nos pacientes portadores do vírus HIV, por possibilitar a ocorrência de aplasia eritrocitária pura crônica. Naqueles que, apesar de imunocompetentes, são portadores de doença hereditária de glóbulos vermelhos, a evolução pode ser para anemia aplástica grave. Embora a aplasia transitória seja, geralmente, auto-limitada, os pacientes podem apresentar-se extremamente debilitados e evoluir para óbito, caso a correção da anemia não seja iniciada prontamente (Valera et al., 2000).

Em um estudo realizado em voluntários, durante a primeira fase de infecção do eritrovírus, se observa uma intensa diminuição de células precursoras eritróides na medula óssea de doadores saudáveis 10 dias depois da inoculação do eritrovírus. Posteriormente ocorre a redução dos reticulócitos em sangue periférico, acompanhada de um ligeiro decréscimo de hemoglobina durante a segunda semana após a inoculação. As alterações hematológicas surgem de 7 a 10 dias, e estende a fase de viremia, nesta fase ocorre a replicação viral intranuclear e posteriormente a lise celular (Potter et al., 1987).

Uma vez que os pacientes portadores de anemias hemolíticas crônicas têm uma acentuada hiperplasia compensatória da série eritróide, a infecção pelo eritrovírus promove uma destruição das células eritróides imaturas, com conseqüente redução da produção de eritrócitos, levando a uma acentuação da anemia já existente. Leucócitos e plaquetas geralmente não são afetados, mas ocasionalmente pode-se notar leucopenia e/ou trombocitopenia, com possível presença de linfócitos atípicos e eosinofilia (Saarinem et al., 1986).

A infecção pelo eritrovírus foi caracterizada através de várias manifestações clínicas, como febre, sintomas de gripe, artropatia e sintomas gastrointestinais. A freqüência de febre e artropatia era substancialmente mais alta em adultos, cerca de 75% e 62.5%, respectivamente. Em relação ao rash cutâneo, não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0.1432$) entre adultos e crianças, que apresentaram 53.1% e 35.6%, respectivamente (Oliveira et al., 2002).

Em alguns animais, foi verificado que o eritrovírus causa uma infecção persistente que conduz a MO a uma leucopenia letal com desregulação da eritropoiese e da megacariopoiese (Segovia et al., 1999).

Após um período de incubação de 5 a 7 dias, ocorre uma fase prodrômica caracterizada por dor de cabeça, mal estar, febre, e sintomas respiratórios associados com uma alta carga viral. Este é freqüentemente seguido de uma semana e, algumas vezes, mais tarde por uma erupção cutânea e uma artralgia transitória. Nos adultos os sintomas tardios, ocorrem comumente em mulheres (Reid et al., 1985).

3.12.1 Eritema Infeccioso (EI)

O eritema infeccioso é a infecção causada pelo eritrovírus humano mais freqüentemente reconhecida, geralmente em crianças de 4 a 10 anos de idade. Caracteriza-se por febre, cefaléia e eritema facial intenso, circunscrito, com aparência de face esbofetada que, após alguns dias, dissemina-se para tronco e membros, e freqüentemente confunde-se com rubéola (Veronesi e Focaccia, 2002).

3.12.2 Crise Aplástica Transitória (CAT)

Pessoas com menor quantidade de eritrócitos por uma série de fatores, tais como: deficiência de ferro, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), doença falciforme, esferocitose, talassemia e anemia hemolítica auto-imune (AHAI) têm maior risco de desenvolverem crise aplástica transitória (CAT) por eritrovírus. O vírus bloqueia transitoriamente a produção de eritrócitos, com risco de morte, embora a maior parte dos casos apresente recuperação em duas semanas, mas com necessidade de múltiplas transfusões inicialmente. Há redução abrupta da hemoglobina, dos reticulócitos e precursores eritróides na medula óssea, com ou sem plaquetopenia e leucopenia. A redução abrupta da hemoglobina cursa com anemia aguda, a presença do quadro de anemia aguda pode causar insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral por hipofluxo ou baixo fluxo cerebral e seqüestro esplênico agudo, pode haver plaquetopenia e leucopenia (Saarinen et al., 1986). Durante a CAT, o paciente está agudamente infectado e elimina enormes quantidades de vírus por via respiratória, constituindo-se numa fonte

potencial de infecção nosocomial. Nesta fase, os pacientes têm alta probabilidade de transmitir a infecção para outros indivíduos e devem ser mantidos em isolamento respiratório (Setúbal et al., 2001).

Em 1981, na cidade de Londres, foi descrita a viremia por eritrovírus em duas crianças, além destes dois casos, este estudo demonstrou a presença dos antígenos do eritrovírus e/ou de anticorpos IgM indicativos de infecção aguda em mais de 800 soros estocados, relatando dados de um estudo retrospectivo. Foram encontradas antigenemia ou soroconversão em seis outras amostras, todas de crianças portadoras de doença falciforme, imigrantes da Jamaica, que haviam sido admitidas com CAT (Pattison, 1981). Também em 1981, a soroconversão e elevação significativa dos títulos ou a presença de partículas virais foram demonstradas em 24 de 28 soros obtidos de crianças jamaicanas portadoras de anemia falciforme com CAT, com a qual o vírus foi finalmente associado como agente causal. Atualmente, o eritrovírus é considerado a mais importante causa de CAT em doença falciforme (Setúbal et al., 2001).

3.12.3 Aplasia Pura de Serie Vermelha (APSV)

O tropismo do vírus para as células precursoras da série vermelha é devido à presença do receptor para o vírus, o antígeno p. Após a síntese da proteína NS1 ocorre o efeito citopático e citotóxico que causa a lise dos eritroblastos, desta forma levando a eritroblastopenia e a reticulopenia (Young et al., 2004).

A infecção por eritrovírus pode ser persistente nos imunossuprimidos. Estes indivíduos apresentam déficit isolado e/ou combinado de imunidade. A

repercussão mais crítica é nos pacientes com imunossupressão da imunidade humoral, na qual há redução ou ausência da síntese de anticorpos. Nos casos em que há disfunção dos anticorpos, *rashes* e artropatias se desenvolvem devido à deposição de complexos e anticorpos na pele e nas articulações. Os pacientes têm fadiga e palidez por anemia, a qual pode ser grave, prolongada ou recorrente. Em pacientes com HIV, o uso de anti-retroviral pode melhorar os sintomas, como exemplo o medicamento Zidovudina (AZT). O tratamento da anemia pode ser feito com a aplicação intravenosa de gamaglobulina humana padrão, que geralmente contém anticorpos em quantidade suficiente para neutralizar os anticorpos e corrigir a anemia (Setúbal et al., 2001).

3.12.4 Hidropisia Fetal

A primeira associação entre infecção por eritrovírus e complicações na gravidez foi descrita em 1984, quando se demonstrou presença de imunoglobulina M (IgM) anti-eritrovírus em fetos que ocorreu durante uma epidemia de eritema infeccioso (Brown et al., 1984).

Embora o eritrovírus não tenha efeito adverso para a saúde da mulher grávida, a transmissão transplacentária para o feto é importante causa de morte fetal intra-uterina. A maioria dos danos secundários ao vírus ocorre no primeiro trimestre de gravidez. O mecanismo pelo qual o feto desenvolve a hidropisia fetal é similar ao que ocorre na chamada crise aplástica, em que a infecção viral determina anemia grave, precipitando a falência cardíaca, anasarca e morte (Brown et al., 1984).

A taxa de transmissão do vírus para o feto é de 33% e o risco de morte pode ser de até 9%. A manifestação clínica mais comum é a hidropisia fetal não imune. Muitos casos de hidropisia causam ao feto anemia aplástica, falência cardíaca e miocardite. O eritrovírus é responsável por 10% dos casos de hidropisia fetal por anemia hemolítica. A imunidade após infecção está presente em 50% das mulheres em idade fértil soropositivas (IgG) com ausência de IgM, indicando infecção prévia assintomática ou sintomática (Xu et al., 2003).

Na transmissão vertical, o eritrovírus ultrapassa a barreira placentária e invade o sistema hematopoiético fetal, acometendo as células precursoras eritróides, nas quais ocorre a replicação do eritrovírus. A destruição destas células pelo eritrovírus durante o período de viremia provoca a redução das células eritróides afetando diretamente a concentração da hemoglobina fetal. Quando a infecção ocorre até a vigésima semana de gestação, período em que a resposta imune fetal ainda não é capaz de controlar uma infecção e esta coincide com intensa atividade metabólica dos precursores eritróides, situação em que o eritrovírus destrói um grande número de células, aumentando a frequência dos abortos por hidropisia fetal (Kailasam et al., 2001).

Durante o desenvolvimento fetal, alguns anticorpos podem provocar hemólise no feto por diversas razões; em casos muito graves desenvolve-se hidropisia fetal, caracterizada por ascite, edema generalizado, hepatomegalia, esplenomegalia e prognóstico fatal (Amico et al., 2003).

Os fetos infectados pelo eritrovírus desenvolvem, provavelmente, uma infecção persistente com lesão das células hematopoiéticas

eritróides, ocorrendo a anemia, insuficiência cardíaca e hidropisia fetal (Jordan et al., 1996).

Os casos de hidropisia fetal não imune devem obrigatoriamente, ser avaliados com a inclusão do teste para diagnóstico de infecção pelo eritrovírus (Gonçalves et al., 2003). O conhecimento da prevalência de anticorpos IgG anti eritrovírus em gestantes é importante, pois durante a infecção aguda, o eritrovírus pode ser transmitido verticalmente para o feto, podendo ocasionar hidropisia e morte fetal (Young et al., 2004).

Em um estudo realizado no Rio de Janeiro entre 2003 e 2006, o eritrovírus foi implicado como o causador de 23,5% de hidropisia fetal em gestantes em acompanhamento pré-natal (Silva et al., 2006).

3.12.5 Artropatia

Artropatia pode ser complicação de eritema infeccioso ou apresentação primária de infecção por eritrovírus; cerca de 8% das crianças infectadas têm artralgia. Entretanto, a artralgia é mais comum nos adolescentes e nos adultos com infecção por eritrovírus, com uma prevalência de até 60%. É duas vezes mais freqüente em mulheres do que em homens, representando cerca de 59% e 30% respectivamente (Aubin et al., 2000).

A infecção pelo eritrovírus pode provocar artropatia transitória e crônica, tem sido considerado um agente etiológico potencial para a artrite reumatóide. O DNA do eritrovírus foi detectado em vários estudos realizados com amostras de membrana e líquido sinovial de pacientes com artrite (Cassinotti et al., 1998;

Dijkmans et al., 1988; Franssila e Hedman, 2006; Kerr et al., 1995; Nikkari et al., 1995; Pallier et al., 1997; Saal et al., 1992; Zakrzewska et al., 2001).

3.12.6 Síndrome “luvas e meias”

O eritrovírus está associado à síndrome *gloves and socks*, caracterizada por eritema e edema simétrico em pés e mãos, mais freqüentemente em adultos jovens. Gradualmente evolui para petéquias e púrpura, podendo chegar à formação de vesículas e bolhas. O marco desta síndrome é a presença de *rash* delimitando o umbigo e tornozelo. Concomitantemente pode haver artralgia, febre, ou ambos, e a resolução dos sintomas ocorre em uma a três semanas. Esta síndrome também pode ser causada pelo vírus da hepatite B, citomegalovírus, herpesvírus humano 6, coxsackievírus B e drogas (Bagot et al., 1991).

3.12.7 Síndrome hemofagocítica

A síndrome hemofagocítica associada a vírus (SHAV) é uma doença rara caracterizada por ativação e proliferação de macrófagos dentro na medula óssea (MO). Macrófagos ativados na MO fagocitam eritrócitos, leucócitos, plaquetas e seus precursores causando citopenias. Os critérios diagnósticos desta síndrome incluem febre, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia e *rash*. Do ponto de vista laboratorial, pode haver pancitopenia, disfunção hepática (aquelas causadas pelo acometimento das células hepáticas), hipertrigliceridemia, coagulação intravascular disseminada e anormalidades de

MO. Em geral está associada a várias infecções virais, como vírus Epstein-Barr (EBV) e eritrovírus (Boruchoff et al., 1990).

A ocorrência do eritrovírus associado com a síndrome hemofagocítica ocorre com uma considerável frequência, não só em crianças e adultos imunossuprimidos, mas também em adultos saudáveis (Shirono et al., 1995).

3.12.8 Citopenias

A citopenia é a redução do número de um determinado grupo de células, que pode ser classificado de algumas formas:

- Anemia: define-se como uma redução da massa eritrocitária circulante ou da concentração de hemoglobina no sangue. Em 1975, a Organização Mundial de Saúde definiu a anemia como sendo a redução da hemoglobina para valores inferiores a 13,0 g/dL para homens, 12 g/dL para mulheres e crianças entre seis e 14 anos e 11 g/dL para gestantes e crianças entre seis meses e seis anos de idade. As principais adaptações à anemia ocorrem no sistema cardiovascular (com aumento do volume sistólico e taquicardia) e na curva de dissociação de O₂ da hemoglobina. Alguns pacientes com anemia grave podem não ter sinais nem sintomas, enquanto outros, com anemia leve, podem ter incapacidade intensa (Hoffbrand et al., 2004).

- Leucopenia: é a redução no número de leucócitos no sangue. Os leucócitos são responsáveis pelas defesas do organismo. A diminuição dos glóbulos brancos, em geral, está relacionada a infecções por vírus ou por bactérias. A influência de determinados medicamentos e algumas neoplasias também podem ser causas de leucopenia. Geralmente, considera-se

como leucopenia a contagem dos leucócitos menor que $4.000/\text{mm}^3$ (Amico et al., 2003).

- Trombocitopenia: ou plaquetopenia é a redução do número de plaquetas no sangue. É considerada quando a quantidade de plaquetas no sangue é inferior a $150.000/\text{mm}^3$. Pacientes com trombocitopenia possuem maior tendência a apresentar fenômenos hemorrágicos, a depender da causa da trombocitopenia e do número total de plaquetas (Amico et al., 2003).

A infecção pelo eritrovírus pode causar citopenias graves e pode sugerir uma recaída leucêmica em pacientes com neoplasias hematológicas, quando apresentam citopenias (Lindblom et al., 2008).

3.12.9 Persistência do vírus em pessoas saudáveis

A incapacidade de desenvolver uma eficiente resposta de neutralização imune, como foi observada principalmente em indivíduos imunossuprimidos, mas também em indivíduos saudáveis, pode resultar na incapacidade de eliminar o vírus, levando à infecção persistente e à possível ocorrência de doenças crônicas, tais como anemia crônica ou artropatias (Heegaard et al., 2002a). A persistência viral tem sido observada em tecidos, incluindo a medula óssea, líquido sinovial e pele, mas, nesses casos, a patogenicidade do vírus permanece incerta (Heegaard et al., 2002) e (Hokynar et al., 2002).

Alguns estudos sugerem que o eritrovírus pode persistir em indivíduos imunocompetentes, como doadores de sangue. Em 2005, Lefrère et al., demonstraram, em um estudo de coorte, que a persistência de níveis baixos do DNA do eritrovírus, relatada até então, por estudos transversais, é freqüente

em pacientes transfundidos e que o vírus pode permanecer detectável durante vários anos após a infecção em indivíduos imunocompetentes.

A infecção primária está relacionada à viremia alta ($>10^{10}$ cópias por mililitro) e geralmente de curto prazo, o marcador de infecção aguda (IgM) desaparece em seis meses, enquanto que o IgG persiste ao longo do tempo e confere imunidade protetora (Young et al., 2004).

Conforme Lefrère et al., em indivíduos imunocompetentes o eritrovírus pode ser detectável vários anos após a infecção. A persistência de infecção pelo vírus em medula também foi documentada em indivíduos imunocompetentes com ou sem sintomas.

Estudos recentes têm demonstrado que grande parte da população adulta mostra evidências de exposição anterior ao eritrovírus. Embora a resposta imune seja capaz de neutralizar a infecção ao longo da vida e proporcionar proteção contra o vírus, em muitos indivíduos ocorre à persistência viral no sangue ou outros tecidos, independente da imunocompetência do hospedeiro (Candotti, 2007). A prevalência de DNA em indivíduos adultos saudáveis é de 0,5% a 9,0%, e a frequência da viremia foi estimada de 1:13 a 1:180, conforme estudo realizado em amostras de soro ou plasma por Lefrère et al., e Candotti et al., entre os anos de 1999 a 2005, em cerca de 2.500 doadores saudáveis. Embora o anticorpo seja prevalente em grande parte da população, a presença de DNA viral ou viremia é rara (Lefrère et al., 2005).

3.13 Diagnóstico do vírus

Devido à citotoxicidade celular, o isolamento do eritrovírus em cultura de células é inviável, desta forma é escassa a utilização de métodos de isolamento do vírus com a finalidade de diagnóstico (Heegaard e Brown, 2002).

Inúmeros métodos têm sido desenvolvidos para a detecção direta do eritrovírus: no soro o vírus pode ser detectado por hemaglutinação (Brown e Cohen, 1992; Cossart et al., 1975; Curry et al., 2006); antígenos podem ser detectados com anticorpos monoclonais por ensaio imunoenzimático ou *immunoblot* (Manaresi et al., 1999; Schwarz et al., 1988).

A presença do ácido nucléico viral no soro pode ser detectada por hibridação direta em formato *dot blot*, que é sensível o bastante para detectar indivíduos com infecção aguda com altas cargas virais, ou por PCR, que é muito mais sensível e pode detectar, por conseguinte, também baixa carga viral (Koch e Adler, 1990; Koch et al., 1990).

Os métodos sorológicos estão disponíveis para detecção de anticorpos específicos para o eritrovírus (Broliden et al., 2006, Cohen et al., 1983; Kaikkonen et al., 1999; Soderlund et al., 1995a; Soderlund et al., 1995b; Soderlund et al., 1997a), a infecção aguda pelo eritrovírus é normalmente diagnosticada pela presença de anticorpos IgM.

Um estudo experimental de voluntários adultos saudáveis demonstrou que após exposição ao vírus, a viremia declinou rapidamente com o aparecimento de anticorpos IgM específicos durante a segunda semana após a inoculação (Anderson et al., 1985). Os anticorpos IgM começam a diminuir durante o segundo mês do início das manifestações clínicas, mas podem

persistir por vários meses (Anderson et al., 1986 e Anderson et al., 1985), já os anticorpos IgG aparecem ao final da terceira semana.

Os anticorpos IgG específicos para VP1 e para os epítomos conformacionais de VP2 podem persistir por toda a vida, enquanto os anticorpos IgG que reconhecem os epítomos lineares de VP2 são expressos apenas durante a fase aguda da infecção pelo eritrovírus (Soderlund et al., 1995b). Além disso, a avidéz de IgG e a especificidade do tipo do epítomo podem ser usadas para identificar a infecção primária (Enders et al., 2007; Kaikkonen et al., 1999; Kaikkonen et al., 2001; Soderlund et al., 1995a; Soderlund et al., 1995b).

No diagnóstico em imunodeprimidos, a metodologia da PCR é preferencial (ou complementar), caso seja utilizado o diagnóstico por sorologia. Resultados de PCR positivo para eritrovírus no sangue ou na medula óssea podem indicar infecção aguda. Entretanto, os níveis detectáveis do DNA do eritrovírus podem permanecer na MO e no soro por longos períodos, mesmo em indivíduos imunocompetentes. A utilização da PCR quantitativa pode ser útil para monitorar as infecções agudas, no entanto, esta questão ainda continua em consensamento (Enders et al., 2007).

O diagnóstico da infecção em pacientes imunocompetentes, muitas vezes, pode ser feito clinicamente. Além disso, o achado de proeritroblastos gigantes ou grandes basófilos com inclusões intranucleares e proeminentes vacúolos citoplasmáticos na medula óssea de um indivíduo com crise aplástica é patognomônico de infecção pelo eritrovírus (Kurtzman et al., 1987). O diagnóstico é confirmado pela detecção de anticorpos IgG e IgM no soro,

presença do DNA viral no sangue periférico ou na medula óssea pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Heegaard et al., 2002).

Em indivíduos imunossuprimidos incapazes de produzir anticorpos neutralizadores, o eritrovírus persiste no sangue ou na medula óssea (MO), com ou sem anemia (Kurtzman et al., 1987; Kurtzman et al., 1988; LaMonte et al., 2004). O DNA do eritrovírus também pode persistir na MO de pacientes imunocompetentes com artropatias recorrentes ou crônicas (Sasaki et al., 1995) e, com menor frequência, em indivíduos saudáveis (Cassinotti et al., 1997; Heegaard e Brown, 2002).

De fato, Lundqvist et al., em um estudo realizado com 50 indivíduos reumáticos, não detectou a presença do DNA do eritrovírus em sangue, mas foi detectado em 26% das amostras de MO (Lundqvist et al., 2005), em contraste com uma prevalência na MO de até 9% entre indivíduos saudáveis soropositivos como relatado anteriormente (Cassinotti et al., 1997; Heegaard e Brown, 2002) e de 4% entre os pacientes soropositivos com doenças hematológicas (Lundqvist et al., 1999). No entanto, essa diferença pode ser devido a diferentes métodos de detecção, uma vez que os pacientes e controles saudáveis não foram estudados em paralelo dentro do mesmo estudo (Lundqvist et al., 2005).

No sangue dos indivíduos imunocompetentes a eliminação completa do vírus, é muitas vezes lenta (Musiani et al., 1995). Lindblom et al., avaliaram a cinética da eliminação viral após a infecção aguda pelo eritrovírus em 5 indivíduos imunocompetentes com sintomas típicos, pelo método da PCR quantitativa uma rápida diminuição na carga viral foi observada,

coincidentemente com o desenvolvimento de anticorpos IgG e resolução dos sintomas clínicos. No entanto, os níveis de DNA permaneceram detectáveis em 4/5 pessoas por 128 semanas de seguimento (Lindblom et al., 2005).

Em estudos com gestantes, Enders et al., observaram uma diminuição drástica na carga viral durante as primeiras duas semanas de infecção (Enders et al., 2006). Os níveis de DNA não diferiram entre pacientes sintomáticos e assintomáticos, e os sintomas eram principalmente auto-limitado apesar da persistência do DNA do eritrovírus. Em um paciente, no entanto, que manteve a artropatia por um ano e meio, níveis elevados de DNA (~ 105 GEQ / ml) no soro foram vistos durante mais de 322 dias. Neste estudo, o DNA do eritrovírus foi detectado por mais de 5 meses em 20/22 pacientes (Enders et al., 2006).

Candotti et al., detectaram por PCRs qualitativos, quantitativos e real-time um baixo nível de persistência do DNA viral no sangue de aproximadamente 1% dos imunocompetentes e de doadores de sangue assintomáticos, apesar da presença de anticorpos IgG específicos (Candotti et al., 2004). Números semelhantes foram relatados em mulheres grávidas por Lefrère et al., em 2005.

Em indivíduos politransfundidos, a prevalência do DNA do eritrovírus pode ser maior e persistir, juntamente com anticorpos IgG, por até 5 anos (Lefrère et al., 2005).

