

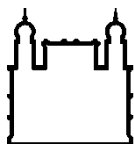
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO PARVOVÍRUS HUMANO
B19 EM PACIENTES COM FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA**

ARTHUR DANIEL ROCHA ALVES

Rio de Janeiro
2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ARTHUR DANIEL ROCHA ALVES

Diagnóstico laboratorial da infecção pelo Parvovírus Humano B19 em pacientes com falência hepática aguda.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2017

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A474 Alves, Arthur Daniel Rocha

Diagnóstico laboratorial da infecção pelo Parvovírus Humano B19 em pacientes com falência hepática aguda / Arthur Daniel Rocha Alves. – Rio de Janeiro, 2017.

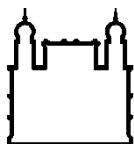
xvi, 128 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Bibliografia: f. 88-101

1. Parvovírus humano B19. 2. PCR em tempo real. 3. Falência hepática aguda. 4. Diagnóstico. I. Título.

CDD 579.247



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: ARTHUR DANIEL ROCHA ALVES

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO PARVOVÍRUS HUMANO B19 EM PACIENTES COM FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia

Prof. Dr. Otacílio da Cruz Moreira

Prof.^a Dr.^a Tatiana Xavier de Castro

Prof. Dr. Túlio Machado Fumian

Prof.^a Dr.^a Claudete Aparecida Araújo Cardoso

Presidente (UFF)

Membro (IOC/FIOCRUZ)

Membro (UFF)

Suplente (IOC/FIOCRUZ)

Suplente (UFF)

Rio de Janeiro, 13 de fevereiro de 2017

**Dedico este trabalho aos meus pais
Daniel Ferreira Alves e Rita de Cássia
da Rocha Alves!**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter colocado no meu caminho todas as pessoas maravilhosas que estou agradecendo aqui. Em seguida agradeço aos meus pais Daniel Ferreira Alves e Rita de Cássia da Rocha Alves, por todo o apoio e paciência que tiveram comigo durante esses dois anos e a toda a minha família, em especial ao meu primo Aurelio Miguel da Rocha Silva, que me ajudou em toda a parte de informática que eu nada domino.

Aos meus orientadores, Dr. Marcelo Alves Pinto e a Dra. Luciane Almeida Amado Leon por todo o conhecimento que ambos me passaram e que levarei por toda a minha vida e por terem confiado a mim um projeto tão importante e interessante.

Ao curso de pós-graduação em Biologia Parasitária pela contribuição na minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

Às professoras da Universidade Federal Fluminense (UFF), Dra. Solange Artimos de Oliveira e Dra. Kátia Martins Lopes de Azevedo da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, que cederam soros de pacientes IgM positivos para dengue e rubéola e de pacientes infectados pelo HIV e a Dra. Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto Biomédico que cedeu soros de pacientes com diagnóstico laboratorial da infecção pelo B19V.

À professora Dra. Débora Regina Lopes dos Santos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) que cedeu amostra de DNA do parvovírus canino para utilização como controle neste estudo.

Ao Serviço de Transplante Hepático do Estado do Rio de Janeiro que cedeu as amostras de soro e tecido hepático de pacientes com Falência Hepática Aguda.

À plataforma de sequenciamento de DNA da Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz pela realização do sequenciamento das amostras de pacientes com Falência Hepática Aguda e ao Laboratório de Vírus Respiratórios e

do Sarampo (LVRS) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) pela realização de testes sorológicos das amostras de pacientes com Falência Hepática Aguda.

À banca examinadora, Dra. Claudete Aparecida Araújo Cardoso, Dr. Otacílio da Cruz Moreira, Dra. Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia, Dra. Tatiana Xavier de Castro e Dr. Túlio Machado Fumian, por todas as críticas construtivas a fim de promover melhorias no estudo.

Aos alunos (de IC, mestrado e doutorado), aos técnicos, tecnologistas e servidores do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV) por todas as edificantes conversas e almoços. É impressionante como grandes descobertas são feitas em conversas informais!

As minhas colegas de laboratório Jéssica Vasques Raposo, que trabalhou muito junto comigo e discutimos muito os nossos resultados e Fernanda de Oliveira Bottino, uma amiga que está sempre disposta a conversar e ajudar a qualquer momento do dia e da noite. Somos alunos exemplares!

A todos da turma de mestrado em Biologia Parasitária de 2015: Agatha Rosa, Alessandra Araújo, Arthur Rasinhas, Beatriz Pavão, Camila Santos, Diana Rangel, Iasmim Mello, Jéssica Lima, Jéssica Raposo, Lana Chaves, Larissa Vieira, Leonardo Lara, Marcelle Cappato, Melina Merlone, Monique Costa, Samyra Silveira, Stéphanie Campos, Taiza Braga e Thiara de Souza. Biossegurança, Parasito I e Parasito II foi muito mais legal por causa da presença de todos vocês!

Aos meus amigos Filipe de Mesquita Santana, Larissa Cristina Duarte Corrêa, Pedro Henrique Duque Teixeira e Thaís Rodrigues Ribeiro que mesmo tendo vindo em momento diferentes da minha vida, hoje me ajudam em conjunto a mostrar que o mundo é muito maior que as fronteiras da FIOCRUZ.

A todos os servidores, alunos e trabalhadores da Fundação Oswaldo Cruz, do Instituto Oswaldo Cruz, em especial ao Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, da Pós-graduação em Biologia Parasitária e da Secretaria Acadêmica do IOC.

“A persistência é o caminho do êxito”.

Charles Chaplin

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

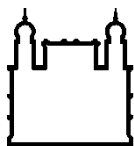
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO PARVOVÍRUS HUMANO B19 EM PACIENTES COM FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Arthur Daniel Rocha Alves

A infecção pelo Parvovírus humano B19 (B19V) geralmente é aguda e autolimitada, podendo causar uma ampla variedade de manifestações clínicas. Estudos relatam a ocorrência de hepatite em pacientes imunocompetentes infectados pelo B19V, com manifestações hepáticas que variam desde alterações bioquímicas do fígado até a falência hepática aguda (FHA). O objetivo desse estudo foi otimizar a PCR em tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação de DNA-B19V em amostras clínicas e dessa forma determinar a importância deste vírus como um dos agentes de hepatite aguda e fulminante. Para otimizar a qPCR, inicialmente foram testadas um painel de amostras positivas ($n=20$) e negativas ($n=36$) para o B19V, composto por soros de pacientes infectados pelo HIV, Rubéola, Dengue, Herpesvírus humano 1, Vírus da Hepatite A, Vírus da Hepatite B e um controle positivo para Parvovírus canino a fim de avaliar a especificidade da técnica. Após a extração do DNA viral foi realizada a qPCR através das metodologias Sybr Green® e TaqMan®, utilizando oligonucleotídeos para a região NS1 do B19V e uma curva padrão sintética para quantificação absoluta da carga viral. Após a otimização do teste, amostras de soro e tecido hepático de pacientes com FHA ($n=30$) foram testados. A metodologia de Sybr Green® apresentou coeficiente de linearidade (R^2)=0,99, eficiência de 97% e um limite de detecção de $4,32 \times 10^1$ cópias/ μL . A metodologia de TaqMan® apresentou R^2 =0,99, eficiência de 95% e um limite de detecção de 1,83 cópias/ μL . Na metodologia de Sybr Green® um resultado falso positivo foi observado enquanto que na metodologia de TaqMan® nenhum resultado falso positivo ou falso negativo foi detectado. Desta forma, a metodologia de TaqMan® foi utilizada para avaliar as amostras de pacientes com FHA ($n=30$). Entre elas, sete amostras pareadas de soro e tecido hepático foram positivas para B19V-DNA, com cargas virais variando de 1,07 a 8,52 cópias/ μL no soro e de $2,5 \times 10^1$ a $1,6 \times 10^2$ cópias/ μL no tecido hepático. Entre esses pacientes, três tinham hepatite sem origem conhecida (hepatite criptogênica), três hepatite viral (dois por HBV e um por CMV) e um caso hepatite medicamentosa por izoniazida. Entre os pacientes com FHA e B19V, quatro evoluíram ao óbito, dois dos quais estavam coinfectados por HBV e dois com hepatite criptogênica. Esses resultados indicam que o B19V deve ser considerado no diagnóstico diferencial de hepatites criptogênicas e na FHA e demonstram a importância em otimizar um método molecular sensível e específico para diagnosticar esses casos de infecção.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

LABORATORY DIAGNOSTIC OF HUMAN PARVOVIRUS B19 INFECTION IN ACUTE LIVER FAILURE PATIENTS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Arthur Daniel Rocha Alves

Human Parvovirus B19 (B19V) infection is usually acute and self-limited and may cause a wide variety of clinical manifestations. Studies report the occurrence of hepatitis in immunocompetent patients infected with B19V, with hepatic manifestations ranging from biochemical changes of the liver to acute liver failure (ALF). The objective of this study was to optimize real-time PCR (qPCR) for detection and quantification of B19V-DNA on clinical samples and thus to evaluate the role of B19V as an agent of acute and fulminant hepatitis. To establish the qPCR, a panel of standard samples positive (n= 20) and negative (n= 36) for B19V, consisting of sera from patients infected with HIV, Rubella, Dengue, HSV, HAV, HBV and a positive control of canine parvovirus to assess the specificity of the technique. After extracting the viral DNA, qPCR was performed through the Sybr Green® and TaqMan® methodologies, using primers and probes for the NS1 region of B19V and a synthetic standard curve for absolute quantification of viral load. After optimization of the test, serum and hepatic tissue samples from patients with ALF (n= 30) were tested. The Sybr Green® methodology showed $R^2= 0.99$, 97% of efficiency and a detection limit of 4.32×10^1 copies/ μ L. The TaqMan® methodology showed $R^2= 0.99$, 95% of efficiency and a detection limit of 1.83 copies/ μ L. In the Sybr Green® methodology a false positive result was found whereas in the TaqMan® methodology no false positive or false negative results were observed. Thus, the TaqMan® methodology was used to test the samples of patients with ALF (n= 30). Among them, seven paired serum and hepatic tissue samples were positive for B19V-DNA, with viral loads ranging from 1.07 to 8.52 copies/ μ L in serum and 2.5×10^1 to 1.6×10^2 copies/ μ L in hepatic tissue. Of these seven patients, three had cryptogenic hepatitis, three viral hepatitis (two for HBV and one for CMV), and one hepatitis of izoniazid. In addition, four cases evolved to death, two co-infected with HBV and two with cryptogenic hepatitis. These results indicate that B19V should be considered in the differential diagnosis of cryptogenic hepatitis and ALF and demonstrate the importance of establishing a sensitive and specific molecular method to diagnose these cases of infection.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Histórico	17
1.2 Taxonomia e estrutura viral	18
1.3 Organização genômica e proteica	19
1.3.1 Variabilidade genômica.....	21
1.4 Ciclo de replicação	23
1.4.1 Propagação do B19V em cultura celular.....	25
1.5 Epidemiologia	26
1.6 Patogênese e resposta imune	29
1.7 Manifestações clínicas	30
1.7.1 Persistência do B19V.....	34
1.8 Parvovírus B19 e hepatites	36
1.9 Tratamento e prevenção	38
1.10 Diagnóstico	39
1.11 Justificativa	41
2 OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo Geral	44
2.2 Objetivos Específicos	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Aspectos éticos	45
3.2 Amostras clínicas	45
3.3 Extração de ácidos nucleicos	48
3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	48
3.4.1 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação da região NS1 do genoma do Parvovírus B19	49
3.4.2 Semi nested PCR para amplificação do genoma que codifica para as proteínas VP1/VP2	50

3.4.3	Eletroforese em gel de agarose	50
3.5	PCR quantitativo em tempo real para detecção do genoma do B19V e determinação da carga viral	51
3.5.1	Metodologia de Sybr Green®	52
3.5.2	Metodologia de TaqMan®.....	53
3.5.3	Avaliação do desempenho da PCR em tempo real	54
3.6	Pesquisa de anticorpos anti-B19V IgM e IgG.....	55
3.7	Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética.....	56
3.8	Avaliação de replicativo intermediário (RNAm) da infecção pelo B19V em pacientes com hepatite fulminante.....	57
3.8.1	Extração de RNAm	57
3.8.2	Síntese do DNA complementar (cDNA).....	58
3.8.3	RT-PCR de replicativo intermediário	59
3.9	Análise bioquímica.....	62
3.10	Análise estatística	62
4	RESULTADOS	63
4.1	Descrição da população de estudo	63
4.2	Otimização da PCR em tempo real para detecção e quantificação do B19V	64
4.2.1	Avaliação de concentrações de oligonucleotídeos iniciadores e temperaturas de hibridização.....	64
4.2.2	Avaliação da Curva Padrão Sintética	66
4.2.3	Avaliação da Sensibilidade	67
4.2.4	Avaliação da Especificidade	68
4.2.5	Avaliação da Reprodutibilidade e Repetitividade.....	69
4.2.6	Avaliação de inibidores de PCR com o controle endógeno RNase P	70
4.3	Detecção de marcadores sorológicos e moleculares para o B19V entre pacientes com FHA.....	71
4.4	Sequenciamento e análise filogenética.....	75
4.5	Detecção de RNAm em tecido hepático de pacientes FHA/B19V-DNA+.....	77
4.6	Avaliação de parâmetros bioquímicos hepáticos nas populações estudadas.....	78

5	DISCUSSÃO	80
6	CONCLUSÕES	86
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	87
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
9	ANEXOS	102
9.1	Anexo 1 – Projeto do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz.....	102
9.2	Anexo 2 – Sequências protótipos de B19V utilizadas para a construção de árvore filogenética	114
9.3	Anexo 3 – Submissão de artigo científico com os dados levantados por essa dissertação	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 (A) Micrografias de transmissão para Parvovirus B19; (B e C) Desenhos esquemáticos da partícula viral	17
Figura 1-2 Estrutura do genoma e mapa genético do B19V	20
Figura 1-3 Esquema do ciclo de Replicação do Parvovirus B19	25
Figura 1-4 Patofisiologia da infecção pelo B19V	30
Figura 1-5 Modelo de persistência do B19V em tecidos não eritroides	36
Figura 3-1 Fluxograma com as etapas da padronização do teste de qPCR.....	47
Figura 3-2 Fluxograma com as etapas da análise de amostras FHA.....	48
Figura 4-1 Curvas de dissociação	65
Figura 4-2 Curva padrão de DNA-B19V na metodologia de Sybr Green®.....	66
Figura 4-3 Curva padrão de DNA-B19V na metodologia de TaqMan®	67
Figura 4-4 Árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining baseada nas sequências de 427pb da região VP1/VP2 do B19V com as sete amostras FHA/B19V-DNA+ marcadas com círculos azuis e o controle positivo (CP) marcado com círculo vermelho e as sequências protótipos do Genbank 76	
Figura 4-5 Gel de eletroforese da PCR nested para amplificação do transcrito codificante de VP2 do B19V	77
Figura 4-6 Gel de eletroforese da PCR 2210-2355 para amplificação do transcrito codificante do éxon central presente em todos os transcritos do B19V	77
Figura 4-7 Gráficos de avaliação de bilirrubina total nas populações de estudo	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-1 Doenças causadas pelo B19V	33
Tabela 3-1 Amostras de soro de pacientes utilizados na padronização do qPCR	46
Tabela 3-2 Oligonucleotídeos utilizados na PCR qualitativa e semi-nested	49
Tabela 3-3 Oligonucleotídeos utilizados na PCR em tempo real	51
Tabela 3-4 Reagentes utilizados na PCR em tempo real - Sybr Green®	52
Tabela 3-5 Reagentes utilizados na PCR em tempo real - TaqMan®	53
Tabela 3-6 Oligonucleotídeos para detecção de RNAm (Abe <i>et al.</i> , 2007)	60
Tabela 3-7 Padrão de termociclagem da RT-PCR (Abe <i>et al.</i> , 2007)	60
Tabela 3-8 Oligonucleotídeos para detecção de RNAm - Bonvicini <i>et al.</i> , 2008	61
Tabela 3-9 Padrão de termociclagem da RT-PCR (Bonvicini <i>et al.</i> , 2008)	61
Tabela 4-1 Descrição da população de estudo conforme o gênero e o grupo etário	63
Tabela 4-2 Descrição da etiologia dos pacientes com Falência Hepática Aguda	64
Tabela 4-3 Avaliação de concentrações de oligonucleotídeos iniciadores e temperaturas de hibridização na metodologia de Sybr Green®	65
Tabela 4-4 Avaliação do limite de detecção da PCR em tempo real	67
Tabela 4-5 Avaliação da especificidade de PCR em tempo real	68
Tabela 4-6 Reprodutibilidade das metodologias Sybr Green® e TaqMan®	69
Tabela 4-7 Repetitividade das metodologias de Sybr Green® e TaqMan®	70
Tabela 4-8 Avaliação do controle endógeno RNase P	71
Tabela 4-9 Características dos sete pacientes com falência hepática aguda positivos e resultados de marcadores sorológicos e moleculares para o B19V-DNA	73
Tabela 4-10 Características dos 23 pacientes com FHA negativos para B19V-DNA	74
Tabela 4-11 Avaliação dos parâmetros bioquímicos hepáticos nas populações caso e controles deste estudo	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Temperatura em graus Celsius
μL	Microlitro
ALT	Alanina Aminotransferase
ALF	<i>Acute liver failure</i>
AST	Aspartato Aminotransferase
B19V	Parvovírus Humano B19
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cox2	Ciclo-oxigenase 2
Ct	<i>Cycle treshold</i>
CMV	Citomegalovírus
CV	Coeficiente de Variação
DENV	Vírus Dengue (do inglês, <i>Dengue virus</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DP	Desvio padrão
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FA	Fosfatase alcalina
FHA	Falência Hepática Aguda (tradução de ALF)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Gramas
Gama-GT	Gama-Glutamil Transferase
HAV	Vírus da Hepatite A (do inglês, <i>Hepatitis A virus</i>)
HBV	Vírus da Hepatite B (do inglês, <i>Hepatitis B virus</i>)
HCV	Vírus da Hepatite C (do inglês, <i>Hepatitis C virus</i>)
HDV	Vírus da Hepatite D (do inglês, <i>Hepatitis D virus</i>)
HEV	Vírus da Hepatite E (do inglês, <i>Hepatitis E virus</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana (do inglês, <i>Human immunodeficiency virus</i>)
HSV	Vírus Herpes Simplex (do inglês, <i>Herpes Simplex virus</i>)
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral (do inglês, <i>International Committee of Taxonomy of Virus</i>)
IFN-γ	Interferon γ
IgG	Imunoglobulina G

IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ITR	Repetições terminais inversamente idênticas (do inglês, <i>Identical inverted terminal repeats</i>)
kDa	Kilodáltons
LADTV	Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia
LVRS	Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo
M	Molar
mM	Milimolar
mL	Mililitro
ND	Não detectado
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kB
NIH	Instituto Nacional de Saúde (do inglês, <i>National Institute of Health</i>)
nm	Nanômetros
NS1	Proteína Não Estrutural 1 (do inglês, <i>non-structural protein 1</i>)
nt	Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa e em tempo real (do inglês, <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>Rybonucleic acid</i>)
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _{seP}	Ribonuclease P
RPM	Rotações por minuto
T _m	Temperatura de Melting
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UI	Unidades Internacionais
VP1	Proteína viral 1 (do inglês, <i>viral protein 1</i>)
VP2	Proteína viral 1 (do inglês, <i>viral protein 2</i>)

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

O Parvovírus Humano B19 (B19V) foi primeiramente descrito e publicado por Yvonne Cossart na Inglaterra em 1974, a partir de soros de pacientes que, quando testados por contraímuno-elektroforese, geravam uma linha de precipitação com soro polivalente humano contra o vírus da hepatite B (HBV) mas quando testados por radioimunoensaio eram negativos para o HBV. A microscopia eletrônica das linhas de precipitação revelou a presença de partículas muito pequenas, de cerca de 23nm, semelhantes à de parvovírus animais (Figura 1-1). Este novo vírus foi denominado “partícula semelhante a parvovírus no soro” ou do inglês SPLV (*Serum parvovirus-like particle*), mas curiosamente, devido ao fato do soro ocupar a posição 19 da placa B do ensaio, o vírus foi denominado Parvovírus B19 (Cossart *et al.*, 1975). O vírus foi independentemente descrito na França em 1972 e recebeu o nome de antígeno Aurillac (Courouce *et al.*, 1984) e no Japão em 1980, chamado de vírus “Nakatani” (Okochi *et al.*, 1984), porém alguns testes foram realizados e revelaram que esses vírus eram idênticos.

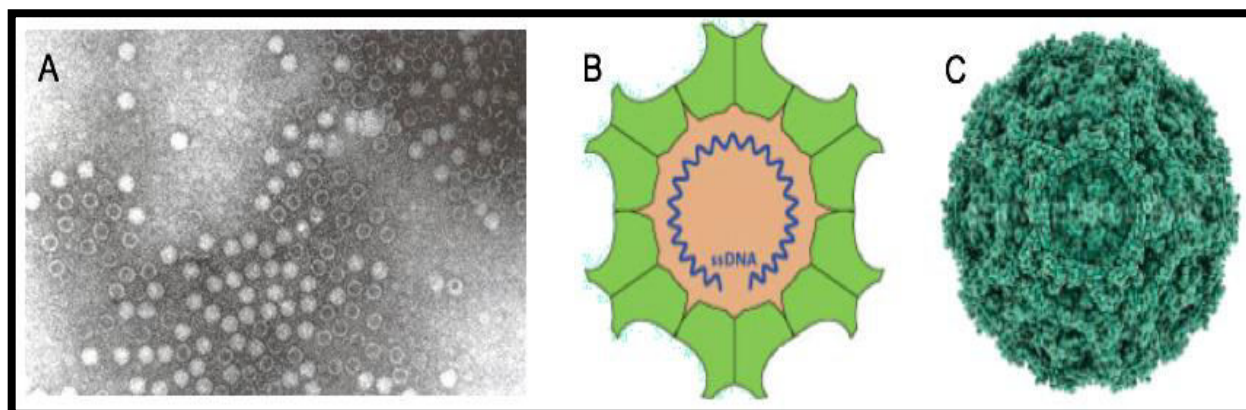


Figura 1-1 (A) Micrografias de transmissão para Parvovírus B19; (B e C) Desenhos esquemáticos da partícula viral

Fonte: adaptado de (A) Servant-Delmas e colaboradores (2010); (B) Viralzone (www.viralzone.expasy.org); (C) Science Photo Library (www.sciencephotolibrary.com)

A primeira associação do vírus com doença humana foi registrada apenas cinco anos depois por Shneerson e colaboradores (1980), através da análise de microscopia eletrônica de partículas virais em amostra de soro de dois soldados com

doença febril. Porém até esse momento não havia nenhuma doença característica da infecção pelo B19V, até ser associado à crise aplástica transitória (Pattison *et al.*, 1981), em que os autores observaram antígenos de B19V no soro de uma criança Jamaicana residente em Londres no momento da crise aplástica e na fase convalescente somente anticorpos foram detectados por contraímuno-elektroforese.

Em 1984, Anderson e colaboradores demonstraram que o B19V era o agente etiológico do eritema infeccioso durante o estudo de um surto em uma escola em Londres, e hoje em dia este vírus é aceito como causador desta doença, conhecida como Quinta doença (Anderson *et al.*, 1984).

A hidropsia fetal decorrente da infecção intrauterina por B19V foi primeiramente relatada por Brown e colaboradores (1984) e a artrite aguda por White e colaboradores (1985).

No Brasil, um estudo de prevalência de anticorpos da infecção pelo B19V na cidade do Rio de Janeiro foi conduzido por Nascimento e colaboradores (1990) utilizando amostras de soro coletadas entre 1985 e 1986. Em Belém, Freitas e colaboradores (1988) e Miranda e colaboradores (1989) estudaram 39 casos de doença exantemática, sendo 13 pacientes IgG positivos para B19V e dois pacientes IgM positivos, ocorrendo a primeira descrição de eritema infeccioso no Brasil. Em outubro de 1988, Cruz e colaboradores detectaram o antígeno de B19V em amostra de plasma de doador de sangue assintomático da cidade de Cabo Frio em outubro de 1988. Em 1992, Cubel e colaboradores relataram pela primeira vez no Brasil, crise aplástica transitória associada ao B19V em pacientes com anemias constitucionais e em 1996 detectaram o genoma do B19V em dois casos de hidropsia fetal não imune que ocorreram no ano de 1988, coincidindo com a detecção do B19V no plasma de doadores de sangue, sugerindo que 1988 foi um ano epidêmico para o B19V no Rio de Janeiro (Cubel *et al.*, 1996).

1.2 Taxonomia e estrutura viral

A família *Parvoviridae* abrange uma ampla faixa de vírus e é dividida em duas sub-famílias: a *Parvovirinae*, de vírus que infectam vertebrados e a *Densovirinae*, de vírus que infectam invertebrados. Caracteriza-se por ter vírus muito pequenos (parvo, vem do latim e significa pequeno), de cerca de 18 a 26nm de diâmetro, estando entre os menores vírus de genoma DNA conhecidos.

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) o Parvovírus Humano B19 (B19V) pertence à família *Parvoviridae*, a sub-família *Parvovirinae* e ao gênero *Erythrovirus*, devido ao seu tropismo por células precursoras de eritrócitos na medula óssea (Fauquet *et al.*, 2005). Em 2013, ele foi classificado no gênero *Erythroparvovirus* e espécie *Erythroparvovirus Primata 1* (Cotmore *et al.*, 2014), mas devido à pouca utilização deste termo na literatura nacional e internacional, segue-se utilizando a nomenclatura antiga.

O virion mede entre 18 e 26nm de diâmetro e entre 5,5 e 6,2x10⁶ kDa de peso molecular, é destituído de envelope e o capsídeo possui simetria icosaédrica, formado por 20 faces triangulares (60 capsômeros) constituído de duas proteínas estruturais (VP1 e VP2). Em decorrência disso é resistente e mantém-se estável a pH variando entre 3 e 9, a inativação por temperatura de 56°C por 60 minutos, e quando submetida a solventes orgânicos, agentes oxidantes, formalina e irradiação por raios gama (Berns, 1996; Heegaard e Brown, 2002; Broliden *et al.*, 2006). O DNA do B19V é de fita simples, e o B19V pode ser considerado como o menor vírus de DNA conhecido que infecta humanos (Figura 1-1).

O B19V foi considerado o único membro da família *Parvoviridae* patogênico para humanos, até descobertas feitas em 2005 sobre o Bocavirus humano (HBoV) por Allander e colaboradores que o detectaram em crianças com infecções respiratórias, e atualmente já se mostrou também como associado a infecções gastrointestinais (Jauru *et al.*, 2012) e o Parvovírus 4 (PARV4) detectado em um paciente usuário de droga e infectado pelo vírus da hepatite B (Jones *et al.*, 2005).

1.3 Organização genômica e proteica

O genoma do B19V é constituído por um filamento de DNA linear de fita simples (ssDNA, do inglês *single strand DNA*), na qual 50% das partículas virais encapsidam ssDNA de polaridade positiva e 50% encapsidam ssDNA de polaridade negativa (Clewley, 1984).

O DNA possui 5596 nucleotídeos e é flanqueado por duas repetições terminais inversamente idênticas (ITRs, do inglês *Identical inverted terminal repeats*) de 365 nucleotídeos que formam um palíndromo imperfeito em cada extremidade do genoma (Figura 1-2A) (Luo e Qiu, 2015). O vírus apresenta um único promotor (P6) que é responsável pela transcrição de nove RNAm. O primeiro RNAm (RNAm 1 e 1'), traduz a proteína NS1, esse é o único RNAm que não sofre processamento pós

transcricional. O RNAm 2 e 2' transcritos, traduzem para a proteína de 7,5kDa e o RNAm 3 e 3' não possuem uma proteína conhecida com a sua transcrição. Os RNAm 4 e 5 transcritos, traduzem para a proteína VP1 e 6 e 7 para a proteína VP2. Os RNAm 8 e 9 transcrevem para uma proteína de 11kDa (Figura 1-2B) (Cotmore et al., 1986; Ozawa e Young, 1987).