O diagnóstico da infecção por eritrovírus pode apresentar dificuldades no paciente imunodeprimido. Embora a prevalência de anticorpos IgM e IgG pareça ser maior nos pacientes com doenças de imunossupressão, tais como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), do que na população em geral, num determinado paciente com aplasia pura de células vermelhas, os

anticorpos podem ser totalmente ausentes, ou se apresentarem apenas sob a forma de baixos títulos de IgM. O diagnóstico exige técnicas de maior sensibilidade. Neste contexto, o recurso laboratorial pode ser apoiado pela pesquisa do vírus através de PCR, hibridização *in situ*, ou de proteínas no *dot blot*, e imunohistoquímica com anticorpos monoclonais em tecidos de amostras colhidos dos pacientes em casos específicos e selecionados (Setúbal et al., 2001).

Em pacientes imunossuprimidos com infecção crônica e em pacientes com crise aplástica transitória, o exame de DNA viral é importante para o diagnóstico de infecção por eritrovírus B19. Estes pacientes podem não apresentar IgM ou IgG no soro, mas persistem com alta taxa de transmissão. Neste contexto faz-se útil a pesquisa propriamente do vírus e não do seu anticorpo. Um dos métodos mais empregados é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); sua sensibilidade e especificidade podem variar, mas ainda assim a técnica de PCR é mais sensível que a pesquisa de IgM (Hong et al., 1998).

Os pacientes imunossuprimidos podem ter uma carga viral alta dentro da célula, porém o mecanismo de demonstrar reatividade pela presença de anticorpos e pela IgM, no caso os pacientes imunossuprimidos, tem redução ou não tem IgM, o que favorece então o papel de pesquisar o vírus por outros métodos. Portanto, faz-se necessário que outros métodos complementem a abordagem da investigação diagnóstica. O paciente imunossuprimido tem uma debilidade de resposta imune humoral, o que faz com que não tenha IgM ou tenha em quantidade pequena.

Nos estudos de Söderlund et al., o DNA do vírus foi detectado pelo método de nested PCR, na sinóvia de indivíduos adultos com trauma comum, e com evidência sorológica de imunidade pré-existente (Soderlund et al., 1997b). Este achado mostrou que a simples detecção do DNA do eritrovírus no tecido sinovial não pode ser usada como um marcador diagnóstico da artrite crônica, apesar de não excluir a possibilidade de o eritrovírus desempenhar um papel importante na patologia dessas doenças. Também as associações de outras doenças com a presença do eritrovírus nos tecidos correspondentes têm sido analisadas.

O DNA do eritrovírus e as proteínas do capsídeo foram detectados na pele de um paciente com EI (Schwarz et al., 1994), e a presença de componentes virais concluiu que existe um papel direto do eritrovírus na formação da erupção exantemática na infecção pelo eritema. Posteriormente, o DNA do eritrovírus foi detectado também em biópsias de pele provenientes de indivíduos com urticária crônica (Vuorinen et al., 2002). Em um estudo de caso-controle, foram realizadas biópsias de pele de adultos saudáveis para serem estudadas em paralelo na detecção do DNA do eritrovírus. Os resultados mostraram a presença de uma grande proporção do DNA do vírus em amostras de pele nos controles saudáveis (Vuorinen et al., 2002).

No estudo realizado por Söderlund et al., em 1997 foi sugerido que a persistência do DNA do vírus não está restrita ao tecido sinovial (Soderlund et al., 1997b). Posteriormente, além da pele e membrana sinovial, a persistência do genoma do eritrovírus tem sido detectada em vários tipos de tecidos, por exemplo, glândula músculos, testículos, fígado, amígdalas, cérebro, salivar e

coração (Baskan et al., 2007; Chevrel et al., 2000; De Stefano et al., 2003; Deiss et al., 1999; Gray et al., 1998; Hobbs, 2006; Lotze et al., 2004; Manning et al., 2007; Norja et al., 2006).

3.14 Tratamento

Nenhuma droga antiviral específica contra a infecção pelo eritrovírus está disponível. Na hidropisia fetal a transfusão sanguínea intra-uterina, intraperitoneal ou por cordocentese pode ser indicada (Dembinsk et al., 2002), mas como a recuperação espontânea pode ocorrer, as recomendações específicas para a realização deste procedimento de alto risco não foram estabelecidas, além disso, alguns autores relatam que a espera pela cura espontânea é um recurso que deve ser utilizado, devido à maior chance de resolução do caso e menores riscos para o feto, pois alguns pacientes se recuperam espontaneamente, sem qualquer tratamento (Shirono et al., 1995 e Forestier et al., 1999). A eficácia da administração profilática de imunoglobulina para a mãe não foi determinada (Ghidini e Lynch, 1994).

Em geral, o eritema infeccioso é autolimitado e não requer tratamento específico. Situações clínicas onde o contexto é mais complexo exigem uma abordagem clínica aprofundada e baseada em evidências científicas. Os pacientes com artrite e artralgia podem necessitar de controle da dor e do edema através do uso de drogas, como os antiinflamatórios não esteróides (Dembinsk et al., 2002).

Os pacientes com crise aplástica necessitam transfusão de hemácias na vigência da anemia. A taxa de hemoglobina varia, mas é importante salientar

que, na instalação da anemia aguda, os pacientes não costumam ter tolerância cardiovascular e, portanto, a correção visa manter a hemoglobina em níveis por volta de 10g/dL. Nas situações onde os pacientes não têm anticorpos ou apresentam uma resposta inadequada, tal como a aplasia crônica da série vermelha grave, pode ser necessária infusão de gamaglobulina humana (Sato et al., 1991).

A gamaglobulina humana é eficaz, porém, como um hemoderivado, contém proteínas, o que pode precipitar *rash* e artropatia. Não existe ainda uma vacina disponível licenciada para a prevenção da infecção (Young e Brown, 2004).

4. MÉTODO

4.1 Casuística e espécimes biológicos

Durante o período compreendido entre setembro de 2006 e maio de 2009, foram selecionados 285 indivíduos procedentes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), consistindo de 120 pacientes apresentando citopenias de origem desconhecida (grupo 1), 45 doadores saudáveis de medula óssea (grupo 2) e 120 pacientes com neoplasias hematológicas (grupo 3).

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado em estudo piloto realizado entre dezembro de 2003 e março de 2005, com 69 indivíduos oriundos do HCFMUSP. Neste subgrupo a frequência do vírus nas amostras de medula óssea foi de 17,3% (12/69) em pacientes com doenças hematológicas. Utilizamos como população geral de estudo um contingente estimado em 11 milhões de habitantes residentes no município de São Paulo, e um contingente estimado em 40 milhões de habitantes residentes no Estado de São Paulo (IBGE, 2009). Desta forma, nós assumimos um alfa de 0.05 e 80% de poder.

A infecção por eritrovírus é sazonal, assim casos e controles foram recrutados na mesma semana e cada grupo foi separado e analisado por idade. Casos e controles somente se tornaram elegíveis a participar deste estudo quando os seus responsáveis legais foram capazes de compreender e aceitar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os participantes ou seus responsáveis legais foram convidados a preencher um questionário padronizado que foi realizado pelo pesquisador. Todos os espécimes foram obtidos para propósitos de diagnóstico.

O questionário focalizou especialmente questões sócio-demográficas e história médica.

Foi critério de inclusão para o grupo 1 pacientes com uma ou mais citopenia de origem desconhecida, ou seja, que apresentava anemia, plaquetopenia ou leucopenia sem diagnóstico concluído. Como roteiro de investigação de citopenia o HCFMUSP segue o seguinte protocolo:

- Investigação de causas extrínsecas da medula óssea: Medicamentos, infecções virais (hepatite B, hepatite C, HIV, toxoplasmose, citomegalovírus), colagenoses, doenças auto-imunes, hiperesplenismo e disfunção de tireóide.

- Investigação de causas intrínsecas da medula óssea: pancitopenia com reticulocitopenia, neutropenia (contagem de neutrófilos inferior a $1000/\text{mm}^3$), bicitopenias, anemias normocíticas e normocromicas, dosagem de vitamina B12 e dosagem de ácido fólico.

Para o grupo 2 foi critério de inclusão ser doador saudável de medula óssea.

E para o grupo 3 pacientes com neoplasias hematológicas crônicas, tais como: Linfoma, Leucemia Linfóide Crônica (LLC), Síndrome Mielóide Crônica (SMC), Síndrome Mielodisplásica (SMD), Leucemia Mielóide Crônica (LMC) e Tricocitoleucemia “Hairy Cell” (HC), diagnosticadas por resultados de mielogramas, exames de citogenética e citometria de fluxo, conforme protocolo da instituição para conclusão diagnóstica.

Os indivíduos foram recrutados nos seguintes locais: enfermaria de clínica médica da disciplina de hematologia da FMUSP; Hospital Dia do transplante de medula óssea e no momento da doação de medula óssea de

doadores saudáveis. De cada participante do estudo foi coletada uma amostra de sangue periférico e uma amostra de medula óssea.

As amostras de sangue periférico foram obtidas por punção venosa, via antecubital, com sistema de coleta a vácuo em tubo de 5ml com anticoagulante EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético). As amostras de medula óssea dos indivíduos com neoplasias hematológicas foram obtidas durante o processo de doação de MO, por punção aspirativa pela crista ilíaca posterior através de aspirações por agulhas de Thomas, dos doadores saudáveis foram obtidas por múltiplas aspirações por agulhas de Thomas após procedimento específico de sedação no centro cirúrgico e colocadas em tubo de 5ml com anticoagulante EDTA. As amostras de sangue periférico e medula óssea foram coletadas simultaneamente e processadas em até 24 horas após a coleta, as amostras que não puderam ser processadas nesse período, foram armazenadas congeladas à -20°C, conforme orientação de armazenamento, descrita por Patou et al., em 1993.

Este projeto foi submetido e aprovado pela comissão de ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPESQ) da diretoria clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 576/06, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 Procedimentos específicos

4.2.1 Pré-analítico

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas no tubo original, em rotação 800g por 10 minutos à temperatura de 18°C. Após centrifugação, a

amostra foi manipulada em fluxo laminar, obedecendo aos critérios de segurança para evitar qualquer tipo de contaminação. Foram armazenadas 2 alíquotas do plasma de cada indivíduo, em microtubos de 1ml, devidamente identificados. As amostras de medula óssea foram armazenadas em microtubos de 1ml, seguindo os mesmos critérios citados anteriormente.

4.2.2 Extração do DNA para amostras de sangue periférico

O protocolo para extração de DNA das amostras de plasma foi realizado com o kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha).

As amostras que necessitaram de congelamento foram descongeladas em temperatura ambiente por 30 minutos.

Em cada tubo de 1ml, foram adicionados 20µl de protease, 200µl da amostra de plasma e 200µl de AL (tampão de lise). Após homogeneização em vórtex por 15 segundos, as amostras foram incubadas em banho-maria a 56°C, durante 10 minutos. Após esse período, foram centrifugadas rapidamente a 8.000 rpm, para remoção de gotas no interior da tampa do tubo (*spin*). Em seguida, foram adicionados em cada tubo 200µl de etanol (96 – 100%), agitando-se durante 15 segundos no vórtex, e centrifugando brevemente (*spin*). A solução resultante foi transferida para o dispositivo da coluna QIAamp DNA Blood Mini Kit® e centrifugada a 8.000 rpm durante um minuto. O dispositivo com a coluna foi removido e recolocado em um dispositivo limpo. Foram adicionados 500µl de AW1 (tampão de lavagem 1) ao dispositivo com a coluna, que foram centrifugados a 8.000 rpm durante um minuto. O procedimento de lavagem foi repetido com 500µl de Tampão AW2 (tampão de lavagem 2),

seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante três minutos. O produto de DNA extraído da coluna foi eluído pela adição de 100µl de AE (tampão de eluição: 10 mM Tris·Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0), em um tubo de 1,5ml. Após incubação de três minutos em temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 8.000 rpm durante um minuto. O produto obtido foi armazenado a -20°C.

4.2.3 Extração do DNA para amostras de medula óssea

Para a extração do DNA das amostras de medula óssea, foi desenvolvido, em conjunto com o suporte técnico da Qiagen dos Estados Unidos, um protocolo para obtenção de uma lise mais eficiente e melhorar a extração do DNA viral das amostras de medula óssea. A metodologia utilizada fornece maior rendimento, menor concentração de interferentes e garantia da integridade da cadeia da biomolécula.

O protocolo para extração de DNA das amostras de medula óssea foi realizado com o kit comercial QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Em cada tubo de 1ml, foram adicionados 20µl de proteinase K, 200µl da amostra de medula óssea e 180 µl de ATL (tampão de lise para tecidos).

Após homogeneização em vórtex por 15 segundos, as amostras foram incubadas em banho-maria a 56°C, durante 10 minutos. Após esse período, foram centrifugadas rapidamente a 8.000 rpm, para remoção de gotas no interior da tampa do tubo (*spin*). Em seguida, foi adicionado em cada tubo 200µl de AL (tampão de lise). Foi realizada homogeneização em vórtex por 15 segundos, as amostras foram incubadas novamente em banho-maria a 56°C,

durante 10 minutos. Após, foram centrifugadas rapidamente a 8.000 rpm, para remoção de gotas no interior da tampa do tubo (*spin*). Em seguida, foram adicionados em cada tubo 200µl de etanol (96 – 100%), agitando-se durante 15 segundos no vórtex, e centrifugando brevemente (*spin*). A solução resultante foi transferida para o dispositivo da coluna QIAamp DNA Mini Kit® e centrifugada a 8.000 rpm durante um minuto. O dispositivo com a coluna foi removido e recolocado em um dispositivo limpo. Foram adicionados 500µl de AW1 (tampão de lavagem 1) ao dispositivo com a coluna, que foram centrifugados a 8.000 rpm durante um minuto. O procedimento de lavagem foi repetido com 500µl de Tampão AW2 (tampão de lavagem 2), seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante três minutos. O produto de DNA extraído da coluna foi eluído pela adição de 100µl de AE (tampão de eluição: 10 mM Tris·Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9,0), em um tubo de 1,5ml. Após incubação de cinco minutos em temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 8.000 rpm durante 3 minutos. O produto obtido foi armazenado a -20°C.

A qualidade e a concentração dos produtos de DNA extraídos foram avaliadas por meio de duas técnicas: espectrofotometria de absorção no ultravioleta (EUV) e eletroforese em gel de agarose a 1% (EGA). Os ácidos nucleicos possuem uma banda de absorção muito intensa e característica em 260 nm. Foi utilizado o espectrômetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) para fornecer a concentração da amostra e a sua pureza. Foi considerada como aceitável para o estudo, os produtos de DNA que apresentam uma razão entre 1,8 e 2,0.

A EGA foi utilizada para avaliar a integridade do DNA genômico, para isto, adicionou-se 1µl de 10X Blue Juice (Invitrogen™) a cada 2 µl do produto de DNA, para acompanhamento da corrida no gel de agarose (agarose low melting, Sigma) a 1% corado por brometo de etídio (Amresco) e a corrida foi feita em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 5X a 100 Volts por 45 minutos. A imagem digital foi capturada sob luz ultravioleta de 302 nm em transiluminador Eagle Eye® (Stratagene), e foto documentado, foram aceitos apenas os produtos de DNA que apresentaram bandas íntegras (Figura 5).

Figura 5. Fotografia de uma corrida de DNA genômico, para controle da corrida foi usado um marcador (M) de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen®, USA).

4.2.4 Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (“primers”)

A sequência completa do eritrovirus está disponível em bancos de dados genômicos públicos GenBank sob o número de acesso [NC000883](#).

Essa sequência foi utilizada como base para o desenho dos “primers” para amplificação dos fragmentos. O programa Primer3™ (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) foi utilizado para desenhar os iniciadores. Os iniciadores foram denominados P0, 101-OR e P5.

A amplificação do DNA do vírus nas amostras de plasma e medula óssea foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) correspondente a um fragmento de 690 pares de bases, nesta primeira etapa foram empregados os “primers” P0 e 101-OR. Em seguida procedeu-se a segunda etapa pelo método de Semi-Nested PCR (SN-PCR) utilizando-se novos “primers” capazes de amplificar 415 pares de bases (pb) da região viral NS1 dos 3 genótipos conhecidos, nesta reação foram utilizados os “primers” P0 e P5 (tabela 1), que amplificam um fragmento interno ao já amplificado.

Tabela 1 - Sequências nucleotídicas dos “primers” para amplificação de fragmentos do eritrovírus e suas posições

Nome	Região	Localização (DNA)	Seqüência dos "primers" 5' - 3'
P0	NS1	1186 - 1208	F – GAAGTTTTCAAATWCAAAGTGC
101-OR	NS1	1855 - 1876	R – TTATTGCCCGAGTTTTCATAGTG
P5	NS1	1576 - 1600	F – CTAAAATGGCTTTTGCAGCTTCTA

NOTA: As direções dos “primers” estão indicadas com F - foward (sense) e R - reverse (anti-sense)

Empregamos a reação de Semi-Nested PCR, no qual o produto amplificado (amplicon) é submetido a um segundo processo de amplificação

utilizando um conjunto de iniciadores homólogos a seqüências internas do segmento já amplificado, a Figura 6 ilustra a localização dos fragmentos. Este procedimento torna a reação de PCR mais específica e sensível (Patou et al.,1993).

Figura 6. Diagrama representativo da localização da região de amplificação das seqüências dos “primers” no genoma viral

4.2.5 Padronização da reação de PCR e Semi-Nested PCR

As condições de PCR para cada “primer” foi otimizada utilizando-se vinte amostras de DNA de indivíduos diferentes. Foram realizados testes de gradientes de temperatura de anelamento assim como variações nas concentrações dos reagentes.

As misturas da PCR da primeira e da segunda etapa tiveram um volume final de 50µL, contendo as concentrações descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Composição para preparação da solução “mix” para a PCR, Semi-Nested PCR para a detecção do eritrovírus e amplificação do gene Beta-globina

Reagentes	Concentração final por reação		
	Primeira etapa	Segunda etapa	Beta-globina
Mix de dNTPs (desoxinucleotídeo trifosfato)	0,4 mM	0,4 mM	10 mM
MgCl ₂ (50mM)	2µL	2µL	2µL
Tampão 10X Tris (pH 8.3 - Invitrogen)	5µL	5µL	5µL
"Primer Forward" (10mM)	1µL	1µL	0,4µL
"Primer Reverse" (10mM)	1µL	1µL	0,4µL
Taq DNA polimerase (5 U/µL, Invitrogen)	0,3µL	0,3µL	0,3µL
DNA extraído	5µL	2µL ¹	4µL
Água livre de nuclease	35,3µL	38,3µL	37,4µL
Volume final	50µL	50µL	50µL

¹ Na segunda etapa é utilizado o amplicon obtido da primeira etapa

A amplificação foi processada em um termociclador Mastercycler Gradient (**Eppendorf** Scientific Inc., Westbury, NY, USA), usando uma denaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos, seguido de 72°C por 10 minutos. Os amplicons obtidos neste processo foram então adicionados à solução “mix” da segunda etapa e imediatamente colocados no termociclador para dar início a

amplificação da segunda etapa, nas mesmas condições descritas na primeira amplificação.

Toda extração genômica do DNA foi testada com “primers” GH20 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3) e PCO4 (5'-CAACTTCATCCACGTTTACC- 3) que amplificam regiões do genoma humano (Simonato et al., 2007) em solução “mix” preparada com concentrações descritas na tabela 1, com volume final de 50µL.

A amplificação se deu no termociclador com ciclos de temperatura que consistiram de denaturação inicial de 94 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 94° C por 1 minuto, 65 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, seguidos de 72 °C por 7 minutos. Após o término do ciclo, o equipamento atinge uma temperatura de 4°C, até que as reações sejam retiradas do termociclador. Os amplicons foram armazenados em freezer a - 20°C até o momento da análise pela eletroforese em gel de agarose. Este procedimento teve como objetivo examinar a integridade do DNA e excluir a presença de inibidores para a reação da PCR.

A sensibilidade do PCR para eritrovírus foi previamente definida em nosso laboratório através de diluições seriadas do controle de qualidade padrão viral B19 DNA (VQC; Sanquin-CLB, Alkmaar, the Netherlands), contendo quantidades conhecidas do genótipo B19 e foi capaz de detectar 250 geq/ml do vírus.

Para controle de qualidade dos procedimentos, em cada reação, foi utilizado um controle positivo (amostra conhecida com a presença do vírus) e um controle negativo para eritrovírus (amostra com ausência de DNA viral, e

não reagentes para IgG e IgM) de cada um dos tipos de amostras, ou seja, para plasma e para medula óssea, e o controle negativo para PCR, o NTC (“no template control”), que é utilizado para a verificação de contaminação em algum dos reagentes durante o procedimento da reação.

4.2.6 Detecção do produto amplificado pela eletroforese em gel de agarose

Em um erlenmeyer de 250 ml, foi adicionado 100 ml de solução tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 5X e 1g de agarose, foi levemente homogeneizado e levado ao forno de microondas em alta temperatura, por cerca de dois minutos (tempo necessário para fundir a agarose, sem que ferva a solução), formando uma solução transparente e homogênea. Após resfriar em torno de 50°C, foi colocado 1µL de brometo de etídio, obedecendo aos critérios de segurança para evitar a inalação do produto.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose (agarose low melting, Sigma®) a 1,0% com brometo de etídio. Para aplicação foi utilizado 1µL do corante BlueJuice Gel Loading Buffer 0,5X (Invitrogen®, USA), imerso em tampão TBE 5X, aplicando-se 2µL do produto de PCR em cada poço do gel, a uma voltagem de 100 Volts por 1 hora. Para controle da corrida foi usado um marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen®, USA). O gel foi visualizado em fonte de luz ultravioleta de 302nm em transiluminador Eagle Eye® (Stratagene) e fotodocumentado.

4.2.7 Purificação do produto da amplificação das amostras de sangue periférico e medula óssea

O Protocolo para purificação do DNA das amostras de plasma e medula óssea foi realizado com o kit comercial QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Em cada tubo de 1ml, foram adicionados 200µL Buffer PB (tampão de ligação) e 40µL da reação de PCR. (Para correção do PH quando a mistura apresentava-se laranja ou violeta, foram adicionados 10µL de acetato de sódio 3.0 M, a cor da mistura deve ser amarela). Foi realizada homogeneização em vórtex por 10 segundos, as amostras foram transferidas para o dispositivo da coluna e centrifugadas a 8.000 rpm durante um minuto. Foi descartado o sobrenadante.

Para lavar, foi adicionado 750µL Buffer PE (tampão concentrado de lavagem) na coluna com o mesmo tubo e centrifugado por um minuto à velocidade de 8.000 rpm. Foi descartado o sobrenadante. A coluna foi centrifugada a 13.000 rpm durante dez minutos. A coluna foi transferida para um tubo de 2ml, e o produto foi eluído pela adição de 50µL Buffer EB (tampão de eluição - 10mM Tris-Cl, pH 8.5) no centro da coluna. Após foi centrifugado por um minuto a 8.000 rpm durante um minuto.

4.2.8 Quantificação do produto purificado no espectrômetro

A concentração dos produtos de DNA purificados foram quantificados pelo espectrômetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.),

sendo aceitáveis apenas os resultados com razão entre 1,8 e 2,0, que indica a pureza da amostra. O resultado da concentração foi dado em Ng/ μ L.

Após padronização do método de seqüenciamento do fragmento de interesse, ficou estabelecido que a quantidade ótima do DNA purificado para a reação deveria estar entre 50 e 100 Ng/ μ L. Desta forma, quando necessário, o produto de DNA purificado foi diluído em água livre de nuclease até a concentração ideal e mantidos a temperatura de 37 °C para assegurar uma correta eluição do material. Quando não seqüenciado imediatamente, o produto foi armazenado a -20°C.

4.2.9 Reação de seqüenciamento

O protocolo para reação de seqüenciamento foi realizado com o kit *Kit* comercial ABI PRISM *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction* (Applied Biosystems®, Foster City CA, USA).

Em cada placa de 96 poços, preparado a solução “mix” com o “primer” específico, foi necessário para este procedimento o preparo de duas soluções “mix”: sense e anti-sense, conforme tabela 2, pois os fragmentos de 425 pares de base foram seqüenciados em ambos os sentidos.

Tabela 3 - Concentrações finais dos reagentes utilizados nas reações de seqüenciamento

Reagente	Concentração final
Mix comercial (Kit BigDye™)	2µL
Tampão (5x) (Applied Biosystems®)	6µL
Mix 1 - F - "Primer" P0 (5pmol/µL) ou	
Mix 2 - R - "Primer" P5 (5pmol/µL)	1µL
DNA purificado (50-100 Ng)	Quantidade em µL conforme concentração
Água livre de nuclease	Volume final 20µL

A amplificação para a reação de seqüenciamento foi processada em um termociclador Mastercycler Gradient (**Eppendorf** Scientific Inc., Westbury, NY, USA), usando uma denaturação inicial de 96 °C por 10 segundos, seguido de 25 ciclos de 50 °C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, após foi resfriado a 4° C até o momento da precipitação.

4.2.10 Precipitação da Reação de seqüenciamento

O processo de precipitação é necessário para a remoção dos “primers dimers” (terminadores) que não foram removidos.

Em cada pocinho da placa (com a reação de seqüenciamento) foi adicionado 80µL de isopropanol 75%, foi realizada homogeneização em vórtex por 10 segundos, a placa de amostras foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após esse período, foi centrifugada por 50 minutos a 4000 rpm, e o sobrenadante foi desprezado por inversão, após houve uma

nova centrifugação a 600 rpm durante 1 minuto, com a placa invertida sobre papel absorvente. Para secagem, foi mantida em temperatura ambiente por 10 minutos, ao abrigo da luz.

As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, USA), desnaturadas a 95 °C por 3 minutos em termociclador e imediatamente acondicionadas em gelo por 2 minutos.

Ambas as fitas complementares foram seqüenciadas diretamente do produto de PCR purificado utilizando-se os “primers” P0 e P5, terminadores fluorescentes, e Taq DNA polimerase em um seqüenciador automático de DNA (ABI 3100 Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA), armado com capilares de 50cm e polímero POP6 (Applied BioSystems). Uma seqüência consenso de ambas as fitas foi formada através do programa Sequencher (Gene Code Corp. Ann Arbor, Mich.). Todas as seqüências foram checadas para contaminação pela pesquisa de Blast contra seqüências de eritrovírus disponíveis no banco de dados do GenBank e entre elas mesmas (Korber et al.,1995). Somente seqüências com diversidade maior que 3% foram aceitas para análises posteriores.

4.2.11 Análises das seqüências

As seqüências foram alinhadas com seqüências referência obtidas no GenBank (genótipo 1, B19-AN87 [AB126271], PVBAUAB19-Au [M13178], Kati4 [AF161226], B19-AN66 [AB126269], PVB19X560 [Z70560], J35 [AY386330], e Kati1 [AF161223]; genótipo 2, Berlin [AJ717293], A6c8 [AY064476], A6c2

[AY064475], e LaLi [AY044266]; e para o genótipo 3, Br543 [AY647977] e D91.1 [AY083234]).

O alinhamento das seqüências e dos padrões foi realizado pelo programa CLUSTAL X™ (Thompson et al.,1997) com o parâmetro de alinhamento padrão “slow accurate” e a matriz para peso de DNA IUB. As seqüências alinhadas foram manualmente editadas para o tamanho mínimo no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999). O programa Modeltest™, v3.1 (Posada D & Crandall KA 1998) foi aplicado para selecionar e testar um modelo estatístico de substituição de DNA com base no critério de informação Akaike (Akaike H 1974) ou o teste de taxa de verossimilhança. O modelo evolucionário escolhido foi usado para construir árvores Bayesianas através do método Markov chain Monte Carlo como descrito no pacote MRBAYES (Huelsenbeck JP e Ronquist F, 2001) e também árvores de máxima verossimilhança usando-se o PHYLIP (Phylogeny Inference Package), versão 3.2 (Philip, 1989). Para árvores de máxima verossimilhança, pesquisas heurísticas para verossimilhança foram realizadas usando-se a bi-seccção e a re-conexão do algoritmo dos ramos permutados. A confiança da topologia da árvore foi acessada usando-se o método de “bootstrap analysis” com 10.000 replicações. Cepas que não estiveram claramente segregadas dentro de um grupo de genótipos representativos foram classificadas de acordo com suas referências.

4.2.12 Ensaios sorológicos

As amostras de plasma foram testadas para anticorpos IgG e IgM anti-eritrovírus específicos por ensaio imunoenzimático com o Kit comercial Parvovirus B19 ELISA Biotrin (Dublin, Irlanda), seguindo-se essencialmente as instruções do fabricante. O teste de detecção de anticorpos IgG é capaz de detectar de 3 a 5UL/ml do padrão de IgG (International Standards and Control, Reino Unido) e apresenta 100% de sensibilidade e especificidade de 100%, conforme informado pelo fabricante. O teste de detecção de anticorpos IgM apresenta 86% de sensibilidade e 100% de especificidade. Para cada microplaca foram testados os controles internos do kit em duplicata e os soros controles negativos (amostras negativas para IgG e IgM, com ausência de DNA viral testado previamente) e soros controles positivos (amostras positivas para IgG e IgM, com presença de DNA viral testado previamente) diluídos (Figura 7). Foi realizada, para cada microplaca, uma calibração com a utilização do soro calibrador contido no kit, com o qual calculamos o valor de corte da reação (“cut off”), que foi utilizado todas as vezes que o ensaio foi realizado. A calibração somente foi aceita quando os resultados dos soros controles e controles internos do kit estiveram dentro do intervalo estabelecido.

Cálculo do “cut off”

Cut off = média da D.O. do calibrador

Cálculo do índice

Índice = Absorbância da amostra testada

Valor obtido de “cut off”

Interpretação dos resultados (para teste de IgG e IgM): O valor obtido foi o valor calculado do índice, desta forma, foram consideradas não reagentes as amostras com índice inferior a 0,9; indeterminadas com índice entre 0,9 a 1,1 e reagentes as amostras com índice maior ou igual a 1,1. As amostras com resultados indeterminados foram repetidas, em duplicata.

Figura 7. Representação esquemática da microplaca com padronização do posicionamento dos controles, calibradores e amostras para cada corrida

Para teste de IgG: Amostras de plasma e dos controles foram pipetadas em cavidades de microplacas sensibilizadas com antígeno do eritrovirus (antígeno recombinante VP2). Na presença de anticorpos na amostra, houve uma formação do complexo antígeno-anticorpo. Após a lavagem para a retirada de proteínas séricas que não se ligaram ao substrato, foi adicionado o conjugado anti-IgG humano específico, marcado com peroxidase, que se ligou ao complexo antígeno-anticorpo previamente formado. Após a lavagem para a retirada do excesso de conjugado, foi adicionada a solução cromógena (H_2O_2 + TMB). A intensidade da cor desenvolvida foi avaliada em leitura espectrofotométrica a 450 nm.

Procedimento do teste: Todos os reagentes e amostras permaneceram em repouso por 30 minutos para atingir a temperatura ambiente (20 a 25°C). Em tubos de 2ml foi realizada a diluição das amostras e dos soros controles, 10 µL de plasma foram diluídos em 1000 µL de tampão diluente de amostra (PBS – tampão fosfato salino), foi homogeneizado levemente e desta solução foi pipetada 100 µL no pocinho da microplaca, sendo posteriormente coberta com um adesivo e incubada a temperatura ambiente por 60 minutos. A placa foi lavada 4 vezes na lavadora de placas (ELx50 - Bio-Tek®), com tampão de lavagem, após a última lavagem, a placa foi invertida sobre papel absorvente para retirar o excesso de tampão de lavagem. Foi acrescentado em cada cavidade 100 µL de conjugado anti-IgG (anti-IgG humana marcada com peroxidase), a placa foi incubada a 37° C por 30 minutos.

A placa foi novamente lavada 4 vezes na lavadora de placas, com tampão de lavagem, após a última lavagem, a placa foi invertida sobre papel absorvente para retirar o excesso de tampão de lavagem. Foram adicionados 100 µL do substrato (TMB – tetrametilbenzidina em tampão com peróxido de hidrogênio) em todas as cavidades, a placa foi incubada por 30 minutos a 37°C. Sem lavar, acrescentou-se imediatamente a cada cavidade 100 µL da solução “stop” (solução de bloqueio – ácido sulfúrico).

A leitura da densidade óptica (D.O) de cada cavidade foi realizada em um leitor de ELISA (Organon-Teknica, Microwell System, E.U.A.), utilizando filtro de 450 nm com filtro de referência de 620 nm, utilizando-se comprimento de onda de 450 nm, em no máximo 30 minutos após a adição da solução de bloqueio.

Para o teste de IgM: Os anticorpos IgM anti-eritrovirus B19 eventualmente presentes na amostra se ligaram as imunoglobulinas anti-IgM fixadas nas cavidades (microcaptura). Após a lavagem para eliminar os anticorpos não fixados, acrescentou-se proteína recombinante B19 VP2 biotinilada que se fixaram as IgM específicas eventualmente capturadas. Após nova etapa de lavagem, o conjugado enzimático (estreptavidina-peroxidase) foi adicionado. O excesso não fixado foi eliminado por lavagem e em seguida adicionado o substrato (TMB + H₂O₂) que permitiu a revelação da reação. A intensidade da cor desenvolvida foi avaliada em leitura espectrofotométrica a 450 nm.

Procedimento do teste: Todos os reagentes e amostras permaneceram em repouso por 30 minutos para adquirir temperatura ambiente (20 a 25 °C). Em tubos de 2ml foi realizada a diluição das amostras e dos soros controles, 10 µL de plasma foram diluídos em 1000 µL de tampão diluente de amostra, foi homogeneizado levemente e desta solução foi pipetada 100 µL no pocinho da microplaca, sendo posteriormente coberta com um adesivo e incubada a temperatura ambiente por 60 minutos. A placa foi lavada 4 vezes na lavadora de placas (ELx50 - Bio-Tek®), com tampão de lavagem, após a última lavagem, a placa foi invertida sobre papel absorvente para retirar o excesso de tampão de lavagem. Após preparação da VP2 biotinilada (para cada tira de 8 cavidades foi acrescentado 100 µL de VP2 biotinilada concentrada e 900 µL de diluente para VP2) foram acrescentados a cada cavidade 100 µL do VP2 pré-diluído com posterior cobertura da cavidade com um adesivo ou tampa plástica e incubação a 37 °C por 30 minutos. A placa foi lavada 4 vezes na lavadora de

placa, com tampão de lavagem, após a última lavagem, a placa foi invertida sobre papel absorvente para retirar o excesso de tampão de lavagem. O conjugado enzimático diluído (para cada tira de 8 cavidades foi acrescentado 100 µL de conjugado enzimático concentrado e 900 µL de diluente para conjugado) foi acrescentado a cada cavidade, no volume de 100 µL, foi coberto com adesivo ou e incubado à 37 °C por 30 minutos. A placa foi lavada 4 vezes na lavadora de placa, com tampão de lavagem, após a última lavagem, a placa foi invertida sobre papel absorvente para retirar o excesso de tampão de lavagem. Foram adicionados 100 µL de substrato e mantido a 37 °C por 30 minutos. Sem lavar, acrescentou-se imediatamente a cada cavidade 100 µL da solução “stop” (solução de bloqueio).

A leitura da densidade óptica (D.O) de cada cavidade foi realizada em um leitor de ELISA (Organon-Teknica, Microwell System, E.U.A.), utilizando filtro de 450 nm com filtro de referência de 620 nm, utilizando-se comprimento de onda de 450 nm, em no máximo 30 minutos após a adição da solução de bloqueio.

4.3 Armazenamento dos dados

Foi criado um banco de dados, com o programa *Microsoft Office Access®*, onde foram computadas todas as informações, referente aos dados cadastrais do sujeito da pesquisa, as informações do questionário, os dados laboratoriais e, posteriormente, os resultados obtidos nos testes práticos (Figura 8).

Microsoft Access - [FORMULARIO2]

Arquivo Editar Exibir Inserir Formatar Registros Ferramentas Janela Ajuda Digite uma pergunta

CODIGO: 224 N°: TIPO: CASO(C-0) SEXO: MASCULINO IDADE: 44

DOADOR: DOENÇA BASE: LEUCEMIA LINFÓIDE CRÔNICA DATA: 21-set-06

FEBRE ☐ DISPINEIA ☒ Hb: 10

RASH CUTANEO ☐ DIARREIA ☐ Plt: 149000

TREMORES E CALAFRIOS ☒ QUIMIO ☐ PCR: POSITIVO MEDULA

DOR DE CABEÇA ☒ DOENÇAS RENAIAS ☐ QTDE DNA

MAL ESTAR ☒ DOENÇAS HEPATICAS ☐ SOROLOGIA: POSITIVO IGM E IC

MIALGIA ☒ TER IMUNOSSUPRESSORA ☐ GENOTIPO:

ARTRAGIA ☒ ORGAO TRANSPLANTADO ☐ CONCLUSÃO DE DIAGNÓSTICO: LLQ

TOSSE ☐ CONVULSAO ☐ HIV/AIDS ☐

VOMITO ☐ DOENÇA CARDIACA ☐ MANIFESTACOES NEURO ☐

ICTERICIA ☐ CEFALEIA ☒

Registro: 1 de 260

Modo formulário CAPS NUM

Figura 8. Banco de dados com informações demográficas, sociais e laboratoriais dos pacientes e doadores envolvidos no estudo, elaborado no programa *Microsoft Office Access®*

4.4 Análise dos dados

Os dados foram analisados com recursos do programa estatístico Stata (versão 9.0) através do teste de Qui-quadrado (χ^2), com correções do teste de Fisher. Um valor de P inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Casuística e espécimes biológicos

Os 285 indivíduos avaliados foram divididos em três grupos: 120 amostras de sangue periférico e medula óssea para o grupo 1 – pacientes com citopenias de origem desconhecida; 45 amostras de sangue periférico e medula óssea para o grupo 2 – doadores saudáveis de medula óssea e 120 amostras de sangue periférico e medula óssea para o grupo 3 – pacientes com neoplasias hematológicas crônicas (Figura 9).

Figura 9. Distribuição dos casos e controles em relação à citopenias, doenças hematológicas e assintomáticos dos indivíduos estudados na cidade de São Paulo- FMUSP - 2006-2009

Destes, 152 (53%) eram do sexo masculino e 133 (47%) do sexo feminino. A mediana de idade foi de 53 anos (DP=18,5).

A Tabela 4 resume os dados de cada um dos três grupos com relação ao sexo e faixa etária. A população com idade superior a 50 anos foi maior no Grupo 1 do que no Grupo 2 e esta diferença foi estaticamente significativa ($p=0,000$). O Grupo 3 continha um maior número de participantes do sexo masculino do que o Grupo 1 ($p<0,001$).

Tabela 4 – Casos e Controles em relação ao sexo e faixa etária dos indivíduos estudados - HCFMUSP - 2006 a 2009

Características	Grupo 1 N (%)	Grupo 2 N (%)	P^1	Grupo 3 N (%)	P^2	Total
Faixa etária (em anos)						
até 25	13 (10,83)	8 (17,78)		10 (8,33)		31 (10,88)
26 - 50	37 (30,83)	30 (66,67)		28 (23,33)		95 (33,33)
mais de 50	70 (58,33)	7 (15,56)		82 (68,33)		159 (55,79)
			<0,001		0,275	
Sexo						
Masculino	54 (45)	25 (55,56)		73 (60,83)		152 (53,33)
Feminino	66 (55)	20 (44,44)		47 (39,17)		133 (46,67)
			0,227		0,014	

¹ Grupo 1 em relação ao Grupo 2

² Grupo 1 em relação ao Grupo 3

5.2 Detecção do ácido nucléico viral e caracterização molecular

Dos 285 indivíduos analisados, 40 (14%) apresentaram resultado positivo na pesquisa de ácido nucléico viral do eritrovírus, com um fragmento de 425 pares de bases, nas amostras de medula óssea pela reação em cadeia da polimerase. Destes, 11 (27,5%) apresentaram positividade concomitante em

amostras de sangue periférico (Figura 10). A tabela 5 resume esses resultados em relação aos três grupos do estudo.

Figura 10. Distribuição de genótipos (1, 2 e 3) de acordo com o tipo de amostra (PL= Amostras de plasma obtidas de sangue periférico e MO = Amostras de medula óssea) analisada de pacientes da cidade de São Paulo infectados pelos eritrovírus no período de 2006 - 2009

Tabela 5 - Detecção de ácido nucléico viral do eritrovírus em amostras coletadas no HCFMUSP no período de 2006 a 2009

	Grupo 1 (%)	Grupo 2 (%)	Grupo 3 (%)	Total
PCR positivo	18 (15,0)	6 (13,3)	16 (13,3)	40 (14,0)
PCR negativo	102 (85,0)	39 (86,6)	104 (86,6)	245 (85,9)
Amostras analisadas	120	45	120	285

NOTA: $p = 0,923$

No grupo 1, 4 amostras DNA positivas foram coletadas de indivíduos na faixa etária entre 26 e 50 anos e 14 delas de indivíduos com mais de 51 anos; no grupo 2, 5 delas foram colhidas de indivíduos entre 26 e 50 anos e 1 delas de indivíduos com mais de 51 anos; no grupo 3, 1 amostra DNA positivas foram colhidas de indivíduos até 25 anos, 5 delas de indivíduos entre 26 e 50 anos e 10 delas de indivíduos com mais de 51 anos.

Entre os 40 indivíduos com resultado positivo na PCR em amostra da medula óssea, o genótipo 1 foi encontrado em 22 (55%), o genótipo 2 em 5 (12,5%), o genótipo 3 em 13 (32,5%). Quando comparadas as frequências de positividade entre os casos e controles (nos grupos 1, 2 e 3), não encontramos diferença significativa com relação ao genótipo 1 ($p=0,192$) nem com relação aos genótipos 2 e 3 ($p=0,143$), conforme tabela 6.

Tabela 6 – Casos e Controles em relação aos genótipos do eritrovírus dos indivíduos infectados - HCFMUSP - 2006 a 2009

Variantes encontradas	Grupo 1 (%)	Grupo 2 (%)	Grupo 3 (%)
Genótipo 1	10 (8,3)	6 (13,3)	6 (5,0)
Genótipo 2	2 (1,7)	0	3 (2,5)
Genótipo 3	6 (5,0)	0	7 (5,9)
Genótipo 2 + Genótipo 3	8 (6,7)	0	10 (8,3)
PCR Negativo	102 (85)	39 (86,7)	104 (86,7)
Total de indivíduos analisados	120	45	120

NOTA: $p = 0,138$ (comparação entre os grupos 1, 2 e 3 em relação às três variantes)

A Figura 11 exibe a frequência de casos laboratorialmente definidos de infecção pelo eritrovírus atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo desde o final do ano de 2006 ao início de 2009, separados por mês. Pode-se constatar que a presença do vírus ocorreu ao longo de todo o ano, com média de 3,3 casos/mês. Em outubro de 2007 observou-se 5 casos, caracterizando, neste estudo, um período de atividade incomum da virose.

Figura 11. Distribuição temporal dos casos de indivíduos infectados pelo eritrovírus no HCFMUSP, coletados entre setembro de 2006 a maio de 2009 (%)

A tabela 7 mostra o resultado da genotipagem em função da idade dos participantes. O genótipo 1 aparece igualmente distribuído nos indivíduos com idade superior a 26 anos, enquanto que os genótipos 2 e 3 aparecem com maior frequência em indivíduos com idade superior a 50 anos.

Tabela 7 – Frequência entre os genótipos do eritrovírus encontrados em pacientes do HCFMUSP – 2006 a 2009

Características		PCR positivo genótipo 1 (%)	PCR positivo genótipo 2 e 3 (%)	Total
Grupo				
	Casos (C0)	10 (8,3)	8 (6,6)	120
	Controle 1 (C1)	6 (13,3)	-	45
	Controle 2 (C2)	6 (5)	10 (8,3)	120
Faixa etária (em anos)				
	até 25	1 (100,0)	-	1
	26 - 50	11 (78,5)	3 (21,4)	14
	mais de 50	10 (40,0)	15 (60,0)	25
Sexo				
	Masculino	11 (55,0)	9 (45,0)	20
	Feminino	11 (55,0)	9 (45,0)	20

NOTA I = Genótipo 1 C0 vs C1 $p=0,337$; NOTA II = Genótipo 1 C0 vs C2 $p=0,301$;
 NOTA III = Genótipo 2-3 C0 vs C1 $p=0,070$ (fischer exact 0,100) e NOTA IV =
 Genótipo 2-3 C0 vs C2 $p=0.620$

Quando analisada a frequência dos genótipos divididos pelo grupo, foi observado no grupo 1, 10 (8,3%) indivíduos infectados pelo eritrovírus identificados como genótipo 1, sendo 3 com idade entre 26 e 50 anos e 7 com mais de 50 anos; 2 como genótipo 2 com idade superior a 51 anos; e 6 (5%) como genótipo 3, sendo 1 com idade entre 26 e 50 anos e 5 com mais de 51 anos. No grupo 2 foram identificados como genótipo 1, 6 (13,3%) indivíduos, todos com idade entre 26 e 50 anos, neste grupo de doadores saudáveis não foram detectadas as variantes genotípicas 2 e 3. E no grupo 3, 6 (5%) foram identificados como genótipo 3, sendo 1 com idade até 25 anos, 3 com idade entre 26 e 50 anos e 2 com mais de 51 anos (Figura 12).

Figura 12. Relação entre a frequência dos genótipos encontrados do eritrovírus na cidade de São Paulo em relação à idade dos indivíduos infectados. HCFMUSP - 2006 a 2009

5.3 Detecção do “status” sorológico

Dos 285 indivíduos estudados, foram encontrados anticorpos IgG em 202 (70,9 %), em 7 (2,5%) delas foram detectados anticorpos IgM específicos do grupo eritrovírus.