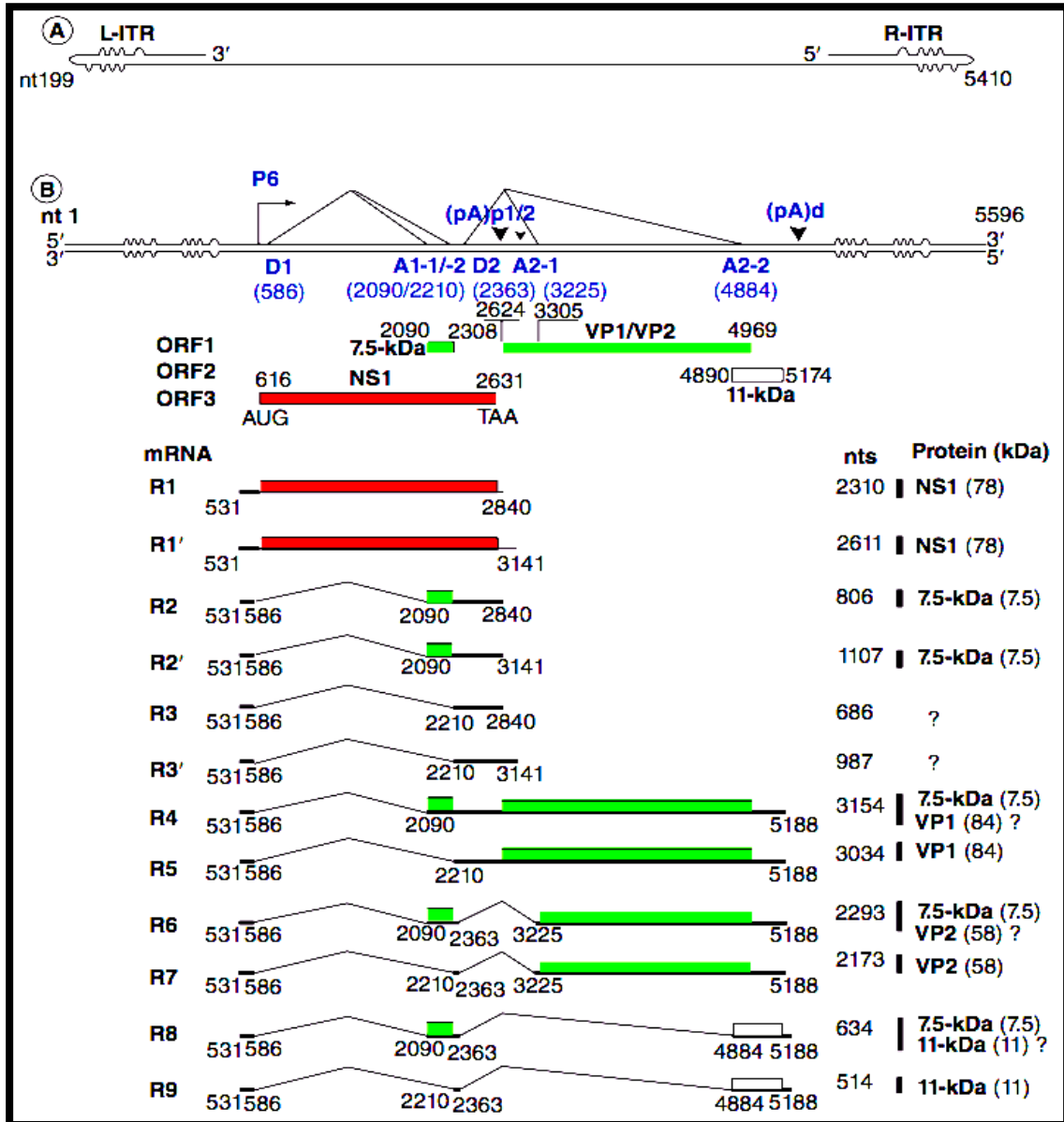


Figura 1-2 Estrutura do genoma e mapa genético do B19V

Figura A: esquema da estrutura do genoma do B19V com as ITRs e a figura B: diagrama esquemático da forma replicativa do genoma do B19V e os RNAm transcritos com as respectivas proteínas. **Fonte:** adaptado de Luo & Qiu 2015.

Entre as proteínas virais não estruturais, a proteína NS1 possui 78kDa e 671 aminoácidos (dos nucleotídeos 436 ao 2451) e é a única proteína essencial para a

replicação do genoma viral (Servant-Delmas e Morinet, 2016), essa proteína foi descrita como necessária para a produção da progênie viral (Zhi *et al.*, 2006).

Além de NS1 outras proteínas não estruturais menores, como 11kDa (dos nucleotídeos 4890 ao 5174) que participa da sinalização celular e 7.5kDa (dos nucleotídeos 2090 ao 2308) que ainda não possui uma função detalhada.

O capsídeo do B19V é composto por duas proteínas estruturais, a VP1 e a VP2, que são codificadas por fases de leitura aberta sobrepostas (Cotmore *et al.*, 1986; Ozawa e Young, 1987). Cada capsídeo formado é composto por uma estrutura icosaédrica com 60 capsômeros. A proteína VP2 é a mais abundante, pois compõe cerca de 96% da estrutura do capsídeo, por isso é alvo do sistema imune para a resposta humoral. Sua sequência é codificada entre os nucleotídeos 3225 a 4789, formando uma proteína de 654 aminoácidos e peso molecular de 58kDa. A proteína do capsídeo menos abundante, a VP1, é codificada entre os nucleotídeos 2444 a 4789, formando uma proteína de 992 aminoácidos, peso molecular de 84kDa e contém epítomos de neutralização para o sistema imune (Cotmore *et al.*, 1986; Ozawa e Young, 1987; Luo e Qiu, 2015). Parte da proteína VP1 e da proteína VP2 são codificadas por uma mesma região, porém a proteína VP1 apresenta uma região única na porção 3' (amino terminal), de 227 aminoácidos, chamada de região única de VP1 (VP1-u). Essa região é importante, por induzir uma resposta imune, por ser alvo de respostas celulares CD4+/CD8+, por ter uma atividade de fosfolipase A2 que auxilia no transporte da partícula viral na célula infectada (Zádori *et al.*, 2001; Zuffi *et al.*, 2001; Adamson-Small e Ruiz-Ordaz, 2016).

As proteínas VP1 e VP2 podem ser expressas em cultura de células bacterianas, de insetos e de mamíferos e são organizadas sem a presença de um DNA viral, formando um capsídeo vazio, também conhecido como VLP (do inglês, *virus like-particle*), que são morfologicamente, antigenicamente e imunologicamente similares a virions (Kajigaya *et al.*, 1989; Kajigaya *et al.*, 1991; Ballou *et al.*, 2003).

1.3.1 Variabilidade genômica

O genoma viral do B19V é altamente conservado, com cerca de 98% de similaridade entre os isolados (Erdman *et al.*, 1996; Hicks *et al.*, 1996). Porém na França, em 1998 foi identificado, a partir de um soro de uma criança com crise aplástica transitória, um isolado cuja sequência apresentava 11% de diferença na região VP1-u quando comparadas às sequências de outros isolados de B19V

(Nguyen *et al.*, 1999). Essa variante, denominada V9, foi clonada e o seu genoma foi inteiramente sequenciado, mostrando que não somente a região VP1-u era diferente, mas todo o genoma. Este achado levou à hipótese de que outras variantes de B19V estariam presentes na população humana.

Em 2002, a variante A6 foi detectada em uma amostra coletada em 1991 de um paciente italiano infectado pelo HIV com anemia crônica, cuja sequência apresentou 87,8% de semelhança com o B19 e 92% em relação ao V9 (Nguyen *et al.*, 2002). Outras variantes do B19V chamadas, LaLi e HaAm, foram encontradas em amostras de pele, mostrando pela primeira vez uma relação entre um genótipo e o tropismo por um tecido específico (Hokynar *et al.*, 2002). Também em 2002, Servant e colaboradores relataram a presença em uma amostra de um paciente francês, do genoma do B19V que se alinhou com o V9 mas com 5,3% de divergência, denominada D91.1 (Servant *et al.*, 2002).

A identificação dessas variantes e análises filogenéticas desses múltiplos isolados do B19V levaram à classificação do parvovírus humano B19 em três genótipos distintos: o genótipo 1, que apresenta como cepa protótipo a Au e pode ser dividido em dois subgrupos (1a e 1b) (Toan *et al.*, 2006; Corcoran *et al.*, 2010); o genótipo 2 que possui as cepas protótipos LaLi (Hokynar *et al.*, 2002) e A6 (Nguyen *et al.*, 2002); e o genótipo 3 que apresenta as cepas protótipos V9 e D91.1, e que posteriormente foi subdividido em dois subtipos, 3a e 3b respectivamente (Nguyen *et al.*, 1998; Parsyan *et al.*, 2007). Esses 3 genótipos são distintos com mais de 9% de divergência nucleotídica em todo o genoma entre as sequências avaliadas (Servant *et al.*, 2002).

A distribuição de cada genótipo depende da origem geográfica, da população e do tipo de amostra avaliado. Em relação à origem geográfica o genótipo 1 é o prevalente em todo o mundo, o genótipo 3 parecia mais restrito à África, porém já foi detectado em outros países inclusive no Brasil e o genótipo 2 era detectado em pacientes maiores de 50 anos (ou seja nascidos até 1973), depois esse genótipo não foi mais encontrado até recentemente, quando foi detectado em um doador de sangue na Alemanha (Norja *et al.*, 2006; Sanabani *et al.*, 2006; Servant-delmas *et al.*, 2010; Eis-Hubinger *et al.*, 2014). Em amostras de tecido a prevalência para o genótipo 1 fica entre 28% e 81% (Wong *et al.*, 2003; Kühl *et al.*, 2008); para o genótipo 2, entre 8% e 71% (Sanabani *et al.*, 2006; Kühl *et al.*, 2008) e para o genótipo 3, entre 0% e 50% (Norja *et al.*, 2006; Kühl *et al.*, 2008). Existe uma

predominância mundial do genótipo 1 e está sendo sugerido uma recente propagação do genótipo 3b em todo o mundo (Hübschen *et al.*, 2009).

No Brasil os três genótipos já foram detectados e existe a predominância do genótipo 1 como em outros países (Sanabani *et al.*, 2006, Freitas *et al.*, 2008, Keller *et al.*, 2009, Garcia *et al.*, 2009, Slavov *et al.*, 2012, da Costa *et al.*, 2013, Cubel Garcia *et al.*, 2016). Até o momento, o genótipo 2 foi detectado apenas em São Paulo, em amostras de medula óssea de um paciente com idade superior a 51 anos que apresentava citopenia de origem desconhecida e neoplasias hematológicas (Sanabani *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2009). O genótipo 3b foi detectado em diversos estudos: em soro de pacientes com exantema, artropatias e desordens hematológicas em Belém (Freitas *et al.*, 2008); em uma paciente com anemia aguda após a ocorrência de um transplante renal (Keller *et al.*, 2009) e em uma paciente infectada pelo HIV durante uma epidemia de eritema infeccioso em Niterói (Pereira *et al.*, 2014). Coinfecção entre os genótipos 1a e 3b foi descrita em amostras de medula óssea de pacientes com leucemia (Da Costa *et al.*, 2013).

1.4 Ciclo de replicação

A replicação do DNA viral ocorre no núcleo de células progenitoras eritroides, pois o B19V depende da ligação entre a sua proteína estrutural VP2 ao antígeno P (globo-tetraosil-ceramida, GalNac(β 1-3), Gal(α 1-4), Gal(β 1-4)GlcCer) dessas “células-alvo”. O antígeno P também está presente em megacariócitos, células endoteliais, placentárias, miocárdicas, fetais e hepáticas, sugerindo que essas células são susceptíveis ao B19V (Brown *et al.*, 1993). Algumas evidências mostram que este antígeno não é o único receptor para o vírus (Wong *et al.*, 2008). Um complexo de integrina α 5 β 1 tem sido implicado como um co-receptor para a entrada do vírus nas células (Servant-Delmas e Morinet, 2016).

Como pode ser observado na Figura 1-3, o vírus entra na célula por meio de endocitose, uma vez que vesículas endocíticas foram observadas através de microscopia eletrônica. O domínio que permite essa entrada na célula é o de fosfolipase A2, presente na região VP1-u do B19V, o qual é exposto devido à diminuição de pH que ocorre dentro das vesículas endocíticas (Filippone *et al.*, 2008). Esse domínio também é responsável por indicar o sinal de localização nuclear e uma rede de microtúbulos é modulada, por β 1, do complexo co-receptor de

integrina $\alpha 5\beta 1$ presente nas vesículas endocíticas, e permite o tráfego dessas vesículas com as partículas virais pelo citosol celular até o núcleo da célula, onde a partícula viral será desfeita (Weigel-Van Aken, 2009).

Após a adsorção, o tráfego pelo citosol, a entrada no núcleo e o desnudamento do capsídeo, o material genético exposto necessita que a célula esteja em fase S da mitose para que a replicação viral possa ocorrer (Berns, 1996). As estruturas palindrômicas ITRs de 365 nucleotídeos, nesse momento de fase S funcionam como iniciadores (*primers*) para a DNA polimerase celular. A replicação começa nessas regiões que são de DNA dupla fita e ocorre através da formação de uma fita complementar. Intermediários de fita dupla são formados com a continuação da replicação, que posteriormente são enzimaticamente clivados gerando o DNA de fita simples (Young, 1988).

O processo de transcrição inicia-se no promotor P6 e a partir desse promotor são transcritos nove RNAm (figura 1-2). Esses transcritos codificam para a proteína não estrutural NS1, para as proteínas estruturais VP1 e VP2 e para as proteínas menores não estruturais de 11kDa e 7,5kDa (Luo e Qiu, 2015). O único RNAm que não sofre processamento pós-transcricional (*splicing*) traduz a proteína NS1, enquanto que todas as demais proteínas, tem os seus RNAm processados, inclusive, as proteínas estruturais, VP1 e VP2, dependem desse processamento, uma vez que suas fases de leitura aberta são sobrepostas (Ozawa *et al.*, 1987).

Nesse momento, a proteína NS1 atua como um forte ativador de transcrição por recrutar numerosos fatores de transcrição celular e também participa da replicação através das suas propriedades de helicase e endonuclease (Momoeda *et al.*, 1994). Um bloqueio da produção de transcritos no sítio de poliadenilação é associado a uma limitada permissividade das células à infecção do B19V (Guan *et al.*, 2009).

Os RNAm processados são transportados ao citosol, onde ocorre a tradução das proteínas virais estruturais e não estruturais. Após a tradução as proteínas são direcionadas para o núcleo para a montagem das novas partículas virais e em seguida ocorre a liberação viral dependente de lise celular (Figura 1-3) (Young *et al.*, 1984).

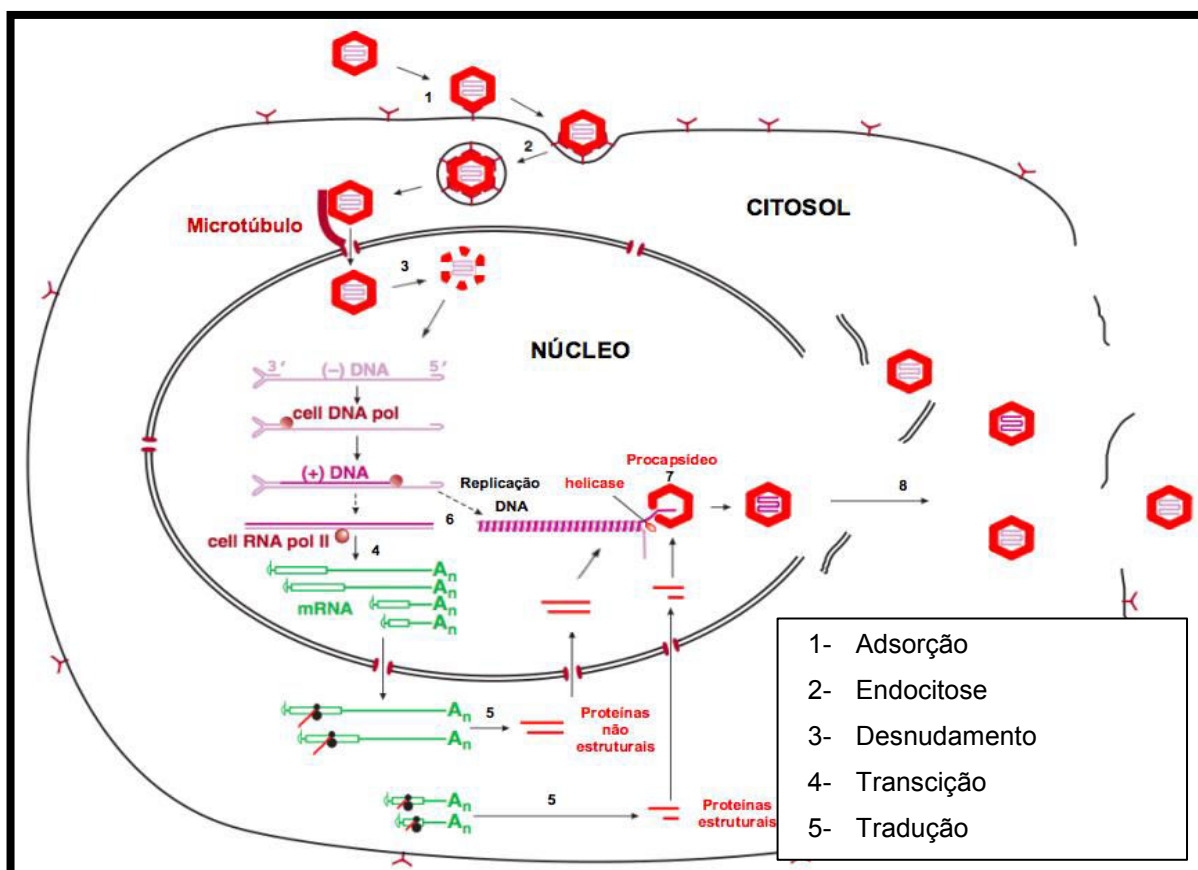


Figura 1-3 Esquema do ciclo de Replicação do Parvovírus B19
 Fonte: adaptado de Carter e Saunders 2007

1.4.1 Propagação do B19V em cultura celular

O parvovírus B19 não pode ser propagado em cultura de células convencionais, mas alguns estudos *in vitro* em culturas humanas de medula óssea explantadas demonstraram que o B19V é capaz de inibir a formação de colônias de células progenitoras eritroides (BFU-E, ou unidades formadoras de broto) (Ozawa e Young, 1987) e de precursores mielóides (Mortimer *et al.*, 1983). A susceptibilidade dos progenitores eritroides à infecção por B19V aumenta com a diferenciação (Takahashi *et al.*, 1993). O B19V pode ser cultivado em células progenitoras eritroides de explantes de medula óssea humana, fígado fetal, sangue umbilical e sangue periférico. Em todos os sistemas de cultura, a eritropoietina é necessária para manter a replicação viral, provavelmente auxiliando na divisão rápida de progenitores eritroides. Todos os sistemas são apenas de explantes de cultura e não são adequados para cultura a longo prazo (Heegaard e Brown, 2002).

No entanto, o B19V também pode ser propagado em algumas linhagens celulares especializadas: duas linhagens celulares de megacarioblastos, MB-02 e

UT-7/Epo e duas linhagens celulares de leucemia eritroide humana, JK-1 e KU812Ep6 (Shimomura *et al.*, 1992; Munshi *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 1993; Miyagawa *et al.*, 1999). Estas linhagens celulares têm sido utilizadas para estudar mecanismos de replicação e desenvolver ensaios de neutralização e de infecciosidade (Bostic *et al.*, 1999; Miyagawa *et al.*, 1999). No entanto, o rendimento de vírus de todas estas culturas é baixo e não podem ser utilizadas como fontes de antígenos para testes de diagnóstico.

O efeito citopático da infecção de células progenitoras eritroides infectadas com B19V, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, manifesta-se como pronormoblastos gigantes (conhecidos como células de lanterna ou como células do tipo *Pop corn*), são células eritroides precoces com um diâmetro de 25 a 32µm, grandes corpos de inclusão nucleares eosinofílicos e vacuolização citoplasmática e, ocasionalmente, podem ser observadas projeções (Caul *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 1991). Algumas micrografias revelam alterações ultra-estruturais citopáticas que incluem formação de pseudópodes, cromatina marginada e partículas virais no núcleo (Koduri, 1998).

1.5 Epidemiologia

O B19V possui distribuição mundial, uma vez que suas manifestações clínicas são reportados em diferentes países em todos os continentes. A infecção pelo B19V é exclusivamente humana e pode ocorrer em qualquer faixa etária. Estudos realizados em vários países, inclusive no Brasil, mostram que a prevalência de anticorpos anti-B19V na população varia de acordo com a idade, aumentando de 2-20% em crianças com menos de 5 anos, a 15-40% em crianças e adolescentes de 5-18 anos e 40-80% na população adulta (Nascimento *et al.*, 1990; Qiu *et al.*, 2017). Mulheres em idade reprodutiva possuem uma taxa de soroconversão anual de 1,5%, e como no grupo populacional de gestantes, a doença tende a ser mais grave, é importante que o acompanhamento médico da gravidez com a detecção de B19V seja realizado (Koch e Adler, 1989).

Em indivíduos adultos e saudáveis, a frequência de anticorpos IgG anti-B19V em diferentes países pode ser variável: 44% de positividade no Chile (Abarca *et al.*, 2002); 44,1% na República Checa (Sodja *et al.*, 1995); 50% na Índia (Abraham *et al.*, 2002), Estados Unidos (Anderson *et al.*, 1986) e Japão (Nunoue *et al.*, 1985); 51,2%

na Espanha (Güerri *et al.*, 2000); e 60%-70% na Inglaterra e em País de Gales (Cohen e Buckley, 1988; Gay *et al.*, 1994).

Estudos soroepidemiológicos realizados no Brasil (Nascimento *et al.*, 1990; Freitas *et al.*, 1990; Cubel *et al.*, 1992; Freitas *et al.*, 1993; Huatuco *et al.*, 2008) revelaram que a infecção pelo B19V é comum em alguns estados do país. Freitas *et al.* (1990) e Nascimento *et al.*, (1990) detectaram nas áreas urbanas de Belém e Rio de Janeiro taxas de prevalência global na ordem de 43% e 72%, respectivamente. Em um estudo realizado em Niterói-RJ, Oliveira e colaboradores encontraram uma prevalência de 32% de casos da infecção por Parvovírus B19 entre pacientes com doença exantemática (Oliveira *et al.*, 2001; 2002). Em relação à faixa etária na população brasileira, a presença de anticorpos anti-B19V é bastante alta, 72% em adultos de 31 a 40 anos e 87% em recém-nascidos, entretanto os anticorpos de origem materna decrescem até os 19 meses. Em contrapartida as populações indígenas, no Pará, apresentam uma baixa frequência de anticorpos, cerca de 10,7% (Freitas *et al.*, 1990).

A presença de eritema infeccioso, uma das manifestações clínicas mais comuns da infecção por B19V, exibe uma variação sazonal, ocorrendo principalmente durante os meses do final do inverno e início da primavera. A taxa de infecção que apresenta um caráter clínico pode subir para um nível epidêmico a cada 3 a 4 anos, o que é então refletido na comunidade por um número aumentado de crianças com eritema infeccioso ou, crise aplástica transitória, outra manifestação clínica decorrente da infecção por B19V (Heegaard e Brown, 2002). Durante os surtos de eritema infeccioso ou crise aplástica induzida por B19V, 10% dos casos ocorrem entre crianças de 5 anos de idade, 70% dos casos ocorrem em crianças de 5 a 15 anos e 20% de pacientes com idade superior a 15 anos (Anderson, 1987).

Uma propagação secundária a contactantes soronegativos é muito comum. Em ambientes escolares ou domiciliares, a taxa de ataque secundário durante as epidemias de eritema infeccioso é de cerca de 50% em crianças susceptíveis e de 20 a 30% em professores susceptíveis (Woolf *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 1990). Além dos professores, o risco ocupacional mais alto de infecção é geralmente encontrado em pessoas em contato próximo com crianças, como atendentes de creche (9%) e donas de casa (9%), enquanto as mulheres que trabalham em outros locais têm um risco reduzido (4%) (Gillespie *et al.*, 1990; Cartter *et al.*, 1991).

A transmissão da infecção pode ocorrer: através da via respiratória, através de produtos derivados do sangue administrados por via parenteral e verticalmente

da mãe para o feto. O intervalo de tempo entre o surgimento de um caso e outro caso de contactante suscetível é de 6 a 11 dias, independentemente do tipo de doença relacionada ao B19V. A transmissão vertical pode ocorrer em um terço dos casos envolvendo infecções maternas primárias confirmadas sorologicamente, com uma taxa de transmissão de 25-50%. A transmissão nosocomial tem sido descrita com pouca frequência, e também tem sido relatada transmissão entre os profissionais de laboratórios que manipulam vírus nativos (Cohen *et al.*, 1988; Shiraishi *et al.*, 1991; Cohen e Brown, 1992; Koziol *et al.*, 1992; Miyamoto *et al.*, 2000).

Embora normalmente mais da metade da população adulta já tenha sido exposta, é difícil detectar a viremia, ou seja, presença de DNA-B19V no sangue de pacientes imunologicamente normais. Estudos relatam que a presença de DNA-B19V em doadores de sangue voluntários é de cerca de 0,0006% a 1,3% em todo o mundo, dependendo se estes estudos são realizados em épocas de epidemia de eritema infeccioso (Kleinman *et al.*, 2007). Em um estudo realizado em Niterói, Setúbal e colaboradores encontraram uma prevalência de 0,69% de bolsas de sangue positivas para DNA-B19V (Setúbal *et al.*, 2004) e 1% em São Paulo (Slavov *et al.*, 2014), porém não existe uma prevalência para todo o país ou legislações nacionais que determinam os níveis de DNA-B19V aceitáveis nas bolsas de sangue para que possam ser utilizadas. Nos Estados Unidos e na Europa, as legislações da *Food and Drug Administration* e na Farmacopeia Europeia recomendam que a concentração de DNA-B19V em bolsas de sangue e hemoderivados não ultrapassem 10^4 UI/mL a fim de se evitar a transmissão por transfusão (Candotti *et al.*, 2004; Marano *et al.*, 2015; Servant-Delmas e Morinet, 2016).

O risco de transmissão por hemoderivados a partir de doadores de sangue é baixo, mas, como um grande número de doações de sangue compõem os *pools* de plasma usados para produzir hemoderivados, estes podem muitas vezes estar contaminados (Jordan *et al.*, 1998). Estudos relatam a detecção de B19V em bolsas de sangue, mesmo com uma aparente eliminação do vírus, por fracionamento, por aquecimento e por uso de solventes e detergentes (Marano *et al.*, 2015).

Estudos relatam a presença de DNA-B19V em concentrados de fatores de coagulação submetidos a inativação viral, com uma soroprevalência de 90% entre os hemofílicos, correlacionando-se com a quantidade de fator de coagulação recebida (Azzi *et al.*, 1993; Rollag *et al.*, 1998). O B19V também pode ser transmitido por medula óssea (Heegaard e Laub Petersen, 2000) e produtos

derivados do sangue, tais como plaquetas (Cohen *et al.*, 1997), imunoglobulina intravenosa (Erdman *et al.*, 1997) e produtos de fibrina (Hino *et al.*, 2000). A infecção por B19V e a soroconversão têm sido observadas em pacientes após receber tratamento com solvente ou unidades de plasma tratadas com detergente (Azzi *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001).