Os 285 indivíduos foram divididos em 3 grupos. No grupo 1, 5 (4,2%) plasmas apresentaram anticorpos da classe IgM e IgG (concomitante), sendo que 3 (2,5%) deles com a presença de DNA; no grupo 2, não foram encontrados anticorpos IgM; e no grupo 3, 2 (1,7%) plasmas analisados mostraram níveis baixos níveis de anticorpos IgM e ausência de DNA. Em relação a presença dos anticorpos IgG no grupo 1, 91 (75,8%) plasmas apresentaram os anticorpos e em 16 (13,3 %) foi confirmada a presença de

DNA; no grupo 2, 27 (60%) apresentaram os anticorpos IgG; e no grupo 3, 84 (70%) apresentaram anticorpos IgG. Na tabela abaixo podemos observar também uma relação positiva entre o aparecimento gradual dos anticorpos contra o eritrovírus e o aumento da idade.

Tabela 8 - Frequência dos anticorpos anti IgG e anti IgM para eritrovírus em relação ao sexo e a idade, detectados na cidade de São Paulo - HCMUSP - Setembro de 2006 a maio de 2009

Características	IgG + (%)	IgM + (%)	Valor de p	Total
Grupo				
Casos (C0)	86 (71,7)	5 (4,2)		120
Controle 1 (C1)	27 (60,0)	-		45
Controle 2 (C2)	82 (68,3)	2 (1,7)		120
			0,174	
Faixa etária (em anos)				
até 25	18 (100)	-		18
26 - 50	65 (94,2)	4 (5,8)		69
mais de 50	112 (97,4)	3 (2,7)		115
			0,319	
Sexo				
Masculino	103 (95,4)	3 (2,8)		108
Feminino	92 (95,8)	4 (4,2)		96
			0,789	

Nota: Os valores de $p = 0,174$ e $0,319$, foram confirmados com o "Fisher's exact", com valores $0,210$ e $0,0371$, respectivamente.

5.4 Comparação entre prevalência de anticorpos e DNA viral

Das amostras positivas na PCR, 7 (17,5%) não apresentaram IgM ou IgG, indicando fase de viremia da infecção pelo eritrovírus. Nesta fase, os anticorpos específicos ainda não foram produzidos, sendo o indivíduo

potencialmente infeccioso. Trinta amostras (75%) positivas na PCR apresentaram apenas IgG o que pode ser explicado pela capacidade da reação da cadeia da polimerase em detectar baixos níveis do DNA do vírus por longo período após a infecção aguda, mesmo após o desaparecimento dos anticorpos classe IgM. Anticorpos da classe IgM foram detectados em 165 (67%) amostras negativas na PCR indicando imunidade nesses indivíduos.

A prevalência de anticorpos nas amostras com o DNA viral está demonstrada na tabela 9.

Tabela 9 - Prevalência dos anticorpos anti IgG e anti IgM contra o eritrovírus em relação a detecção do DNA viral - HCFMUSP - 2006 a 2009

Genótipo	Grupo 1 (%)	Grupo 2 (%)	Grupo 3 (%)
Gen 1	10 (8,3)	6 (13,3)	6 (5,0)
Gen 2	2 (1,7)	-	3 (2,5)
Gen 3	6 (5,0)	-	7 (5,9)
PCR Neg	102 (85)	39 (86,7)	104 (86,7)
PCR pos	18 (15)	6 (13,3)	16 (13,3)
IgG pos	91 (75,8)	27 (60)	84 (70)
IgG neg	29 (24,2)	18 (40)	36 (30)
IgM pos	5 (4,1)	-	2 (1,6)
IgM neg	115 (95,8)	45 (100)	118 (98,3)

Quando comparamos os genótipos à presença dos anticorpos anti IgG e anti IgM para o eritrovírus não observamos diferença estatisticamente significativa ($p = 0,913$), conforme tabela 10:

Tabela 10 - Correlação da caracterização molecular do eritrovírus e a presença dos anticorpos anti IgG e anti IgM na cidade de São Paulo - 2006 a 2009

Anticorpos	Genótipo 1 (%)	Genótipo 2 (%)	Genótipo 3 (%)
IgG pos	20 (91)	4 (80)	10 (77)
IgG neg	2 (9)	1 (20)	3 (23)
IgM pos	2 (9)	-	1 (8)
IgM neg	20 (91)	-	12 (92)
Total	22	5	13

5.5 Prevalência e soroprevalência do eritrovírus entre os doadores saudáveis de medula óssea

O grupo 2 foi composto exclusivamente de doadores saudáveis, deste 45 indivíduos, o DNA do vírus foi detectado em 6 (13%) deles, apenas em amostras de medula óssea.

A soro prevalência neste grupo foi cerca de 60% de detecção de anticorpos IgG, com ausência de anticorpos IgM.

Após análise filogenética foi relatada apenas a presença do genótipo 1 nos doadores saudáveis de medula óssea.

5.6 Prevalência e soroprevalência do eritrovírus entre os pacientes com neoplasias hematológicas crônicas.

Ao analisarmos o grupo 3, compreendido pelos pacientes com neoplasias hematológicas, obtivemos 34 pacientes com linfomas, 26 com

leucemia linfóide crônica (LLC), 12 com síndrome mielóide crônica (SMC), 18 com síndrome mielodisplásica (SMD), 15 leucemia mielóide crônica (LMC) e 5 com tricocitoleucemia (*Hairy Cell* – HC) (tabela 8).

Tabela 11 - Frequência dos anticorpos anti IgG e anti IgM e DNA do eritrovírus em pacientes com neoplasias hematológicas atendidos no HCFMUSP entre o período de 2006 a 2009

	Linfomas	LLC	SMC	SMD	LMC	HC
PCR+	5 (15)	3 (12)	1(8)	1(6)	1(7)	2 (40)
IgG	21(62)	18 (69)	9 (75)	14 (78)	14 (93)	3 (60)
IgM	0	0	0	0	2 (13)	0
Genótipo 1	3 (9)	0	0	1(6)	0	1(20)
Genótipo 2	0	2 (8)	0	0	0	0
Genótipo 3	2 (6)	1(4)	1(8)	0	1(7)	1(20)

A prevalência do DNA do eritrovírus entre os portadores de neoplasias hematológicas crônicas ocorreu em maior número entre os pacientes com HC, que de um total de 5 pacientes com esta neoplasia, em 2 deles foram detectados o DNA do eritrovírus, cerca de 40%. nos pacientes com linfomas foi de 15%, LLC com 12%, SMC 8%, SMD 6% e LMC 7%.

Em relação a soro prevalência, houve o maior número entre os pacientes com LMC, cerca de 93% de presença dos anticorpos IgG, e com uma variação entre 60 a 80% dentre os pacientes portadores das outras neoplasias hematológicas. A presença dos anticorpos IgM ocorreu apenas em 2 pacientes

com LMC, compreendendo cerca de 13% de soro prevalência entre os portadores desta neoplasia.

Ao analisarmos a prevalência da variante do eritrovírus, observamos cerca de 20% dos pacientes com HC infectados com o genótipo 1; a variante 2 foi detectada apenas em pacientes com LLC (8%); e o genótipo 3 apareceu com maior frequência entre os pacientes com HC (20%), e com uma frequência de 4 a 8% nos outros pacientes deste grupo de doenças, o genótipo 3 esteve ausente apenas nos pacientes com SMD.

5.7 Correlação entre os genótipos do eritrovírus e a ocorrência de citopenias de causa não esclarecida

A Tabela 9 mostra as características dos casos e controles que apresentaram resultados positivo na PCR em relação à idade, à amostra que apresentou resultado positivo na PCR, ao genótipo encontrado, ao resultado sorológico e aos respectivos antecedentes clínicos.

Tabela 12 – Características dos casos e controles com relação à idade, tipo de amostra com resultado positivo, genótipo encontrado, sorologia e histórico clínico - HCFMUSP - 2006 a 2009

	Nº	Idade (anos)	Amostra com PCR +	Genótipo	Sorologia	Histórico clínico
Grupo 1						
	1	36	PL e MO	1	IgM e IgG	APSV - HIV - Hepatite
	2	61	MO	1	IgG	Pancitopenia
	3	27	MO	1	IgG	Anemia - Rash Cutâneo - Artralgias
	4	84	MO	3	IgG	APSV
	5	54	PL e MO	3	IgM e IgG	Anemia - Rash Cutâneo - Artralgias
	6	53	PL e MO	1	IgM e IgG	APSV - Rash Cutâneo - Artralgias
	7	76	MO	3	Negativa	Anemia - Rash Cutâneo - Artralgias

	Nº	Idade (anos)	Amostra com PCR +	Genótipo	Sorologia	(continuação) Histórico clínico
Grupo 1	8	33	MO	3	IgG	Leucopenia
	9	76	MO	1	IgG	Plaquetopenia
	10	72	MO	2	IgG	Plaquetopenia
	11	56	MO	1	IgG	Anemia - Artralgias
	12	43	MO	1	IgG	Anemia e Plaquetopenia
	13	87	PL e MO	1	Negativa	Pancitopenia
	14	55	PL e MO	3	IgG	Plaquetopenia
	15	61	PL e MO	1	IgG	Anemia - Rash Cutâneo - Hepatite
	16	69	MO	2	IgG	Plaquetopenia – Rash Cutâneo – Artralgias – Hepatite
	17	62	MO	3	IgG	Plaquetopenia - Artralgias
	18	53	MO	1	IgG	Leucopenia – Artralgias
Grupo 2	1	31	MO	1	IgG	Assintomático
	2	30	MO	1	IgG	Assintomático
	3	31	MO	1	IgG	Assintomático
	4	33	MO	1	IgG	Assintomático
	5	51	MO	1	Negativa	Assintomático
	6	45	MO	1	IgG	Assintomático
Grupo 3	1	63	PL e MO	3	IgG	Linfoma não-Hodgkin
	2	74	MO	3	IgG	LLC
	3	57	MO	1	IgG	Linfoma de Hodgkin
	4	57	MO	1	Negativa	Hairy Cell Leukemia
	5	73	PL e MO	2	Negativa	LLC
	6	47	PL e MO	3	IgG	LMC
	7	63	MO	3	IgG	Hairy Cell Leukemia
	8	56	MO	3	IgG	Doença Linfoproliferativa Crônica
	9	42	MO	1	IgG	SMD
	10	61	MO	3	Negativa	Linfoma Folicular
	11	47	PL e MO	1	IgG	Linfoma Folicular
	12	19	MO	1	IgG	LLC
	13	61	MO	3	Negativa	SMC
	14	49	MO	2	IgG	LLC
	15	73	MO	2	IgG	LLC
	16	37	PL e MO	1	IgG	Linfoma não-Hodgkin

NOTA: PL = plasma; MO = Medula óssea; APSV = Aplasia Pura de Série Vermelha; SMD = Síndrome Mielodisplásica; SMC = Síndrome Mieloproliferativa Crônica; LLC = Leucemia Linfóide Crônica; LMC = Leucemia Mielóide Crônica

Dos 22 indivíduos infectados com o genótipo 1, 14 (63,6%) apresentaram anemias, 7 (31,8%) apresentaram leucopenia e 8 (36,3%) plaquetopenia, destes 2 (9,0%) eram pancitopenicos. Dos 5 indivíduos com o genótipo 2, 1 (20%) apresentou anemia, 2 (40%) leucopenia e 3 (60%) plaquetopenia. E dos 13 com o genótipo 3, 5 (38,4%) apresentaram anemia, apenas 1 (7%) com leucopenia e 8 (61,5%) com plaquetopenia. A anemia apareceu com mais frequência nos indivíduos com o genótipo 1 ($p=0,004$) em relação aos genótipos 2 e 3.

Em relação às manifestações clínicas, dos 40 indivíduos que apresentaram o DNA do eritrovírus, 10 (25%) apresentaram febre, 6 (15%) apresentaram rash cutâneo, 10 (25%) apresentaram artralgia e 4 (10%) manifestações gastrointestinais (febre e/ou vômito).

Ao relacionar os genótipos com as manifestações clínicas após a análise filogenética (tabela 13), dos indivíduos infectados pelo genótipo 1, 5 (22,7%) apresentaram febre, 4 (18,1%) rash cutâneo, 5 (22,7%) artralgia e 2 (9,0%) manifestações gastrointestinais. Com o genótipo 2, 2 (40%) pacientes apresentaram febre, 1 (20%) rash cutâneo, 1 (20%) artralgia e 3 (60%) manifestações gastrointestinais. E com o genótipo 3, 3 (23%) deles apresentaram febre, 1 (8%) rash cutâneo, 4 (30,7%) artralgia e 1 (8%) manifestações gastrointestinais.

Tabela 13 - Frequência das manifestações clínicas comparadas ao genótipo do eritrovírus nos pacientes infectados no HCFMUSP, coletados entre o período de 2006 a 2009

Genótipo 1	N	Média de idade	IgG+	IgM+	HB	PLAQ	WBC
<i>Manifestação Clínica</i>							
Febre	5	51,6	4	0	10	210000	4958
Rash	4	45,7	4	1	10,5	248000	6760
Dor de cabeça	2	44	2	0	10	86000	3830
Mal estar	6	51,8	5	1	10,3	238000	6170
Artralgia	5	49,2	6	1	10,8	190000	6930
Tosse	4	56,7	4	1	10,2	165000	8330
Vômito	1	53	1	1	11	218000	11000
Doenças renais	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Doenças hepáticas	4	44,2	4	2	10	212000	6240
Doenças neurológicas	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Doença cardíaca	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Média total	4	49,5	3,75	0,8	10,3	196000	6770
Genótipo 2							
<i>Manifestação Clínica</i>							
Febre	2	71	1	0	12	131000	1060
Rash	1	69	1	0	13	85000	1130
Dor de cabeça	2	71	1	0	12	131000	1130
Mal estar	3	71	2	0	13	117000	1410
Artralgia	1	69	1	0	13	85000	1130
Tosse	2	71	1	0	12	131000	1060
Vômito	2	71	1	0	12	131000	1060
Doenças renais	1	69	1	0	13	85000	1130
Doenças hepáticas	2	71	1	0	12	131000	1060
Doenças neurológicas	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Doença cardíaca	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Média total	2	70	1	0	12	114000	1130
Genótipo 3							
<i>Manifestação Clínica</i>							
Febre	3	58	3	2	11,3	176000	6460
Rash	1	55	1	-	16	86000	6820
Dor de cabeça	3	64	2	1	14,7	154000	5270
Mal estar	6	57	4	1	12,8	168000	5488
Artralgia	4	59	4	1	12,7	152000	7630
Tosse	3	62	2	-	13,3	90000	7500
Vômito	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Doenças renais	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Doenças hepáticas	1	63	1	-	14	120000	8000

(continuação)

Genótipo 1	N	Média de idade	IgG+	IgM+	HB	PLAQ	WBC
<i>Manifestação Clínica</i>							
Doenças neurológicas	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Doença cardíaca	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Média total	3	60	2	1	13,5	135000	6700

NOTA: I - N= número de indivíduos; II - Média de idade em anos; III - HB (hemoglobina) em g/dL; IV - PLAQ (plaquetas) mm³ e V - WBC (leucócitos) mm³.

Verificamos a frequência de 50% de anemia entre os infectados pelo eritrovírus e 47,5% de plaquetopenia e 20% dos infectados apresentaram leucopenia. Após a genotipagem das variantes do eritrovírus, ao analisar a frequência de citopenias nos três genótipos, observamos para o genótipo 1 uma maior frequência de anemia, cerca de 64%, a concentração média de hemoglobina neste grupo foi de 10,3 g/dL. No genótipo 2 a frequência de plaquetopenia foi igual a frequência de leucopenia, cerca de 60%, contra uma baixa frequência de anemia, cerca de 20%, entre os indivíduos deste grupo a contagem média de plaquetas foi de 114.000 / mm³ e a contagem média de leucócitos foi de 1.130 / mm³. E em relação ao genótipo 3, houve uma maior frequência de plaquetopenia, cerca 61,5% dos indivíduos infectados pelo eritrovírus apresentaram esta citopenia, com contagem de plaquetas em média de 135.000 mm³ (Tabela 14).

Tabela 14 - Distribuição dos genótipos do eritrovírus de acordo com a citopenia, a partir de amostras DNA positivas de pacientes da cidade de São Paulo, coletadas no período de 2006 - 2009

	Anemia	Plaquetopenia	Leucopenia
Genótipo 1	14 (63,6)	8 (36,3)	1 (4,5)
Genótipo 2	1 (20)	3 (60)	3 (60)
Genótipo 3	5 (38,4)	5(38,4)	1 (15,3)

6. DISCUSSÃO

Apesar dos estudos de prevalência realizados em nosso país (Freitas et al., 1990 e 2007, Nascimento et al., 1990), dados relacionados à caracterização molecular do vírus e a sua relação com doenças hematológicas em humanos ainda são muito escassos. Neste estudo, nós realizamos um levantamento dos dados clínicos, epidemiológicos, análise de soroprevalência e de filogenia do eritrovírus em 285 indivíduos, com o objetivo principal de avaliar a relação entre a presença dos genótipos do eritrovírus e citopenias de causa não esclarecida em amostras de plasma e medula óssea. A identificação do genótipo torna-se importante na investigação da história natural e avaliação clínica da infecção pelo eritrovírus, nossas amostras foram identificados dentro dos três genótipos: genótipo 1 (variante protótipo Pvbaua); genótipo 2 (variante Lali protótipo) e genótipo 3 (variante V9 protótipo) (Nguyen et al., 1999, Nguyen et al., 2002; Servant, et al., 2002).

A incidência de infecção pelo eritrovírus mostra uma variação sazonal em clima temperado sendo mais freqüente no final do inverno, na primavera e em muitos casos perduram até o início do verão, as taxas de infecção podem também aumentar a cada três ou quatro anos (Koch e Adler, 1989). Surtos de infecção pelo eritrovírus em climas temperados foram mais comuns no final do inverno e na primavera, embora haja casos registrados em outros meses (Cohen et al., 1995).

Nossos resultados constataam que a presença do vírus ocorreu ao longo de todo o ano, com média de 3,3 casos/mês. Em outubro de 2007 observou-se 5 casos, caracterizando período de atividade incomum da virose.

O fato de não se encontrar maior taxa de soroconversão entre o final do inverno e o início da primavera, pode ser explicado pelo clima subtropical da região de São Paulo, dificultando a divisão clara entre as estações do ano. Segundo a classificação de clima de Koppen, que se baseia no regime de chuvas, relevo e temperatura, a cidade de São Paulo é definida como subtropical, com média de temperatura de 22,5° C nos meses mais quentes e de 16°C nos meses mais frios. A média anual de temperatura é de 19° C. Com base nestes dados podemos ressaltar que devido à ausência de mudanças bruscas de temperaturas durante o ano não permite fazer divisões de período endêmico e epidêmico para a infecção pelo eritrovírus.

Após a pesquisa do vírus pelo Semi-Nested-PCR, as 40 amostras com resultado positivo foram submetidas ao estudo filogenético. Nossos resultados demonstraram maior prevalência do genótipo 1 (55%), seguido do genótipo 3 (32,5%). O genótipo 2 foi o que apresentou a menor frequência (12,5%). Apesar da sua baixa frequência em relação aos outros dois genótipos, juntamente com a descrição de Sanabani e colaboradores (Sanabani et al., 2006), este é um dos trabalhos pioneiros na detecção do genótipo 2 e 3 na região Sudeste do Brasil, provavelmente devido à escassez, até então, de estudos que utilizaram um ensaio capaz de detectar todas as variantes do eritrovírus descritas nessa população.

O genótipo 1 apareceu igualmente distribuído nos indivíduos com idade superior a 26 anos, enquanto que os genótipos 2 e 3 apareceram com maior frequência em indivíduos com mais de 50 anos. A mediana de idade dos indivíduos com positividade para o genótipo 1 foi de 46 anos e para os

genótipos 2 e 3, foi de 61 anos. Esta maior frequência dos genótipos 2 e 3 entre indivíduos mais idosos pode estar relacionada à introdução mais antiga destes genótipos na população da região sudeste do país e pode indicar que estes genótipos poderão desaparecer ao longo do tempo nessa população. Em 2006, Norja et al., em concordância com os achados de que a prevalência dos genótipos varia ao longo do tempo, descreveram que os genótipos 1 e 2 circularam com igual frequência na Europa no início do século passado. No entanto, após a década de 70, o genótipo 1 diminuiu sua frequência de maneira significativa e o genótipo 2 desapareceu. Neste mesmo estudo, a ausência do genótipo 3 em 1640 doadores de sangue, inferiu a exclusão da ocorrência generalizada do genótipo 3 na Europa, nos últimos 70 anos. Estas diferentes prevalências dos genótipos em relação à idade dos indivíduos infectados representam interessantes dados para avaliação epidemiológica e filogenética da infecção pelo eritrovírus.

Entre os métodos de biologia molecular para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo eritrovírus, a técnica da PCR em tempo real poderá ser um ganho trazendo subsídios para melhor compreensão da doença associada ao eritrovírus. O desenvolvimento de testes de quantificação da carga viral pode possibilitar, além do diagnóstico, a análise da correlação entre carga viral e evolução clínica.

A história natural da infecção pelo eritrovírus em indivíduos imunocompetentes tem evidenciado que a viremia ocorre em aproximadamente uma semana após a exposição e usualmente persiste por aproximadamente 5-7 dias. Com o desenvolvimento de anticorpos tipo IgM em cerca de 10-12

dias da infecção, seguido em poucos dias pelo aparecimento de anticorpos tipo IgG, a viremia cai e desaparece em poucas semanas. O IgM se torna indetectável após alguns meses e o anticorpo IgG persiste por longo tempo (Corcoran, 2004).

A infecção pelo eritrovírus ocorre em todo o mundo sendo que a soroprevalência aumenta com a idade. De acordo com Kerr e colaboradores, mais de 70% da população adulta é soropositiva. Crianças representam a principal fonte de transmissão (Kerr, 1999).

No Brasil, a soroprevalência para eritrovírus em algumas regiões já foi reportada em estudos anteriores. Em 1990, um estudo realizado por Freitas et al., mostrou uma prevalência de 43% no estado do Pará. No mesmo ano, Nascimento et al., encontraram uma prevalência de 73% no estado do Rio de Janeiro. Em 2008, Huatuco reportou uma prevalência de 72% na cidade de São Paulo (Huatuco, 2008). Em concordância com nosso estudo, que foi encontrada uma prevalência de 71%. Esses dados demonstram variações na prevalência entre as diversas regiões do Brasil e confirmam a importância da realização de estudos regionais para a obtenção de dados em populações específicas.

Nós observamos uma relação positiva entre o aparecimento gradual dos anticorpos contra o eritrovírus e o aumento da idade. Ao comparar a presença dos anticorpos anti IgG e anti IgM contra o eritrovírus nos casos e controles, não encontramos diferença estatística entre os grupos estudados ($p = 0,319$). Porém ao compararmos a soroprevalência dos anticorpos anti IgG para o eritrovírus entre os casos e os controles saudáveis encontramos uma diferença significativa ($p = 0,045$), esta diferença provavelmente está relacionada a

diferença de idade entre os grupos estudados, pois como descrito anteriormente, ao compararmos a idade entre casos e controles saudáveis, os indivíduos do grupo 2 são mais jovens que os indivíduos do grupo 1 (casos).