1.6 Patogênese e resposta imune

O primeiro estudo realizado para se entender a patogênese da infecção por B19V foi o de Anderson e colaboradores (1985), no qual se mostrou que o período de incubação viral varia de 4 a 14 dias e a viremia ocorre de 6 a 8 dias após a exposição, persistindo por 6 a 7 dias, a partir de técnicas de hibridização *in situ*. Durante a fase aguda da doença (período de viremia), o vírus está presente no sangue, saliva e secreção da nasofaringe, facilitando a disseminação viral (Schmidt *et al.*, 2001; Chisaka *et al.*, 2006).

A transmissão por via respiratória, através da inalação de aerossóis contaminados, é a mais eficaz na propagação do B19 principalmente durante a infância (Woolf *et al.*, 1989; Setúbal *et al.*, 2004). O vírus também pode ser transmitido por transfusões sanguíneas (Yoto *et al.*, 1995) e por transplante de órgãos como: rim, coração e fígado de doadores infectados (Choi *et al.*, 2002). Além disso, devido ao tropismo do vírus por células sanguíneas mitoticamente ativas pode ocasionar em gestantes a passagem do vírus através do cordão umbilical, comprometendo o tecido fetal (Morey *et al.*, 1991).

Na patofisiologia da infecção pelo B19V é visto que com 7 dias do estabelecimento da infecção, ocorre um pico de carga viral no sangue (viremia de 10^{11} - 10^{14} cópias do genoma por mL), e com o início da queda da carga viral ocorre o aparecimento de anticorpos da classe IgM específicos anti-B19V que permanecem detectáveis até 4 meses após a infecção. Os anticorpos IgG anti-B19V surgem com 14 dias após a infecção e permanecem no soro durante toda a vida do indivíduo. Com a viremia, outros eventos são detectados, como a redução abrupta de reticulócitos, de 0,8% a 0,2% em indivíduos saudáveis, os níveis de hemoglobina apresentam reduções, porém pouco perceptíveis em indivíduos saudáveis (em torno de 14g/dL), mas muito abrupta em pacientes com crise aplástica transitória (variação de 8g/dL para 4g/dL) e irreversível em pacientes com anemia severa, apenas se administrado hematocomponentes. Os sintomas inespecíficos como febre, calafrios,

cefaleia e mialgia são observados após a viremia inicial e em um segundo momento, ocorrem sintomas mais específicos da infecção como eritema e artralgia. Em pacientes com crise aplásica transitória e anemia, os sintomas de anemia ocorrem por períodos mais prolongados de tempo (Figura 1-4).

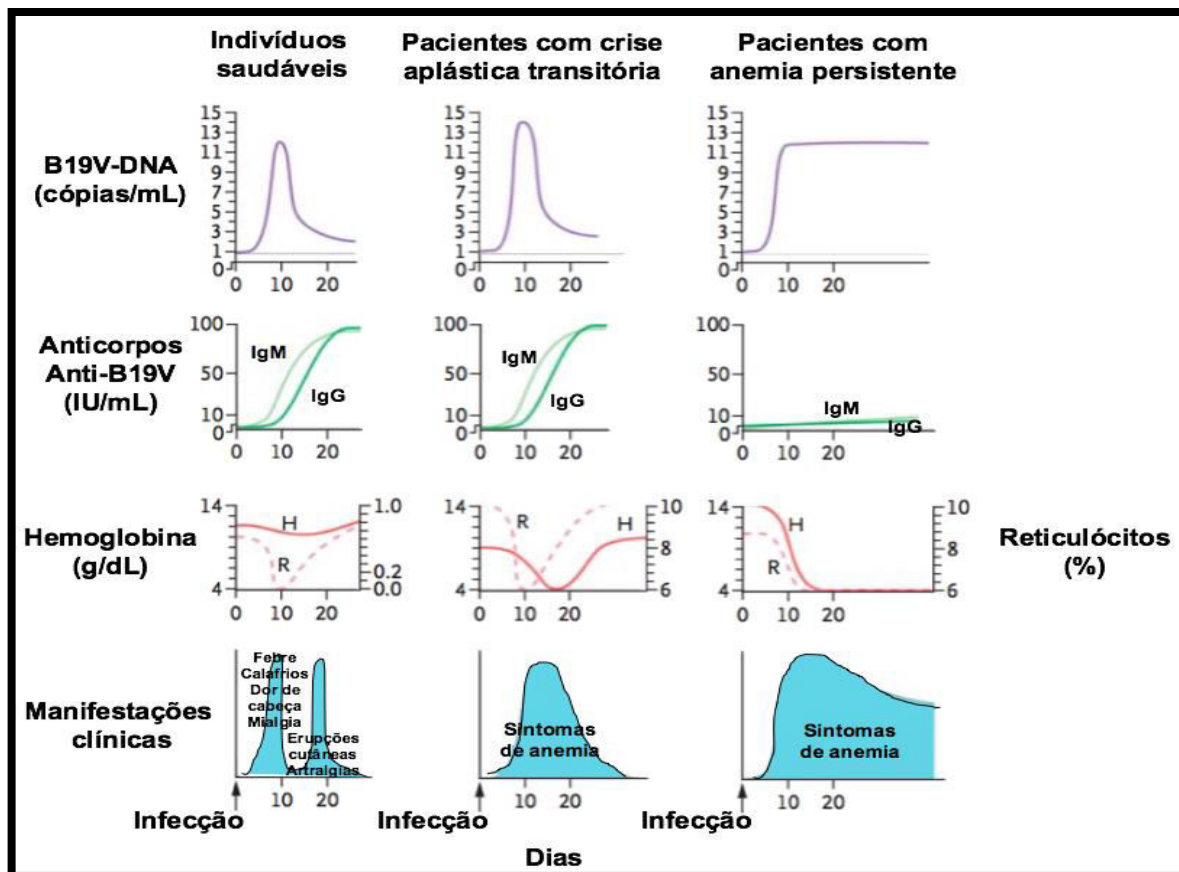


Figura 1-4 Patofisiologia da infecção pelo B19V
 Fonte: adaptado de Young & Brown, 2004

1.7 Manifestações clínicas

O espectro de doenças relacionados ao B19V primeiramente envolve as condições do sistema imunológico e hematológico do hospedeiro, podendo acarretar diferentes manifestações clínicas (Tabela 1-1) (Heegaard e Brown, 2002). Em indivíduos saudáveis, a infecção pelo B19V geralmente é assintomática ou com sintomas inespecíficos e pode ocorrer tanto em crianças quanto em adultos (Woolf *et al.*, 1989).

O **eritema infeccioso** (EI), também conhecido como quinta doença, é a manifestação mais clínica mais comum em crianças (Anderson *et al.*, 1984). Os sintomas prodrômicos muitas vezes passam despercebidos, mas podem incluir

febre, coriza, dor de cabeça e náuseas. O eritema infeccioso é caracterizado por um eritema facial de intensidade média envolvendo as bochechas, com uma aparência de bochecha salpicada, começando 18 dias após a infecção. Uma segunda fase, consiste de uma erupção cutânea envolvendo o tronco e os membros, e ocorre 1 a 4 dias após o eritema inicial. A erupção cutânea pode ser transitória ou recorrente, sendo que as recorrências podem estar ligadas a fatores ambientais como a exposição à luz solar e ao calor (Woolf *et al.*, 1989; Zerbini *et al.*, 1992). Outros sintomas incluem prurido, vesículas e dermatite escamosa (Heegaard e Brown, 2002).

Em crianças com eritema infeccioso, a presença de **poliartropatia** ocorre em até 10% dos casos (Nocton *et al.*, 1993). Em contraste, a poliartropatia é a manifestação mais comum da infecção primária por B19V em adultos, afetando 60% das mulheres e 30% dos homens (Woolf *et al.*, 1989). A poliartropatia é mediada imunologicamente, uma vez que o aparecimento dos sintomas coincide com o surgimento de anticorpos circulantes. Os sintomas articulares aparecem como poliartrite periférica aguda, moderadamente grave, envolvendo as articulações metacarpofalângicas (75%), joelhos (65%), pulsos (55%) e tornozelos (40%), sem erosão articular (Woolf, 1990). Durante o seguimento a longo prazo da doença, nenhum paciente com poliartropatia associada a B19V relatou persistência de inchaço articular ou movimento restrito e nenhuma evidência de doença articular inflamatória foi encontrada, mesmo com a presença de B19V-DNA no líquido sinovial. Não há evidência para uma cronificação da poliartropatia causada pelo B19V (Dijkmans *et al.*, 1988; Söderlund *et al.*, 1997; Speyer *et al.*, 1998).

A **crise aplástica transitória** (CAT) foi a primeira doença associada à infecção pelo B19V, refere-se a um breve episódio auto-limitado de aplasia de eritrócitos e foi originalmente descrita em pacientes com anemia hemolítica (Pattisson *et al.*, 1981). Indivíduos infectados por B19V que sofram de diminuição na produção de eritrócitos ou maior destruição/perda destes estará em risco de desenvolver uma crise aplástica. A parada na produção de eritrócitos ocorre durante 10 a 15 dias, como observado durante a infecção em indivíduos saudáveis, e resulta em uma queda acentuada dos níveis de hemoglobina em doentes hemolíticos, devido à diminuição subjacente na sobrevivência de eritrócitos nesses doentes. Deficiência de ferro, anemia diseritropoiética congênita e talassemias são condições associadas à diminuição da produção de eritrócitos que tornam os pacientes susceptíveis à crise aplástica induzida pelo B19V (Young & Brown, 2004). Embora

os eritrócitos sejam predominantemente afetados, outras alterações hematológicas podem ser observadas concomitantemente, tais como a trombocitopenia, neutropenia ou pancitopenia (Saarinen *et al.*, 1986; Muir *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 1992). A crise aplástica tem os seus sintomas reduzidos com o aparecimento de anticorpos específicos e, portanto, raramente dura mais de 2 semanas. A incidência anual é de 1 a 5%, dependendo se ocorre ou não em epidemias de EI, predominando em crianças e representando um evento único na vida (Chorba *et al.*, 1986). A crise aplástica geralmente se apresenta com palidez, fraqueza e letargia, e os pacientes são altamente virêmicos, representando um risco de transmissão para outros (Bell *et al.*, 1989).

Em pacientes imunocomprometidos, com uma capacidade reduzida de produzir uma resposta de anticorpos neutralizantes e devido a uma insuficiência persistente da medula óssea em produzir precursores eritroides, a infecção por B19V pode causar **anemia persistente**. As condições predisponentes para esse imunocomprometimento incluem: a síndrome de Nezelof (Kurtzman *et al.*, 1987), leucemia (Kurtzman *et al.*, 1988; Weiland *et al.*, 1989; Koch *et al.*, 1990; Frickhofen *et al.*, 1992), síndrome mielodisplásica (Hasle *et al.*, 1996), linfoma de Burkitt, linfoma linfoblástico (Graeve *et al.*, 1989), astrocitoma, Tumor de Wilms, infecção por HIV, desde que os pacientes não estejam fazendo uso de terapia antirretroviral (Frickhofen *et al.*, 1990; Nigro *et al.*, 1992; Taillan *et al.*, 1992), transplante de medula óssea (Weiland *et al.*, 1989; Frickhofen *et al.*, 1992; Azzi *et al.*, 1993), transplante de órgãos (Corral *et al.*, 1993; Nour *et al.*, 1993) e tratamento quimioterápico contra o câncer (Graeve *et al.*, 1989). Os pacientes apresentam baixos níveis (ou ausência) de anticorpos específicos, sendo detectada a viremia persistente (Kurtzman *et al.*, 1987). As características clínicas incluem fadiga e palidez, enquanto que os sintomas mediados pela imunidade (erupção cutânea e artralgia) geralmente não estão presentes (Kurtzman *et al.*, 1987).

A infecção pelo B19V durante a gestação é um grave problema de saúde pública, pois no primeiro trimestre de gestação pode ocorrer o aborto e no segundo trimestre o feto pode desenvolver a **hidropsia fetal** não imune (Brown *et al.*, 1994), como o resultado de uma anemia que leva a falência cardíaca e a um edema generalizado. A patogênese do dano fetal parece ser semelhante à dos pacientes com CAT em que os eritrócitos têm uma vida útil reduzida. Eritroblastos no fígado fetal podem exibir sinais de infecção pelo B19V, como a presença de DNA-B19V (Caul *et al.*, 1988). A infecção intrauterina é persistente e caracterizada por anemia

grave, falência cardíaca e morte (Wright *et al.*, 1996). A circulação diminuída devido à miocardite fetal pode contribuir para a acumulação de fluidos (Morey *et al.*, 1992). O B19V também pode estar associado a casos de morte fetal intrauterina não-hidrópica (Skjöldebrand-Sparre *et al.*, 2000). A incidência de infecção primária de B19V durante a gestação foi estimada em 1 a 5% (Bruu e Flugsrud, 1994; Kerr *et al.*, 1994; Harger *et al.*, 1998) e a transmissão transplacentária subsequente é de 24 a 33% (Yaegashi *et al.*, 1989; Eis-Hübinger *et al.*, 1998). O risco de desenvolver hidropsia após esta infecção é variado (0 a 24%) (Enders e Biber, 1990; Essary *et al.*, 1998), mas, a taxa é provavelmente bastante baixa (1 a 1,6%), (Harger *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1998). A chance de desfecho fetal adverso após a infecção parece ser maior entre 11 e 23 semanas de gestação, o que se correlaciona com o período hepático de atividade hematopoiética (Tabela 1-1) (Yaegashi *et al.*, 1998; Yaegashi *et al.*, 1999).

Tabela 1-1 Doenças causadas pelo B19V

DOENÇA	EVOLUÇÃO CLÍNICA	GRUPO DE PACIENTES
Eritema infeccioso	Aguda	Crianças saudáveis
Poliartropatia	Aguda	Adultos saudáveis
Crise aplástica transitória	Aguda	Pacientes com distúrbios hemolíticos
Anemia persistente	Crônica	Pacientes imunocomprometidos
Hidropsia fetal	Aguda/crônica	Fetos (<20 semanas)

Fonte: Adaptado de Young & Brown, (2004)

Algumas doenças podem ser associadas a infecção pelo B19V, estas são incomuns e ainda não possuem mecanismos definidos sobre a causa, mas muitos relatos de caso são mostrados na literatura. Dentre as quais: miocardite (Beghetti *et al.*, 2000), vasculite necrotizante (Finkel *et al.*, 1994), doença de Kawasaki (Nigro *et al.*, 1994), púrpura de Henoch-Schönlein, ou púrpura reumática (Ferguson *et al.*, 1996), arterite de células gigantes (Gabriel *et al.*, 1999), síndrome de luvas e meias (Smith *et al.*, 2002), síndrome da fadiga crônica (Kim *et al.*, 2009), meningite, encefalite, oftalmite (Kerr *et al.*, 2002) e hepatite (Arista *et al.*, 2003).

1.7.1 Persistência do B19V

Uma característica que vem fazendo com que médicos e hematologistas estudem a infecção por B19V é a capacidade do B19V-DNA persistir no sangue e em tecidos específicos de indivíduos imunocompetentes mesmo depois da resolução da infecção aguda (Servant-Delmas e Morinet, 2016). Os tecidos que podem ser acometidos por essa persistência do B19V-DNA são: amígdalas, cérebro, colo do útero, coração, fígado, linfonodos, medula óssea, pele, pulmão, rim, tecido sinovial, testículos e tireóide (Adamson-Small *et al.*, 2014).

A persistência do B19V é definida pela detecção do DNA no sangue por mais de 16 semanas. A primeira descrição que evidenciou a persistência do vírus foi em 1993, em um caso de meningite associada ao B19V em que o DNA foi detectado até 9 meses após a infecção (Cassinotti *et al.*, 1993). Geralmente, a carga viral de indivíduos imunocompetentes que desenvolvem infecção persistente, é baixa e somente pode ser detectada por PCR em tempo real quantitativo (qPCR, do inglês, quantitative Polymerase Chain Reaction) devido à alta sensibilidade da técnica (Brown *et al.*, 2001).

A detecção de B19V-DNA em tecidos deve ser combinada com a detecção de anticorpos específicos anti-B19V no soro para estabelecer se a carga viral detectada está associada a uma infecção persistente ou a uma infecção aguda, portanto se um paciente apresenta carga viral menor que 10^4 cópias/mL, IgM não reativo e IgG reativo é uma infecção persistente e se um paciente apresenta carga viral maior ou igual a 10^4 cópias/mL, IgM e IgG reativo, a infecção é aguda (Adamson-Small *et al.*, 2014). Geralmente, a quantidade média de amostras positivas para o B19V-DNA em tecidos é de 44,8%, estando de acordo com relatos de que cerca da metade da população jovem já foi infectada pelo B19V (Young e Brown, 2004). Quando são realizados ensaios de PCR para as sequências que codificam as proteínas do capsídeo (VP1 e VP2) e para a sequência que codifica a proteína não estrutural (NS1), foram relatadas disparidades na detecção das duas regiões. Por exemplo, nos tecidos testiculares e da pele, as sequências VP1-VP2 foram detectadas a uma frequência mais elevada em comparação com a NS1; em contraste, nenhuma diferença foi relatada em amostras de tecido sinovial. Detectando unicamente o B19V-DNA, não é possível mostrar a persistência e qualquer associação com doenças em medula óssea, cérebro e tireoide. Em contrapartida, estudos que examinaram amostras de tecido cardíaco, hepático, sinovial e testicular possuem

resultados que mostram a ligação entre a persistência do B19V-DNA e o desenvolvimento de doença específica desses órgãos (Norja *et al.*, 2006).

Ainda não existe uma explicação para a ocorrência da infecção persistente do B19V no sangue e em alguns tecidos, mas alguns autores acreditam que o B19V-DNA se integre ao genoma da célula hospedeira, o que poderia levar a essa detecção persistente do genoma do B19V, porém esse fato, até o presente momento, não pode ser confirmado (Musiani *et al.*, 1995; Azzi *et al.*, 1996; Mendelson *et al.*, 2006). Outras hipóteses que estão sendo estudadas são: o silenciamento da expressão do B19V-DNA por metilação das ilhas CpG (Bonvicini *et al.*, 2012); o aumento da expressão de citocinas como NF- κ B, Cox2 e IL-6 correlacionado com a expressão de proteínas VP1-VP2 de B19V em tecidos tireóides, linfóides e de colo (Lu *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Polcz *et al.*, 2013); a expressão de NS1 em linhagens celulares HepG2 de hepatócitos que induzem apoptose envolvendo a ativação das caspases 3 e 9 (Poole *et al.*, 2004; 2006).

Um modelo das associações potenciais entre a infecção por B19V e o desenvolvimento de doença em tecidos não eritroides está ilustrado na Figura 1-5. Neste modelo, as células normais foram infectadas com B19V (A e B). A incapacidade de replicar em células não permissivas pode levar à persistência de um nível baixo de DNA-B19V. Nas células sem expressão detectável de genes virais, a persistência do DNA-B19V pode resultar em nenhum efeito (C). Alterações na expressão de certos fatores celulares podem contribuir para a expressão de B19V em microambientes celulares específicos e indução de uma resposta inflamatória relacionada ao vírus (D), é desconhecido se o B19V é expresso continuamente nestas células a um nível baixo ou é reativado. Se B19V pode realmente reativar ainda não foi demonstrado (Adamson-Small *et al.*, 2014).

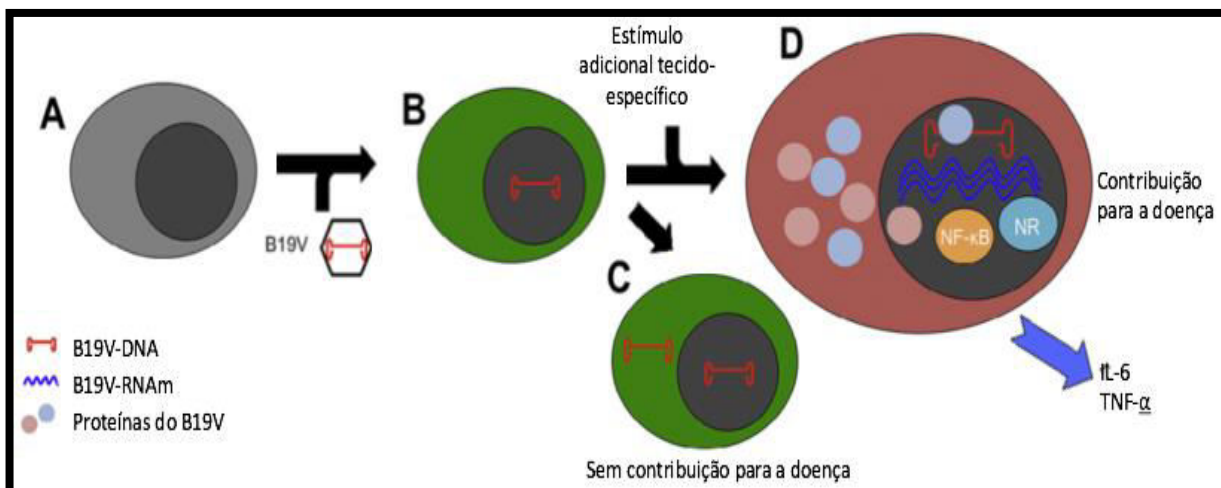


Figura 1-5 Modelo de persistência do B19V em tecidos não eritroides
 Fonte: adaptado de Adamson-Small *et al.*, 2014

1.8 Parvovírus B19 e hepatites

A hepatite aguda e falência hepática aguda (FHA ou ALF, do inglês *acute liver failure*), podem ser causadas pelo B19V, porém a incidência é muito rara. De acordo com Mihaly e colaboradores (2012) a infecção pelo B19V relacionado a hepatites pode ocorrer em 4,1% de pacientes infectados por esse vírus.

O espectro de doenças hepáticas associadas ao B19V é amplo e pode variar desde uma elevação nas transaminases à FHA. Doenças hepáticas associadas à infecção pelo B19V têm sido descritas em todos os grupos etários, de neonatos a idosos (Bihari *et al.*, 2013).

Casos de hepatite aguda e de FHA têm sido descritos com maior frequência em grupos pediátricos, porém existem relatos em adultos. Em adultos a gravidade da doença é menor do que em crianças e pode ser manifestada em pacientes imunocompetentes ou imunodeficientes, com ou sem alterações hemolíticas (Al Nahdi *et al.*, 2010; Hatakka *et al.*, 2011; Larsen, 2011; Sun *et al.*, 2011; Martínez González *et al.*, 2012; Sun e Zhang, 2012; Yang *et al.*, 2012).

A FHA é uma manifestação clínica rara, ocorre em menos de 1% dos casos, e pode ser considerada como subdiagnosticada devido à falta de conhecimento dos médicos e a falta de testes (Kim *et al.*, 2009). A biópsia hepática de pacientes infectados e que apresentam FHA mostram colestase celular e canalicular, apoptose e necrose dependendo da condição do sistema imune do hospedeiro e da severidade do envolvimento hepático (Hatakka *et al.*, 2011).

Um único caso foi descrito associando hepatite colestatia fibrosante à infecção pelo B19V em um paciente transplantado renal devido a uma nefropatia. Ao desenvolver uma FHA, todos os marcadores virais foram negativos, exceto para HBV e B19V-DNA. O paciente veio a falecer e não foram encontrados marcadores para HBsAg e HBcAg, enquanto que o B19V-DNA se mostrou fortemente positivo no fígado (Shan *et al.*, 2001).

A coinfeção do B19V com outros vírus hepatotrópicos pode levar a FHA grave, quando comparados a infecção apenas pelo B19V ou pelos vírus hepatotrópicos. Estudos demonstram que essa coinfeção pode levar a uma grave icterícia, altos níveis de bilirrubina e de enzimas hepáticas, e a um desfecho clínico desfavorável, podendo culminar na morte da maioria dos pacientes (Dwivedi *et al.*, 2009).

Existe um relato de caso de hepatite crônica associada à infecção pelo B19V em um paciente com linfopenia (Mogensen *et al.*, 2010). Pongratz e colaboradores (2009), mostraram que a persistência do B19V e a ocorrência de hepatite crônica estão diretamente correlacionadas com a extensão do dano hepático. A associação entre a infecção pelo B19V concomitante a coinfeções pelo vírus das hepatites B e C gerando uma hepatite crônica não se mostrou verdadeira, pois não foram encontrados agravos no dano hepático (Wang *et al.*, 2009).

É importante ressaltar que mesmo não havendo comprometimento hepático nesses casos de coinfeção, nenhum estudo foi feito com grandes coortes. Esses estudos são necessários para explorar o curso patológico da infecção pelo B19V associado a hepatite crônica e aos seus desfechos clínicos (Krygier *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

Na hepatite associada a anemia aplástica (HAAA) ocorre uma hepatite aguda grave que pode culminar na falência da medula óssea e em uma pancitopenia (Osugi *et al.*, 2007). Muitos vírus são conhecidos por causar HAAA em pacientes imunocomprometidos, como os vírus das hepatites A, B, C, D, E e G, citomegalovírus, vírus Epstein Barr, vírus Transmitido por Transfusão (TTV) e o B19V (Rauff *et al.*, 2011).

O mecanismo pelo qual a infecção por B19V estaria relacionada a hepatite não está claro, mas alguns autores acreditam em dois efeitos que podem levar ao dano do fígado, um efeito direto da infecção pelo B19V e um efeito indireto, imunologicamente mediado (Morita *et al.*, 2003; Rauff *et al.*, 2011).

O B19V só consegue completar o seu ciclo de replicação em células progenitoras eritroides e em outras células como os hepatócitos fetais, além de células de medula óssea e megacariócitos (Morita *et al.*, 2003). Como os hepatócitos conseguem expressar glicosídeos e glicosíngolipídeos, que são os receptores para a adsorção do B19V, este vírus consegue entrar nos hepatócitos e estabelecer uma infecção restrita, com a produção da proteína NS1, porém sem a produção da progênie viral (Cooling *et al.*, 1995). Essa proteína viral tem a capacidade de levar a célula para a fase G1 do ciclo celular, tanto por uma maneira direta, como indiretamente através da indução da expressão de uma quinase dependente de ciclina (p21/WAF1). Nessa fase do ciclo, os hepatócitos são levados a induzir a apoptose, devido a ativação de caspase 3 e caspase 9, e esse seria o efeito direto do dano hepático causado pelo B19V (Morita *et al.*, 2003; Poole *et al.*, 2004).

O efeito indireto desse dano hepático é causado pelo aumento da circulação de linfócito T CD8+ citotóxico, o qual leva a uma diferenciação defectiva e alterada de monócitos e macrófagos, causando uma diminuição na expressão de IL-1 e um aumento de IFN- γ e TNF- α , contribuindo para o aumento do dano hepático e subsequentemente gerando uma hepatite aguda (Rauff *et al.*, 2011).

1.9 Tratamento e prevenção

Não existe um tratamento específico para a parvovirose, sendo tratados apenas os sintomas e os sinais clínicos. Alguns pacientes que apresentam poliartropatias, podem requerer o uso de drogas anti-inflamatórias, para amenizar as dores nas articulações (Heegaard *et al.*, 2001).

Transfusões de eritrócitos são necessárias em pacientes com crise aplástica transitória, enquanto a medula óssea se recupera (Posfay-Barbe, 2003). Este tratamento também pode ser recomendado em casos de hidropsia fetal, pois já foi observado que com a transfusão de eritrócitos, a taxa de mortalidade reduz em 18% (Schild *et al.*, 1999).

O tratamento com imunoglobulinas intravenosas pode melhorar os sintomas de anemia, porém pode causar o desenvolvimento de exantemas e artropatias. Esse tratamento também tem sido utilizado em pacientes com infecção persistente que desenvolvem doenças graves (Kurtzman *et al.*, 1989).

Um estudo *in vitro* foi realizado para avaliar o uso da droga Cidofovir na replicação do B19V. Essa droga é utilizada para bloquear a DNA polimerase viral de vírus de DNA fita dupla que infectam humanos. No caso do B19V, um vírus de DNA fita simples e que utiliza a polimerase celular, o composto também inibiu eficientemente, e de maneira dose dependente, a replicação do DNA viral, porém estudos *in vivo* precisam ser realizados para avaliar a toxicidade do composto (Bonvicini *et al.*, 2015).

Um método de prevenção que vem sendo estudado nas últimas décadas é uma vacina recombinante, composta pelas proteínas VP1 e VP2 expressas como VLP, e que demonstrou promover uma resposta de anticorpos neutralizantes em adultos, porém mais estudos são necessários para compreender a sua eficácia frente à infecção pelo B19V. Um ensaio clínico de fase I da vacina descrita anteriormente foi realizado em conjunto com o adjuvante MF59. Os voluntários vacinados receberam duas doses da vacina por via intramuscular e todos apresentaram soroconversão de anticorpos anti-B19V (Ballou *et al.*, 2003; Bernstein *et al.*, 2011). Os anticorpos neutralizantes foram detectados no soro por 6 meses após a terceira dose da vacina (Bernstein *et al.*, 2011). As avaliações de segurança da vacina mostraram reações moderadas nos voluntários em um primeiro ensaio clínico, porém no segundo ensaio clínico, a vacina foi descontinuada devido a erupções cutâneas que apareceram no local de aplicação (Chandramouli *et al.*, 2013).

1.10 Diagnóstico

Uma das primeiras formas de diagnosticar a infecção de B19V em crianças se dá através do diagnóstico clínico, pela observação dos sintomas e sinais do eritema infeccioso. Porém o diagnóstico clínico é dificultado devido à infecção por B19V não manifestar um padrão exantemático típico e à semelhança com manifestações típicas de rubéola (Heegaard e Brown, 2002).

O diagnóstico específico para B19V é realizado convencionalmente pelo método sorológico, a partir da detecção de anticorpos, IgM e IgG no soro. Vários testes sorológicos comerciais foram desenvolvidos para o diagnóstico de B19V, com o uso de antígenos sintéticos e recombinantes, através da expressão das proteínas VP1 e VP2 do B19V em sistemas de baculovírus recombinante, o qual formam um capsídeo vazio, ocorre a perda frequente dos epítopos conformacionais desses

antígenos, reduzindo a sensibilidade e a especificidade dos testes comerciais e aumentando a indicação de resultados falso positivos e falso negativos (Patou e Ayliffe, 1991; Bruu e Nordbø, 1995; Tolfvenstam *et al.*, 1996; Butchko e Jordan, 2004).

Na Noruega, cinco *kits* sorológicos e comerciais foram avaliados, quanto a sua especificidade o resultado foi de 70,1% a 94,8%, porém não testaram a sensibilidade dos testes (Patou e Ayliffe, 1991). Em um estudo conduzido na Suécia, quatro *kits* foram avaliados, e apresentaram sensibilidade de 90% a 97% e especificidade de 88% a 96% (Tolfvenstam *et al.*, 1996). Um terceiro estudo avaliou somente a sensibilidade de três *kits* de ELISA, avaliando anti-B19V IgM e anti-B19V IgG, com uma sensibilidade de 92,3% a 100% para IgM e 97,9% a 99,5% para IgG (Butchko e Jordan, 2004). De maneira geral, os testes comerciais apresentam sensibilidade que variam de 90% a 100% e especificidade de 70% a 96%.

Estudos recentes recomendam correlacionar testes sorológicos com testes moleculares para estabelecer um diagnóstico de infecção aguda (Maple *et al.*, 2014) devido a possibilidade de resultados falso-negativos, uma vez que anticorpos contra as proteínas virais VP1 e VP2 podem estar complexados com as partículas virais e conseqüentemente se tornar indetectáveis em ensaios sorológicos (Mendelson *et al.*, 2006).

O diagnóstico molecular para a infecção pelo B19V foi precocemente estabelecido, devido as dificuldades de se propagar o vírus em cultura de células convencionais. Este teste é feito por meio da detecção do DNA-B19V, a partir da amplificação de sequências do genoma do B19V através de PCR e PCR em tempo real, utilizando conjuntos de oligonucleotídeos que podem detectar diferentes regiões do genoma viral, principalmente para as proteínas virais NS1, VP1 e VP2 (Salimans *et al.*, 1989; Peterlana *et al.*, 2006; Slavov *et al.*, 2011).

Esse tipo de diagnóstico é importante para pacientes com crise aplástica transitória, pois com a viremia é possível detectar o DNA-B19V no sangue antes da resposta de anticorpos, por isso antes da possibilidade do uso do diagnóstico sorológico e para pacientes imunossuprimidos com anemia persistente (pois estes não apresentam resposta imune adequada, para que seja diagnosticado por sorologia) (Heegaard e Brown, 2002). Para a genotipagem do B19V, o sequenciamento total ou parcial do genoma é feito (Shade *et al.*, 1986).

Os ensaios de diagnóstico molecular, baseados em PCR qualitativa (ou PCR convencional) apresentam um limite de detecção de 10^2 a 10^5 cópias/mL (Kovacs *et*

al., 1992; Sevall *et al.*, 1992). Além disso, outra metodologia, a nested PCR, que se baseia em duas reações de PCR com conjuntos de oligonucleotídeos diferentes, aumenta esse limite de detecção para 1 a 10 cópias/mL (Carrière *et al.*, 1993; Cassinotti *et al.*, 1993; Musiani *et al.*, 1993; Patou *et al.*, 1993; Gallinella *et al.*, 2003).

Além dessas metodologias, o diagnóstico molecular também inclui a PCR quantitativa, baseada nas metodologias *Sybr Green*® e *TaqMan*® de PCR em tempo real. Foi relatado na literatura que existe a necessidade de se correlacionar a presença de anticorpos com a carga viral presente na amostra, para mostrar a persistência do B19V. Para determinar a carga viral das amostras clínicas, a metodologia utilizada é a PCR em tempo real. A PCR em tempo real é mais sensível que a PCR convencional e a nested PCR, além do mais essa metodologia pode ser estabelecida e padronizada *in house* e por não depender de géis de agarose com brometo de etídeo são mais seguras e com menor chance de contaminação, pois não ocorre manipulação do produto amplificado (Aberham *et al.*, 2001; Manaresi *et al.*, 2002; Braham *et al.*, 2004; Schorling *et al.*, 2004).

Embora não exista um consenso sobre qual seria a amostra clínica e o método de detecção de B19V-DNA mais apropriado para o diagnóstico, alguns autores sugerem que amostras pareadas de tecido e soro sejam o ideal para estudos em pacientes com infecção persistente ou em gestantes (Knöll *et al.*, 2002; Adamson-Small *et al.*, 2014).

1.11 Justificativa

No Brasil, a importância do diagnóstico da infecção por B19V na vigilância epidemiológica de doenças exantemáticas, vem aumentando devido à erradicação dos vírus da rubéola e do sarampo (Cubel *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2001; OPAS, 2014). Esses dados indicam que o diagnóstico para B19V deveria ser realizado, particularmente entre mulheres grávidas, pacientes imunocomprometidos e indivíduos com doenças hemolíticas, já que nestes casos a infecção é mais grave.

Estudos recentes relatam a ocorrência de hepatite aguda em pacientes adultos imunocompetentes infectados com parvovírus B19 (anti-B19V IgM e B19V-DNA detectáveis), com achados bioquímicos compatíveis com hepatite aguda, entretanto, com testes sorológicos e moleculares negativos para detecção dos agentes virais comumente implicados na causa de hepatite (Hillingsø *et al.*, 1998; Díaz e Collazos, 2000a; Ho *et al.*, 2005; Hatakka *et al.*, 2011; Larsen, 2011; Sun *et*

al., 2011; Sun e Zhang, 2012). Segundo Pardi e colaboradores (1998), a hepatite associada à anemia aplástica em geral é rara, mas ocorre em cerca de 28% dos pacientes que receberam transplante de fígado devido a hepatite não-A, não-B, sugerindo que o B19V é uma das causas de hepatite associada a anemia aplástica e pode portanto, ser subdiagnosticado como vírus hepatotrópico. Estes achados sugerem fortemente uma associação entre infecção por parvovírus B19 e o desenvolvimento de hepatites agudas, sendo, portanto, sugerido como uma possível etiologia para hepatite aguda criptogênica.

Hepatites agudas ou crônicas de causas não definidas constituem um problema na prática da medicina. Apesar do desenvolvimento de testes laboratoriais sofisticados, uma proporção significativa das hepatites (17%) ainda permanece com causa não determinada, com alguns aspectos sugerindo etiologia viral (Codes *et al.*, 2006). São as chamadas hepatites criptogênicas ou hepatites não A-E.

O parvovírus B19 tem sido proposto como a causa de FHA em pacientes com ou sem anemia aplástica, baseando-se no isolamento e caracterização do genoma do B19V em tecido hepático de pacientes com FHA (Langnas *et al.*, 1995; Sokal *et al.*, 1998; Bernuau *et al.*, 1999; Abe *et al.*, 2007; Sun e Zhang, 2012). No entanto, os mecanismos de injúria hepática causada por B19V ainda não são conhecidos. Estudos prévios demonstraram o genoma do B19V em amostras de fígado de 67% de pacientes com hepatite não-A, -B, -C, -E que progrediram para FHA associada com anemia aplástica, e em 50% dos pacientes com FHA criptogênica sem anemia aplástica, comparada a 15% dos pacientes do grupo controle com falência hepática crônica. Estes achados sugerem que o B19V pode ser um possível agente de FHA (Langnas *et al.*, 1995).

Recentemente, alguns autores demonstraram que a infecção pelo HAV pode ser significativamente afetada em pacientes coinfetados com B19V (Dwivedi *et al.*, 2009; Kishore e Sen, 2009). Dwivedi e colaboradores (2009) observaram que em grupos pediátricos com falência hepática aguda, a coinfecção pelo B19V com outros vírus contribui para a gravidade da doença e com isso aumenta a probabilidade de um resultado fatal. Kishore e Sen, (2009) em um estudo envolvendo pacientes com FHA infectados com B19V (B19V-DNA detectável), relataram que 27% desses pacientes também eram IgM positivos para um ou mais outros vírus hepatotrópicos (HAV em 3, HBV em 6, HCV em 2; HAV+HEV em 2 pacientes). Neste estudo, foi demonstrado que a gravidade da doença foi significativamente maior em pacientes coinfetados com B19V, sugerindo que o B19V cause um dano hepático

independente e produza um efeito de sinergismo quando presente com outros vírus hepatotrópicos, como um cofator. Estes estudos sugerem que o B19V possa ter um papel importante na patogênese da doença hepática em pacientes coinfectados pelos vírus das hepatites A (HAV), B (HBV), C (HCV) e E (HEV) (Opaleye *et al.*, 2011).

No Brasil não existem dados publicados sobre a detecção do B19V em pacientes infectados pelo HAV, HBV, HCV e HEV. Portanto, é de especial importância esclarecer o papel deste vírus como agente etiológico de hepatites agudas, criptogênicas e fulminantes, assim como determinar se a coinfeção com vírus hepatotrópicos clássicos pode afetar o curso dessas infecções, influenciando ou não no prognóstico da doença.

Além disso, o diagnóstico diferencial deve ser considerado de acordo também com a sazonalidade da infecção. Estudos realizados no estado do Rio de Janeiro mostram que, conforme demonstrado em outros países, a infecção pelo B19V aumenta a cada 3 ou 4 anos, com o pico no número de casos coincidindo com o final da primavera e início do verão (Cubel *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2001; 2002). Nesses períodos epidêmicos, a circulação de B19V é maior, o risco de infecções mais complicadas se dá principalmente em pacientes imunocomprometidos e/ou com hemoglobinopatias.

Estes dados reforçam a importância de estabelecer métodos moleculares para detecção e quantificação de B19V-DNA em amostras de soro e tecido hepático visando a sua implementação na rotina laboratorial de diagnóstico diferencial das hepatites virais e desta forma, esses dados podem esclarecer se o parvovírus humano B19 pode ser um dos agentes etiológicos de hepatites agudas, criptogênicas e fulminantes, assim como determinar a frequência da sua infecção em pacientes com hepatites.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar o diagnóstico molecular da infecção pelo Parvovírus Humano B19 em pacientes com Falência Hepática Aguda com e sem etiologia definida e determinar a importância deste vírus na patogênese da doença.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar a técnica de PCR em tempo real para detecção e quantificação de DNA do B19V em amostras de soro e fígado visando o diagnóstico molecular da infecção;
- Determinar os casos de falência hepática aguda com e sem etiologia definida associados a infecção pelo Parvovírus humano B19 e avaliar a ocorrência de coinfeção pelo B19V e os vírus das hepatites A, B, e C em casos de falência hepática aguda;
- Confirmar a presença de DNA do Parvovírus humano B19 nas amostras de falência hepática aguda utilizando metodologias de sequenciamento e genotipagem;
- Detectar as imunoglobulinas de classe M e G (IgM e IgG) contra antígenos do Parvovírus humano B19 nas amostras de soro dos pacientes com falência hepática aguda, a fim de avaliar o período da infecção;
- Avaliar a replicação do Parvovírus humano B19 em tecido hepático de pacientes com falência hepática aguda utilizando protocolos de detecção de RNA mensageiro;
- Correlacionar os parâmetros bioquímicos entre o grupo casos (pacientes com falência hepática aguda e infectados pelo Parvovírus humano B19) e os grupos controle (pacientes com falência hepática aguda e indivíduos saudáveis) para mostrar um possível agravamento na falência hepática devido a infecção pelo vírus.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Em 2012, o Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV) iniciou uma linha de pesquisa sobre: “Avaliação dos aspectos imunopatológicos envolvidos em quadros de hepatite aguda com evolução para falência hepática fulminante”. Desde então tem sido coletados e armazenados soro e tecido hepático de pacientes com quadro de hepatite com evolução para falência hepática aguda, durante o procedimento de transplante hepático. Os pacientes eram provenientes do Serviço de Transplantes do Estado do Rio de Janeiro, sob aprovação do Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (CEP Fiocruz 1.896.353) que consta como anexo 1 deste documento.

O presente projeto foi executado após a aprovação do comitê de ética em Pesquisa em seres humanos da Fiocruz, e as amostras coletadas e armazenadas no LADTV, só foram utilizadas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e do termo de assentimento livre e esclarecido, com os pesquisadores responsáveis se comprometendo a manter a confidencialidade e o anonimato do sujeito da pesquisa.

3.2 Amostras clínicas

A fim de avaliar o desempenho das técnicas de PCR e PCR em tempo real para detecção e quantificação de B19V-DNA foi utilizado um painel de amostras de pacientes com doença exantemática e pacientes infectados pelo HIV, cedidas pela Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina e Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP) da Universidade Federal Fluminense (UFF), além de amostras de pacientes com hepatites ou herpesvírus humano1/2 pertencentes ao banco do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV) (Tabela 3-1). Essas amostras (DNA extraído do soro dos pacientes) foram divididas em dois grupos: amostras B19V reativas (n=20) e amostras de outras etiologias (n=36) para avaliação da sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos testes de PCR em tempo real.

Tabela 3-1 Amostras de soro de pacientes utilizados na padronização do qPCR

Amostras	Queixa clínica	Resultado laboratorial	Nº de soros	Referência
B19V (+)	Eritema infeccioso	DNA-B19V (+) IgM Anti-B19V (+)	21*	Cubel et al 1997 Cubel Garcia et al 2016
	Crise aplástica transitória	DNA-B19 (+) IgM Anti-B19V (+)	6	Cubel et al 1992
	Anemia	DNA-B19V (+) RNA-HIV (+)	2	Pereira et al 2014
	Assintomático	DNA-B19V (+) RNA-HIV (+)	3	Pereira et al 2014
B19V(-)	Doença exantemática	IgM anti-DENV (+) DNA-B19V (-)	10	Oliveira et al 2001
		IgM anti-RUB (+) DNA-B19V (-)	10	Oliveira et al 2001
	Anemia	RNA-HIV (+) DNA-B19V (-)	2	Pereira et al 2014
	Assintomático	RNA-HIV (+) DNA-B19V (-)	3	Pereira et al 2014
	Hepatite	RNA-HAV (+)	4	Banco de amostras do LADTV
	Hepatite	DNA-HBV (+)	3	
	Herpesvirose	DNA-HHV1/2 (+)	4	

*Seis amostras foram utilizadas para avaliação da reprodutibilidade e repetitividade da metodologia Sybr Green® e outras seis da metodologia TaqMan®. Nove amostras foram utilizadas nos ensaios de especificidade das duas metodologias.

B19V: Parvovírus humano B19; DENV: Vírus Dengue; DNA: Ácido desoxirribonucleico; HAV: Vírus da Hepatite A; HBV: Vírus da Hepatite B; HHV1/2: Herpesvírus humano 1/2; HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana; IgM: Imunoglobulina de classe M; LADTV: Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia; RNA: Ácido ribonucleico; RUB: Vírus Rubéola.

Além das amostras citadas na tabela anterior, utilizou-se o DNA extraído de uma amostra fecal de um cão infectado pelo Parvovírus Canino gentilmente cedido pela Dra. Débora Regina Lopes dos Santos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Como controle positivo para todas as reações de amplificação (PCR e qPCR) foi utilizado o DNA extraído de um plasma de doador de sangue assintomático pertencente à coleção de amostras do Laboratório de Gastroenterites Virais e do

Parvovírus do MIP/ UFF e como controle negativo foi utilizado água DNase/RNase free.

Para a realização do presente estudo foram utilizadas amostras de soro (n=30) e tecido hepático (n=14) de pacientes com FHA, com e sem etiologia definida. Além desses, foram utilizadas amostras de soro (n=5) e tecido hepático (n=2) de pacientes saudáveis, como grupo controle. Não foram utilizados critérios de exclusão para utilizar as amostras nesse estudo.

As amostras de sangue foram coletadas em procedimento de rotina do HGB: 5 mL de sangue periférico foi coletado por profissionais especializados por meio de punção venosa periférica, utilizando agulhas hipodérmicas e tubos estéreis do tipo vacutainer (Becton Dickinson Company, Franklin Lakes, Estados Unidos da América) contendo ativador de coágulo jateado na parede do tubo, que acelera o processo de coagulação, e gel separador para obtenção de soro. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm a 25°C por 10 minutos e o soro formado foi aliqotado em tubo de poliestireno de 1,5mL devidamente identificado e estocado a -70°C. Para os pacientes que realizaram transplante hepático, explantes do fígado foram coletados no momento do transplante por profissionais especializados, utilizando lâminas de bisturi nº 24 e frascos para biópsias e enxertos. Posteriormente as amostras foram aliqotadas em tubo de poliestireno de 1,5mL devidamente identificado e estocados em nitrogênio líquido a -196°C.

Para melhor visualização das etapas realizadas neste estudo, as Figuras 3-1 e 3-2 mostram o fluxograma do desenho experimental.

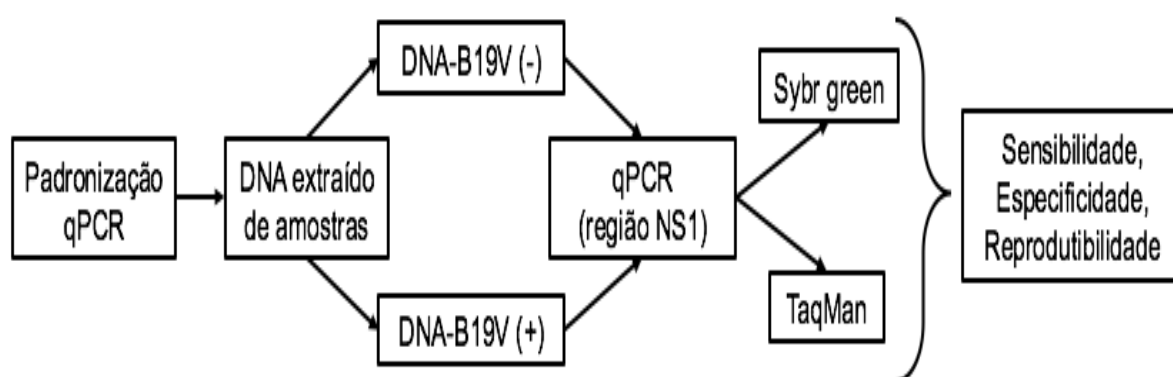


Figura 3-1 Fluxograma com as etapas da padronização do teste de qPCR

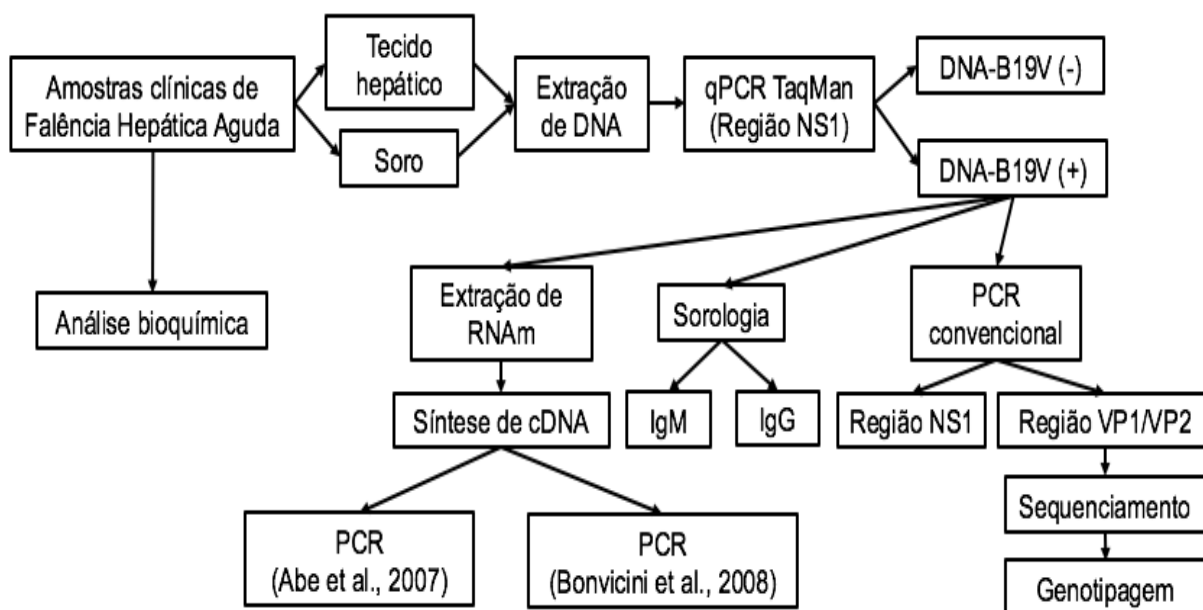


Figura 3-2 Fluxograma com as etapas da análise de amostras FHA

3.3 Extração de ácidos nucleicos

Para esse estudo, o DNA das amostras de soro e fígado dos pacientes com FHA foi extraído utilizando os *kits* comerciais. Para as amostras de soro, o DNA foi extraído utilizando o kit QIAamp DNA *Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, a partir de 200µL de soro. Para as amostras de tecido hepático foi utilizado o QIAamp DNA *tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, a partir de 25mg de tecido hepático. Em ambos os kits utilizados, foram eluídos 200µL de DNA, e os tubos contendo o DNA foram estocados a -20°C.

3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a detecção de DNA-B19V foi realizado uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 102pb da região que codifica a proteína NS1 do genoma viral (Nguyen *et al.*, 2002) e uma semi-nested PCR utilizando oligonucleotídeos que amplificam um fragmento de 476pb da região do genoma que codifica as proteínas do capsídeo viral VP1/VP2 (Durigon *et al.*, 1993) (Tabela 3-2).

Tabela 3-2 Oligonucleotídeos utilizados na PCR qualitativa e semi-nested

Direção	Iniciador	Localização (nt)	Sequência (5´-3´)	Região alvo	Amplicon
Senso	E1905 ^a	1905-1923	TGCAGATGCCCTCCACCCA	NS1	102pb
Antisenso	E1987 ^a	2007-1987	GCTGCTTTCACTGAGTTCTTC		
Senso	P12 ^b	4127-4148	CAGCCATACCACCACTGGGACA	VP1/ VP2	563pb
Antisenso	P16 ^b	4689-4665	AGTACATATGGTAAATGACCTGCTG		
Senso	P13 ^b	4214-4237	GACAAAGAGTATCAGCAAGGAGTG	VP1/ VP2	476pb
Antisenso	P16 ^b	4689-4665	AGTACATATGGTAAATGACCTGCTG		

^a Nguyen *et al.*, 2002 e ^b Duringon *et al.*, 1993

3.4.1 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para amplificação da região NS1 do genoma do Parvovírus B19

Nesta metodologia, a mistura da reação foi preparada em um tubo de 0,5mL previamente identificado, utilizando 12,5µL de água DNase/RNase *free*, 2,5µL de tampão 10x (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América), 2µL de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatos) a 10 mM (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América), 1,5µL de MgCl₂ (Cloreto de Magnésio) a 50mM (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América), 0,5µL de Taq DNA Polimerase 5U/µL (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América), 0,5µL de oligonucleotídeo senso (E1905) a 20pmol/µL e 0,5µL de oligonucleotídeo antisenso (E1987) a 20pmol/µL (Integrated DNA Technologies, Iowa, Estados Unidos da América). Em seguida, 5µL de DNA extraído foi aplicado à reação. Ambos os controles (positivo e negativo) foram submetidos a PCR.

A termociclagem seguiu o programa: incubação inicial a 94°C por 5 minutos, a PCR consistiu de 40 ciclos de incubação a 94°C por 45 segundos seguido por 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, a extensão final se deu com 72°C por 7 minutos (Nguyen *et al.*, 2002). Após a reação os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese (Item 3.3.3) e então armazenados a -20°C.

3.4.2 Semi nested PCR para amplificação do genoma que codifica para as proteínas VP1/VP2

Nesta metodologia, foram preparadas duas misturas em tubos de 0,5mL previamente identificados em diferentes momentos.

Na primeira mistura, (PCR1) foi utilizado 13,5 μ L de água DNase/RNase free, 2,5 μ L de tampão 10x (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América), 2 μ L de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatos) a 1,25mM (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América), 0,75 μ L de MgCl₂ (Cloreto de Magnésio) a 50mM (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América), 0,25 μ L de Taq DNA Polimerase 5U/ μ L (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América), 0,5 μ L de oligonucleotídeo senso (P12) a 20pmol/ μ L e 0,5 μ L de oligonucleotídeo antisenso (P16) a 20 pmol/ μ L (Integrated DNA Technologies, Iowa, Estados Unidos da América). Em seguida, 5 μ L de DNA extraído foi aplicado a reação, juntamente com controle positivo e negativo.

A termociclagem seguiu o programa: incubação inicial a 94°C por 5 minutos, a PCR consistiu de 40 ciclos de incubação a 94°C por 45 segundos seguido por 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, a extensão final se deu com 72°C por 7 minutos (Durigon *et al.*, 1993). As amostras positivas e negativas na primeira reação foram submetidas a uma nova amplificação (PCR2) com os iniciadores P13 e P16. As concentrações de reagentes da mistura da reação e as condições da termociclagem foram as mesmas descritas anteriormente. Após as reações, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese (Item 3.3.3) e então armazenados a -20°C.