Foi detectado em 4 indivíduos a presença de anticorpos IgM com resultados negativos na PCR. Alguns pacientes com eritema infeccioso ou artropatia podem apresentar anticorpos IgM anti eritrovírus sem o vírus detectável no soro (Anderson et al., 1990).

Após a infecção pelo eritrovírus há redução abrupta da hemoglobina, com ou sem plaquetopenia e leucopenia. A redução abrupta da hemoglobina cursa com anemia aguda (Saarinen et al., 1986), nos nossos resultados verificamos esta ocorrência nos pacientes infectados pelo eritrovírus com o genótipo 1, cerca de 64% dos indivíduos com este genótipo apresentaram anemia, com hemoglobina em torno de 10,3 g/dL, com contagens de leucócitos e plaquetas normais, em média 6.770/mm³ e 196.000/mm³, respectivamente.

A presença do quadro de anemia pode haver plaquetopenia e leucopenia, provavelmente devido a ocorrência de seqüestro esplênico agudo (Saarinen et al., 1986). A plaquetopenia e leucopenia, com média de 114.000/mm³ e 1.130/mm³, respectivamente, apareceram concomitante nos pacientes infectados com o genótipo 2. A presença de plaquetopenia isolada acometeu apenas os indivíduos infectados pelo genótipo 2, com a contagem média de plaquetas de 135.000/mm³.

Embora ocorrência de complicações hematológicas como consequência da infecção aguda pelo eritrovírus já tenha sido estabelecida (Lindblom, 2008), o papel do eritrovírus na etiopatogenia de citopenias não está bem estabelecido

na literatura, especialmente em pacientes com infecções persistentes pelo vírus. Apesar disso, a pesquisa de eritrovírus tem sido indicada na investigação etiológica de pacientes com citopenias de causa não definida.

No nosso estudo a infecção pelo eritrovírus foi caracterizada através de várias manifestações clínicas, como febre, rash cutâneo, artralgia e sintomas gastrointestinais. A frequência de febre foi cerca de 25%. Em relação ao rash cutâneo, a frequência entre os infectados pelo eritrovírus foi de 15%, a frequência de artralgia foi de 25%, e em relação às manifestações gastrointestinais, houve uma frequência de 10% entre os indivíduos com a presença do DNA viral.

Como esta relação ainda não está esclarecida, a terapia nos casos com resultado positivo é controversa. Alguns autores indicam o tratamento específico com Imunoglobulina Intravenosa em todos os casos positivos para eritrovírus, independente de a infecção ser aguda ou persistente e do tempo de evolução da citopenia. Analisando os resultados encontrados neste estudo, obtivemos para o grupo 1 cerca de 15% dos indivíduos infectados pelo eritrovírus, no grupo 2 e 3 cerca de 13%. Assim, nós não observamos diferença significativa ($p = 0,923$) nas frequências de positividade para o eritrovírus entre os casos de citopenia de etiologia não esclarecida e os controles. Desta forma, nós não pudemos estabelecer uma relação entre a presença do eritrovírus e a ocorrência dessas citopenias. Também não observamos diferença significativa na frequência dos três genótipos avaliados quando comparamos os casos com os controles ($p = 0,138$).

Como citado anteriormente, infecções agudas pelo eritrovírus são associadas clinicamente com anemia e com outras citopenias como neutropenia e/ou trombocitopenia (Frotscher, 2009). Embora o vírus tenha tropismo pelos precursores eritróides da medula óssea, o mecanismo pelo qual ocorrem as outras citopenias que não anemia, ainda não está totalmente elucidado. Em nosso estudo verificamos uma alta frequência de leucopenia e plaquetopenia entre os infectados pelo genótipo 2, cerca de 60% dos indivíduos apresentaram estas citopenias. Uma hipótese é a de que o eritrovírus seja responsável por uma síndrome de ativação macrofágica de evolução favorável. O achado de macrófagos fagocitários na medula óssea de pacientes na fase aguda da doença reforça esta hipótese (Risvall, 1979; Shirono, 1995; Hong, 1998).

Apesar destes achados, nós não observamos associação estatisticamente significativa entre o achado de eritrovírus e a presença de citopenias de origem não definida em pacientes com infecção aguda e infecção persistente, o encontro de eritrovírus pela PCR não necessariamente está relacionado com a etiopatogenia do quadro hematológico. Exceção deve ser feita caso uma síndrome hemofagocítica seja evidenciada na análise citológica da medula óssea, a qual sugere ativação macrofágica vírus-induzida, causando citopenias de graus variáveis. Nesta situação, a literatura sugere uma relação entre a presença viral e o achado hematológico, inclusive com o eritrovírus. Nas condições em que esta síndrome não esteja presente, o achado do eritrovírus na medula e no plasma provavelmente não tem relação etiopatogênica com a citopenia apresentada pelo paciente.

Esse também é o primeiro estudo no Brasil que avaliou a prevalência do eritrovírus em amostras de medula óssea de doadores saudáveis. O resultado observado foi de aproximadamente 13% de positividade. Em concordância com resultados encontrados em indivíduos saudáveis no Reino Unido (0,9%), África do Sul (0,5%) e Malawi (1,25%), após análise filogenética, apenas o genótipo 1 foi encontrado nos doadores saudáveis incluídos em nosso estudo. Contrariamente, em Gana, 100% das amostras de doadores saudáveis com resultado positivo para eritrovírus eram genótipo 3, sugerindo que este genótipo tenha se originado em Gana (Candotti, 2004). A presença do genótipo 3 em indivíduos do nosso estudo nos sugere que este genótipo possa ter sido trazido do continente Africano como resultado de imigração.

Ao relacionar os genótipos com as manifestações clínicas após a análise filogenética, a infecção pelo eritrovírus foi caracterizada através de algumas manifestações clínicas, como febre, sintomas de gripe (dor de cabeça, mal estar, tosse), artralgia, sintomas gastrointestinais (vômito e diarreia), doenças renais, hepáticas, cardiológicas e neurológicas. A frequência de sintomas de gripe, gastrointestinais e doenças hepáticas foi mais alta nos indivíduos infectados com o genótipo 2 cerca de 45%, 40 e 40%, respectivamente. Em relação a artralgia, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,83$) entre os genótipos, que apresentaram cerca de 23, 20% e 30% respectivamente. Ao comparar a presença do rash cutâneo apareceu igualmente distribuído entre os genótipos 1 e 2, com uma pequena frequência no genótipo 3, cerca de 18%, 20% e 8%,

respectivamente, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,66$). Não foram observadas doenças neurológicas e cardíacas nos indivíduos infectados pelo eritrovírus em nossa população.

7. CONCLUSÕES

Concluimos que a infecção isolada pelo eritrovírus, independente do genótipo encontrado, não tem relação etiopatogênica com as citopenias de origem desconhecida, uma vez que o vírus foi encontrado com a mesma frequência nos casos e nos controles estudados ($p>0,05$). Nestes pacientes, a pesquisa positiva do DNA do eritrovírus não deve ser utilizada isoladamente para orientação terapêutica específica. A soroprevalência do eritrovírus na população estudada foi de 71% e também não apresentou diferença estatística entre os casos e controles.

8. ANEXOS

Anexo A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Hospital
das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Anexo A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL****1. NOME DO PACIENTE.....**

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO..... Nº..... APTO:

BAIRRO:..... CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO..... Nº..... APTO:

BAIRRO:..... CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

**TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: O significado das variantes do
Eritrovírus em pacientes com citopenias: um estudo de caso-controle.**

1. PESQUISADOR: Sheila de Oliveira Garcia.**2. CARGO/FUNÇÃO:** Aluna do curso de Mestrado da FMUSPUNIDADE DO HCFMUSP: Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO () RISCO MÍNIMO (X) RISCO MÉDIO () RISCO BAIXO () RISCO MAIOR () (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses**III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:**

1. Justificativa e objetivos da pesquisa: Este estudo pretende documentar a presença dos 3 genótipos de eritrovírus no Brasil e desta forma expandir nosso entendimento da distribuição dessas variantes no país. A detecção dos genótipos 2 e 3 nesses pacientes permitirá definir a patogenicidade, ou seja, a capacidade do vírus produzir doença nas pessoas. Para testar essa hipótese, nós pretendemos conduzir um estudo de caso-controle em grupos selecionados e analisa-los com relação a presença do DNA viral e anticorpos. O estudo será composto dos seguintes sujeitos: pacientes com diminuição dos glóbulos vermelhos, diminuição dos leucócitos e diminuição das plaquetas de origem desconhecida; doadores saudáveis de medula óssea e finalmente, pacientes com diminuição dos glóbulos vermelhos, diminuição dos leucócitos e diminuição das plaquetas decorrentes da quimioterapia.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: Ao aceitar tomar parte deste estudo, você irá responder sozinho, em uma sala isolada, um questionário contendo aproximadamente 20 perguntas sobre questões sócio-demográficas e sua história médica. Este questionário tomará aproximadamente 20 minutos do seu tempo. Após ter respondido o questionário, iremos coletar uma amostra de 4 ml de sangue venoso, e 2ml de medula óssea para a realização dos testes para detecção dos 03 genótipos do eritrovírus. Essa coleta não trará maiores desconforto para você. O eritrovírus humano B19 pertence ao gênero dos *Eritrovírus* sendo o único membro da família dos *Parvoviridae* causador de amplo espectro de doenças humanas incluindo eritema infeccioso, artropatia, crise aplástica transitória, anemia persistente e hidropisia fetal. Assim como outras famílias de vírus, o

eritrovirus pode permanecer oculto, em estado latente depois da infecção primária; reativando e revertendo de volta à latência. Infecção persistente durante toda vida foi documentada em indivíduos saudáveis. O vírus pode também estabelecer infecção persistente em indivíduos imunocomprometidos, resultando geralmente em anemia crônica severa.

3. Desconfortos e riscos esperados: O desconforto será o *stress* de tomar conhecimento da sua condição de positividade para qualquer um dos genótipos do eritrovírus. Esse desconforto será minimizado através de consulta em nosso ambulatório de pacientes com sorologia alterada, que providenciará o aconselhamento e orientações necessárias para os participantes que apresentarem alteração em seus exames.

4. Benefícios que poderão ser obtidos: Para os participantes que apresentarem positividade nos exames será oferecido a possibilidade de tratamento, quando indicado, e as devidas orientações e encaminhamentos que se fizerem necessários.

5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: não existe nenhum procedimento alternativo.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. Em caso de dúvidas ou informações sobre a pesquisa, resultados de exames, basta entrar em contato pelo telefone 30615544 r 399.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Caso não queira mais que a amostra do seu sangue seja utilizada para a realização dos testes, terá total liberdade de deixar de participar do estudo.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. Os resultados dos exames serão guardados de forma sigilosa não tendo risco de exposição a situações constrangedoras.

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa. Caso ocorra algum problema no local da punção ou dor desconfortável, favor entrar em contato conosco no telefone 0800550300 ou procurar a Fundação Pró-Sangue.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. Eventuais danos à saúde poderão ocorrer: Não haverá risco adicional visto que o material destinado a esta pesquisa será proveniente da coleta de medula óssea que é rotineiramente coletada e de acordo com os protocolos médicos. Neste caso o paciente que apresente eventual dano pela coleta de amostra da medula óssea deve procurar retornar ao mesmo local onde foi realizada a coleta da medula óssea para ser atendido pelo médico de plantão.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Caso você tenha alguma dúvida ou questionamento a respeito deste estudo, por favor, entre em contato com a Dra. Ester Sabino ou Juliana Pereira pelo telefone 011-30615544 ramal: 221.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. O resultados do exame para detecção dos eritrovírus (1, 2 e 3) serão discutidos com você caso for positivo. Todas as informações obtidas neste estudo são consideradas confidenciais e utilizadas apenas com propósito de pesquisa. Todos os dados são confidenciais e protegidos por lei.

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 200 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador

Anexo B – QUESTIONÁRIO - Características Sócio-demográficas, Aspectos Clínicos e dados laboratoriais

Data: ____/____/____
Responsável coleta dados e amostra: _____

Crterios de Incluso:

C ____/n ____

Anexo B – QUESTIONÁRIO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO

<u>Critérios de Inclusão</u>	Código	n
<u>Casos</u> : pacientes com citopenias de origem desconhecida	C-0	120
<u>Controle 1</u> :- doador saudável de medula óssea	C-1	120
<u>Controle 2</u> : pacientes com neoplasias hematológicas crônicas	C-2	120
Todos aceitos após consentimento informados		360

Obs: Amostras de medula óssea e de sangue periférico deverão ser pareadas entre os casos e controles.

1) Características Socio-demográficas:

Nome do paciente ou doador saudável de medula

óssea::

Idade: _____ (anos) Sexo: ☐ masc ☐ fem N° RG: _____

Nº do registro Hospitalar: _____

Local de nascimento:

Telefone de contato: _____ E-mail: _____

2) Aspectos Clínicos:

2. a) Doença de Base: _____

2. b) Sinais/Sintomas	Sim	Não
-----------------------	-----	-----

Febre		
Rash cutâneo:		
Tremores e calafrios		
Dor de cabeça		
Mal estar		
Mialgia		
Artralgia		
Sintomas respiratórios		

2. c) Sintomas respiratórios:Tosse: ☐ sim ☐ nãoDispnéia: ☐ sim ☐ não

Outros:

(descrever): _____
_____**2. d) Achados gastrointestinais:**Diarréia: ☐ sim ☐ nãoVômito: ☐ sim ☐ não

Outros:

(descrever): _____

_____**2. e) Desordens Hepáticas:**Icterícia: ☐ sim ☐ não

Outros: (descrever):

_____**2. f) Manifestações Neurológicas:**Cefaléia: ☐ sim ☐ nãoConvulsão: ☐ sim ☐ não

Outros:

(descrever): _____

_____**3) HIV/AIDS:**☐ sim ☐ não**4) Quimioterapia:**☐ sim ☐ não**5) Terapia Imunossupressora:**☐ sim ☐ não**6) Órgão Transplantado:**☐ sim ☐ não

(se sim, defina o tipo de órgão indicado abaixo):

Fígado ()

Pulmão ()

Coração ()

Pâncreas ()

Medula óssea ()

Outros: _____

7) Outras infecções, além do eritrovírus, presentes no sangue:

☐ sim ☐ não (se, sim, para um ou mais agentes, defina o micro-organismo isolado):

7.a) Bactéria: _____

7.b) Micótica: _____

7.c) Viral: _____

8) Tratamento para eritrovirus (imunoglobulina):

☐ sim ☐ não

Se sim: data: ____/____/____

Dados Laboratorias

Nome do paciente ou doador saudável de medula óssea _____

Idade: _____(anos) Sexo: ☐ masc ☐ fem Nº RG: _____

Nº do registro Hospitalar: _____

Local de nascimento: _____

Telefone de contato: _____ E-mail: _____

2) Perfil Sorológico do Eritrovirus:

IgM: ☐ sim ☐ não

IgG: ☐ sim ☐ não

3) DNA eritrovirus

Sangue periférico: ☐ sim ☐ não

Medula óssea: ☐ sim ☐ não

4) Genótipo Detectado do Eritrovirus:

Genótipo 1 () Genótipo 2 () Genótipo 3 ()

5) Resultado do Exame da Medula Óssea: anexar cópia xerográfica do laudo

Síndrome Hemofagocítica;

Aplasia pura de células vermelhas;

Aplasia de medula óssea;

6) Tratamento para Eritrovirus (imunoglobulina):

☐ sim ☐ não

7) Resultado do exames do sangue periférico antes do tratamento:

Glóbulos Vermelhos: _____ (Ref. Homens: $5,5 \pm 1,0^6$ /uL; Mulheres: $4,8 \pm 1,0^6$ /uL)

Hemoglobina: _____ (Ref. Homens: $15,5 \pm 2,5$ g/dL; Mulheres: $14,0 \pm 12,5$ g/dL)

Leucócitos: _____ (Ref. $7,5 \pm 3,5 \times 10^3$ /uL;)

Neutrófilos: _____ (Ref. $2,0 \pm 7,5 \times 10^3$ /uL)

Plaquetas: _____ (Ref. $150 - 400 \times 10^3$ /uL;)

8) Outras informações de interesse clínico-laboratorial:

9. REFERÊNCIAS

Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*. 1974; 19:716-22.

Amico ED, Daniel MM, Silveira PAA, Buccheri V. *Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica*. 3ª ed. São Paulo: Medsi. 2003; 356.

Anderson LJ, Gillespie SM, Torok TJ, Hurwitz ES, Tsou J, Gary, GW. Risk of infection following exposures to human parvovirus B19. *Behring Inst. Mi*. 1990a; 85: 60-63.

Anderson LJ, Tsou C, Parker RA, Chorba TL, Wulff H, Tattersall P, Mortimer PP. Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol*. 1986; 24: 522-6.

Anderson MJ, Higgins PG, Davis LR, Willman JS, Jones SE, Kidd IM, Pattison JR, Tyrrell DA. Experimental parvoviral infection in humans. *J. Infect. Dis*. 1985; 152: 257-65.

Araújo F, Koch MC, Monteiro F, Araújo AR. A infecção pelo parvovírus B19. *Acta Med Portuguesa*. 1999; 12:195-202.

Aubin JT, Defer C, Vidaud M, Maniez Montreuil M, Flan B. Largescale screening for human parvovirus B19 DNA by PCR: application to the quality control of plasma for fractionation. *Vox Sang.* 2000; 78: 7-12.

Bagot M, Revuz J. Papular-purpuric "gloves and socks" syndrome: primary infection with parvovirus B19? *J Am Acad Dermatol.* 1991; 25: 341-2.

Bansal GP, Hatfield JA, Dunn FE, Kramer AA, Brady F, Riggin CH, Collett MS, Yoshimoto K, Kagigaya S, Young NS. Candidate recombinant vaccine for human parvovirus B19. *J. Infect. Dis.* 1993; 167 (5): 1034-44.

Baskan EB, Yilmaz E, Saricaoglu H, Alkan G, Ercan I, Mistik R, Adim SB, Goral G, Dilek K and Tunali S. Detection of parvovirus B19 DNA in the lesional skin of patients with Behcet's disease. *Clin. Exp. Dermatol.* 2007; 32: 186-90.

Berns KI. Parvoviridae and their replication. En: Fields BN, Knipe DM, editores. *Virology.* 2.^a ed. Nueva York: Raven Press. 1990; 2: 743-63.

Boruchoff SE, Woda BA, Pihan GA, Durbin WA, Burstein D, Blacklow NR. Parvovirus B19-associated hemophagocytic syndrome. *Arch Intern Med.* 1990;150 (4):897-9.

Bradford GB, Williams B, Rossi R, Bertoncello I. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp. Hematol.* 1997; 25:445-453

Broliden K, Tolfvenstam T, Norbeck O. Clinical aspects of parvovirus B19 infection. *J. Intern. Med.* 2006; 260: 285-304.

Brown T, Anand A, Ritchie LD, Clewley JP, Reid TM. Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis. *Lancet.* 1984; 2(8410):1033-4.

Brown KE e Young NS. Parvoviruses and bone marrow failure. – *Stem Cells.* 1996; 14:151-63.

Brown KE e Cohen BJ. Haemagglutination by parvovirus B19. *J. Gen. Virol.* 1992; 73: 2147-9.

Brown KE, Anderson, SM, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 1993; 262: 114-7.

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

Carper, EK, GJ Kurtzman. Human parvovirus B19 infection. – *Curr. Opin. Hematol.* 1996; 3:111-7.

Cassinotti P, Siegl G, Michel BA and Bruhlmann 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: 199-204.

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

Chevrel G, Calvet A, Belin V and Miossec P. Dermatomyositis associated with the presence of parvovirus B19 DNA in muscle. *Rheumatology: Oxford*. 2000; 39:1037-9.

Cohen B, Millar A, Schwind P. Screening blood donations for parvovirus B19. *Lancet*. 1995. 16;346(8990):1631.

Cohen BJ, Gandhi J, Clewley JP. Genetic variants of parvovirus B19 identified in the United Kingdom: implications for diagnostic testing. *J Clin Virol*. 2006; 2 (36):152-5.

Cohen BJ, Mortimer PP and Pereira MS. Diagnostic assays with monoclonal antibodies for the human serum parvovirus-like virus (SPLV). *J. Hyg. Londres*. 1983; 91: 113-30.

Corcoran A, Doyle S. Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19. *J Med Microbiol*. 2004; 53: 459-75

Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*. 1975; 1(7898):72-3.

Cotmore SF, McKie VC, Anderson LJ, Astell CR and Tattersall P. Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by procaryotic expression of isolated genomic fragments. *J. Virol.* 1986; 60: 548-57.

Cotmore SF and Tattersall P. Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome. *Science.* 1984; 226:1161-5.

Coulombel L, Morinet F, Mielot F, Tchernia G. Parvovirus infection, leukaemia and immunodeficiency. *Lancet* 1989; 1: 101-2.

Cruz A S, Serpa MJ, Barth OM, do Nascimento JP. Detection of the human parvovirus B19 in a blood donor plasma in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989; 84(2): 279-80.

Cubel RC, Garcia AG, Pegado CS, Ramos HI, Fonseca ME, Clewley JP, Cohen BJ, Nascimento JP. Human parvovirus B19 infection and hydrops fetalis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996; 91(2):147-51.

Curry A, Appleton H and Dowsett B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future. *Micron.* 2006; 37: 91-106.

De Stefano R, Manganelli S, Frati E, Selvi E, Azzi A, Zakrzewska K, Deiss V, Tratschin JD, Weitz M, Siegl G. Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology* 1990; 175(1): 247- 54.

Deiss V, Trtatschin JD, Weitz M, Siegl G. Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology*, v. 175, n. 1, p. 247- 254, 1990.

Dembinsk J, Haverkamp F, Maara H, Hansmann M, Eis-Hubinger AM, Bartmann P. Neurodevelopmental outcome after intrauterine red cell transfusion for parvovirus B19 induced fetal hydropsis. *BJOG*. 2002; 109:1232-4.

Dijkmans BA, Elsacker-Niele AM, Salimans MM, Albada-Kuipers, Diss TC, Pan LX, Du MQ, Peng HZ, Kerr JR. Parvovirus B19 is associated with benign testes as well as testicular germ cell tumours. *Mol. Pathol.* 1999; 52: 349- 52.

Doerig C, Beard P and Hirt B. A transcriptional promoter of the human parvovirus B19 active in vitro and in vivo. *Virology*. 1987; 157, 539-542.

Eis-Hubinger AM, Reber U, Abdul-Nour T, Glatzel U, Lauschke H Putz U. Evidence for persistence of parvovirus B19 DNA in livers of adults. *J. Med. Virol.* 2001; 65: 395-401.

Enders M, Weidner A and Enders G. Current epidemiological aspects of human parvovirus B19 infection during pregnancy and childhood in the western part of Germany. *Epidemiol. Infect.* 2007; 135: 563-9.

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

Florea AV, Ionescu DN, Melhem MF. Parvovirus B19 infection in the immunocompromised host. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; 131 (5):799-804.

Forestier F, Tissot JD, Vial Y, Daffos F, Hohlfield P. Haematological parameters of parvovirus B19 infection in 13 fetus with hydrops foetalis. *Br J Haematol* 1999; 104:925-7.