3.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR (*amplicon*) foram separados por eletroforese em gel de agarose à concentração de 1,5% contendo tampão Tris/Acetato/EDTA (TAE) 1x (50x – 242 g de Tris base/ 57,1 mL de ácido acético glacial/100 mL de EDTA 0,5 M pH: 8,0), agarose (Gibco, Estados Unidos da América) e 0,5% de brometo de etídio a 0,5 μ g/mL (Invitrogen, Estados Unidos da América). Posteriormente foi aplicado ao gel 8 μ L de cada produto da PCR e 2 μ L de tampão de amostra (50% de glicerol, 0,4% de azul de bromofenol, 0,4% de xileno cianol). Foi utilizado 6 μ L do padrão de peso molecular 100 pares de bases (Norgen Biotek Corporation, Ontario, Canadá). Os

produtos amplificados foram visualizados no foto-documentador Kodak Gel Logic 2200 (Hyland Scientific, Washington, USA).

3.5 PCR quantitativo em tempo real para detecção do genoma do B19V e determinação da carga viral

A PCR em tempo real foi otimizada para a detecção e quantificação do fragmento da região NS1 do genoma do B19V. As metodologias de PCR em tempo real, corante intercalante (Sybr Green®) e sonda de hidrólise (TaqMan®) foram avaliadas e os oligonucleotídeos e a curva sintética utilizados nesse estudo se encontram na tabela a seguir (Tabela 3-3).

Tabela 3-3 Oligonucleotídeos utilizados na PCR em tempo real

Oligonucleotídeo	Localização (nt)*	Sequencia (5'-3')	Tamanho
Senso (E1905)	1905-1923	TGCAGATGCCCTCCACCCA	20pb
Antisenso (E1987)	2007-1987	GCTGCTTTCAGTGGTCTTC	20pb
Sonda FAM	1925-1951	6FAM-ACCTCCAAACCACCCCAATTGTCACA-MGBNFQ	26pb
Oligo-ultrâmerno (Curva padrão)	1905-2009	TGCAGATGCCCTCCACCCAGACCTCCAAACC ACCCCAATTGTCACCAGTATCAGCAGTGGTG AAAGCTCTGAAGAACTCAGTGAAAGCAGCC	104pb

* A localização do nucleotídeo se refere ao número que consta na referência do isolado do Genbank NC_000883

Com o auxílio do software *Primer Express*® (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos da América) foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores e a sonda da região parcial do gene NS1 do genoma do B19V. A sonda foi marcada na região 5' com o repórter 6-Carboxifluorescein (FAM), para que a sua detecção seja feita pelo software do equipamento de PCR em tempo real. Esta sonda somente foi utilizada na metodologia de TaqMan®.

Para determinar as condições ótimas da reação de qPCR na metodologia de Sybr Green®, foi utilizado o oligonucleotídeo ultrâmerno sintético (Integrated DNA Technologies, Iowa, Estados Unidos da América) de 104pb, cujo a sequência corresponde a região do genoma que codifica a proteína NS1, como controle

positivos de DNA-B19V. Várias reações foram realizadas com diferentes concentrações de oligonucleotídeos iniciadores (0,2mM, 0,3mM, 0,4mM e 0,5mM) e de temperaturas de anelamento (60°C, 61°C e 62°C).

Em seguida, com as condições ótimas, a quantificação absoluta das amostras foi determinada pela curva padrão sintética diluída em série de Log10, a fim de obter os pontos da curva. A curva foi aliquoteada e aplicada na placa em duplicata. A quantificação da curva foi estabelecida pelo fluorímetro Qubit® 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América).

Para a utilização dessa curva nos ensaios de PCR em tempo real ocorreu uma conversão de unidade de medida de pmol/µl para cópias/µl, para tal foi utilizado o cálculo da curva padrão levando-se em conta o número de Avogadro e o tamanho do ultrâmero utilizado. A equação de conversão está demonstrada a seguir:

$$\frac{\text{Concentração (g/}\mu\text{l)}}{[\text{Tamanho do ultrâmero (pb)}] \times 660} \times (6,022 \times 10^{23})$$

A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando o sistema de PCR em tempo real 7500 da Applied Biosystems (Califórnia, Estados Unidos da América) acoplado a um computador fazendo uso do *software* 7500 System SDS.

3.5.1 Metodologia de Sybr Green®

Nesta metodologia, foi preparada uma mistura em gelo, com os reagentes demonstrados na Tabela 3-4 (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos da América). As amostras foram aplicadas em uma placa de 96 cavidades (MicroAmp® Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos da América) contendo 15µL da mistura da reação e 5µL de DNA para um volume final de 20µL.

Tabela 3-4 Reagentes utilizados na PCR em tempo real - Sybr Green®

Reagentes	Volume na Reação	Concentração Final
2X Sybr Green® Master mix	10µL	1X
Oligonucleotídeo E1905F (20pmol/µL)	0,4µL	0,4mM
Oligonucleotídeo E1987R (20pmol/µL)	0,4µL	0,4mM
Água RNase/Dnase free	4,2µL	
Amostra	5µL	
Total	20µL	

As condições de corrida foram as seguintes: Estágio 1 – 1 ciclo de descontaminação da placa com Uracil N-Glicosilase (UNG) (50°C por 2 minutos); Estágio 2 – 1 ciclo de ativação da enzima (95°C por 10 minutos); Estágio 3 – 40 ciclos de desnaturação da fita (95°C por 15 segundos) seguido por hibridização do oligonucleotídeo e extensão da fita (61°C por 1 minuto); Estágio 4 – 1 ciclo de curva de dissociação (95°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos e 95°C por 15 segundos). Esse estágio 4 gera a curva de dissociação, que são representações gráficas da temperatura em que se encontram 50% da fita dissociada (Temperatura de *melting* – Tm ou temperatura de dissociação) (Maple *et al.*, 2014).

Todas as amostras foram testadas em duplicata e a fluorescência foi detectada no final do estágio 3 e o valor de Ct (*Threshold Cycle*) foi fornecido automaticamente em cada corrida. Este valor se refere ao número do ciclo no qual a fluorescência é detectada caracterizando a amplificação da amostra.

3.5.2 Metodologia de TaqMan®

Nesta metodologia, foi preparada uma mistura em gelo, com os reagentes do Mastermix Ag-Path-ID™ One Step RT-PCR (Thermo Fisher, Massachusetts, Estados Unidos da América) demonstrados na Tabela 3-5. As amostras foram aplicadas em uma placa de 96 cavidades (MicroAmp® Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos da América) contendo 20µL da mistura da reação e 5µL de DNA para um volume final de 25µL.

Tabela 3-5 Reagentes utilizados na PCR em tempo real – TaqMan®

Reagentes	Volume na Reação	Concentração Final
2X RT-PCR Buffer	12,5µL	1X
Água RNase/Dnase free	2,0µL	
Oligonucleotídeo E1905F (20pmol/µL)	1,25µL	1,0mM
Oligonucleotídeo E1987R (20pmol/µL)	1,25µL	1,0mM
Sonda NS1 – FAM (10pmol/µL)	1,0µL	0,4mM
Detection Enhancer	1,0µL	1X
25X RT-PCR Mix de enzimas	1,0µL	1X
Amostra	5µL	
Total	25µL	

As condições de corrida foram as seguintes: Estágio 1 – 1 ciclo de descontaminação da placa (50°C por 2 minutos); Estágio 2 – 1 ciclo de ativação da enzima DNA Polimerase AmpliTaq Gold e Inibição da enzima Transcriptase reversa ArrayScript (95°C por 10 minutos) (esta etapa foi necessária devido ao material ser DNA, não existindo a necessidade de transcrição reversa); Estágio 3 – 40 ciclos de desnaturação das fitas (95°C por 15 segundos) seguido por hibridização do oligonucleotídeo e extensão da fita (60°C por 1 minuto). O estágio 4 não foi utilizado para esta metodologia.

Todas as amostras foram testadas em duplicata e a fluorescência foi detectada no final do estágio 3 e o valor de Ct (Threshold Cycle) foi fornecido automaticamente em cada corrida. Este valor se refere ao número do ciclo no qual a fluorescência é detectada caracterizando a amplificação da amostra.

3.5.3 Avaliação do desempenho da PCR em tempo real

Todas as placas utilizadas nesse estudo foram aplicadas com pontos da curva padrão sintética para análise de parâmetros R_2 , Slope, Eixo de interceptação e eficiência. Os controles positivo e negativo foram aplicados e além disso, o NTC (non-template control ou controle sem DNA alvo) também foi utilizado, para garantir que não houveram contaminações.

Para otimizar a PCR em tempo real para detecção e quantificação de DNA-B19V, ambas as metodologias (Sybr Green® e TaqMan®) foram submetidas a testes que determinaram a sensibilidade, a especificidade e a reprodutibilidade das metodologias, de acordo com os *guidelines* do *National Institute of Health* (NIH) (Burd, 2010).

3.5.3.1 Avaliação da sensibilidade

Para avaliar a sensibilidade de ambas as metodologias, o limite de detecção foi estabelecido a partir da diluição seriada em série de Log₁₀ (5µL de Controle e 45µL de água RNase/DNase free) do controle positivo. Na placa de PCR em tempo real, as diluições foram colocadas em duplicata, e tiveram os Cts (Cycle Threshold) e cargas avaliadas até o ponto de diluição em que não houve a detecção da amostra. Na metodologia de Sybr Green®, além do Ct e da carga, o valor de Tm também foi avaliado.

3.5.3.2 Avaliação da especificidade

Para avaliar a especificidade de ambas as metodologias, soros de pacientes com diferentes manifestações clínicas da infecção por B19V e soros de pacientes com outras infecções virais foram testados (tabela 3-1). Além dessas, o DNA de parvovírus canino extraído a partir de uma amostra fecal de cão também foi avaliado. Na placa de PCR em tempo real, as amostras extraídas de DNA foram colocadas em duplicata, e tiveram os Cts e cargas avaliados, no momento em que houve a detecção. Além desses parâmetros, o Tm também foi avaliado para a metodologia de Sybr Green®.

3.5.3.3 Avaliação da reprodutibilidade

Para avaliar a reprodutibilidade e a repetitividade de ambas as metodologias, amostras de pacientes com eritema infeccioso foram testadas (tabela 3-1). Foram feitos testes em 3 dias consecutivos (reprodutibilidade) e em triplicata (repetitividade). Foram avaliados os valores de Ct, média, desvio padrão e coeficiente de variação (%).

3.5.3.4 Avaliação de presença de inibidores

Para avaliar a presença de inibidores de PCR na metodologia de TaqMan®, foi utilizado um controle positivo interno endógeno, que consiste em oligonucleotídeos e sonda marcada na extremidade 5' por uma fluorescência VIC para um alvo do genoma humano conhecido como RNase P (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos da América, Através do número de catálogo 4316844). Este controle interno comercial foi adicionado à 5µL de DNA extraído, permitindo a coamplificação da sequência alvo do controle interno e do B19V-DNA. O preparo da mistura e condições da corrida de PCR em tempo real foram as mesmas estabelecidas no item 3.5.2.

3.6 Pesquisa de anticorpos anti-B19V IgM e IgG

As amostras de soro de pacientes com FHA que foram positivas para o DNA-B19V, foram submetidas ao ensaio imunoenzimático comercial Parvovirus B19 IgM

EIA e Parvovirus B19 IgG EIA (Biotrin International Ltd, Dublin, Irlanda) para pesquisa de anticorpos, anti-B19V IgM e anti-B19V IgG, de acordo com as instruções do fabricante.

3.7 Sequenciamento nucleotídico e análise filogenética

Os produtos de PCR de pacientes com falência hepática aguda positivos para B19V-DNA foram submetidos à caracterização molecular dos isolados de B19V através do exame de análise filogenética baseada na região parcial de VP1/VP2 do genoma do vírus. Os isolados de B19V foram genotipados através de sequenciamento direto do produto de PCR de 476pb purificado da segunda reação de PCR para a região VP1/VP2 (PCR Semi-nested). A purificação desse material foi realizada com um kit comercial QIAquick gel extraction (Qiagen, Hilden, Alemanha) preparada de acordo com as instruções do fabricante.

Para a reação de sequenciamento de DNA, foi feita uma mistura em tubos de poliestireno de 1,5mL livres de nucleases e devidamente identificados, com 4,5µL de água RNase/DNase free, 1µL de oligonucleotídeos (P13/P16) a 3,2pmol (Tabela 3-3) e 2µL do respectivo amplicon obtido na etapa da PCR Semi-nested (item 3.3.2). O sequenciamento foi realizado em ambas as direções (senso e antisenso).

Essas reações foram entregues à plataforma de sequenciamento de DNA do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde/PDTIS (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil), onde o sequenciamento foi realizado utilizando o *kit BigDye 40 Terminator 3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, California, United States of America) no termociclador Gen Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, California, United States of America) e o sequenciador ABI3730xl -96 capilares (Applied Biosystems, California, United States of America) (Otto *et al.*, 2008).

As sequências nucleotídicas obtidas tiveram o seu eletroferograma analisado pelo programa BioEdit 7.2.5 (Hall *et al.*, 2007), a partir da observação de picos únicos das sequências. Em seguida as sequências que apresentavam boa qualidade (presença de picos únicos) foram comparadas a outras sequências depositadas no Genbank por meio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Em seguida as sequências foram alinhadas e editadas, com a retirada das regiões correspondentes aos oligonucleotídeos iniciadores pelo método Clustal W do programa BioEdit 7.2.5. A árvore filogenética foi reconstruída

pelo método Neighbor-Joining com um bootstrap de 1000 repetições, através do programa MEGA 6.0 (Saitou e Nei, 1987; Tamura *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2016). Para a genotipagem as sequências deste estudo foram comparadas com sequências dos três genótipos do B19V (Anexo 2).

3.8 Avaliação de replicativo intermediário (RNA_m) da infecção pelo B19V em pacientes com hepatite fulminante

De maneira a avaliar a replicação do B19V no tecido hepático, foi investigado a presença de RNA_m-B19V nas amostras dos pacientes com FHA, a partir de protocolos de detecção de replicativo intermediário. Os pacientes com FHA positivos para DNA-B19V no fígado e que foram anti-B19V IgG reativo foram utilizados nesse estudo. Além desses, um fígado de primata não humano (macaco *Cynomolgus* – *Macaca fascicularis*) infectado experimentalmente com vírus da hepatite A (cepa HAF-203) foi utilizado como um controle negativo.

3.8.1 Extração de RNA_m

Para a extração de RNA_m utilizou-se o kit MicroPoly A Purist (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América), que seleciona o RNA_m do RNA total presente na amostra, de acordo com as instruções do fabricante.

Primeiramente, 50mg de tecido foi pesado, cortado em pequenos fragmentos e colocado em um microtubo de 1,5mL devidamente identificado. Em seguida foi colocado 600µL de tampão de lise e o tecido foi homogeneizado com o homogeneizador elétrico *TissueRuptor* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Em seguida, foi adicionado a esse homogeneizado, 1400µL de solução de diluição e o tubo foi centrifugado a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5mL devidamente identificado e o precipitado formado foi descartado.

No tubo com o sobrenadante, foi adicionado 100µg de Oligo(dT) Celulose (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América) e essa mistura foi homogeneizada e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente sob leve agitação. Em seguida a mistura foi centrifugada a 4.000xg por 3 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado. Ao precipitado foi adicionado 1mL de tampão de lavagem, seguido por

homogeneização e posterior ressuspensão do mesmo. Esse processo foi repetido três vezes. A mistura foi transferida para a coluna fornecida pelo *kit* e centrifugada a 5.000xg por 20 segundos a temperatura ambiente. O líquido coletado foi descartado, em seguida foi adicionado 200 μ L da solução de eluição e estoque de RNA pré-aquecida à 75°C e a coluna foi novamente centrifugada a 5.000xg por 20 segundos a temperatura ambiente. O RNA total da amostra obtido foi reservado.

Para a seleção do RNAm foi adicionado 200 μ L de solução de ligação na coluna e esta foi homogeneizada, ressuspensa e adicionada ao tubo coletor com o RNA total. A mistura foi incubada a 75°C por 5 minutos, em seguida a temperatura ambiente com leve agitação por 15 minutos, transferida novamente para a coluna e centrifugada a 5.000xg por 20 segundos a temperatura ambiente. A coluna foi lavada com 500 μ L de tampão de lavagem 1, homogeneizada e centrifugada a 4.000xg por 3 minutos a temperatura ambiente e o líquido foi descartado. Em seguida, a coluna foi novamente lavada com 500 μ L de tampão de lavagem 2, homogeneizada e centrifugada a 4.000xg por 3 minutos a temperatura ambiente e o líquido foi descartado. A coluna foi então colocada em um novo tubo coletor e adicionado 200 μ L da solução de eluição e estoque de RNA pré-aquecida à 75°C e a coluna foi homogeneizada e centrifugada a 5.000xG por 20 segundos a temperatura ambiente. O RNAm obtido foi estocado a -70°C.

3.8.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Inicialmente, o RNAm purificado obtido da amostra de fígado foi submetido a um tratamento de digestão com a enzima DNase I (Promega, Wisconsin, Estados Unidos da América) para eliminar a presença de um possível DNA residual. Para isso, foi colocado em um tubo de 0,5mL previamente identificado, 2 μ L de DNase I (concentração final de 90U/mL), 10 μ L de tampão da DNase I, 18 μ L de água DNase/RNase free e 20 μ L de RNAm purificado. O tubo foi incubado à 65°C por 25 minutos. Em seguida foi aplicado 2 μ L de EDTA (concentração final de 15 μ M/mL) e este foi incubado por 15 minutos à 95°C para inativação da enzima.

A síntese de cDNA foi feita com a enzima transcriptase reversa Super Script III e com o oligonucleotídeo antissenso específico (Abe *et al.*, 2007; Bonvicini *et al.*, 2008). Após a extração do RNAm viral e do tratamento com DNase I foi preparada a reação para a síntese do DNA complementar (cDNA). Para cada amostra de RNAm foi preparada uma mistura contendo 1 μ L de dNTP (desoxirribonucleotídeos

trifosfatos) a 1,25mM (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América); 4µL do tampão de reação da enzima 5x Super Script III (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América); 2µL de oligonucleotídeo antisense a 20pmol (tabela 3-8) (Integrated DNA Technologies, Iowa, Estados Unidos da América), 0,5µL de RNAsin (inibidor de RNA) a 20 U/µL (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América); 1,5µL de DNase/RNase free e 1µL da enzima SUPER SCRIPT III a 200 U/µL (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América). Após o preparo desta mistura, 10µL de RNAm viral (tratado com DNase I) foi adicionado. A reação foi incubada no termociclador à 50°C por 1 hora e, em seguida, à 70°C durante 20 minutos para inativação da enzima, e o material foi armazenado a -70°C.

3.8.3 RT-PCR de replicativo intermediário

As reações de RT-PCR para a pesquisa de RNAm foram realizadas de acordo com o descrito previamente por Abe *et al.* (2007) e por Bonvicini *et al.* (2008).

De acordo com o protocolo descrito por Abe e colaboradores (2007), foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região VP1/VP2 (Tabela 3-6) visando a detecção de transcritos não processados (*non-spliced*) da região VP1/VP2 por nested-PCR. Para isso foi feita mistura em gelo, contendo 23,5µL de água DNase/RNase free, 5µL de tampão 10x (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América), 2µL de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatos) a 1,25 mM (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América), 10µL de MgCl₂ (Cloreto de Magnésio) a 50mM (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América), 0,5µL de Taq DNA Polimerase 5U/µL (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América). Além desses itens foram colocados 0,5µL de oligonucleotídeo senso (PV1F) a 20pmol e 0,5µL de oligonucleotídeo antisense (PV1R) a 20pmol para a PCR 1. Em contrapartida, na mistura da nested-PCR foi acrescentado 0,5µL de oligonucleotídeo senso (PV2F) a 20pmol e 0,5µL de oligonucleotídeo antisense (PV2R) a 20pmol para a PCR 2 (Tabela 3-6) (Integrated DNA Technologies, Iowa, Estados Unidos da América). Em seguida, 5µL de RNAm extraído foi aplicado a reação de PCR 1 e 5µL de produto de PCR 1 foi aplicado na PCR 2.

Tabela 3-6 Oligonucleotídeos para detecção de RNAm (Abe et al., 2007)

PCR	Iniciador	Localização (nt)	Sequência (5'-3')	Região alvo	Amplicon
PCR 1	PV1F ^a	3520-3539	GCTGTTAAGGATGTTACAGA	VP1/VP2	381pb
	PV1R ^b	3882-3901	GGATCCGTATAAGGGATTGT		
PCR 2 (Nested)	PV2F ^a	3541-3560	CAGGTTACTGACAGCACTAC	VP1/VP2	326pb
	PV2R ^b	3848-3867	TGTTGACTGCAGCCCTCTAA		

^a Oligonucleotídeo iniciador senso (forward); ^b Oligonucleotídeo iniciador antisenso (reverse)

Em seguida as amostras foram colocadas em um termociclador e após a desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, foram submetidos à 40 ciclos conforme descrito na tabela 3-7. Após a termociclagem os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese (Item 3.4.3) e então estocados a -20°C.

Tabela 3-7 Padrão de termociclagem da RT-PCR (Abe et al., 2007)

Ciclo(s)	Temperatura	Tempo	
1 ciclo	94°C	5 minutos	
40 ciclos	94°C	30 segundos	Para a PCR 1 Para a PCR 2
	51°C	30 segundos	
	55°C	30 segundos	
	72°C	1 minuto	
1 ciclo	72°C	7 minutos	

De acordo com o protocolo descrito por Bonvicini e colaboradores (2008), foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para diferentes regiões do mapa de transcritos do B19V (Tabela 3-8), por isso foram feitos quatro PCR distintas, com diferentes conjuntos de oligonucleotídeos e diferentes temperaturas de hibridização. Em cada PCR foi feita uma mistura contendo 23,5µL de água DNase/RNase free, 5µL de tampão 10x (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América), 2µL de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatos) a 10 mM (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América), 10µL de MgCl₂ (Cloroeto de Magnésio) a 50mM (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América), 0,5µL de Taq DNA Polimerase 5U/µL (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos da América). Em todas as reações foram utilizados 0,5µL de oligonucleotídeo senso a 20pmol e 0,5µL de oligonucleotídeo antisenso a 20pmol, conforme descrito na tabela 3-8 (Integrated

DNA Technologies, Iowa, Estados Unidos da América). Em seguida, 5 μ L de RNAm extraído foi aplicado às diferentes reações.

Tabela 3-8 Oligonucleotídeos para detecção de RNAm - Bonvicini et al., 2008

PCR	Iniciador	Localização (nt)	Sequencia (5'-3')	Região alvo	Amplicon
PCR 1	2210F ^a 2355R ^b	2210-2229 2334-2355	CGCCTGGAACACTGAAACC GAAACTGGTCTGCCCAAAGGT	Exon central	146pb
PCR 2	0534F ^a 0622R ^b	0534-0555 0602-0622	TGGGCTGCTTTTCTGGAC ATAGCTCCATGTTAGTATGT	RNAm 01' (NS1)	89pb
PCR 3	2210F ^a 2377R ^b	2210-2229 2356-2377	CGCCTGGAACACTGAAACC TCAACCCCAACTAACAGTTC	RNAm 01' (NS1) 02'(7,5kDa), 04 e 05 (VP1)	168pb
PCR 4	2210F ^a 3238R ^b	2210-2229 3207-3238	CGCCTGGAACACTGAAACC CAGGGGCAGCTGGACAGTTC	RNAm 06 07 (VP2)	168pb

^a Oligonucleotídeo iniciador senso (forward); ^b Oligonucleotídeo iniciador antisenso (reverse)

Em seguida as amostras foram colocadas em um termociclador e após a desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, foram submetidos à 40 ciclos conforme descrito na tabela 3-9. Após a termociclagem os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese (Item 3.4.3) e então guardados a -20°C.

Tabela 3-9 Padrão de termociclagem da RT-PCR (Bonvicini et al., 2008)

Ciclo (s)	Temperatura	Tempo	
1 ciclo	94°C	5 minutos	
40 ciclos	94°C	30 segundos	Para a PCR 1 Para a PCR 2 Para a PCR 3 Para a PCR 4
	57°C	30 segundos	
	54°C	30 segundos	
	55°C	30 segundos	
	59°C	30 segundos	
	72°C	2 minutos	
1 ciclo	72°C	10 minutos	

3.9 Análise bioquímica

As amostras de soro dos pacientes com FHA foram analisadas para a determinação das transaminases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), de gama glutamil transpeptidase (Gama-GT), de fosfatase alcalina e de bilirrubina direta no Hospital Geral de Bonsucesso através de procedimentos colorimétricos usando kits comerciais (Abbott, Illinois, Estados Unidos da América) de acordo com as instruções do fabricante.

3.10 Análise estatística

Os dados obtidos referentes aos resultados foram digitados e codificados em um banco de dados criado no programa Microsoft Office Excel 10.0 (Microsoft Corporation, Estados Unidos da América). Foi realizada análise estatística descritiva com cálculo de frequências, média, desvio padrão e intervalos de confiança. Foi utilizado teste T de *Student* (não pareado) e ANOVA de fator único com pós-teste Bonferroni quando apropriado. As correlações entre as variáveis foram analisadas pelo coeficiente de Spearman. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram feitas usando o programa GraphPad InStat 3.0.1. (GraphPad, Califórnia, Estados Unidos da América).

4 RESULTADOS

4.1 Descrição da população de estudo

A população de estudo desse trabalho retrospectivo foi composta por 30 pacientes com FHA e por cinco indivíduos saudáveis doadores de fígado como controle, com a coleta das amostras realizadas entre 2004 e 2012. Em relação ao gênero, pode-se observar na tabela 4-1 uma predominância do sexo feminino tanto em pacientes com FHA quanto em indivíduos saudáveis. As idades dos pacientes FHA variaram de 1 a 55 anos, com média de $25,7 \pm 17,5$ anos. Houve um predomínio de indivíduos na faixa de 46 a 55 anos ($n=8$). Entre os indivíduos saudáveis, as idades variaram de 29 a 33 anos, com média de $30,8 \pm 3,4$ para os controles saudáveis (Tabela 4-1).

Tabela 4-1 Descrição da população de estudo conforme o gênero e o grupo etário

	Pacientes FHA	Indivíduos saudáveis	Total
Gênero			
Sexo feminino	22	3	25
Sexo masculino	8	2	10
Total	30	5	35
Grupo etário			
1 a 9 anos	6	0	6
10 a 18 anos	6	0	6
19 a 27 anos	7	0	7
28 a 36 anos	2	5	7
37 a 45 anos	1	0	1
46 a 55 anos	8	0	8
Total	30	5	35

Em relação a etiologia de FHA, conforme pode ser observado na Tabela 4-2, 11 pacientes tinham hepatite criptogênica; 11 pacientes com hepatites virais, sendo: quatro pacientes infectados pelo Vírus da Hepatite A (HAV), um paciente coinfestado HAV / citomegalovírus (CMV), quatro pacientes infectados pelo vírus da hepatite B (HBV), um paciente coinfestado HBV/HIV e um paciente infectado pelo herpesvírus humano 6 (HHV-6); três pacientes com hepatite autoimune; e cinco pacientes com

hepatite medicamentosa, sendo: um paciente com hepatite causada pela rifampicina, um paciente com hepatite causada por isoniazida, um paciente com hepatite causada por metildopamina, um paciente com hepatite causada por fenobarbital e um paciente com hepatite causada por paracetamol.

Tabela 4-2 Descrição da etiologia dos pacientes com Falência Hepática Aguda

Número de pacientes com Falência Hepática Aguda				
Criptogênica	Viral	Autoimune	Medicamentosa	
	HAV = 4		Rifampicina = 1	
	HBV = 4		Isoniazida = 1	
11	HHV-6 = 1	3	Metildopamina = 1	
	HAV/CMV = 1		Fenobarbital = 1	
	HBV/HIV = 1		Paracetamol = 1	
Total	11	3	5	

4.2 Otimização da PCR em tempo real para detecção e quantificação do B19V

4.2.1 Avaliação de concentrações de oligonucleotídeos iniciadores e temperaturas de hibridização

De maneira a otimizar a detecção na metodologia de Sybr Green®, foi feita uma matriz com diferentes concentrações de oligonucleotídeos iniciadores (0,2mM, 0,3mM, 0,4mM e 0,5mM) e de temperaturas de hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores (60°C, 61°C e 62°C) para detectar diferentes pontos da curva padrão sintética. A partir dos resultados expressos na tabela 4-3 é possível excluir os resultados com valores de T_m (expressos em azul) menores que 80,5°C e maiores que 82,5°C, pois mostram amplificação inespecífica. Sendo aceite um intervalo entre 80,5°C e 82,5°C. Com isso pode-se observar que a detecção na concentração de 0,4mM de oligonucleotídeos iniciadores a uma temperatura de hibridização de 61°C foi a mais satisfatória (área marcada em cinza). A Figura 4-1 mostra a curva de dissociação de 61°C à 0,4mM (A) e 62°C à 0,4mM (B)

Tabela 4-3 Avaliação de concentrações de oligonucleotídeos iniciadores e temperaturas de hibridização na metodologia de Sybr Green®

Temperatura de hibridização	60°C			61°C		62°C		
	0,3mM	0,4mM	0,5mM	0,3mM	0,4mM	0,2mM	0,4mM	0,5mM
Concentração de oligonucleotídeo	Ct (Tm)	Ct (Tm)	Ct (Tm)	Ct (Tm)	Ct (Tm)	Ct (Tm)	Ct (Tm)	Ct (Tm)
Concentração da curva (em cópias/ μ L)	Ct (Tm)	Ct (Tm)	Ct (Tm)	Ct (Tm)	Ct (Tm)	Ct (Tm)	Ct (Tm)	Ct (Tm)
10^{10}	NA	NA	6,87 (80,5)	17,57 (79,9)	10,78 (81,4)	16,28 (80,1)	14,95 (80,6)	21,50 (81,2)
10^9	8,76 (79,5)	8,73 (79,3)	10,92 (80,5)	20,07 (79,9)	13,85 (81,4)	15,61 (80,3)	14,90 (80,8)	26,45 (81,3)
10^8	12,20 (79,9)	12,09 (79,5)	15,14 (80,7)	23,09 (80,5)	16,15 (81,4)	18,57 (80,4)	17,91 (81,0)	31,67 (81,5)
10^7	15,74 (79,9)	15,19 (79,7)	21,58 (80,6)	28,61 (80,6)	19,05 (81,4)	24,99 (80,6)	26,07 (80,8)	36,79 (81,7)
10^6	19,22 (79,9)	18,65 (79,9)	ND	32,15 (80,6)	22,26 (81,4)	29,76 (80,6)	24,33 (80,6)	19,77 (82,9)
10^5	22,64 (79,9)	21,82 (79,7)	ND	35,16 (80,5)	26,40 (80,7)	34,65 (79,5)	36,13 (79,5)	ND
10^4	23,25 (79,9)	ND	ND	37,40 (80,2)	29,03 (80,7)	36,36 (78,9)	35,00 (79,0)	ND
10^3	26,28 (79,9)	ND	ND	ND	31,91 (80,7)	37,90 (84,0)	36,42 (79,7)	ND
10^2	NA	NA	ND	ND	34,79 (80,7)	ND	35,89 (77,3)	ND
10^1	NA	NA	ND	ND	37,83 (80,7)	ND	37,96 (80,6)	ND

mM= miliMolar; Ct= *Cycle threshold*; Tm= Temperatura de melting (em °C); NA= Não avaliado; ND= Não detectado

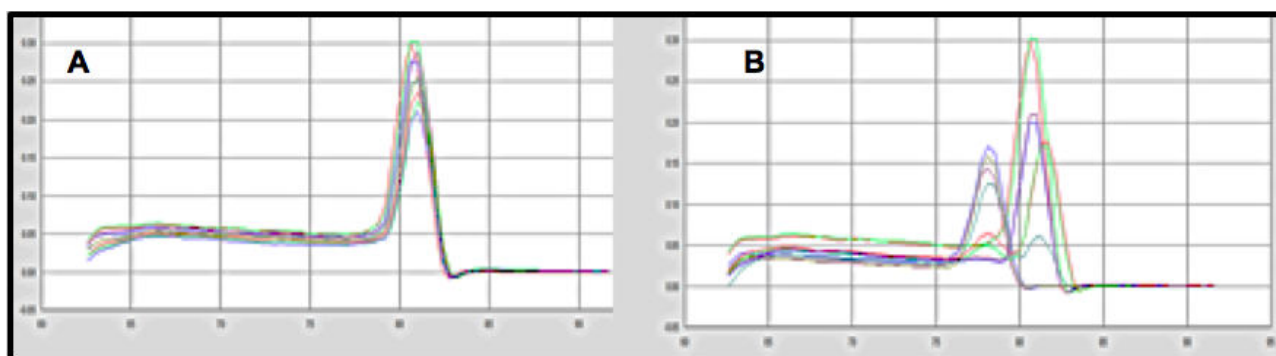


Figura 4-1 Curvas de dissociação

Em A o teste foi feito com uma temperatura de hibridização de 61°C e 0,4mM de oligonucleotídeos iniciadores e em B o teste feito com uma temperatura de hibridização de 62°C e 0,4mM de oligonucleotídeos iniciadores

4.2.2 Avaliação da Curva Padrão Sintética

Para a otimização da técnica de PCR em tempo real (qPCR) foi realizada a diluição da curva padrão sintética de DNA fita simples da região NS1 do vírus (104pb), permitindo assim a quantificação absoluta das amostras.

Na metodologia de Sybr Green®, a curva apresentou linearidade entre as diluições 10^{-1} (Ct de 7,5 e carga de 10^9 cópias/ μ L) e 10^{-9} (Ct de 37,5 e carga de 10^1 cópias/ μ L); temperatura de melting de $81,5^\circ\text{C}$, coeficiente de correlação R^2 de 0,999, Slope de -3,37, eixo de interceptação (Y) de 39,30, Eficiência de 97%. Foram consideradas positivas, as amostras que apresentavam essa variação de Ct e Tm variando de $80,5^\circ\text{C}$ a $82,5^\circ\text{C}$. A curva padrão de Sybr Green® está representada na Figura 4-2.

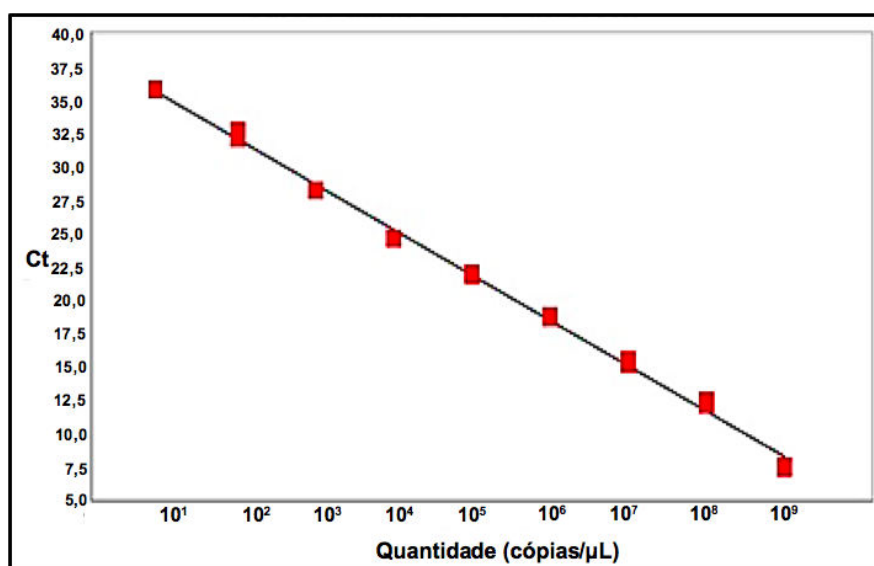


Figura 4-2 Curva padrão de DNA-B19V na metodologia de Sybr Green®

Na metodologia de TaqMan®, a curva apresentou linearidade entre as diluições 10^{-1} (Ct de 6 e carga de 10^9 cópias/ μ L) e 10^{-9} (Ct de 35 e carga de 10^1 cópias/ μ L); coeficiente de correlação R^2 de 0,992, Slope de -3,46, eixo de interceptação (Y) de 39,76, Eficiência de 95%. Foram consideradas positivas, as amostras que apresentavam essa variação de Ct. A curva padrão de TaqMan® está representada na Figura 4-3.

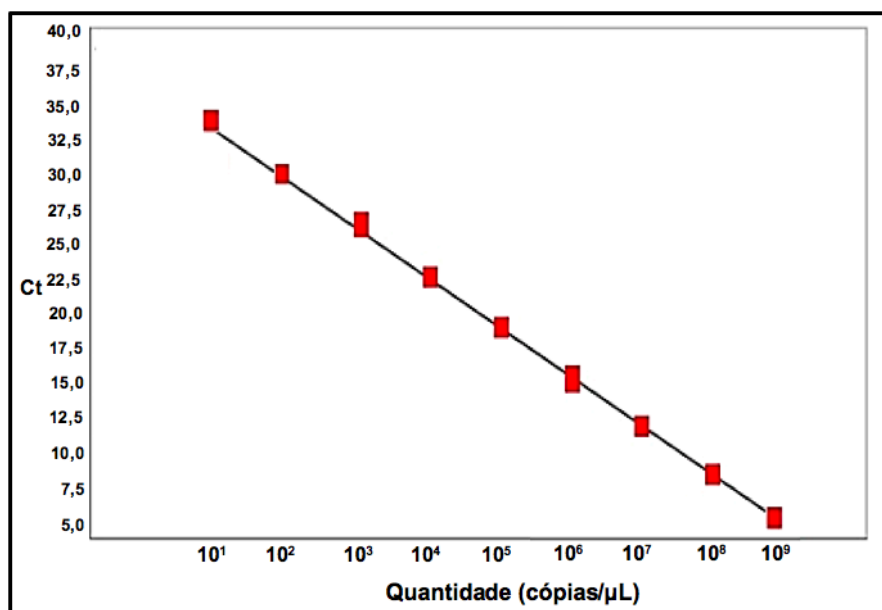


Figura 4-3 Curva padrão de DNA-B19V na metodologia de TaqMan®

4.2.3 Avaliação da Sensibilidade

A sensibilidade das metodologias de PCR em tempo real (Sybr Green® e TaqMan®) foram determinadas utilizando-se o limite de detecção de diluições seriadas Log10 (10⁻¹ a 10⁻¹²) do controle positivo. A metodologia de Sybr Green® teve o limite de detecção de 4,32x10¹ cópias/μL (Ct de 34,76 e Tm de 81,5°C). A metodologia de TaqMan® teve o limite de detecção de 1,83 cópias/μL (Ct de 38,65) (Tabela 4-4).

Tabela 4-4 Avaliação do limite de detecção da PCR em tempo real

Diluição (em cópias/μL)	Sybr Green®			TaqMan®	
	Ct	Cópias/μL	Tm	Ct	Cópias/μL
CP 10 ⁰	10,23	3,80x10 ⁸	81,5°C	8,56	3,60x10 ⁸
CP 10 ⁻¹	14,56	3,50x10 ⁷	81,2°C	12,31	4,20x10 ⁷
CP 10 ⁻²	17,62	4,83x10 ⁶	81,2°C	15,29	5,74x10 ⁶
CP 10 ⁻³	20,89	4,12x10 ⁵	81,5°C	18,74	5,73x10 ⁵
CP 10 ⁻⁴	24,41	5,23x10 ⁴	81,5°C	22,76	3,92x10 ⁴
CP 10 ⁻⁵	27,13	5,12x10 ³	81,5°C	26,07	4,30x10 ³
CP 10 ⁻⁶	31,54	4,65x10 ²	81,2°C	30,01	3,10x10 ²
CP 10 ⁻⁷	34,76	4,32x10 ¹	81,5°C	33,35	3,34x10 ¹
CP 10 ⁻⁸	ND	ND	ND	36,54	3,98
CP 10 ⁻⁹	ND	ND	ND	38,65	1,83
CP 10 ⁻¹⁰	ND	ND	ND	ND	ND
CP 10 ⁻¹¹	ND	ND	ND	ND	ND
CP 10 ⁻¹²	ND	ND	ND	ND	ND

Ct= Cycle Threshold; Tm= Temperatura de melting; CP= Controle Positivo; ND= Não detectado

4.2.4 Avaliação da Especificidade

A especificidade das metodologias de PCR em tempo real (Sybr Green® e TaqMan®) foram determinadas analisando amostras de soro positivas e negativas para DNA-B19V. Na metodologia de Sybr Green® nenhum resultado falso-negativo foi observado, ou seja, todas as amostras de pacientes que eram positivos para DNA-B19V foram detectadas por essa metodologia independentemente da manifestação clínica ou da coinfeção com HIV. Entretanto, um resultado falso-positivo foi detectado, uma vez que uma amostra anti-DENV IgM+ foi reativa nessa metodologia. A metodologia de TaqMan® não apresentou resultados falso-positivos ou falso-negativos (Tabela 4-5).

Tabela 4-5 Avaliação da especificidade de PCR em tempo real

Amostras	Resultado laboratorial inicial	Nº de soros	Sybr Green®		TaqMan®
			DNA-B19V (+)	Tm	DNA-B19V (+)
Eritema infeccioso	DNA-B19V (+) IgM Anti-B19V (+)	9	9	80,7°C	9
Crise aplástica transitória	DNA-B19V (+) IgM Anti-B19V (+)	6	6	80,7°C	6
Anemia (infectado por HIV)	DNA-B19V (+)	2	2	80,7°C	2
Infectado pelo HIV	DNA-B19V (+)	3	3	80,7°C	3
Doença exantemática	IgM anti-DENV (+) DNA-B19V (-)	10	1	80,7°C	ND
	IgM anti-RUB (+) DNA-B19V (-)	10	ND	ND	ND
Anemia (infectado por HIV)	DNA-B19V (-)	2	ND	ND	ND
Infectado pelo HIV	DNA-B19V (-)	3	ND	ND	ND
Hepatite A (HAV)	RNA-HAV (+)	4	ND	ND	ND
Hepatite B (HBV)	DNA-HBV (+)	3	ND	ND	ND
Herpesvírus humano 1/2 (HHV-1/2)	DNA-HHV1/2 (+)	4	ND	ND	ND
Parvovírus Canino	DNA-CPV (+)	1	ND	ND	ND

Nº= número; Tm= Temperatura de dissociação; ND= Não detectado

4.2.5 Avaliação da Reprodutibilidade e Repetitividade

A avaliação da reprodutibilidade e repetitividade foi determinada utilizando-se 12 amostras de pacientes com eritema infeccioso (DNA-B19V+ e IgM anti-B19V+). Foram utilizadas seis amostras para cada metodologia (Sybr Green® e TaqMan®).

4.2.5.1 Reprodutibilidade nas metodologias de Sybr Green® e TaqMan®

A reprodutibilidade inter-ensaio foi avaliada testando as amostras em 3 dias consecutivos. Com os valores de Ct, foram obtidos a média e o desvio padrão (DP), e assim foram determinados os coeficientes de variação (CV) com valores de 0,08% a 2,10% para a metodologia de Sybr Green® e de 0,06% a 0,82% para a metodologia de TaqMan® (Tabela 4-6).

Tabela 4-6 Reprodutibilidade das metodologias Sybr Green® e TaqMan®

Reprodutibilidade da metodologia Sybr Green®						
Dias	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
1	29,37	31,17	28,12	25,81	27,15	25,32
2	29,33	30,02	27,67	26,12	27,02	25,08
3	29,37	30,39	27,91	25,07	27,12	25,31
Média±DP	29,36±0,02	30,53±0,59	27,90±0,23	25,67±0,54	27,10±0,07	25,24±0,14
CV (%)	0,08	1,92	0,81	2,10	0,25	0,54
Reprodutibilidade da metodologia de TaqMan®						
Dias	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10	Amostra 11	Amostra 12
1	28,66	30,06	32,19	28,87	28,15	31,89
2	29,02	30,02	32,84	28,93	27,81	32,31
3	28,75	30,05	32,45	29,33	27,65	32,05
Média±DP	28,81±0,13	30±0,04	32,49±0,27	29,04±0,20	27,87±0,21	31,25±0,17
CV (%)	0,53	0,06	0,82	0,70	0,75	0,54

DP= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de Variação

4.2.5.2 Repetitividade nas metodologias de Sybr Green® e TaqMan®

A repetitividade (ou reprodutibilidade intra-ensaio) foi avaliada testando as amostras em triplicatas. Com os valores de Ct, foram obtidos a média e o desvio padrão (DP), e assim foram determinados os coeficientes de variação (CV) com valores de 0,07% a 1,58% para a metodologia de Sybr Green® e de 0,17% a 1,16% para a metodologia de TaqMan® (Tabela 4-7).

Tabela 4-7 Repetitividade das metodologias de Sybr Green® e TaqMan®

Repetitividade da metodologia Sybr Green®						
Replicatas	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
1	29,37	31,17	28,12	25,81	27,15	25,32
2	29,45	31,65	28,47	26,04	27,11	25,26
3	29,20	32,17	28,20	26,07	27,13	25,16
Média±DP	29,34±0,13	31,66±0,50	28,26±0,18	25,97±0,14	27,13±0,02	25,25±0,08
CV (%)	0,44	1,58	0,65	0,55	0,07	0,32
Repetitividade da metodologia de TaqMan®						
Replicatas	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10	Amostra 11	Amostra 12
1	29,02	30,02	32,84	28,93	27,81	32,31
2	28,71	30,12	32,91	28,72	27,68	32,14
3	28,45	30,09	32,22	29,12	28,12	31,96
Média±DP	28,73±0,29	30,06±0,05	32,66±0,38	28,92±0,20	27,87±0,23	32,14±0,17
CV (%)	0,99	0,17	1,16	0,69	0,81	0,51

DP= Desvio Padrão; CV= Coeficiente de Variação

4.2.6 Avaliação de inibidores de PCR com o controle endógeno RNase P

Na metodologia de TaqMan® foi utilizado um controle endógeno que detecta a região RNase P do DNA humano. Para a realização desse teste foram utilizadas

as amostras de pacientes com FHA e controles saudáveis, em detrimento das amostras já utilizadas até o momento, devido a possibilidade de avaliação de diferentes tecidos (soro e fígado). Com o teste foi possível observar que não houve inibição de PCR, uma vez que todas as amostras foram positivas na RNase P, tanto no soro como no fígado (Tabela 4-8).

Tabela 4-8 Avaliação do controle endógeno RNase P

Amostra	Tipo de amostra	Média Ct ± DP (B19V-DNA)	Média Ct ± DP (RNase P)
FHA 001	Soro	36,30 ± 0,153	32,89 ± 0,259
	Fígado	32,00 ± 0,072	20,35 ± 0,046
FHA 002	Soro	37,27 ± 0,098	32,06 ± 0,063
	Fígado	33,45 ± 0,081	17,23 ± 0,019
FHA 017	Soro	ND	31,14 ± 0,072
	Fígado	ND	16,01 ± 0,084
FHA 026	Soro	ND	33,61 ± 0,421
	Fígado	ND	21,30 ± 0,042
FHA 029	Soro	ND	31,12 ± 3,177
	Fígado	ND	22,91 ± 0,218
FHA 030	Soro	ND	35,22 ± 0,954
	Fígado	ND	25,44 ± 0,141
IS 003	Soro	ND	30,02 ± 0,232
	Fígado	ND	20,25 ± 0,077

Ct= Cycle threshold; DP= Desvio Padrão; FHA= Falência Hepática Aguda; IS= Indivíduo saudável; ND= Não detectado

4.3 Detecção de marcadores sorológicos e moleculares para o B19V entre pacientes com FHA

Uma vez que a metodologia de TaqMan® apresentou resultados mais satisfatórios de sensibilidade e especificidade em relação à Sybr Green®, a população com FHA descrita no item 4.1 foi analisada por essa metodologia. Entre os 30 pacientes com FHA, sete foram positivos para DNA-B19V (população FHA/B19V-DNA+), dentre eles, três apresentavam hepatite criptogênica, três apresentavam hepatite viral, dois por hepatite B (HBV), um por CMV e um hepatite medicamentosa causada por izoniazida. Quanto ao desfecho clínico, quatro

pacientes evoluíram para o óbito, dentre eles dois apresentavam hepatite criptogênica e dois hepatite B (Tabela 4-9).

Em relação à sorologia todas as amostras foram negativas para o anticorpo IgM-anti-B19V e apenas uma foi negativa para o anticorpo IgG-anti-B19V. Em relação a PCR convencional, para a região NS1, todas as amostras de soro foram negativas e todas as amostras de tecido hepático foram positivas. Para a região VP1/VP2 uma amostra de soro foi positiva e todas as amostras de tecido hepático foram positivas. Em relação a PCR em tempo real todas as amostras foram positivas, tanto de soro quanto de tecido hepático. A carga viral no soro variou de $1,07 \times 10^0$ cópias/ μ L a $8,58 \times 10^0$ cópias/ μ L e no tecido hepático variou de $2,56 \times 10^1$ cópias/ μ L a $1,65 \times 10^2$ cópias/ μ L.

Entre os 23 pacientes negativos para o DNA-B19V (população FHA/B19V-DNA-), oito apresentavam hepatite criptogênica; oito apresentavam hepatite viral (quatro por HAV, um por HBV, um por HHV-6, um por HAV/CMV e um por HBV/HIV), quatro apresentavam hepatite medicamentosa (um por rifampicina, um por metildopamina, um por fenobarbital e um por paracetamol); e três apresentavam hepatite autoimune. Quanto ao desfecho clínico, quatro pacientes evoluíram para o óbito, dentre eles três apresentavam hepatite A e um apresentava hepatite criptogênica; nove pacientes tiveram alta hospitalar e para 10 pacientes não obtivemos informações quanto ao desfecho clínico (Tabela 4-10).

Tabela 4-9 Características dos sete pacientes com falência hepática aguda positivos e resultados de marcadores sorológicos e moleculares para o B19V-DNA

Paciente	Ano	Idade	Sexo	Etiologia FHA	Desfecho clínico	Sorologia		Tipo de amostra	PCR convencional		qPCR	Genótipo
						IgM	IgG		NS1	VP1/VP2	Carga viral	
FHA001	2006	9	Feminino	Criptogênica	Óbito	-	+	Soro	-	-	8,52x10 ⁰	1a
								Fígado	+	+	1,65x10 ²	
FHA002	2008	49	Feminino	Criptogênica	Alta	-	+	Soro	-	-	3,51x10 ⁰	3b
								Fígado	+	+	6,52x10 ¹	
FHA007	2005	52	Feminino	Criptogênica	Óbito	-	+	Soro	-	-	5,78x10 ⁰	3b
								Fígado	+	+	2,56x10 ¹	
FHA005	2004	49	Feminino	Viral (HBV)	Óbito	-	+	Soro	-	-	3,49x10 ⁰	3b
								Fígado	+	+	3,92x10 ¹	
FHA011	2009	31	Feminino	Viral (HBV)	Óbito	-	+	Soro	-	-	7,12x10 ⁰	1a
								Fígado	+	+	3,80x10 ¹	
FHA008	2008	48	Feminino	Viral (CMV)	Alta	-	+	Soro	-	-	1,07x10 ⁰	3b
								Fígado	+	+	6,25x10 ¹	
FHA006	2005	11	Feminino	Medicamentosa (Isoniazida)	Alta	-	-	Soro	-	+	8,58x10 ⁰	1a
								Fígado	+	+	9,55x10 ¹	

FHA= falência hepática aguda; IgM= Imunoglobulina M; IgG= Imunoglobulina G; PCR= Reação em cadeia da polimerase; qPCR= PCR quantitativo e em tempo real; NS1= Proteína não estrutural 1 do B19V; VP1/VP2= Proteína estrutural 1 e 2 do B19V; HBV= Vírus da Hepatite B; CMV= Citomegalovírus; - = Negativo; + = Positivo

Tabela 4-10 Características dos 23 pacientes com FHA negativos para B19V-DNA

Paciente	Ano	Idade	Sexo	Etiologia FHA	Desfecho clínico	Tipo de amostra
FHA010	2005	20	Feminino	Criptogênica	Alta	Soro
FHA012	2006	20	Feminino	Criptogênica	Alta	Soro e Fígado
FHA014	2009	10	Masculino	Criptogênica	NI	Soro
FHA016	2008	11	Feminino	Criptogênica	NI	Soro
FHA018	2006	6	Feminino	Criptogênica	Alta	Soro
FHA019	2008	11	Masculino	Criptogênica	NI	Soro
FHA020	NI	24	Masculino	Criptogênica	Alta	Soro
FHA027	2005	32	Feminino	Criptogênica	Óbito	Soro
FHA004	2011	14	Masculino	Viral (HAV)	Óbito	Soro
FHA013	NI	23	Feminino	Viral (HAV)	Óbito	Soro
FHA017	2009	1	Feminino	Viral (HAV)	Óbito	Soro e Fígado
FHA028	2005	5	Feminino	Viral (HAV)	Alta	Soro
FHA009	2004	24	Masculino	Viral (HBV)	NI	Soro
FHA030	2004	14	Feminino	Viral (HHV-6)	Alta	Soro e Fígado
FHA029	2009	7	Masculino	Viral (HAV/CMV)	NI	Soro e Fígado
FHA003	2012	45	Masculino	Viral (HIV/HBV)	NI	Soro e Fígado
FHA015	2004	27	Feminino	Medicamentosa (Rifampicina)	NI	Soro
FHA021	2005	48	Feminino	Medicamentosa (Metildopamina)	NI	Soro
FHA024	2004	6	Masculino	Medicamentosa (Fenobarbital)	Alta	Soro
FHA025	2004	47	Feminino	Medicamentosa (Paracetamol)	Alta	Soro
FHA022	2005	51	Feminino	Autoimune	NI	Soro
FHA023	2006	22	Feminino	Autoimune	Alta	Soro e Fígado
FHA026	2009	55	Feminino	Autoimune	NI	Soro e Fígado

FHA= falência hepática aguda; HBV= Vírus da Hepatite B; HIV= Vírus da Imunodeficiência Humana; HAV= Vírus da Hepatite A; CMV= Citomegalovírus; HHV-6= Herpesvírus humano 6; - = Negativo; NI= Não Informado

4.4 Sequenciamento e análise filogenética

A sequência nucleotídica do produto de PCR semi-nested de 427pb da região VP1/VP2 do B19V foi determinada nas amostras de fígado dos sete pacientes FHA/B19V-DNA+.

A fim de confirmar se todas as sequências dos isolados obtidos eram do B19V, utilizamos a ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) para verificar a identidade dessas sequências com sequências do B19V depositadas no Genbank, e essa identidade das sequências dos pacientes variou de 97% a 100%.

Para a classificação do B19V em genótipos foram utilizadas sequências protótipos para todos os genótipos (1a, 1b, 2, 3a, 3b) conhecidos do vírus que foram depositadas no Genbank (Anexo 8.2). Com as amostras FHA/B19V-DNA+ sequenciadas e as sequência protótipos foi construída uma árvore filogenética (Figura 4-4).

As amostras FHA001, FHA006 e FHA011 foram classificadas como o genótipo 1A, enquanto que as amostras FHA005, FHA002, FHA008 e FHA007 foram classificados como genótipo 3B do B19V. O controle positivo (CP) utilizado na PCR também foi sequenciado para garantir que não houve contaminação das amostras pelo controle, visto que estão em ramos diferentes da árvore.