Franssila R and Hedman K. Infection and musculoskeletal conditions: Viral causes of arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2006; 20: 1139-57.

Freitas RB, Wong D, Boswel F, Miranda MFR, Linhares AC, Shirley J, Desselberger U. Prevalence of Human Parvovirus (B19) and rubellavirus infections in urban and remote rural areas in Northern Brazil. *J Med Virol* 1990; 32:203-8.

Frickhofen N, Abkowitz JL, Safford M, Berry JM, Antunez-de-Mayolo J, Astrow A, Cohen R, Halperin I, King L, Mintzer D. Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. *Ann Int Med* 1990; 113: 926-933.

Frotscher B, Salignac S, Morlon L, Bonmati C, Jeulin H, Venard V, Lecompte T. Neutropenia and/or thrombocytopenia due to acute parvovirus B19 infection. *Ann Biol Clin. Paris.* 2009; 67(3):343-8.

Garcia SO, Pereira J, Godoy CRT, Sanabani S, Neto WK, Sabino EC. Doenças hematológicas associadas ao eritrovírus. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2009; 31(4): 285-90.

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

Gareus R, Gigler A, Hemauer A, Leruez-Ville M, Morinet F, Wolf H, Ghidini A, Lynch L. Management strategies for congenital infections. – *Mt. Sinai J. Med.* 1994; 61: 376-88.

Gonçalves CV, Duarte G, Marcolin AC, Quintana SM, Covas DT, Costa JSD. Avaliação longitudinal da infecção por parvovírus B19 entre grávidas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* 2003; 25:317-21.

Gray A, Guillou L, Zufferey J, Rey F, Kurt AM, Jichlinski P, Leisinger HJ and Benhattar J. Persistence of parvovirus B19 DNA in testis of patients with testicular germ cell tumours. *J. Gen. Virol.* 1998; 79 (3): 573-9.

Green SW, Malkovska I, O'Sullivan MG, Brown KE. Rhesus and pig-tailed macaque parvoviruses: identification of two new members of the erythrovirus genus in monkeys. *Virology.* 2000; 269: 105-12.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999; 41: 95-8.

Handgretinger PFR, Schaefer HE. Pure red cell aplasia. *Brit J Haematol* 2000; 111:1010-22.

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

Heegaard ED, Jensen I, Christensen J. Novel PCR assay for differential detection and screening of erythrovirus B19 and erythrovirus V9. *J. Med. Virol.* 2001; 65: 362-7.

Hemauer A, Poblitzki V, Gigler A, Cassinotti A, Siegl P, Wolf G, Modrow H. S. Sequence variability among different parvovirus B19 isolates. *J. Gen. Virol.* 1996;77 (8): 1781-5.

Hobbs JA. Detection of adeno-associated virus 2 and parvovirus B19 in the human dorsolateral prefrontal cortex. *J. Neurovirol.* 2006; 12: 190-9.

Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PA. *Fundamentos em hematologia*. Porto Alegre: Artmed, 2004; 138-9.

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

Hong MP, Dawson DB, Rogers ZR. Polymerase chain reaction amplification of archival material for Epstein Barr virus, cytomegalovirus, human herpesvirus 6 and parvovirus B19 in children with bone marrow hemophagocytosis. *Hum Pathol.* 1998; 29:1074-7

Huatuco EMM, Durigon EL, Lebrun FLAS, Passos SD, Gazeta RE, Azevedo Neto RS. Seroprevalence of human parvovirus B19 in a suburban population in São Paulo, Brazil. *Rev. Saúde Pública.* 2008; 42(3):443-9.

Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 2001; 17:754-5

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 01 de março de 2009.

ICTVdB – (The Universal Vírus Database). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>.

Jordan JA. Identification of human parvovirus B19 infection in idiopathic nonimmune hydrops fetalis. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 174(1): 37-42.

Kaikkonen L, Lankinen H, Harjunpaa I, Hokynar K, Soderlund-Venermo M, Oker-Blom C, Hedman L, Hedman K. Acute-phase-specific heptapeptide epitope for diagnosis of parvovirus B19 infection. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 3952-6

Kaikkonen L, Soderlund-Venermo M, Brunstein J, Schou O, Panum Jensen I, Rousseau S, Caul EO, Cohen B, Valle M, Hedman L, Hedman K. Diagnosis of human parvovirus B19 infections by detection of epitope-type-specific VP2 IgG. *J. Med. Virol.* 2001; 64: 360-5.

Kailasam C, Brennand J, Cameron AD. Congenital parvovirus B19 infection: experience of a recent epidemic. *Fetal Diagn Ther.* 2001; 16:18-22.

Kajigaya S, Fujii H, Field A, Anderson S, Rosenfeld S, Anderson LJ, Kaufmann B, Simpson AA, Rossmann MG. The structure of human parvovirus B19. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101: 11628-33.

Kerr JR, Cartron JP, Curran MD, Moore JE, Elliott JR, Mollan RA. A study of the role of parvovirus B19 in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1995; 34:809-13.

Kerr JR. Parvovirus B19 infection. – *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1996; 15: 10-20.

Kerr S, O’Keeffe G, Kilty C & Doyle S. Undenatured parvovirus B19 antigens are essential for the accurate detection of parvovirus B19 IgG. *J Med Virol* 1999; 57:179-85.

Kauffman B. Parvovirus B19 does not bind to membrane-associated globoside in vitro. *Virology.* 2005; 332: 189-98.

Koch WC, Adler SP. Detection of human parvovirus B19 DNA by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 65-9.

Koch WC, Massey G, Russell CE and Adler SP. Manifestations and treatment of human parvovirus B19 infection in immunocompromised patients. *J. Pediatr.* 1990; 116: 355-9.

Korber BT, Learn G, Mullins JI, Hahn BH, Wolinsky S. Protecting HIV databases. *Nature* 1995; 378:242-4.

Kurtzman GJ, Cohen B, Meyers P, Amunullah A, and Young NS. (1987). Chronic bone marrow failure due to persistent B19 parvovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 1988; 317: 287-94.

Kurtzman GJ, Ozawa K, Cohen B, Hanson G, Oseas R and Young NS, LaMonte AC, Paul ME, Read JS, Frederick MM, Erdman DD, Han LL, Anderson LJ, Women and Infants Transmission Study. Persistent parvovirus B19 infection without the development of chronic anemia in HIV-infected and –uninfected children: the Women and Infants Transmission Study. *J. Infect. Dis.* 2004; 189: 847-51.

Lefrère JJ, 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.

Lindblom A, Heyman M, Gustafsson I, Norbeck O, Kaldensjo T, Vernby A. Parvovirus B19 infection in children with acute lymphoblastic leukemia is associated with cytopenia resulting in prolonged interruptions of chemotherapy. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(4): 528-36.

Liu JM, Green SW, Shimada T, Young NS. A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus. *J. Virol*. 1992; 66: 4686-92.

Lotze U, Egerer R, Tresselt C, Gluck B, Dannberg G, Stelzner A and Figulla HR. Frequent detection of parvovirus B19 genome in the myocardium of adult patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Med. Microbiol. Immunol*. 2004; 193: 75-82.

Lundqvist A, Isa A, Tolfvenstam T, Kvist G, Broliden K. High frequency of parvovirus B19 DNA in bone marrow samples from rheumatic patients. *J. Clin. Virol*. 2005; 33: 71-4.

Lundqvist A, Tolfvenstam T, Brytting M, Stolt CM, Hedman K, Broliden K. Prevalence of parvovirus B19 DNA in bone marrow of patients with haematological disorders. *Scand. J. Infect. Dis*. 1999; 31: 119-22.

Manaresi E, Gallinella G, Zerbini M, Venturoli S, Gentilomi G, Musiani M. IgG immune response to B19 parvovirus VP1 and VP2 linear epitopes by immunoblot assay. *J. Med. Virol*. 1999; 57: 174-8.

Manning A, Willey SJ, Bell JE, Simmonds P. Comparison of Tissue Distribution, Persistence and Molecular Epidemiology of Parvovirus B19 and Novel Human Parvoviruses PARV4 and Human Bocavirus. *J. Infect. Dis.* 2007; 195: 1345-52.

Marcolongo R. No association between human parvovirus B19 infection and Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 2003; 62: 86-7.

Marcus DM, Kundu SK, Suzuki A. The P blood group system: recent progress in immunochemistry and genetics. *Semin Hematol.* 1981; 18(1): 63-71.

Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature.* 1989; 339:27-30.

Modrow S. Characterization of cis-acting and NS1 protein-responsive elements in the p6 promoter of parvovirus B19. *J. Virol.* 1998; 72: 609-16.

Moffatt S, Yaegashi N, Tada K, Tanaka N, Sugamura K. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J. Virol.* 1998; 72: 3018-28.

Mortimer PP, Humphries RK, Moore JG, Purcell RH, Young NS. A human parvovirus- like virus inhibits hematopoietic colony formation in vitro. **Nature**, v. 302, n. 5907, p. 426-429, 1983.

Musiani M, Zerbini M, Gentilomi G, Plazzi M, Gallinella G, Venturoli S. Parvovirus B19 clearance from peripheral blood after acute infection. *J. Infect. Dis.* 1995; 172, 1360-3.

Nascimento JP, Buckley MM, Brown KE. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 1990; 32: 41-5.

Nguyen QT, Sifer C, Schneider V, Allaume X, Servant A, Bernaudin F, Auguste V, Garbarg-Chenon A. Novel human erythrovirus associated with transient aplastic anemia. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:2483-87.

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

Nguyen Q T, Sifer C, Schneider V, Bernaudin F, Auguste V and Garbarg-Chenon A. Detection of an erythrovirus sequence distinct from B19 in a child with acute anaemia. *Lancet* 1998; 352:1524

Nikkari S, Roivainen A, Hannonen P, Mottonen T, Luukkainen R, Yli-Jama T, and Toivanen P. Persistence of parvovirus B19 in synovial fluid and bone marrow. *Ann. Rheum. Dis.* 1995; 54: 597-600.

Norja P, Hokynar K, Aaltonen LM, Chen R, Ranki A, Partio EK, Kiviluoto O, Davidkin I, Leivo T, Eis-Hübinger AM, Schneider B, Fischer HP, Tolba R, Vapalahti O, Vaheri A, Söderlund-Venermo M, Hedman K. Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103 (19): 7450-3.

Oliveira SA, Camacho LAB, Pereira ACM, Faillace TF, Setúbal S, Nascimento JP. Clinical and Epidemiological Aspects of Human Parvovirus B19 Infection in an Urban Area in Brazil (Niterói City Area, State of Rio de Janeiro, Brazil) *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 2002; 97(7): 965-70.

O'Sullivan MG, Anderson DC, Fikes JD, Bain FT, Carlson CS, Green SW, Young NS and Brown KE. Identification of a novel simian parvovirus in cynomolgus monkeys with severe anemia. A paradigm of human B19 parvovirus infection. *J. Clin. Invest.* 1994; 93: 1571-6.

Ozawa K, Young N. Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J. Virol.* 1987; 61: 2627-30.

Ozawa K, Ayub J, Young N. Functional mapping of the genome of the B19 (human) parvovirus by in vitro translation after negative hybrid selection. *J. Virol.* 1988b; 62: 2508-11.

Ozawa K, Ayub J, Hao YS, Kurtzman G, Shimada T Young N. Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J. Virol.* 1987; 61: 2395-406.

Ozawa K, Ayub J, Hao YS, Kurtzman G, Shimada T and Young N. Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J. Virol.* 1987; 61: 2395-406.

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.* 1988a; 62: 2884-89.

Pallier C, Greco A, Le Junter J, Saib A, Vassias I, Morinet F. The 3' untranslated region of the B19 parvovirus capsid protein mRNAs inhibits its own mRNA translation in nonpermissive cells. *J. Virol.* 1997; 71: 9482-9.

Parsyan A, Candotti D. Human erythrovirus B19 and blood transfusion – an update. *Transfus Med.* 2007; 17 (4): 263-78.

Pattison JR, Jones SE, Hodgson J, Davis LR, White JM, Stroud CE. Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet.* 1981; 1 (8221): 664-5.

Pillet S, Annan Z, Fichelson S, Morinet F. Identification of a nonconventional motif necessary for the nuclear import of the human parvovirus B19 major capsid protein (VP2). *Virology.* 2003; 306: 25-32.

Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 1998; 14: 817-8.

Potter CG, Potter AC, Hatton CSR, Chapel HM, Anderson MJ, Pattison JR, Tyrrell DAJ, Higgins PG, Willman JS, Parry HF, Cotes, PM. Variation of erythroid and myeloid precursors in the marrow and peripheral blood of volunteer subjects infected with human parvovirus (B19). *Journal of Clinical Investigation*. 1987; 79: 1486-92.

Prowse C, Ludlam PLY. Human Parvovirus and blood products. – *Vox Sang*. 1997; 72: 1-10.

Raab U, Beckenlehner K, Lowin T, Niller HH, Doyle S, Modrow S. NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3. *Virology*. 2002; 293: 286-93.

Reid DM, Reid TM, Brown T, Rennie JA and Eastmond CJ. Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. *Lancet*. 1985; 1: 422-5.

Risdall RJ, McKenna RW, Nesbit ME. Virus-associated hemophagocytic syndrome: a benign histiocytic proliferation distinct from malignant histiocytosis. *Cancer*. 1979; 44: 993-1002.

Saal JG, Steidle M, Einsele H, Muller CA, Fritz, Zacher J. Persistence of B19 parvovirus in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol*. 1992; 12: 147-51.

Saarinen UM, Chorba TL, Tattersall P, Young NS, Anderson LJ, Palmer E. Human parvovirus B19-induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood*. 1986; 67 (5): 1411-7.

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 symptoms. *J Clin Microbiol*. 2006; 44 (2): 604-6.

Sasaki T, Murai C, Muryoi T, Takahashi Y, Munakata Y, Sugamura K, Abe K. Persistent infection of human parvovirus B19 in a normal subjects. *Lancet* 1995; 346-351.

Sato H, Hirata J, Kuroda N, Shiraki H, Maeda Y, Okochi K. Identification and mapping of neutralizing epitopes of human parvovirus B19 by using human antibodies. *J. Virol*. 1991; 65: 5485-90.

Schneider B, Höne A, Tolba RH, Fischer HP, Blümel J, Eis-Hübinger AM. Simultaneous persistence of multiple genome variants of human parvovirus B19. *J Gen Virol*. 2008; 89 (1):164-76.

Schwarz TF, Roggendorf M and Deinhardt F. Human parvovirus B19: ELISA and immunoblot assays. *J. Virol. Methods*. 1988; 20: 155-68.

Schwarz TF, Wiersbitzky S, Pambor M. Case report: detection of parvovirus B19 in a skin biopsy of a patient with erythema infectiosum. *J. Med. Virol.* 1994; 43: 171-4.

Segovia JC, Gallego JM, Bueren JA and Almendral JM. Severe leukopenia and dysregulated erythropoiesis in SCID mice persistently infected with the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* 1999; 73:1774–84.

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: 9124-34.

Servant-Delmas A, Laperche S, Mercier M, Lefrère JJ. Genetic diversity of human Erythroviruses. *Pathol Biol. Paris.* 2009; 57(2):167-74.

Setúbal S, Oliveira SA, Angelis FD, Serôdio AC, Nascimento JP. Manifestações clínicas associadas ao parvovírus B19, incluindo a anemia persistente na AIDS e em outras formas de imunodepressão. *J Bras Doenças Sex Transm.* 2001; 13(4): 55-60.

Shade RO, Blundell MC, Cotmore SF, Tattersall P, Astell CR. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J Virol.* 1986; 58: 921-36.

Shimada T, Young NS. Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991; 88: 4646-50.

Shirono K, Tsuda H: Parvovirus B19-associated haemophagocytic syndrome in healthy adults. *Br J Haematol.* 1995; 189: 923-6.

Silva ARA, Nogueira SA, Alzequir JCL, Costa MCFL, Nascimento JP. Prevalência de anticorpos IgG antiparvovírus B19 em gestantes durante o atendimento pré-natal e casos de hidropisia fetal não imune atribuídos ao parvovírus B19, na Cidade do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2006; 39 (5): 467-72.

Soderlund M, Brown CS, Cohen BJ Hedman K. Accurate serodiagnosis of B19 parvovirus infections by measurement of IgG avidity. *J. Infect. Dis.* 1995a; 171: 710-3.

Soderlund M, Brown CS, Spaan WJ, Hedman L, Hedman K. Epitope type-specific IgG responses to capsid proteins VP1 and VP2 of human parvovirus B19. *J. Infect. Dis.* 1995b; 172: 1431-6.

Soderlund M, Ruutu P, Ruutu T, Asikainen K, Franssila R, Hedman K. Primary and secondary infections by human parvovirus B19 following bone marrow transplantation: characterization by PCR and B-cell molecular immunology. *Scand. J. Infect. Dis.* 1997a; 29: 129-35.

Soderlund M, von Essen R, Haapasaari J, Kiistala U, Kiviluoto O, Hedman K. Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet*. 1997b; 349: 1063-5.

Srivastava A, Bruno E, Briddell R, Cooper R, Srivastava C, van Besien K, Hoffman R. Parvovirus B19-induced perturbation of human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood*. 1990; 76: 1997-2004.

St Amand J, Beard C, Humphries K, Astell CR. Analysis of splice junctions and in vitro and in vivo translation potential of the small, abundant B19 parvovirus RNAs. *Virology*. 1991; 183: 133-42.

St Amand J, Aatell CR. Identification and characterization of a family of 11 kDa proteins encoded by the human parvovirus B19. *Virology*. 1993; 192 (1): 121-31.

Swofford D. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Versão 4.0. *Sinauer Associates*, Sunderland, MA. 1999.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 1997; 25: 4876.

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; 87:2941-9.

Tolfvenstam T. Slow clearance of human parvovirus B19 viremia following acute infection. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41: 1201-03.

Valera ET, Cipolotti R, Bernardes JE, Pacagnella RC, Lima DM, Tone LG. Pancitopenia transitória induzida por parvovírus B19 em criança portadora de esferocitose hereditária. *J Pediatr.* 2000; 76 (4): 323-6.

Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de infectologia*. São Paulo: Atheneu. 2002; 486-90.

Vuorinen T, Lammintausta K, Kotilainen P, Nikkari S. Presence of parvovirus B19 DNA in chronic urticaric and healthy human skin. *J. Clin. Virol.* 2002; 25: 217- 21.

VuorinemT, Lammintausta K, Kotinailen P, Nikkari S. Presence of parvovirus B19 DNA in chronic urticaric and healthy human skin. *J. Clin. Virol.* 2002; 25: (2): 217-21.

Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood.* (2003); 102: 3927-33.

Wong S, Young NS, Brown KE. Prevalence of parvovirus B19 in liver tissue: no association with fulminant hepatitis or hepatitis-associated aplastic anemia. *J Infect Dis.* 2003; 187(10):1581-6.

Xu J, Raff TC, Muallem NS, Neubert AG. Hydrops fetalis secondary to parvovirus B19 infections. *J Am Board Fam Pract.* 2003; 16 (1): 63-8.

Yoo BC, Lee DH, Park SM, Park JW, Kim CY, Lee HS, Seo JS, Park KJ, Ryu WS. A novel parvovirus isolated from Manchurian chipmunks. *Virology.* 1999. 253: 250-8.

Young N. Hematologic and hematopoietic consequences of B19 parvovirus infection. *Semin Hematol.* 1988; 25(2):159-72.

Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *New Engl J Med.* 2004; 350:586-97.

Zakrzewska K, Azzi A, De Biasi E, Radossi P, De Santis R, Davoli PG, Tagariello G. Persistence of parvovirus B19 DNA in synovium of patients with haemophilic arthritis. *J. Med. Virol.* 2001; 65: 402-7.

Zhi N, Mills IP, Lu J, Wong S, Filippone C, Brown KE, Molecular and Functional Analyses of a Human Parvovirus B19 Infectious Clone Demonstrates Essential Roles for NS1, VP1, and the 11-Kilodalton Protein in Virus Replication and Infectivity. *J. Virology.* 2006; 5941-50.

Zhi N, Zadori Z, Brown KE, Tijssen P. Construction and sequencing of an infectious clone of the human parvovirus B19. *Virology.* 2004; 318: 142-52.

APÊNDICES

Apêndice A – Garcia SO, Sabino EC, Martinez GM. *Células infectadas pelo eritrovírus B19*. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, vol. 31, n. 1, p. 54, 2009

Células infectadas pelo eritrovírus B19

Cells infected by erythrovirus B19

Sheila O. Garcia¹, Ester C. Sabino², Gracia M. Martinez³

O eritrovírus, anteriormente descrito como parvovírus B19, é um membro da família *Parvoviridae*. Devido ao alto tropismo para células eritropoéticas, o B19 foi incluído no gênero *Erythrovirus*, pois se replica apenas em células eritróides da medula óssea e do sangue.¹ Como consequência da infecção viral há inibição da eritropoese e efeitos citotóxicos. A infecção inicia-se quando o capsídeo liga-se ao antígeno P. O antígeno P é um glicoesfingolípido da linhagem vermelha, especialmente expresso nos proeritroblastos.²

A infecção pelo eritrovírus pode apresentar manifestações clínicas como o eritema infeccioso, a artropatia, a crise aplásica transitória, a aplasia pura de células vermelhas, a erupção papular, purpúrica em mãos e pés e hidropisia fetal. Algumas manifestações são relacionadas à maior morbimortalidade e são a encefalopatia, epilepsia, meningite, miocardite, cardiomiopatia dilatada e hepatite autoimune. O eritrovírus tem sido sugerido por vários autores como agente causal em várias síndromes clínicas, o que por vezes é de difícil comprovação.³ A presença de precursores eritróides gigantes, com inclusões citoplasmáticas e granulação eosinofílica é altamente sugestiva de infecção pelo eritrovírus, porém o teste mais preciso para a confirmação do diagnóstico é a pesquisa de DNA viral pelo método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Referências Bibliográficas

1. Valera ET, Cipolotti R, Bernardes JE, Pacagnella RC, Lima DM, Tone LG, *et al.* Pancitopenia transitória induzida por parvovírus B19 em criança portadora de esferocitose hereditária. *J. Pediatr.* 2000; 76(4):323-6.
2. Brown KE, Anderson SM, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science.* 1993;262:114-7.
3. Setúbal S, Oliveira SA, Angelis FD, Seródio AC, Nascimento JP. Manifestações clínicas associadas ao parvovírus B19, incluindo a anemia persistente na AIDS e em outras formas de imunodepressão. *J Bras Doenças Sex Transm.* 2001;13(4):55-60.

Suporte Financeiro: Fapesp

Avaliação: Editor e dois revisores externos

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 14/11/2008

Aceito: 25/11/2008

Figura 1. Proeritroblasto gigante com inclusões citoplasmáticas sugerindo infecção pelo eritrovírus B19. Medula óssea, coloração por Leishman, aumento X 1000.

Figura 2. Eritroblasto com vacuolização citoplasmática sugerindo infecção pelo eritrovírus B19. Medula óssea, coloração por Leishman, aumento X 1000.

¹Aluna do curso de Mestrado em Processos Imunes e Infecciosos da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo-SP.

²Médica chefe do Departamento de Biologia Molecular da Fundação Pró-Sangue.

³Médica assistente do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo-SP.

Correspondência: Sheila de Oliveira Garcia

Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155 – 1º andar, bloco 4, sala 61, Laboratório de Imunopatologia

05403-000 – Cerqueira César – São Paulo-SP – Brasil

Email: sheilagarcia.hp@gmail.com

Apêndice B – Garcia SO, Pereira J, Godoy CRT, Sanabani S, Kleine neto W, Sabino EC. *Doenças hematológicas associadas ao eritrovírus*. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, vol. 31, n. 4, p. 285 - 290, 2009

Doenças hematológicas associadas ao eritrovírus

Hematologic diseases associated with eritrovírus

Sheila O. Garcia¹

Juliana Pereira²

Carla R. T. Godoy³

Sabri Sanabani⁴

Walter Kleine Neto⁵

Ester C. Sabino⁶

O eritrovírus infecta células precursoras eritroides, determinando a interrupção temporária da eritropoese. Neste contexto, é importante o conhecimento das principais doenças hematológicas que podem estar associadas à presença do vírus, principalmente quando estão presentes em condições mórbidas, tais como nas anemias hemolíticas hereditárias. Este trabalho tem como objetivo relatar as principais doenças hematológicas que cursam com a infecção pelo eritrovírus B19. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.

Palavras-chave: Eritrovírus; diagnóstico; doenças hematológicas.

Introdução

O eritrovírus humano (parvovírus) B19 foi descoberto na Inglaterra, em 1975, por Yvonne Cossart,¹ em soro de doadores de sangue cujas amostras foram submetidas a testes sorológicos para diagnóstico do vírus da hepatite B.¹ Posteriormente sugeriu-se sua associação com diversas síndromes clínicas, a exemplo do eritema infeccioso, crise aplásica de medula óssea, e outros quadros com sintomatologia de mialgia, artralgia e febre.²

No Brasil, a primeira menção à infecção por eritrovírus B19 parece ter sido feita em 1983, no qual foram encontrados anticorpos por contraímunoelctroforese em alguns doadores de sangue do Rio de Janeiro. Em 1985, também no Rio de Janeiro, foram encontrados anticorpos anti-B19 por radioimunoensaio em três soros de mulheres grávidas, enviados para detecção de anticorpos contra rubéola. Aparentemente, nenhum destes autores publicou os seus achados, sendo apenas citados em 1989.³

Em 1984 foi relatado, na Inglaterra, o primeiro caso de infecção intrauterina por B19. Tratava-se de um caso de hidropisia fetal durante um surto epidêmico de eritema infeccioso. A partir deste relato, documentou-se a potencial toxicidade do eritrovírus B19 aos tecidos embrionários e fetais, agregando mais essa complicação ao grupo das doenças associadas a este agente.² Desde então pode ser feita a associação do vírus com tropismo por células e tecidos, estes com alta taxa de multiplicação celular.

Devido às características estruturais de seu DNA, o eritrovírus foi incluído na família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*, gênero *Erythrovirus* pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses*.⁴ Em 2002 foram descritos os genótipos 1 B19 clássico, genótipo 2, (protótipo K71 e cepa A6-similar) e genótipo 3 (protótipo V9).⁵

Estas novas variantes foram encontradas na Europa Ocidental, EUA e Brasil, mas com menor prevalência que o genótipo 1.⁵⁻⁸ Uma região epidêmica de genótipo 3 foi descrita em Ghana.^{9,10}

¹Bióloga, pós-graduanda do Laboratório de Imunopatologia da Faculdade de Medicina de São Paulo-SP.

²Professora colaboradora da Disciplina e Serviço de Hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-SP.

³Biomédica do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-SP.

⁴Biomédico. Aluno do curso de pós-doutorado da Faculdade de Medicina de São Paulo-SP.

⁵Biomédico do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-SP.

⁶Médica chefe do setor de Biologia Molecular da Fundação Pró-sangue, Hemocentro, São Paulo-SP.

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo-SP.

Correspondência: Sheila de Oliveira Garcia

Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 – 1º andar, bloco 4, sala 61 – Cerqueira César

Laboratório de Imunopatologia

05403-000 – São Paulo-SP – Brasil

Fone: (11)3061-5544 r. 339 – Fax: (11)3085-2290

E-mail: sheilagarcia.hp@gmail.com

Doi:

Figura 1. A estrutura do eritrovírus humano B19 (Kaufmann *et al.*)

Classificação e estrutura viral

O eritrovírus B19 é um vírus com cerca de 23nm, de estrutura icosaédrica (Figura 1), constituído por uma única fita de DNA não envelopado.¹¹ A classificação na família *Parvoviridae* é feita por morfologia e função e o material genético constituído por uma fita simples de DNA.¹²

Devido à sua capacidade de infectar células de vertebrados e invertebrados, os *Parvoviridae* são divididos em *Parvovirinae* e *Densovirinae*, respectivamente. O *Parvovirinae* subdivide-se em gêneros *Parvovirus*, *Dependovirus* e *Erytrovirus*, de acordo com suas peculiaridades genéticas. Somente os membros dos *Dependovirus* e *Erytrovirus* causam infecção em humanos. Devido ao alto tropismo para células eritropoéticas, o B19 foi incluído no gênero *Erytrovirus*, pois se replica apenas em células eritroides da medula óssea (incluindo unidades formadoras de colônia BFU-E – *burst forming units erythroid*) e do sangue. Como consequência da infecção viral há inibição da eritropoese e efeitos citotóxicos. A infecção inicia-se quando o capsídeo liga-se ao antígeno P. O antígeno P é um glicoesfingolípido da linhagem vermelha, especialmente expresso nos proeritroblastos.¹³ É o único vírus desta família conhecido como patogênico para o homem.^{14,15}

Portanto, a afinidade do vírus por células progenitoras eritroides deve-se à presença do globosídeo P. Sua adsorção ocorre na região formada por carboidratos do globosídeo ou antígeno eritrocitário "P" (tetrahexoseramida), conforme Brown *et al.*, em 1993. O antígeno P está presente não só em eritrócitos como também em megacariócitos, células endoteliais, placentárias, hepatócitos e coração fetal.

Figura 2. A multiplicação do eritrovírus humano B19 (Adaptada de Kasamatsu e Nakanishi, 1998)

A multiplicação do eritrovírus ocorre nas células precursoras eritroides proliferantes da medula óssea (Figura 2) e fígado fetal.¹⁷ O eritrovírus é totalmente dependente do material genético celular para sua multiplicação, pois não codifica proteínas estimuladoras de síntese protéica. Na extremidade genômica possui palíndromos ou terminações semelhantes a "grampos", estruturas estas que servem como iniciadores de síntese proteica e multiplicação do genoma viral.

O antígeno P pode estar ausente numa parcela da população. As estatísticas demonstram que esta ocorrência é razoavelmente rara (1/200.000). Uma vez que não há a presença desta molécula que propicia a ligação e adsorção do vírus para o interior da célula, os indivíduos desprovidos da expressão desta proteína são naturalmente imunes à infecção por eritrovírus B19.^{15,18}

A população apresenta quatro grandes grupos de pessoas com diferentes riscos de infecção pelo B19, a saber:

- 1) indivíduos saudáveis
- 2) grávidas
- 3) indivíduos com doenças hematológicas
- 4) pacientes imunodeprimidos

Os indivíduos saudáveis desenvolvem aplasia eritroide por parada de maturação da eritropoiese medular por cinco a sete dias acompanhada de *rash* cutâneo e artralgia. As gestantes podem ter aborto e hidropisia fetal. Já os pacientes com doenças hematológicas apresentam quadro caracterizado por anemia aguda; e, finalmente, os imunossuprimidos podem apresentar simplesmente anemia crônica.¹⁹⁻²³

Condições clínicas associadas ao eritrovírus B19

A maioria das pessoas com eritrovírus B19 são assintomáticas ou apresentam sintomas leves, inespecíficos e associados ao frio, que são manifestações frustras e não patognomônicas de um quadro relacionado à infecção pelo vírus. Entretanto, os pacientes podem ter manifestações clínicas mais exuberantes, tais como o eritema infeccioso, a artropatia, a crise aplásica transitória, a aplasia pura de células vermelhas, a erupção papular, purpúrica em mãos e pés e hidropisia fetal. Algumas manifestações são relacionadas à maior morbimortalidade e são a encefalopatia, epilepsia, meningite, miocardite, cardiomiopatia dilatada e hepatite autoimune. O eritrovírus B19 tem sido sugerido por vários autores como agente causal em várias síndromes clínicas, o que, por vezes, é de difícil comprovação.

A infecção por eritrovírus B19 adquire importância quando acomete portadores de doenças hematológicas hereditárias, tais como as anemias hemolíticas. Nestas doenças, em que o *turnover* celular é extremamente elevado, a manifestação clínica, no caso a anemia, se torna mais exuberante em função da menor meia vida das hemácias destes pacientes. Como exemplos destacam-se as síndromes falcêmicas, as talassemias, enzimopatias, ou defeitos da membrana eritrocitária, pelo risco de desencadear crise aplásica,²⁴ e nos pacientes portadores do HIV, por possibilitar a ocorrência de aplasia eritrocitária pura crônica. Naqueles que, apesar de imunocompetentes, são portadores de patologia hereditária de glóbulos vermelhos, a evolução pode ser para anemia aplásica grave, porém reversível. Embora a aplasia transitória seja, geralmente, autolimitada, os pacientes podem apresentar-se extremamente debilitados e evoluir para óbito caso a correção da anemia não seja iniciada prontamente.¹³

Eritema infeccioso (Quinta doença)

O eritema infeccioso é a infecção causada pelo eritrovírus B19 humano mais frequentemente reconhecida, geralmente em crianças de 4 a 10 anos de idade. Caracteriza-se por febre, cefaléia e eritema facial intenso, circunscrito, com aparência de face esbofetada que, após alguns dias, dissemina-se para tronco e membros, e frequentemente confunde-se com rubéola.²⁵

Crise aplásica transitória

Pessoas com menor quantidade de eritrócitos por uma série de fatores, tais como: deficiência de ferro, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), doença falciforme, esferocitose, talassemia e anemia hemolítica autoimune (AHAI) têm maior risco de desenvolverem crise aplásica transitória (CAT) por eritrovírus B19. O vírus bloqueia transitoriamente a produção de eritrócitos, com risco de morte, embora a maior parte dos casos apresente recuperação em

duas semanas, mas com necessidade de múltiplas transfusões inicialmente. Há redução abrupta da hemoglobina, dos reticulócitos e precursores eritroides na medula óssea, com ou sem plaquetopenia e leucopenia. A redução abrupta da hemoglobina cursa com anemia aguda. A presença do quadro de anemia aguda pode causar insuficiência cardíaca congestiva, dita cor anêmica, acidente vascular cerebral por hipofluxo ou baixo fluxo cerebral, e sequestro esplênico agudo. Pode haver plaquetopenia e leucopenia.²⁶

Durante a CAT, o paciente está agudamente infectado e elimina enormes quantidades de vírus por via respiratória, constituindo-se numa fonte potencial de infecção nosocomial. Nesta fase, os pacientes têm alta probabilidade de transmitir a infecção para outros indivíduos e devem ser mantidos em isolamento respiratório.^{12, 27}

Em 1981, na cidade de Londres, foi descrita a viremia por eritrovírus em duas crianças; este estudo demonstrou a presença dos antígenos B19 e/ou de anticorpos IgM indicativos de infecção aguda em mais de 800 soros estocados. Surpreendentemente, foram encontradas antigenemia ou soroconversão em seis outras amostras, todas de crianças portadoras de doença falciforme, imigrantes da Jamaica, que haviam sido admitidas com CAT.²⁸ Também em 1981, a soroconversão e elevação significativa dos títulos ou a presença de partículas virais foram demonstradas em 24 de 28 soros obtidos de crianças jamaicanas portadoras de anemia falciforme com CAT, com a qual o vírus foi finalmente associado como agente causal. Atualmente, o eritrovírus B19 é considerado a mais importante causa de CAT em doença falciforme.²⁷

Aplasia pura da Série Vermelha

A infecção por eritrovírus B19 pode ser persistente nos imunossuprimidos. Estes indivíduos apresentam déficit isolado e/ou combinado de imunidade. A repercussão mais crítica é nos pacientes com imunossupressão da imunidade humoral, na qual há redução ou ausência da síntese de anticorpos. Com relação ao eritrovírus, é importante que sejam estabelecidos anticorpos específicos para combate à infecção. Portanto, *rashes* e artropatia não se desenvolvem, pois estes ocorrem devido à deposição de complexos e anticorpos na pele e nas articulações. Os pacientes têm fadiga e palidez por anemia, a qual pode ser grave, prolongada ou recorrente. Em pacientes com HIV, o uso de anti-retroviral pode melhorar os sintomas, como exemplo o AZT. O tratamento da anemia pode ser feito com a aplicação intravenosa de gamaglobulina humana padrão, que geralmente contém anticorpos em quantidade suficiente para debelar a viremia.²⁷

Hidropisia fetal

Durante o desenvolvimento fetal, alguns anticorpos podem provocar hemólise no feto por diversas razões; em

casos muito graves desenvolve-se hidropisia fetal, caracterizada por ascite, edema generalizado, hepatomegalia, esplenomegalia e prognóstico fatal, geralmente a IgG é que ultrapassa a placenta.²⁹

A primeira associação entre infecção por eritrovírus B19 e complicações na gravidez foi descrita em 1984, quando se demonstrou presença de imunoglobulina M (IGM) anti-B19 em fetos.²

Embora o B19 não tenha efeito adverso para a saúde da mulher grávida, a transmissão transplacentária para o feto é importante causa de morte fetal intrauterina. A maioria dos danos secundários ao vírus ocorre no primeiro trimestre de gravidez.²

A taxa de transmissão do vírus para o feto é de 33% e o risco de morte pode ser de 0% a 9%. A manifestação clínica mais comum é a hidropisia fetal não imune. Muitos casos de hidropisia causam ao feto anemia aplástica, falência cardíaca e miocardite. O eritrovírus é responsável por 10% dos casos de hidropisia fetal por anemia hemolítica. A imunidade após infecção está presente em 50% das mulheres em idade fértil soropositivas (IgG) com ausência de IgM, indicando infecção prévia assintomática ou sintomática.³⁰

Artropatia

Artropatia pode ser complicação de eritema infeccioso ou apresentação primária de infecção por eritrovírus; cerca de 8% das crianças infectadas têm artralgia. Entretanto, a artralgia é mais comum em adolescente e adulto com infecção por eritrovírus B19, acometendo 60% das pessoas. É duas vezes mais frequente em mulheres do que em homens.²¹

Síndrome *gloves and socks* (luvas e meias)

O eritrovírus B19 está associado à síndrome *gloves and socks*, caracterizada por eritema e edema simétrico em pés e mãos, mais frequentemente em adultos jovens. Gradualmente evolui para petéquias e púrpura, podendo chegar à formação de vesículas e bolhas. O marco desta síndrome é a presença de *rash* delimitando o umbigo e tornozelo. Concomitantemente pode haver artralgia, febre, ou ambos, e a resolução dos sintomas ocorre em uma a três semanas. Esta síndrome também pode ser causada pelo vírus da hepatite B, citomegalovírus, herpesvírus humano 6, coxsackievírus B e drogas.³¹

Síndrome hemofagocítica

A síndrome hemofagocítica associada a vírus (VAHS) é uma doença rara caracterizada por ativação e proliferação de macrófagos dentro na medula óssea (MO). Macrófagos ativados na MO fagocitam eritrócitos, leucócitos, plaquetas e seus precursores causando citopenias. Os critérios diagnósticos desta síndrome incluem febre, hepato-

esplenomegalia, linfadenomegalia e *rash*. Laboratorialmente pode haver pancitopenia, disfunção hepática, coagulação intravascular disseminada, hipertrigliceridemia e anormalidades de MO. Em geral está associada a várias infecções virais, como vírus Epstein-Barr (EBV) e eritrovírus B19.³²

Persistência do eritrovírus em pessoas saudáveis

Conforme Lefrere *et al.*, em indivíduos imunocompetentes o eritrovírus pode ser detectável vários anos após a infecção. A persistência de infecção pelo vírus em medula também foi documentada em indivíduos imunocompetentes com ou sem sintomas.

Recentes estudos têm demonstrado que grande parte da população adulta mostra evidências de exposição anterior ao eritrovírus. Embora a resposta imune seja capaz de neutralizar a infecção ao longo da vida e proporcionar proteção contra o vírus, em muitos indivíduos ocorre à persistência viral no sangue ou outros tecidos, independente da imunocompetência do hospedeiro.³⁷

A prevalência de DNA em indivíduos adultos saudáveis é de 0,5% a 9,0%, e a frequência da viremia foi estimada de 1:13 a 1:180, conforme estudo realizado em amostras de soro ou plasma por Lefrere *et al.* e Candotti *et al.* entre os anos de 1999 a 2005, em cerca de 2.500 doadores saudáveis (Tabela 1).

Embora o anticorpo seja prevalente em grande parte da população, a presença de DNA viral ou viremia é rara.³⁶

Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por eritrovírus B19 pode apresentar dificuldades no paciente imunodeprimido. Embora a prevalência de anticorpos IgM e IgG pareça ser maior nos pacientes com doenças de imunossupressão, tais como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), do que na população em geral, num determinado paciente com aplasia pura de células vermelhas, os anticorpos podem ser totalmente ausentes, ou se apresentarem apenas sob a forma

Presença do DNA do eritrovírus em doadores saudáveis entre 1999 a 2005

Local do estudo	Tipo de material	Nº total de amostras	DNA do eritrovírus	Prevalência DNA
Reino Unido	Soro ou plasma	1.000	9	0,90%
Ghana	Soro ou plasma	1.000	13	1,29%
África do Sul	Soro ou plasma	360	2	0,50%
Malawi	Soro ou plasma	80	1	1,25%
França	Soro	76	6	7,90%
Total		2516	31	1,23%

de baixos títulos de IgM. O diagnóstico exige técnicas de maior sensibilidade. Neste contexto, o recurso laboratorial pode ser apoiado pela pesquisa do vírus através de PCR, hibridização *in situ*, ou de proteínas no *dot blot*, e imuno-histoquímica com anticorpos monoclonais em tecidos de amostras colhidos dos pacientes em casos específicos e selecionados.²⁷

Em pacientes imunossuprimidos com infecção crônica e em pacientes com crise aplástica transitória, o exame de DNA viral é importante para o diagnóstico de infecção por eritrovírus B19. Estes pacientes podem não apresentar IgM ou IgG no soro, mas persistem com alta taxa de transmissão. Neste contexto faz-se útil a pesquisa propriamente do vírus e não do seu anticorpo. Um dos métodos mais empregados é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); sua sensibilidade e especificidade podem variar, mas ainda assim a técnica de PCR é mais sensível que a pesquisa de IgM. Os pacientes imunossuprimidos podem ter uma carga viral alta dentro da célula, porém o mecanismo de demonstrar reatividade pela presença de anticorpos e pela IgM, no caso os pacientes imunossuprimidos, tem redução ou não tem IgM, o que favorece então o papel de pesquisar o vírus por outros métodos.³³ Portanto, faz-se necessário que outros métodos complementem a abordagem da investigação diagnóstica. O paciente imunossuprimido tem uma debilidade de resposta imune, o que faz com que não tenha IgM ou tenha muito pouca. Consequentemente, o paciente pode ter anemia persistente, que pode ser o parâmetro clínico observado pelo médico; no momento seguinte, em conjunto com reticulocitopenia, o médico pensa em infecção por B19 e pede IgM. A IgM vem negativa para eritrovírus, o médico continua a achar que é infecção por B19, mas vale ressaltar que pode ter uma viremia elevada e debilidade na produção de anticorpo. Se não for feito o PCR, ou a cultura de vírus, a anemia pelo B19 poderá não ser diagnosticada neste contexto.³⁴

Tratamento

Em geral, o eritema infeccioso é autolimitado e não requer tratamento específico. Situações clínicas onde o contexto é mais complexo exigem uma abordagem clínica aprofundada e baseada em evidências científicas. Os pacientes com artrite e artralgia podem necessitar de controle da dor e do edema através do uso de drogas, como os anti-inflamatórios não esteroides. Os pacientes com crise aplástica necessitam transfusão de hemácias entre o período de recuperação medular. A taxa de hemoglobina varia, mas é importante salientar que, na instalação da anemia aguda, os pacientes não costumam ter tolerância cardiovascular e, portanto, a correção visa manter a hemoglobina em níveis por volta de 10g/dL. Nas situações onde os pacientes não têm anticorpos ou apresentam uma resposta inadequada, tal como a aplasia crônica da série vermelha grave, pode ser necessária infusão de imunoglobulina humana. A imuno-

globulina humana é eficaz, porém, como um hemoderivado, contém proteínas, o que pode precipitar *rash* e artropatia. Não existe ainda uma vacina disponível licenciada para a prevenção da infecção.³⁵

Discussão

Os pacientes com eritrovírus B19 persistente podem se beneficiar com terapia com imunoglobulina intravenosa imune.

Gestantes com diagnóstico de infecção por eritrovírus B19 devem receber ultrassonografia seriada semanalmente duas vezes por semana por 10 a 12 semanas, devido às complicações causadas acerca da infecção.

O padrão ouro de diagnóstico até o momento é a biologia molecular, no qual o teste da reação da polimerase em cadeia (PCR) é o mais preciso para a detecção e identificação das variantes do vírus.

É importante lembrar que vários estudos estão voltados para a genotipagem, pois é bastante discutido o significado das variantes dos eritrovírus e sua relação com as doenças hematológicas.

Abstract

Erythroviruses infect precursor erythroid cells, determining a temporary disruption of erythropoiesis. Thus, knowledge of the main hematological diseases that may be associated with the virus is important, especially when they are present in morbid conditions, such as in hereditary hemolytic anemia. This paper aims at reporting the main hematological diseases that are associated with erythrovirus infections. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.

Key words: Erythrovirus; diagnostic; hematologic diseases.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

Referências Bibliográficas

1. Cossart YE, Field AM, Cant B, Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*. 1975;1(7898):72-3.
2. Brown T, Anand A, Ritchie LD, Clewley JP, Reid TM. Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis. *Lancet*. 1984; 2(8410):1033-4.
3. da Silva Cruz A, Serpa MJ, Barth OM, do Nascimento JP. Detection of the human parvovirus B19 in a blood donor plasma in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1989;84(2):279-80.
4. Siegl G, Bates RC, Berns KI, Carter BJ, Kelly DC, Kurstak E, et al. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology*. 1985;23(2):61-73.