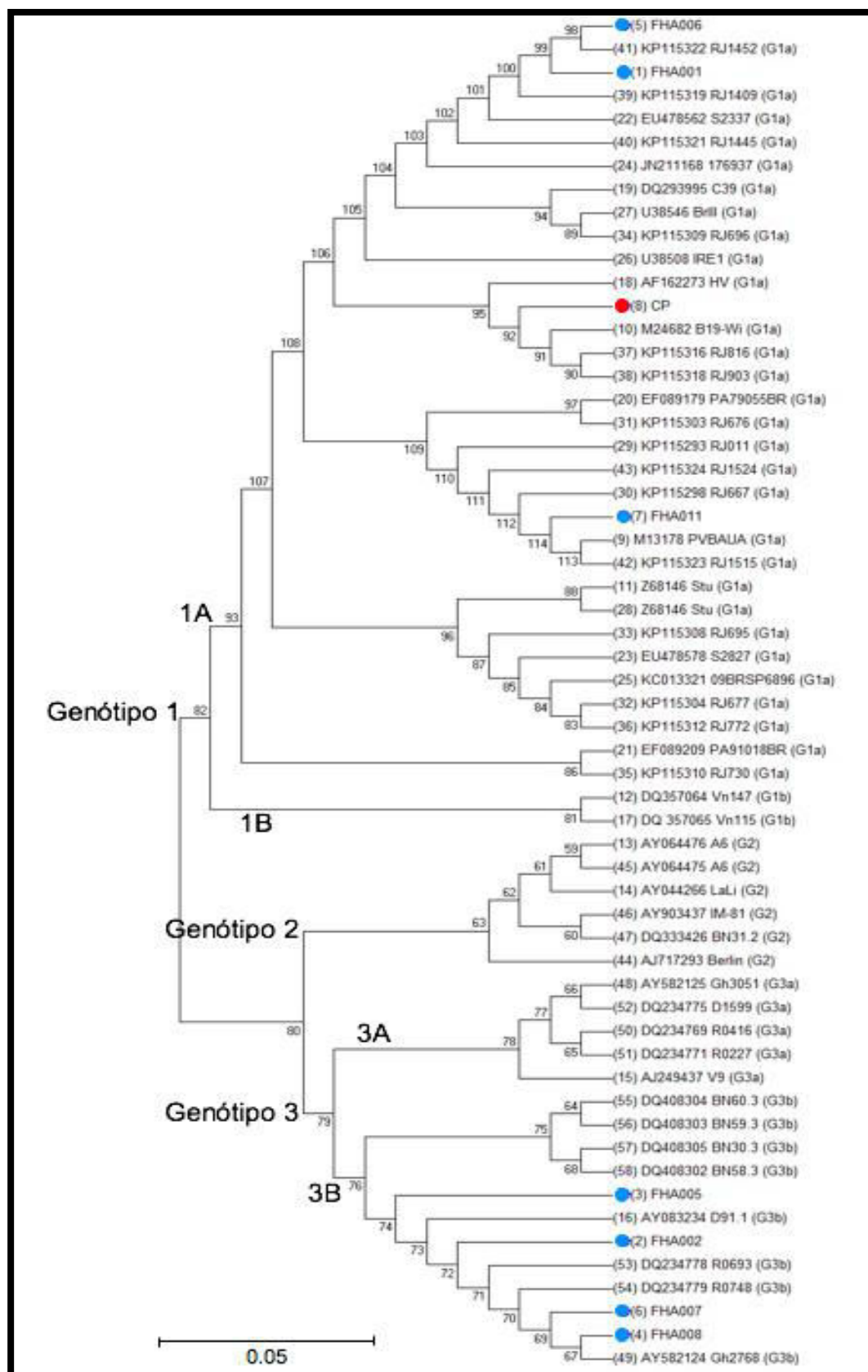


Figura 4-4 Árvore filogenética construída pelo método Neighbor-Joining baseada nas seqüências de 427pb da região VP1/VP2 do B19V com as sete amostras FHA/B19V-DNA+ marcadas com círculos azuis e o controle positivo (CP) marcado com círculo vermelho e as seqüências protótipos do Genbank

4.5 Detecção de RNAm em tecido hepático de pacientes FHA/B19V-DNA+

Utilizando o protocolo descrito por Abe e colaboradores (2007), foi detectado o RNAm de 326pb para a região VP1/VP2 do B19V em uma amostra de tecido hepático (FHA001), uma vez que foi observada uma banda de tamanho esperado (Figura 4-5). Os controles negativo e de hepatite A (HAV) dessa PCR não apresentaram bandas, mostrando que não houve contaminação.



Figura 4-5 Gel de eletroforese da PCR nested para amplificação do transcrito codificante de VP2 do B19V

PM= Peso molecular; pb= pares de bases; CN= controle negativo; CN HAV= Controle negativo de vírus da hepatite A; FHA= falência hepática aguda. A seta indica a altura esperada para o amplicon (326pb).

De acordo com o protocolo de Bonvicini e colaboradores (2008), foram utilizados os quatro conjuntos de oligonucleotídeos para amplificação de quatro tipos de transcritos. Na PCR 1 (2210-2355) para região éxon central foram observadas bandas nas amostras de FHA001, FHA002, FHA006 e FHA007 com a altura esperada de 146pb e os controles negativos e de hepatite A não apresentaram bandas, porém bandas inespecíficas com cerca de 100pb também apareceram (Figura 4-6).

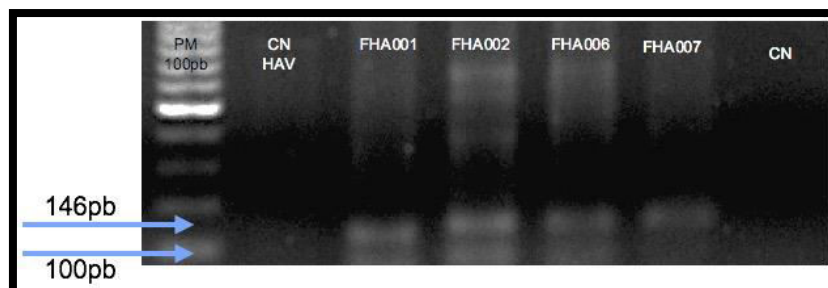


Figura 4-6 Gel de eletroforese da PCR 2210-2355 para amplificação do transcrito codificante do éxon central presente em todos os transcritos do B19V

PM= Peso molecular; pb= pares de bases; CN= controle negativo; CN HAV= Controle negativo de vírus da hepatite A; FHA= falência hepática aguda. A seta de 146pb indica a altura esperada para o amplicon e a seta de 100pb mostra bandas inespecíficas.

Na PCR 2 (0534-0622) para a região alvo do RNAm 1' (transcrito de NS1) de 88pb, na PCR 3 (2210-2377) para a região alvo RNAm 1' (transcrito de NS1), 2' (transcrito de 7,5kDa), 4 e 5 (transcrito de VP1) e na PCR 4 (2210-3238) para a região alvo do RNAm 6 e 7 (transcritos de VP2) de 168pb não foram demonstradas bandas na altura esperada para cada reação.

4.6 Avaliação de parâmetros bioquímicos hepáticos nas populações estudadas

O intuito de correlacionar os parâmetros bioquímicos hepáticos entre o grupo caso (FHA/B19V-DNA+) e os grupos controles (FHA/B19V-DNA- e Controle de indivíduos saudáveis) foi para avaliar um possível agravo da FHA devido a infecção pelo B19V. A Tabela 4-11 mostra as médias de cada parâmetro em cada grupo e os valores de p obtidos.

Tabela 4-11 Avaliação dos parâmetros bioquímicos hepáticos nas populações caso e controles deste estudo

Parâmetro	FHA/B19V-DNA+	FHA/B19V-DNA-	Controle	R ²	Valor-p
ALT	262,04±559,89	445,24±1029,54	68,75±15,17	0,14	0,23
AST	836,86±714,53	777,50±693,70	174,00±122,30	0,09	0,37
FA	969,14±683,07	1182,56±1453,34	126,50±105,30	0,19	0,09
GGT	159,00±226,63	226,63±180,72	66,67±22,50	0,13	0,29
APT	125,00±148,68	52,17±41,44	83,50±99,70	0,02	0,71
BT	10,45±9,53	28,94±14,54	1,18±0,28	0,49	0,0003

FHA= Falência hepática aguda; R²= coeficiente de determinação de uma regressão linear; Valor-p= probabilidade de significância (p<0,05); ALT= Alanina aminotransferase; AST= Aspartato aminotransferase; FA= Fosfatase alcalina; GGT= Gama-glutamil transferase; APT= Atividade de protrombina; BT= Bilirrubina total

Apenas o parâmetro bilirrubina total foi considerado estatisticamente significativo, na avaliação entre todos os grupos estudados, FHA/B19V-DNA+,

FHA/B19V-DNA- e controle de indivíduos saudáveis, pois apresentaram $p= 0,0003$. Além disso, outras análises parciais entre os grupos também apresentaram diferença estatística significativa, sendo: FHA/B19V-DNA+ e FHA/B19V-DNA- ($r= 0,29$ e $p= 0,0095$); FHA/B19V-DNA+ e controle de indivíduo saudável ($r= 0,34$ e $p= 0,0059$); FHA/B19V-DNA- e controle de indivíduo saudável ($r= 0,48$ e $p=0,0005$) (Figura 4-7).

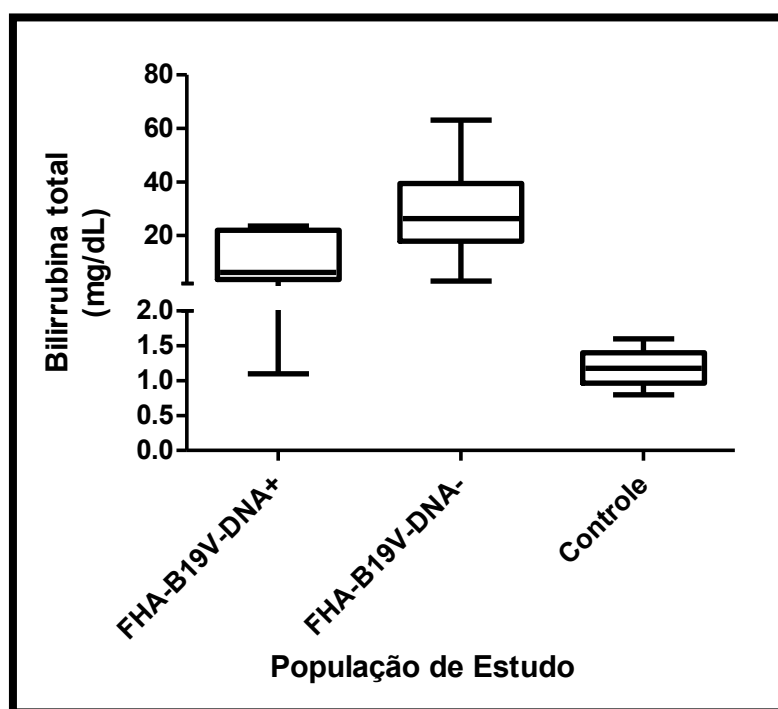


Figura 4-7 Gráficos de avaliação de bilirrubina total nas populações de estudo

A carga viral dos pacientes com FHA/B19V-DNA+ foi avaliada em relação aos parâmetros bioquímicos do tecido hepático. Não foi observada correlação estatística significativa entre a carga viral e ALT ($r= 0,60$ e $p= 0,16$), AST ($r= 0,50$ e $p= 0,26$), Gama-GT ($r= 0,48$ e $p= 0,35$) e com fosfatase alcalina ($r= 0,77$ e $p= 0,10$).

5 DISCUSSÃO

A FHA é uma condição em que o fígado saudável se deteriora rapidamente, resultando em quadros de icterícia, encefalopatia e coagulopatia. Por ano, cerca de 2000 casos de FHA são relatados nos Estados Unidos (Lee e Wijdicks, 2008) e no mundo há uma média anual aproximadamente de 1 a 6 casos por milhão de habitante. No Brasil, 2% dos transplantes hepáticos são decorrentes da FHA (Squires, 2004). A etiologia de casos de FHA muitas das vezes é desconhecida, e em muitos desses casos há uma negatividade nos testes para os vírus das hepatites A e E, os vírus comumente hepatotrópicos. Essas hepatites são as chamadas hepatites criptogênicas (Codes *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2006). Sem que a etiologia da doença seja determinada, muitos dos casos possuem tratamento tardio, e assim podem levar ao óbito. Devido a isso, estudos vem sendo realizados, com o intuito de identificar o agente etiológico da FHA (Jayakumar *et al.*, 2013). Dentre os vírus encontrados como causadores de FHA, o parvovírus B19 vem sendo associado à infecção hepática (Díaz e Collazos, 2000b; Krygier *et al.*, 2009; Sun e Zhang, 2012).

As diversas manifestações clínicas causadas pelo B19V estão fortemente associadas ao *status* hematológico e imunológico dos hospedeiros (Bathla *et al.*, 2014). Indivíduos imunocompetentes podem mostrar uma infecção aguda com depressão temporária da eritropoese, sendo características agudas e autolimitadas (Anderson *et al.*, 1985). Entretanto, em 4,1% da população infectada pelo B19V ocorrem diferentes quadros de hepatites associada a infecção por esse vírus (Mihaly *et al.*, 2012). A ocorrência de FHA é rara e vem sendo mostrada como subdiagnosticada devido à falta de conhecimento médico sobre a infecção do B19V acarretar FHA e, conseqüentemente, a falta de realização de testes específicos para esse vírus.

No Brasil, existe uma carência de dados sobre a FHA causada pelo B19V. Dessa forma, este estudo foi conduzido visando a otimização da metodologia de PCR em tempo real, de modo a detectar e quantificar o B19V nas amostras de soro e de fígado de pacientes com FHA de etiologia tanto conhecida quanto desconhecida (criptogênica).

Em fases muito precoces da infecção (antes do aparecimento de anticorpos) apenas o diagnóstico molecular é indicado (Gallinella *et al.*, 2003). A PCR é o único método de diagnóstico possível para indivíduos imunodeficientes, devido à falta de

produção de anticorpos específicos. Além disso, este método ajuda na detecção de B19V em mulheres grávidas e nos fetos. Entretanto, devido à persistência do vírus, a detecção de B19V-DNA em amostras de tecido não pode indicar se a infecção é aguda (Söderlund-Venermo *et al.*, 2002).

Ambas as técnicas, Sybr Green® e TaqMan®, foram otimizadas e os seus parâmetros de qualidade foram comparados.

A otimização iniciou-se com a diluição da curva padrão sintética e avaliação de concentração de oligonucleotídeos iniciadores e temperaturas de hibridização destes. A curva, após ser diluída e com parâmetros ideais, conforme preconizado na literatura, serviu para a quantificação das amostras de FHA. No teste otimizado neste estudo, ambas as metodologias (Sybr Green® e TaqMan®) obtiveram parâmetros dentro do ideal (Bustin *et al.*, 2009).

Neste estudo foi estabelecida uma metodologia original de quantificação do B19V-DNA, através da construção e utilização da curva padrão sintética, a partir de um oligonucleotídeo-ultrâmero correspondente a sequência completa de NS1 (104 pares de bases). Convencionalmente a curva padrão é obtida a partir de diluições seriadas de sequências do DNA viral clonado, o que demanda uma metodologia demorada e laboriosa.

A partir dessa otimização da curva, ensaios de limite de detecção (sensibilidade), especificidade, reprodutibilidade (inter-ensaio) e repetitividade (intra-ensaio) foram realizados com ambas as metodologias conforme preconizados por Burd (2010). Foi observado um limite de detecção de $4,32 \times 10^1$ cópias/ μ L na metodologia de Sybr Green® e 1,83 cópias/ μ L na metodologia de TaqMan®, mostrando uma sensibilidade melhor nessa metodologia. Estudos anteriores que também desenvolveram ensaios moleculares *in house* para B19V, demonstraram um limite de detecção de 6 geq/mL a 8×10^5 geq/mL (Knöll *et al.*, 2002); 10^2 geq/mL, (Liefeldt *et al.*, 2005) e $3,2 \times 10^1$ cópias/ μ L (Molenaar-De Backer *et al.*, 2016). Ao analisarmos o limite de detecção entre os trabalhos, foi observado um melhor limite de detecção para o nosso estudo quando comparado ao de Molenaar-De Backer *et al.*, (2016), porém em relação aos demais trabalhos existe uma falta de correlação entre as unidades geq/mL e cópias/ μ L para o B19V, não sendo possível fazer comparações.

De acordo com as recomendações da OMS, os resultados dos testes moleculares devem ser apresentados em UI/mL (unidades internacionais por

mililitro). Segundo um estudo descrito por Koppelman *et al.*, (2004) o fator de multiplicação para a conversão de cópias/ μ L para UI/mL é de 3,34 para o B19V (Koppelman *et al.*, 2004). Desta forma, o presente estudo apresentou um limite de detecção de $1,45 \times 10^2$ UI/mL para a metodologia de Sybr Green® e 6,11 UI/mL para a metodologia de TaqMan®. Um estudo de padronização de testes moleculares para B19V realizado pelo *Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD)* (Diagnostics, 2011) mostrou que os ensaios comerciais avaliados e o ensaio *in house* do grupo tinham um limite de detecção de 0,465 a 1,032 cópias/mL ou 0,442 a 0,611 UI/mL que são limites de detecção muito superiores aos nossos testes, porém, esses ensaios são caros, funcionam apenas para poucas reações e muitos deles não são comercializados no Brasil. Os testes comerciais avaliados por esse trabalho do QCMD foram: Abbott Parvo B19 PCR Kit, Astra GmBh Parvo B19 Kit, Biodiversity BioQuant Parvovirus B19 Kit, Lontek Fluorion Parvovirus B19 QNP, Nanogen Parvovirus B19 ELITE MGB Kit, QIAGEN artus Parvo B19 PCR Kit e Roche LightCycler Parvovirus B19 Quantification Kit.

Em relação a especificidade do nosso teste, diferentes painéis de amostras foram avaliados, todas as amostras positivas se mantiveram como positivas tanto na metodologia de Sybr Green® quanto na metodologia de TaqMan®, portanto não houve resultados falso-negativos. Para as amostras negativas para B19V, uma amostra do grupo de anti-DENV IgM+ foi falsamente positiva para Sybr Green®, com um Tm igual ao de B19V. Não houve resultado falso-positivos em TaqMan®. Devido ao perfil de doenças exantemáticas, amostras de pacientes com Rubéola e Dengue foram utilizadas no teste (Oliveira *et al.*, 2002), porém esses vírus são de genoma RNA, portanto foi necessário incluir na análise vírus de genoma DNA (HBV, herpesvírus e parvovírus canino). Na literatura não encontramos nenhum trabalho de otimização de técnica para B19V que tenha feito um painel de especificidade tão amplo.

Desta forma, pode-se concluir que o teste apresentou sensibilidade de 100% tanto para a metodologia de Sybr Green® quanto para a metodologia de TaqMan® e apresentou especificidade 97,22% para a metodologia de Sybr Green® e de 100% para a metodologia de TaqMan®.

Em relação à reprodutibilidade, o teste padronizado neste estudo apresentou um coeficiente de variação (CV) abaixo de 15%, variando de 0,06% a 2,10%, indicando que o teste é reprodutível. Estes valores foram menores do que os

encontrados em testes comerciais, como o Nanogen Parvovirus B19 ELITE MGB e o Roche LightCycler Parvovirus B19 Quantification demonstraram coeficientes de variação de 10,6% a 14,7%, sugerindo que nos testes comerciais não se pode fazer análises em duplicatas de amostras ou análise em dias diferentes, pois o teste não irá apresentar os mesmos valores (Diagnostics, 2011).

De acordo com os resultados da otimização das metodologias de qPCR, foi visto que a metodologia de TaqMan® foi mais específica e sensível, por isso foi a metodologia escolhida para testar as amostras de FHA.

No grupo de amostras FHA/B19V-DNA+ (Tabela 4-9) foi possível observar que sete pacientes com FHA eram positivos para DNA-B19V e esse número representa 20% (7/35) da população total de estudo desse trabalho.

Em relação ao ano em que essas amostras foram coletadas, podem ser notados dois períodos de surtos da infecção pelo B19V, de final de 2004 a início de 2006 e entre os anos de 2008 e 2009. Esses períodos de surtos ocorrem pela sazonalidade da infecção pelo B19V (Oliveira *et al.*, 2001; Cubel Garcia *et al.*, 2016).

Todas as pacientes eram do sexo feminino e em relação a faixa etária da população FHA/B19V-DNA+, as sete pacientes apresentavam idades variando de 9 a 52 anos e a média de idade era de $35,5 \pm 17,3$ anos. Na literatura, apenas um trabalho mostra a distribuição de sexo e idade para pacientes com hepatites relacionadas a infecção pelo B19V, sendo uma população de 18 pacientes do sexo masculino e 10 pacientes do sexo feminino com uma média de idade de $30,5 \pm 13,5$ anos (Eis-Hübinger *et al.*, 2001). Ao compararmos o trabalho com o nosso é visto que não é possível fazer inferências do caso total de pessoas no local que sofrem de algum quadro hepático relacionado ao B19V, devido ao número diminuto de amostras e aos prováveis casos subdiagnosticados (Bihari *et al.*, 2013).

Segundo Kishore e Sen (2009) e Dwivedi e colaboradores (2009) a coinfeção entre o B19V e os vírus hepatotrópicos aumenta a gravidade da doença, e isso pode ser sugerido no trabalho, pois os pacientes com a coinfeção (B19V e HBV) foram a óbito.

Através da PCR qualitativa e semi-nested PCR, todas as amostras de soro foram negativas. Esse resultado se deve provavelmente as baixas cargas virais encontradas nessas amostras. Entre as amostras de fígado, todas as amostras foram positivas e as cargas virais variaram de 1,07 a 8,52 nas amostras de soro e $2,56 \times 10^1$ a $1,65 \times 10^2$ nas amostras de fígado. Essas cargas virais refletem a baixa

viremia e uma possível persistência no tecido hepático desses pacientes. Em relação a sorologia, a ausência de anticorpos anti-B19V IgM em todos os pacientes e a presença de anti-B19V IgG indicam que as infecções nesses pacientes não são agudas. Esses dados associados às baixas cargas virais no soro e moderadas cargas virais no fígado sugerem uma infecção persistente do B19V, consoante com os relatos de diversos autores (Von Poblitzki *et al.*, 1995; Söderlund-Venermo *et al.*, 2002; Norja *et al.*, 2006; Adamson-Small *et al.*, 2014).

Houve uma exceção para o demonstrado anteriormente, a paciente FHA006, apresentou PCR semi-nested positiva no soro que não foi confirmada no sequenciamento e ausência tanto de anticorpos IgM quanto de anticorpos IgG, o que pode ser sugerido é um período inicial de infecção aguda nesta paciente, por isso ainda não apresenta resposta de anticorpo e cargas virais baixas, em detrimento de uma infecção persistente como ocorre nas anteriores (Adamson-Small *et al.*, 2014).

Através da análise filogenética, três pacientes foram classificados como sendo do genótipo 1A e quatro pacientes do genótipo 3B, esperava-se mais pacientes com genótipo 1A, visto que esse é o de maior prevalência na população mundial, mas como no Brasil, ocorre a cocirculação entre os genótipos 1 e 3, os achados do presente trabalho estão em consonância com o relatado na literatura (da Costa *et al.*, 2013). Não é possível estabelecer uma associação entre o genótipo do B19V e um aumento na severidade da doença, pois a proporção de desfecho clínico, como alta e óbito foram proporcionais em ambos os genótipos. Além disso, o número de pacientes avaliados era pequeno, não sendo possível fazer correlações estatísticas.

De acordo com Karetnyi e colaboradores, (1999) a detecção do RNAm de proteínas do capsídeo do B19V sugere uma evidência para o dano hepático causado pelo B19V, por mostrar uma possível replicação nesse tecido. Nesse presente estudo foi detectado por diferentes reações de PCR, o RNAm da região VP1 na paciente FHA001. Nos pacientes FHA001, FHA002, FHA006 e FHA007 foi detectado o RNAm da região de éxon central do genoma, que conforme descrito por Bonvicini e colaboradores, (2008) pode representar qualquer RNAm do B19V, o que sugere uma possível replicação do B19V no tecido hepático, com síntese de proteínas estruturais e não estruturais.

A fim de avaliar a ocorrência de aumento da gravidade da doença hepática em indivíduos infectados por B19V, correlações entre o grupo caso (FHA/B19V-

DNA+) e os grupos controle foram feitas. Os componentes bioquímicos avaliados (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase e atividade de protrombina) não tiveram diferença estatística significativa (valor- $p < 0,05$) entre o grupo caso e os grupos controle, e isso pode estar relacionado a não ocorrência de aumento da gravidade da doença ou ao pequeno número de indivíduos avaliados nesse estudo.

A detecção de bilirrubina total, um marcador de quebra do grupamento heme que leva a deposição deste na pele, causando a icterícia, teve diferença estatística significativa entre os grupos, mostrando que o grupo FHA/B19V-DNA- teve a maior média ($28,94 \pm 14,54$) seguido por FHA/B19V-DNA+ ($10,45 \pm 9,53$) e o grupo controle ($1,18 \pm 0,28$), apresentando valores normais. Esta diferença entre valores nos grupos FHA pode ser explicado, devido ao fato dos pacientes FHA/B19V-DNA- apresentarem etiologias agudas de FHA, enquanto os pacientes FHA/B19V-DNA+ apresentarem a infecção persistente, levando a uma diminuição desses níveis de bilirrubina (Gazzin *et al.*, 2017).

Não houve diferença significativa entre a carga viral do B19V, no grupo FHA/B19V-DNA+ e os componentes bioquímicos (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, gama-glutamil transferase e fosfatase alcalina), mas isso mais uma vez pode ser devido à ausência de aumento da gravidade da infecção hepática por B19V ou ao número diminuto de amostras avaliadas. Alguns trabalhos já criticaram o uso do valor-p em pesquisas médicas, pois este leva a amostras pequenas a gerarem valores-p muito grandes, mesmo com importantes efeitos sendo observados (Gardner e Altman, 1986; Grimes e Schulz, 2002). Não existem, de acordo com a nossa revisão de literatura, outros trabalhos que mostrem correlações entre os componentes bioquímicos e a infecção por B19V.

Sendo assim é possível concluir que a infecção pelo parvovírus humano B19 deve ser considerada no diagnóstico diferencial de FHA, principalmente nos períodos de epidemia de eritema infeccioso e demonstra a importância em estabelecer métodos moleculares sensíveis e específicos para esclarecer esses casos de hepatites agudas e fulminante sem etiologia definida.