5. Servant A, Laperche S, Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Meritet JF, *et al*. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J Virol*. 2002;76(18):9124-34.
6. Wong S, Young NS, Brown KE. Prevalence of parvovirus B19 in liver tissue: no association with fulminant hepatitis or hepatitis-associated aplastic anemia. *J Infect Dis*. 2003;187(10):1581-6.
7. Cohen BJ, Gandhi J, Clewley JP. Genetic variants of parvovirus B19 identified in the United Kingdom: implications for diagnostic testing. *J Clin Virol*. 2006;36(2):152-5.
8. 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 symptoms. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):604-6.
9. Candotti D, Etiz N, Parsyan A, Allain JP. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J Virol*. 2004;78(22):12169-78.
10. Parsyan A, Kerr S, Owusu-Ofori S, Elliott G, Allain JP. Reactivity of genotype-specific recombinant proteins of human erythrovirus B19 with plasmas from areas where genotype 1 or 3 is endemic. *J Clin Microbiol*. 2006;44(4):1367-75.
11. Kaufmann B, Simpson AA, Rossmann MG. The structure of human parvovirus B19. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(32):11628-33.
12. Costa FF. Anemia Falciforme. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia. Fundamentos e Prática. 1ª ed. Rio de Janeiro: 2000.
13. Valera ET, Cipolotti R, Bernardes JE, Pacagnella RC, Lima DM, Tone LG, *et al*. Pancitopenia transitória induzida por parvovirus B19 em criança portadora de esferocitose hereditária. *J Pediatr*. 2000;76(4):323-6.
14. Azzi A, Morfini M, Mannucci PM. The transfusion-associated transmission of parvovirus B19. *Transfus Med Rev*. 1999;13(3):194-204.
15. Araújo F, Koch MC, Monteiro F, Araújo AR. A infecção pelo parvovirus B19. *Acta Med Portuguesa*. 1999;12:195-202.
16. Brown KE, Anderson SM, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science*. 1993;262(5130):114-7.
17. Kasamatsu H, Nakanishi A. How do animal DNA viruses get to the nucleus? *Annu Rev Microbiol*. 1998;52:627-86.
18. Godinho C, Costa M, Alegria A, Coimbra E. Infecção por parvovirus B19 – revisão bibliográfica. *Rev Pot Doenc Infec*. 1994;4:215.
19. Wakamatsu C, Takakura F, Kojima E, Kiriya Y, Goto N, Matsumoto K, *et al*. Screening of blood donors for human parvovirus B19 and characterization of the results. *Vox Sang*. 1999;76(1):14-21.
20. Santagostino E, Mannucci PM, Gringeri A, Azzi A, Morfini M. Eliminating parvovirus B19 from blood products. *Lancet*. 1994; 343(8900):798.
21. Siegl G, Cassinotti P. Presence and significance of parvovirus B19 in blood and blood products. *Biologicals*. 1998;26(2):89-94.
22. Prowse C, Ludlam CA, Yap PL. Human parvovirus B19 and blood products. *Vox Sang*. 1997;72(1):1-10.
23. Aubin JT, Defer C, Vidaud M, Maniez Montreuil M, Flan B. Large-scale screening for human parvovirus B19 DNA by PCR: application to the quality control of plasma for fractionation. *Vox Sang*. 2000;78(1):7-12.
24. Young N. Hematologic and hematopoietic consequences of B19 parvovirus infection. *Semin Hematol*. 1988;25(2):159-72.
25. Veronesi R, Focaccia R. Tratado de infectologia: v.1. São Paulo, Atheneu, 2002. p.486-490.
26. Saarinen UM, Chorba TL, Tattersall P, Young NS, Anderson LJ, Palmer E, *et al*. Human parvovirus B19-induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood*. 1986;67(5):1411-7.
27. Setúbal S, Oliveira SA, Angelis FD, Seródio AC, Nascimento JP. Manifestações clínicas associadas ao parvovirus B19, incluindo a anemia persistente na AIDS e em outras formas de imunodepressão. *J Bras Doenças Sex Transm*. 2001;13(4):55-60.
28. Pattison JR, Jones SE, Hodgson J, Davis LR, White JM, Stroud CE, *et al*. Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet*. 1981;1(8221):664-5.
29. Amico ED, Daniel MM, Silveira PAA, Buccheri V. Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica. 3ª ed. São Paulo: Medsi; 2003. p.356.
30. Xu J, Raff TC, Muallem NS, Neubert AG. Hydrops fetalis secondary to parvovirus B19 infections. *J Am Board Fam Pract*. 2003; 16(1):63-8.
31. Bagot M, Revuz J. Papular-purpuric "gloves and socks" syndrome: primary infection with parvovirus B19? *J Am Acad Dermatol*. 1991;25(2 Pt 1):341-2.
32. Boruchoff SE, Woda BA, Pihan GA, Durbin WA, Burstein D, Blacklow NR. Parvovirus B19-associated hemophagocytic syndrome. *Arch Intern Med*. 1990;150(4):897-9.
33. Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, Anderson SM, Lehman ED, McCarthy P, *et al*. Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N Engl J Med*. 1994;330(17):1192-6.
34. Florea AV, Ionescu DN, Melhem MF. Parvovirus B19 infection in the immunocompromised host. *Arch Pathol Lab Med*. 2007; 131(5):799-804.
35. Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *N Engl J Med*. 2004; 350(6):586-97.
36. Lefrère JJ, Servant-Delmas A, Candotti D, Mariotti M, Thomas I, Brossard Y, *et al*. Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety. *Blood*. 2005; 106(8):2890-5.
37. Parsyan A, Candotti D. Human erythrovirus B19 and blood transfusion – an update. *Transfus Med*. 2007;17(4):263-78.
38. Candotti D, Etiz N, Parsyan A, Allain JP. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J Virol*. 2004;78(22):12169-78.

Avaliação: Editor e dois revisores externos
 Conflito de interesse: sem conflito de interesse.

Recebido: 15/6/2008
 Aceito: 22/01/2009

Apêndice C – Garcia SO, Pereira J, Mendrone junior A, Nissiya A, Ferreira SC, Sanabani S, Kleine neto W, Sabino EC. *Erythrovirus among patients with cytopenia of unknown origins in Brazil: a case control study*. Submetido ao JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. Junho, 2010.

Erythrovirus among patients with cytopenia of unknown origins in Brazil: a case control study

Sheila de Oliveira Garcia,^{1*} Juliana Pereira¹, Anna Nishiya², Suzete Cleusa
Ferreira², Alfredo Mendrone Jr¹, Walter Kleine-Neto², Sabri Sanabani,² and
Ester Cerdeira Sabino^{1,2}

*1-Department of Hematology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São
Paulo, Brazil*

2 Fundação Pró-Sangue, Hemocentro, São Paulo, Brazil

* Corresponding author. Mailing address: Molecular Biology Laboratory,
Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo, Brazil, Av. Eneas de
Carvalho Aguiar, 155, 1º andar, São Paulo, Brazil 05403 000. Fax: 5511
30888317. Phone: 5511 30615544, ext. 399. E-mail:
sheilagarcia.hp@gmail.com

ABSTRACT

The human erythrovirus, comprises three distinct genotypes(1,2 and 3). The role of the genotype 2 and 3 in the etiopathogenesis of hematological diseases in humans remains uncertain. Recently we have shown that genotypes 2 and 3 represent half of the infection detected in our center. The objective of this study was to evaluate the etiopathogenic relationship between these genotypes and cytopenias of unknown origins. We designed a prospective case control study in which the prevalence of erythrovirus in bone marrow samples from 120 individuals with cytopenias of unknown origins was compared with 2 controls group: 45 bone marrow donors (control 1), and 120 patients recovering from onco-hematological diseases (control 2). Parvovirus was detected through a semi-nested PCR method in bone marrow and peripheral blood samples. Positive samples were sequenced and genotyped. Of the 285 individuals analyzed, 40(14%) were PCR positive (22 were genotype 1, 5 were genotype 2 and 13 were genotype 3).The overall erythrovirus prevalence was similar between cases and controls (15% among cases and 13% in each control). Genotype 2 and 3 was associated with older age and were detected in similar proportion among cases and control group 2. This study does not support a role for erythrovirus in the etiology of cytopenias of unknown origins.

Introduction

The erythrovirus, (previously called Parvovirus B19) belongs to the genus *Erytrovirus* of the family *Parvoviridae* (2). In humans, it is responsible for a wide spectrum of diseases, including infectious erythema, arthropathies, pure red cell aplasia, anemia in immunosuppressed individuals and fetal complications when exposure and infection occur during the gestation period (16). Similar to representatives of other viral families, after the primary infection, the erythrovirus can remain in a latent state for long periods then suffer reactivation and return again to a latent state (1, 3 and 13). Persistent infection in immunocompetent individuals has been documented by detection of viral DNA in bone marrow after years of acute infection (7), however, without clinical consequences. In immunocompromised individuals, persistent infection can result in chronic anemia (4).

More recent *Erytrovirus* was sub-classified in 3 genotypes: genotype 1 (prototype variant Pvbaua); genotype 2 (prototype variant Lali) and genotype 3 (prototype variant V9) (8, 9 and 14).

Acute infection from genotype 1 has been associated with temporary block of medullar erythropoiesis in immunocompetent individuals, transient aplastic crisis, in patients with chronic hemolytic anemia and chronic development of pure red cell aplasia in immunosuppressed patients, due to the tropism that the virus has to bone marrow erythroid precursors cells. The emergence of other cytopenias such as leukopenia and thrombocytopenia has also been associated with erythrovirus acute infection, and is probably due to stimulation of the histiocytic- macrophage system in the bone marrow,

leading to phagocytosis of the megakaryocytes and granulocytes precursors (11, 15 and 6).

As a result of these hematological findings, the search for erythrovirus by PCR became part of the diagnostic investigation of patients with cytopenias of unknown origins (5).

We have previously shown that half of the positive samples for erythrovirus in our center were from genotype 3 (12). However the clinical significance of detecting genotype 2 and 3 in bone marrow has not yet been defined. The objective of this study was to if the presence of erythrovirus in bone marrow is associated to cytopenias of unknown cause.

Materials and Methods

Study design

The present study was designed as a prospective case-control study and was conducted from September of 2006 to May 2009. Cases were consecutively collected among patients from the Hospital das Clínicas of the University of Sao Paulo (FMUSP) with cytopenia of unknow origin from whom a bone marrow samples was collected for diagnosis purpose that included PCR for erythrovirus. The working hypothesis was that detection of erythrovirus by PCR would be higher in this group as compared to controls.

Two controls group were used from the same hospital:

Group 1: bone marrow donors (N=45) we collected all available samples during the study period;

Group 2: patients with onco-hematological disorders from whom a bone marrow sample was requested as part of their routine follow up (N=120). We matched according to the week of the case collected.

The study was approved by the Ethics Committee of the FMUSP. All of the participants were able to read and sign the Informed Consent before entering the study. A standardized questionnaire was applied by the researcher, containing questions related to their socio-demographic data and medical history.

Erythrovirus PCR

From each participant, in the study, two samples were collected: one aspirate sample of bone marrow (approximately 1 mL) and 5 mL of peripheral blood

The nucleic acids were extracted from the bone marrow and plasma samples using the kit Qiamp Blood (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), according to the instructions of the manufacturer. A semi-nested PCR using primers that amplify all 3 genotype was used as previously described (12), the PCR product yield a fragment of 424 bp (nt 1267 to 1691, corresponding to those of the prototype strain Pvbaua [GenBank accession no. M13178]).

Genotyping

Sequencing and genotyping of the 424 bp PCR product was purified with the QIAquick kit (QIAquick®, Qiagen Inc, Valencia, CA, USA) and directly sequenced in an automatic DNA sequencer (ABI 3130 Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) with the ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) according to their respective protocols.

The sequences were edited using the Sequencher program version 4.0.5 (Gene Code Corp. Ann Arbor, Mich.) and aligned using the program BioEdit Sequence Alignment Editor with the reference sequences of the three main genotypes obtained from GenBank (AB126271, M13178, AF161226, AB126269, Z70560, AY386330, AF161223, AJ717293, AY064476, AY064475, AY044266, AY647977, AY083234). The phylogenetic analysis was carried out with the Phylip 3.5c program. Bootstrap values were determined on 1000 replicates of the sequence using Seqboot program. Phylogenetic reconstructions were generated by the Neighbor-Joining program, and the distances were calculated by the maximum likelihood with DNADist program. The consensus tree was performed by the Consense program.

Serology

The plasma samples were tested for the presence of IgG and IgM anti-erythrovirus antibodies through an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), utilizing the commercial Kit BIOTRIM following the instructions of the manufacturer.

Statistical Methods

The data was analyzed using resources from the statistical program Stata (version 9.0), analysis of categorical variables was carried out using chi-square (χ^2) tests with corrections from the Fisher test. A value of P less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Of the 285 individuals evaluated, 152 (53%) were male and 133 (47%) were female. The median age was 53 years old (DP=18.5). Table 1 summarizes the data of each of the three groups in relation to gender and age. Bone marrow donors were younger as compared to cases and control 2 ($p<0.01$). Control 2 had more males than females as compared to cases and control 1 ($p=0.05$).

PCR was positive in 40 (14%) of the 285 bone marrow samples. Of these, 11 (27.5%) was also positive in the peripheral blood samples.

Among the 40 individuals with positive PCR results in their bone marrow samples, genotype 1 was found in 22 (55%), genotype 2 in 5 (12.5%), and genotype 3 in 13 (32.5%). The overall prevalence of erythrovirus was similar between cases and controls (Table 2). Genotype 2 and 3 had also a similar prevalence among cases (6.6%) and the control 2 (8.3%). We could not detect genotype 2 and 3 among bone marrow donors. PCR positivity in plasma was also similar in cases (5.0%) and controls (4.2%)

The age distribution was different among genotype 1 and genotype 2 and 3 ($p=0.031$). The youngest individual positive for genotype 2 was 49 years old and for genotype 3 was 33, whereas with genotype 1 the youngest individual was 19 years old.

Selected clinical and laboratory data of the individuals positive for PCR are given on Table 3.

Discussion

In a previous study we have shown that erythrovirus was detected in 17% of the samples submitted to our laboratory and genotypes 2 and 3 were found in approximately half of those samples (12). The higher prevalence of these genotypes in our patients allowed us to design a case control study to determine whether the detection of erythrovirus in bone marrow samples could be associated to cytopenia.

The overall erythrovirus prevalence that we found (14%) was similar to our previous results, genotype 2 and 3 also represented half of the positive samples.

Unfortunately, because we were using convenient samples, the controls groups were not fully matched in terms of age: bone marrow donors were younger as compared to the other 2 groups. Also during the study period, the procedure for stem cell collection changed and aphaeresis was preferable used in the place of bone marrow aspirate. So we could not reach the 120 bone marrow samples as originally planned.

Nevertheless the overall PCR results were quite similar in the 3 groups suggesting that detection of erythrovirus in bone marrow is common for all genotypes and that these virus are not the etiological agent of most cases of cytopenia. Although the numbers were small to make final conclusion, plasma PCR was also similar in both groups.

The genotype distribution was associated with age, and was mainly present in people over 50 years old. These findings are in agreement with Norja and colleagues (10) that have also found a high percentage of these viruses in a

variety of human tissue and also genotype 2 was mainly found in older people. This age distribution may explain why we did not find genotype 2 and 3 among bone marrow controls, they were younger than the other two groups. In conclusion our data suggest that erythrovirus detection in bone marrow is a common event and probably not related to most cytopenias of unknown origins. In these patients, PCR results should not be utilized exclusively for specific therapeutic orientation.

Nucleotide sequence accession numbers. The sequences of our isolates were reported to GenBank under accession numbers DQ229350 to DQ229361.

Acknowledgment

The study was supported by a FAPESP grant 06/55708-4 and by a CNPQ grant 136625/2008-8.

References Bibliographical

1. **Cassinotti P, Burtonboy G, Fopp M and Siegl G.** Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. *J Med Virol* 1997; **53**: 229-32.
 2. **Cossart YE, Field AM, Cant B and Widdows D.** Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* 1975; 1(7898):72-3.
 3. **Coulombel L, Morinet F, Mielot F, Tchernia G.** Parvovirus infection, Leukaemia, and immunodeficiency. *Lancet* 1989; **1**: 101-102.
 4. **Frickhofen N, Abkowitz JL, Safford M, Berry JM, Antunez-de-Mayolo J, Astrow A, Cohen R, Halperin I, King L and Mintzer D.** Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. *Ann Int Med* 1990; **113**: 926-933.
 5. **Handgretinger PFR and Schaefer HE.** Pure red cell aplasia. *Brit J Haematol* 2000; **111**:1010-22.
 6. **Hong MP, Dawson DB and Rogers ZR.** Polymerase chain reaction amplification of archival material for Epstein Barr virus, cytomegalovirus, human herpesvirus 6 and parvovirus B19 in children with bone marrow hemophagocytosis. *Hum Pathol* 1998; **29**:1074-7.
 7. **Kerr JR, Cartron JP, Curran MD, Moore JE, Elliott JR and Mollan RA.** A study of the role of parvovirus B19 in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1995; **34**:809-813.
 8. **Nguyen QT, Sifer C, Schneider V, Allaume X, Servant A, Bernaudin F, Auguste V and Garbarg-Chenon A.** Novel human erythrovirus associated with transient aplastic anemia. *J Clin Microbiol* 1999; **37**:2483-2487.
 9. **Nguyen QT, Wong S, Heegaard ED and Brown KE.** Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. *Virology* 2002; **301**:374-380.
 10. **Norja P, Hokynar K, Aaltonen LM, Chen R, Ranki A, Partio EK, Kiviluoto O, Davidkin I, Leivo T, Eis-Hübinger AM, Schneider B,**
-

- Fischer HP, Tolba R, Vapalahti O, Vaheri A, Söderlund-Venermo M and Hedman K.** Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc Natl Acad Sci* 2006; **103**(19):7450-3.
11. **Risdall RJ, McKenna RW and Nesbit ME.** Virus-associated hemophagocytic syndrome: a benign histiocytic proliferation distinct from malignant histiocytosis. *Cancer* 1979; **44**:993-1002.
12. **Sanabani S, Neto WK, Pereira J and Sabino EC.** Sequence variability of human erythroviruses present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus B19-related hematological symptoms. *J Clin Microbiol* 2006; **44**(2):604-6.
13. **Sasaki T, Murai C, Muryoi T, Takahashi Y, Munakata Y, Sugamura K and Abe K.** Persistent infection of human parvovirus B19 in a normal subjects. *Lancet* 1995; 346-351.
14. **Servant A, Laperche S, Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Meritet JF and Garbarg-Chenon A.** Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J Virol.* 2002; **76**:9124-9134.
15. **Shirono K and Tsuda H.** Parvovirus B19-associated haemophagocytic syndrome in healthy adults. *Br J Haematol* 1995; **189**:923-926.
16. **Young NS and Brown KE.** Parvovirus B19. *New Engl J Med* 2004; **350**:586-597.
-

Table 1 Demographic characteristics of the cases and controls.

Characteristics	Case N (%)	Control 1 N (%)	Control 2 N (%)	Total
Age Group (in years)				
Up to 25	13 (10.8)	8 (17.7)	10 (8.3)	31 (10.9)
26 - 50	37 (30.8)	30 (66.6)	28 (23.3)	95 (33.3)
over 50	70 (58.3)	7 (15.6)*	82 (68.3)	159 (55.9)
Gender				
Male	54 (45.0)	25 (55.6)	73(60.8)**	152 (53.3)
Female	66 (55.0)	20 (44.4)	47 (39.7)	133 (46.7)

*p< 0.01 (control 1 as compared to case and control 2)

** p<0.05 (control 2 as compared to case and control 1)

TABLE 2 – Erythrovirus prevalence according to genotype.

		Overall PCR N(%)	Genotype 1 N(%)	Genotype 2 and 3 N(%)	Total
Group					
	Cases	18(15.0)	10 (8.3)	8 (6.6)	120
	Control 1	6(13.3)	6 (13.3)	0(0)	45
	Control 2	16(13.3)	6 (5)	10 (8.3)	120
Age group (in years)					
	Up to 25	1(3.2)	1 (3.2)	0(0)*	31
	26 - 50	14(14.7)	11 (11.6)	3 (3.1)	95
	Over 50	25(15.7)	10 (6.3)	15 (9.4)*	159
Gender					
	Male	20(13.1)	11 (7.2)	9 (5.9)	152
	Female	20(15.0)	11 (8.2)	9 (6.7)	133

*Fisher exact test $p=0.03$ (age distribution for genotype 2 and 3 as compared to genotype 1)

TABLE 3 – Description of the 40 cases positive by PCR

		Age (years)	Sample PCR +	Genotype	Serology (ELISA)	Clinical History
Cases	1	36	PL and BM	1	IgM and IgG	Pure Red Cell Aplasia - HIV - Hepatitis
	2	61	BM	1	IgG	Pancytopenia
	3	27	BM	1	IgG	Anemia – Skin rash – Arthralgia
	4	84	BM	3	IgG	Pure Red Cell Aplasia
	5	54	PL and BM	3	IgM and IgG	Anemia – Skin rash - Arthralgia
	6	53	PL and BM	1	IgM and IgG	Pure Red Cell Aplasia – Skin rash - Arthralgia
	7	76	BM	3	Negativa	Anemia – Skin rash - Arthralgia
	8	33	BM	3	IgG	Leukopenia
	9	76	BM	1	IgG	Thrombocytopenia
	10	72	BM	2	IgG	Thrombocytopenia
	11	56	BM	1	IgG	Anemia - Arthralgia
	12	43	BM	1	IgG	Anemia e Thrombocytopenia
	13	87	PL and BM	1	Negative	Pancytopenia
	14	55	PL and BM	3	IgG	Thrombocytopenia
	15	61	PL and BM	1	IgG	Anemia – Skin rash - Hepatitis
	16	69	BM	2	IgG	Thrombocytopenia – Skin rash – Arthralgia – Hepatitis
	17	62	BM	3	IgG	Thrombocytopenia - Arthralgia
	18	53	BM	1	IgG	Leukopenia – Arthralgia
Control 1	1	31	BM	1	IgG	Asymptomatic
	2	30	BM	1	IgG	Asymptomatic
	3	31	BM	1	IgG	Asymptomatic
	4	33	BM	1	IgG	Asymptomatic
	6	45	BM	1	IgG	Asymptomatic

Control 2	1	63	PL and BM	3	IgG	Non-Hodgkin lymphoma
	2	74	BM	3	IgG	Chronic Lymphocytic Leukemia
	3	57	BM	1	IgG	Hodgkin lymphoma
	4	57	BM	1	Negative	Hairy Cell Leukemia
	5	73	PL and BM	2	Negative	Chronic Lymphocytic Leukemia
	6	47	PL and BM	3	IgG	Chronic Myelogenous Leukemia
	7	63	BM	3	IgG	Hairy Cell Leukemia
	8	56	BM	3	IgG	Chronic Lymphoproliferative disease
	9	42	BM	1	IgG	Myelodysplastic Syndrome
	10	61	BM	3	Negative	Follicular lymphoma
	11	47	PL and BM	1	IgG	Follicular lymphoma
	12	19	BM	1	IgG	Chronic Lymphocytic Leukemia
	13	61	BM	3	Negative	Myeloproliferative Syndrome
	14	49	BM	2	IgG	Chronic Lymphocytic Leukemia
	15	73	BM	2	IgG	Chronic Lymphocytic Leukemia
	16	37	PL and BM	1	IgG	Non-Hodgkin Lymphoma

PL = plasma and BM = Bone Marrow