6 CONCLUSÕES

- Foi otimizada a PCR em tempo real para o parvovirus humano B19 (Sybr Green® e TaqMan®) para a detecção e quantificação de DNA-B19V tanto em amostras de soro quanto em amostras de fígado;
- Os parâmetros de validação das técnicas de PCR em tempo real foram determinados mostrando uma sensibilidade e especificidade melhor para a metodologia de TaqMan® e uma boa reprodutibilidade e repetitividade em ambas as metodologias;
- Utilizando o qPCR foi possível detectar o DNA-B19V em amostras de soro e tecido hepático de sete pacientes com falência hepática aguda com e sem etiologia definida;
- O qPCR foi capaz de identificar em pacientes com falência hepática aguda a coinfeção entre o parvovirus humano B19 e o vírus da hepatite B, mostrando um aumento na gravidade da doença com essa coinfeção, pois os casos evoluíram para óbito;
- Nas pacientes com falência hepática aguda, foram detectados os genótipos 1a e 3b do Parvovirus humano B19, além de anticorpos de classe IgG e ausência de anticorpos de classe IgM, sugerindo uma infecção persistente pelo B19V nesses indivíduos;
- Foi possível mostrar a presença de replicativo intermediário em quatro das sete pacientes com falência hepática aguda infectadas pelo parvovirus humano B19;
- Não foi possível mostrar correlações bioquímicas hepáticas entre os grupos estudados (Pacientes com falência hepática aguda com e sem a infecção pelo Parvovirus humano B19 e indivíduos saudáveis), provavelmente devido ao número diminuto de amostras testadas.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Implementar o diagnóstico diferencial por B19V nos casos de pacientes com falência hepática aguda sem etiologia definida que forem requisitadas ao LADTV;
- Utilizar a metodologia de PCR em tempo real estabelecida com essa dissertação para estudo da infecção por B19V entre gestantes portadoras de HIV e em doadores de sangue do estado do Rio de Janeiro, uma vez que não existem dados sobre a infecção pelo B19V nessas populações na literatura científica;
- Publicar em revista científica os resultados levantados nessa dissertação, sendo um artigo *Case Report* na fase de submissão (Anexo 3) e um artigo com a padronização da técnica na fase de redação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, K.; COHEN, B. J.; VIAL, P. A. Seroprevalence of parvovirus B19 in urban Chilean children and young adults, 1990 and 1996. **Epidemiol Infect**, 128, (1), 59-62, 2002.
- ABE, K. et al. Characterization of erythrovirus B19 genomes isolated in liver tissues from patients with fulminant hepatitis and biliary atresia who underwent liver transplantation. **Int J Med Sci**, 4, (2), 105-9, 2007.
- ABERHAM, C. et al. A quantitative, internally controlled real-time PCR Assay for the detection of parvovirus B19 DNA. **J Virol Methods**, 92, (2), 183-91, 2001.
- ABRAHAM, M. et al. A pilot study on the seroprevalence of parvovirus B19 infection. **Indian J Med Res**, 115), 139-43, 2002.
- ADAMSON-SMALL, L. A. et al. Persistent parvovirus B19 infection in non-erythroid tissues: possible role in the inflammatory and disease process. **Virus Res**, 190), 8-16, 2014.
- ADAMSON-SMALL, L. A.; RUIZ-ORDAZ, B. H. Hepatic inflammation resulting from localized, subcutaneous expression of Parvovirus VP1u capsid protein: Importance and implication. **Virulence**, 7, (2), 70-1, 2016.
- AL NAHDI, N. et al. Recurrent idiopathic acute hepatitis-associated aplastic anemia/pancytopenia fourteen years after initial episode. **Ann Hepatol**, 9, (4), 468-70, 2010.
- ALLANDER, T. et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, (36), 12891-6, 2005.
- ANDERSON, L. J. Role of parvovirus B19 in human disease. **Pediatr Infect Dis J**, 6, (8), 711-8, 1987.
- ANDERSON, L. J. et al. Risk of infection following exposures to human parvovirus B19. **Behring Inst Mitt**, (85), 60-3, 1990.
- ANDERSON, L. J. et al. Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Microbiol**, 24, (4), 522-6, 1986.
- ANDERSON, M. J. et al. The development and use of an antibody capture radioimmunoassay for specific IgM to a human parvovirus-like agent. **J Hyg (Lond)**, 88, (2), 309-24, 1982.
- ANDERSON, M. J. et al. Experimental parvoviral infection in humans. **J Infect Dis**, 152, (2), 257-65, 1985.
- ANDERSON, M. J. et al. An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. **J Hyg (Lond)**, 93, (1), 85-93, 1984.
- ARISTA, S. et al. Parvovirus B19 and "cryptogenic" chronic hepatitis. **J Hepatol**, 38, (3), 375-6, 2003.
- AZEVEDO, K. M. et al. Parvovirus B19 seroconversion in a cohort of human immunodeficiency virus-infected patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 107, (3), 356-61, 2012.
- AZZI, A. et al. Human parvovirus B19 infection in bone marrow transplantation patients. **Am J Hematol**, 44, (3), 207-9, 1993.
- AZZI, A.; MORFINI, M.; MANNUCCI, P. M. The transfusion-associated transmission of parvovirus B19. **Transfus Med Rev**, 13, (3), 194-204, 1999.
- AZZI, A. et al. Persistent parvovirus B19 infections with different clinical outcomes in renal transplant recipients: diagnostic relevance of polymerase chain reaction (PCR) and of quantification of B19 DNA in sera. **Clin Microbiol Infect**, 2, (2), 105-108, 1996.

- BALLOU, W. R. et al. Safety and immunogenicity of a recombinant parvovirus B19 vaccine formulated with MF59C.1. **J Infect Dis**, 187, (4), 675-8, 2003.
- BATHLA, L. et al. Parvovirus associated fulminant hepatic failure and aplastic anemia treated successfully with liver and bone marrow transplantation. A report of two cases. **Am J Transplant**, 14, (11), 2645-50, 2014.
- BEARD, P. Parvoviruses. In: ACHESON, N. S. (Ed.). **Fundamentals of Molecular Virology**. 2. Danvers: John Wiley & Sons, Inc, 2011. p.238-446.
- BEGHETTI, M. et al. Myocarditis associated with parvovirus B19 infection in two siblings with merosin-deficient congenital muscular dystrophy. **Eur J Pediatr**, 159, (1-2), 135-6, 2000.
- BELL, L. M. et al. Human parvovirus B19 infection among hospital staff members after contact with infected patients. **N Engl J Med**, 321, (8), 485-91, 1989.
- BERNS, K. I. Parvoviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, D. M.;KNIPE, P. M., *et al* (Ed.). **Fundamental Virology**. 3. Philadelphia: Raven, 1996. p.1017-1048.
- BERNS, K. I.; PARRISH, C. R. Parvoviridae. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 6. Philadelphia: Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins, v.2, 2013. cap. 57, p.1768-1791.
- BERNSTEIN, D. I. et al. Safety and immunogenicity of a candidate parvovirus B19 vaccine. **Vaccine**, 29, (43), 7357-63, 2011.
- BERNUAU, J.; DURAND, F.; VALLA, D. Parvovirus B19 infection and fulminant hepatitis. **Lancet**, 353, (9154), 754-5, 1999.
- BIHARI, C. et al. Parvovirus b19 associated hepatitis. **Hepat Res Treat**, 2013), 472027, 2013.
- BONVICINI, F. et al. Antiviral effect of cidofovir on parvovirus B19 replication. **Antiviral Res**, 113), 11-8, 2015.
- BONVICINI, F. et al. Functional analysis and quantitative determination of the expression profile of human parvovirus B19. **Virology**, 381, (2), 168-77, 2008.
- BONVICINI, F. et al. Parvovirus b19 DNA CpG dinucleotide methylation and epigenetic regulation of viral expression. **PLoS One**, 7, (3), e33316, 2012.
- BOSTIC, J. R. et al. Quantitative analysis of neutralizing immune responses to human parvovirus B19 using a novel reverse transcriptase-polymerase chain reaction-based assay. **J Infect Dis**, 179, (3), 619-26, 1999.
- BRAHAM, S. et al. Evaluation of the Roche LightCycler parvovirus B19 quantification kit for the diagnosis of parvovirus B19 infections. **J Clin Virol**, 31, (1), 5-10, 2004.
- BROLIDEN, K.; TOLFVENSTAM, T.; NORBECK, O. Clinical aspects of parvovirus B19 infection. **J Intern Med**, 260, (4), 285-304, 2006.
- BROWN; YOUNG. The Simian Parvoviruses. **Rev Med Virol**, 7, (4), 211-218, 1997.
- BROWN, C. S. et al. Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. **J Virol**, 65, (5), 2702-6, 1991.
- BROWN, K. E.; ANDERSON, S. M.; YOUNG, N. S. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. **Science**, 262, (5130), 114-7, 1993.
- BROWN, K. E. et al. Congenital anaemia after transplacental B19 parvovirus infection. **Lancet**, 343, (8902), 895-6, 1994.

BROWN, K. E.; VIRUS DISCOVERY GROUP, H. B., NATIONAL HEART, LUNG AND BLOOD INSTITUTE, BETHESDA, MD, USA. Human Parvoviruses. In: (Ed.): John Wiley & Sons, Ltd, 2004. p.703-720.

BROWN, K. E. et al. Parvovirus B19: implications for transfusion medicine. Summary of a workshop. **Transfusion**, 41, (1), 130-5, 2001.

BRUU, A. L.; FLUGSRUD, L. B. [Erythema infectiosum in pregnancy. A follow-up of children after 2 years]. **Tidsskr Nor Laegeforen**, 114, (3), 308-10, 1994.

BRUU, A. L.; NORDBØ, S. A. Evaluation of five commercial tests for detection of immunoglobulin M antibodies to human parvovirus B19. **J Clin Microbiol**, 33, (5), 1363-5, 1995.

BURD, E. M. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. In: (Ed.). **Clin Microbiol Rev**, v.23, 2010. p.550-76.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem**, 55, (4), 611-22, 2009.

BUTCHKO, A. R.; JORDAN, J. A. Comparison of three commercially available serologic assays used to detect human parvovirus B19-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera of pregnant women. **J Clin Microbiol**, 42, (7), 3191-5, 2004.

CANDOTTI, D. et al. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. **J Virol**, 78, (22), 12169-78, 2004.

CARRIÈRE, C.; BOULANGER, P.; DELSERT, C. Rapid and sensitive method for the detection of B19 virus DNA using the polymerase chain reaction with nested primers. **J Virol Methods**, 44, (2-3), 221-34, 1993.

CARTTER, M. L. et al. Occupational risk factors for infection with parvovirus B19 among pregnant women. **J Infect Dis**, 163, (2), 282-5, 1991.

CASSINOTTI, P. et al. Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. **J Med Virol**, 53, (3), 229-32, 1997.

CASSINOTTI, P.; WEITZ, M.; SIEGL, G. Human parvovirus B19 infections: routine diagnosis by a new nested polymerase chain reaction assay. **J Med Virol**, 40, (3), 228-34, 1993.

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

CHANDRAMOULI, S. et al. Generation of a parvovirus B19 vaccine candidate. **Vaccine**, 31, (37), 3872-8, 2013.

CHISAKA, H. et al. Clinical manifestations and outcomes of parvovirus B19 infection during pregnancy in Japan. **Tohoku J Exp Med**, 209, (4), 277-83, 2006.

CHOI, S. H. et al. A case of persistent anemia in a renal transplant recipient: association with parvovirus B19 infection. **Scand J Infect Dis**, 34, (1), 71-5, 2002.

CHORBA, T. et al. The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease). **J Infect Dis**, 154, (3), 383-93, 1986.

CODES, L. et al. Acute cryptogenic hepatitis: a heterogeneous entity, with possible complications. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, 42, (4), 293-298, 2006.

COHEN, B. J. et al. Chronic anemia due to parvovirus B19 infection in a bone marrow transplant patient after platelet transfusion. **Transfusion**, 37, (9), 947-52, 1997.

COHEN, B. J.; BROWN, K. E. Laboratory infection with human parvovirus B19. **J Infect**, 24, (1), 113-4, 1992.

- COHEN, B. J.; BUCKLEY, M. M. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales. **J Med Microbiol**, 25, (2), 151-3, 1988.
- COHEN, B. J. et al. Laboratory infection with parvovirus B19. **J Clin Pathol**, 41, (9), 1027-8, 1988.
- COOLING, L. L.; KOERNER, T. A.; NAIDES, S. J. Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of parvovirus B19. **J Infect Dis**, 172, (5), 1198-205, 1995.
- CORCORAN, C. et al. Genetic variants of human parvovirus B19 in South Africa: cocirculation of three genotypes and identification of a novel subtype of genotype 1. **J Clin Microbiol**, 48, (1), 137-42, 2010.
- CORRAL, D. A. et al. Parvovirus B19 infection causing pure red cell aplasia in a recipient of pediatric donor kidneys. **Transplantation**, 55, (2), 427-30, 1993.
- COSSART, Y. E. et al. **Parvovirus-like particles in human sera.** Lancet: 72-73 p. 1975.
- COTMORE, S. F. et al. **Rationalization and extension of the taxonomy of the family Parvoviridae.** 2013. 65.
- COTMORE, S. F. et al. Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by prokaryotic expression of isolated genomic fragments. **J Virol**, 60, (2), 548-57, 1986.
- COUROUCE, A. M. et al. [Parvovirus (serum-parvovirus-like-virus) and Aurillac antigen. A study of 18 cases]. **Rev Fr Transfus Immunohematol**, 27, (1), 5-19, 1984.
- CUBEL, R. C. et al. Diagnosis of parvovirus B19 infection by detection of specific immunoglobulin M antibody in saliva. **J Clin Microbiol**, 34, (1), 205-7, 1996.
- CUBEL, R. C. et al. Human parvovirus B19 infections among exanthematic diseases notified as measles. **Rev Soc Bras Med Trop**, 30, (1), 15-20, 1997.
- CUBEL, R. C. et al. Aplastic crisis due to human parvovirus B19 infection in hereditary hemolytic anaemia. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 34, (5), 479-82, 1992.
- DA COSTA, A. C. et al. Investigation of human parvovirus B19 occurrence and genetic variability in different leukaemia entities. **Clin Microbiol Infect**, 19, (1), E31-43, 2013.
- DA SILVA CRUZ, A. et al. Detection of the human parvovirus B19 in a blood donor plasma in Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 84, (2), 279-80, 1989.
- DE FREITAS, R. B. et al. Parvovirus B19 antibodies in sera of patients with unexplained exanthemata from Belém, Pará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 88, (3), 497-9, 1993.
- DE FREITAS, R. B. et al. Prevalence of human parvovirus (B19) and rubella virus infections in urban and remote rural areas in northern Brazil. **J Med Virol**, 32, (4), 203-8, 1990.
- DE MIRANDA, M. F.; LINHARES, A. C.; SHIRLEY, J. A. Fifth disease in children living in Belem, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 31, (5), 359-62, 1989.
- DIAGNOSTICS, Q. C. F. M. **EQA Programmes B19 Virus.** Scotland: http://www.qcmd.org/QCMD_B19DNA_Report_2011.pdf: 14 p. 2011.
- DÍAZ, F.; COLLAZOS, J. Glomerulonephritis and Henoch-Schoenlein purpura associated with acute parvovirus B19 infection. **Clin Nephrol**, 53, (3), 237-8, 2000a.
- _____. Hepatic dysfunction due to parvovirus B19 infection. **J Infect Chemother**, 6, (1), 63-4, 2000b.

- DIJKMANS, B. A. et al. Human parvovirus B19 DNA in synovial fluid. **Arthritis Rheum**, 31, (2), 279-81, 1988.
- DURIGON, E. L. et al. Multiple primer pairs for polymerase chain reaction (PCR) amplification of human parvovirus B19 DNA. **J Virol Methods**, 44, (2-3), 155-65, 1993.
- DWIVEDI, M. et al. Coinfection of parvovirus b19 with other hepatitis viruses leading to fulminant hepatitis of unfavorable outcome in children. **Pediatr Infect Dis J**, 28, (7), 649-50, 2009.
- EIS-HÜBINGER, A. M. et al. Parvovirus B19 infection in pregnancy. **Intervirol**, 41, (4-5), 178-84, 1998.
- EIS-HÜBINGER, A. M. et al. Evidence for persistence of parvovirus B19 DNA in livers of adults. **J Med Virol**, 65, (2), 395-401, 2001.
- EIS-HÜBINGER, A. M. et al. Parvovirus B19 Genotype 2 in blood donations. **Transfusion**, 54, 1682-1684, 2014.
- ENDERS, G.; BIBER, M. Parvovirus B19 infections in pregnancy. **Behring Inst Mitt**, (85), 74-8, 1990.
- ERDMAN, D. D. et al. Possible transmission of parvovirus B19 from intravenous immune globulin. **J Med Virol**, 53, (3), 233-6, 1997.
- ERDMAN, D. D. et al. Genetic diversity of human parvovirus B19: sequence analysis of the VP1/VP2 gene from multiple isolates. **J Gen Virol**, 77 (Pt 11)), 2767-74, 1996.
- ESSARY, L. R. et al. Frequency of parvovirus B19 infection in nonimmune hydrops fetalis and utility of three diagnostic methods. **Hum Pathol**, 29, (7), 696-701, 1998.
- FAUQUET, C. M. et al. **Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 1162.
- FERGUSON, P. J. et al. Prevalence of human parvovirus B19 infection in children with Henoch-Schönlein purpura. **Arthritis Rheum**, 39, (5), 880-1, 1996.
- FILIPPONE, C. et al. VP1u phospholipase activity is critical for infectivity of full-length parvovirus B19 genomic clones. **Virology**, 374, (2), 444-52, 2008.
- FINKEL, T. H. et al. Chronic parvovirus B19 infection and systemic necrotising vasculitis: opportunistic infection or aetiological agent? **Lancet**, 343, (8908), 1255-8, 1994.
- FOTO, F. et al. Parvovirus B19-specific DNA in bone marrow from B19 arthropathy patients: evidence for B19 virus persistence. **J Infect Dis**, 167, (3), 744-8, 1993.
- FREITAS, R. et al. **Novo agente de doença exantemática na Amazônia: O parvovirus "B19"**. SAÚDE, M. D. Fundação SESP: Boletim Epidemiológico. 20: 1-4 p. 1988.
- FREITAS, R. B. et al. Molecular characterization of human erythrovirus B19 strains obtained from patients with several clinical presentations in the Amazon region of Brazil. **J Clin Virol**, 43, (1), 60-5, 2008.
- FRICKHOFEN, N. et al. Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. **Ann Intern Med**, 113, (12), 926-33, 1990.
- FRICKHOFEN, N. et al. Parvovirus B19 infection and bone marrow transplantation. **Ann Hematol**, 64 Suppl), A121-4, 1992.
- GABRIEL, S. E. et al. The role of parvovirus B19 in the pathogenesis of giant cell arteritis: a preliminary evaluation. **Arthritis Rheum**, 42, (6), 1255-8, 1999.
- GALLINELLA, G. et al. Relevance of B19 markers in serum samples for a diagnosis of parvovirus B19-correlated diseases. **J Med Virol**, 71, (1), 135-9, 2003.

- GAY, N. J. et al. Age specific antibody prevalence to parvovirus B19: how many women are infected in pregnancy? **Commun Dis Rep CDR Rev**, 4, (9), R104-7, 1994.
- GAZZIN, S. et al. The molecular basis of jaundice: An old symptom revisited. **Liver International**), 2017.
- GILLESPIE, S. M. et al. Occupational risk of human parvovirus B19 infection for school and day-care personnel during an outbreak of erythema infectiosum. **JAMA**, 263, (15), 2061-5, 1990.
- GRAEVE, J. L.; DE ALARCON, P. A.; NAIDES, S. J. Parvovirus B19 infection in patients receiving cancer chemotherapy: the expanding spectrum of disease. **Am J Pediatr Hematol Oncol**, 11, (4), 441-4, 1989.
- GUAN, W. et al. The genome of human parvovirus b19 can replicate in nonpermissive cells with the help of adenovirus genes and produces infectious virus. **J Virol**, 83, (18), 9541-53, 2009.
- GÜERRI, M. L. et al. [Seroprevalence of parvovirus B19 in our area and its distribution by ages and sexes]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, 18, (5), 243-4, 2000.
- HARGER, J. H. et al. Prospective evaluation of 618 pregnant women exposed to parvovirus B19: risks and symptoms. **Obstet Gynecol**, 91, (3), 413-20, 1998.
- HASLE, H. et al. Parvovirus B19 infection infrequently involved in children and adults with myelodysplastic syndrome. **Leuk Res**, 20, (1), 81-3, 1996.
- HATAKKA, A. et al. Acute hepatitis as a manifestation of parvovirus B19 infection. **J Clin Microbiol**, 49, (9), 3422-4, 2011.
- HEEGAARD, E. D.; BROWN, K. E. Human parvovirus B19. **Clin Microbiol Rev**, 15, (3), 485-505, 2002.
- HEEGAARD, E. D.; LAUB PETERSEN, B. Parvovirus B19 transmitted by bone marrow. **Br J Haematol**, 111, (2), 659-61, 2000.
- HEEGAARD, E. D.; MADSEN, H. O.; SCHMIEGELOW, K. Transient pancytopenia preceding acute lymphoblastic leukaemia (pre-ALL) precipitated by parvovirus B19. **Br J Haematol**, 114, (4), 810-3, 2001.
- HICKS, K. E. et al. Sequence analysis of a parvovirus B19 isolate and baculovirus expression of the non-structural protein. **Arch Virol**, 141, (7), 1319-27, 1996.
- HILLINGSØ, J. G.; JENSEN, I. P.; TOM-PETERSEN, L. Parvovirus B19 and acute hepatitis in adults. **Lancet**, 351, (9107), 955-6, 1998.
- HINO, M. et al. Transmission of symptomatic parvovirus B19 infection by fibrin sealant used during surgery. **Br J Haematol**, 108, (1), 194-5, 2000.
- HO, J. K. et al. Parvovirus B19 in an immunocompetent adult patient with acute liver failure: an underdiagnosed cause of acute non-A-E viral hepatitis. **Can J Gastroenterol**, 19, (3), 161-2, 2005.
- HOKYNAR, K. et al. Detection and differentiation of human parvovirus variants by commercial quantitative real-time PCR tests. **J Clin Microbiol**, 42, (5), 2013-9, 2004.
- HOKYNAR, K. et al. A new parvovirus genotype persistent in human skin. **Virology**, 302, (2), 224-8, 2002.
- HUATUCO, E. M. et al. Seroprevalence of human parvovirus B19 in a suburban population in São Paulo, Brazil. **Rev Saude Publica**, 42, (3), 443-9, 2008.
- HÜBSCHEN, J. M. et al. Phylogenetic analysis of human parvovirus b19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. **J Clin Microbiol**, 47, (11), 3735-8, 2009.
- JAYAKUMAR, S. et al. Fulminant viral hepatitis. **Crit Care Clin**, 29, (3), 677-97, 2013.

JOHN CARTER, V. S. **Virology: Principles and Applications, 2nd Edition.** 2013.

JONES, S. M. et al. New DNA Viruses Identified in Patients with Acute Viral Infection Syndrome. **Journal of Virology**, 79), 8230-8236, 2005.

JORDAN, J. et al. Human parvovirus B19: prevalence of viral DNA in volunteer blood donors and clinical outcomes of transfusion recipients. **Vox Sang**, 75, (2), 97-102, 1998.

KAJIGAYA, S. et al. Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88, (11), 4646-50, 1991.

KAJIGAYA, S. et al. A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 86, (19), 7601-5, 1989.

KARETNYI, Y. V. et al. Human parvovirus B19 infection in acute fulminant liver failure. **Arch Virol**, 144, (9), 1713-24, 1999.

KELLER, L. W. et al. Phylogenetic analysis of a near-full-length sequence of an erythrovirus genotype 3 strain isolated in Brazil. **Arch Virol**, 154, (10), 1685-7, 2009.

KERR, J. R. et al. Evidence for the role of demyelination, HLA-DR alleles, and cytokines in the pathogenesis of parvovirus B19 meningoencephalitis and its sequelae. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 73, (6), 739-46, 2002.

KERR, J. R. et al. An outbreak of parvovirus B19 infection; a study of clinical manifestations and the incidence of fetal loss. **Ir J Med Sci**, 163, (2), 65-7, 1994.

KIM, B. J. et al. Parvovirus B19 infection associated with acute hepatitis in infant. **Pediatr Infect Dis J**, 28, (7), 667, 2009.

KIM, Y. W. et al. Allopurinol-induced aplastic anemia in a patient with chronic kidney disease. **Clin Nephrol**, 71, (2), 203-6, 2009.

KISHORE, J.; SEN, M. Parvovirus B19-induced thrombocytopenia and anemia in a child with fatal fulminant hepatic failure coinfecting with hepatitis A and E viruses. **J Trop Pediatr**, 55, (5), 335-7, 2009.

KLEINMAN, S. H. et al. Prevalence and quantitation of parvovirus B19 DNA levels in blood donors with a sensitive polymerase chain reaction screening assay. **Transfusion**, 47, (10), 1756-64, 2007.

KNÖLL, A. et al. Parvovirus B19 infection in pregnancy: quantitative viral DNA analysis using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan® PCR). **J Med Virol**, 67, (2), 259-66, 2002.

KOCH, W. C.; ADLER, S. P. Human parvovirus B19 infections in women of childbearing age and within families. **Pediatr Infect Dis J**, 8, (2), 83-7, 1989.

KOCH, W. C. et al. Manifestations and treatment of human parvovirus B19 infection in immunocompromised patients. **J Pediatr**, 116, (3), 355-9, 1990.

KODURI, P. R. Novel cytomorphology of the giant proerythroblasts of parvovirus B19 infection. **Am J Hematol**, 58, (2), 95-9, 1998.

KOPPELMAN, M. H. et al. Quantitative real-time detection of parvovirus B19 DNA in plasma. **Transfusion**, 44, (1), 97-103, 2004.

KOVACS, B. W. et al. Prenatal diagnosis of human parvovirus B19 in nonimmune hydrops fetalis by polymerase chain reaction. **Am J Obstet Gynecol**, 167, (2), 461-6, 1992.

KOZIOL, D. E. et al. Nosocomial human parvovirus B19 infection: lack of transmission from a chronically infected patient to hospital staff. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 13, (6), 343-8, 1992.

- KRYGIER, D. S. et al. Parvovirus B19 induced hepatic failure in an adult requiring liver transplantation. **World J Gastroenterol**, 15, (32), 4067-9, 2009.
- KÜHL, U. et al. Prevalence of erythrovirus genotypes in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy. **J Med Virol**, 80, (7), 1243-51, 2008.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**, 33, (7), 1870-4, 2016.
- KURTZMAN, G. et al. Pure red-cell aplasia of 10 years' duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy. **N Engl J Med**, 321, (8), 519-23, 1989.
- KURTZMAN, G. J. et al. Persistent B19 parvovirus infection as a cause of severe chronic anaemia in children with acute lymphocytic leukaemia. **Lancet**, 2, (8621), 1159-62, 1988.
- KURTZMAN, G. J. et al. Chronic bone marrow failure due to persistent B19 parvovirus infection. **N Engl J Med**, 317, (5), 287-94, 1987.
- LANGNAS, A. N. et al. Parvovirus B19 as a possible causative agent of fulminant liver failure and associated aplastic anemia. **Hepatology**, 22, (6), 1661-5, 1995.
- LARSEN, L. [Parvovirus B19 acute hepatitis in an immunocompetent adult]. **Ugeskr Laeger**, 173, (43), 2719-20, 2011.
- LEE, W. M.; WIJICKS, E. F. Fulminant hepatic failure: when the hepatologist meets the neurointensivist. **Neurocrit Care**, 9, (1), 1-2, 2008.
- LERUEZ-VILLE, M. et al. Establishment of a cell line expressing human parvovirus B19 non-structural protein from an inducible promoter. **J Gen Virol**, 78 (Pt 1), 215-9, 1997.
- LI, Y. et al. Detection of parvovirus B19 nucleic acids and expression of viral VP1/VP2 antigen in human colon carcinoma. **Am J Gastroenterol**, 102, (7), 1489-98, 2007.
- LIEFELDT, L. et al. Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. **J Med Virol**, 75, (1), 161-9, 2005.
- LU, J. et al. Activation of synoviocytes by the secreted phospholipase A2 motif in the VP1-unique region of parvovirus B19 minor capsid protein. **J Infect Dis**, 193, (4), 582-90, 2006.
- LUO, Y.; QIU, J. Human parvovirus B19: a mechanistic overview of infection and DNA replication. **Future Virol**, 10, (2), 155-167, 2015.
- MANARESI, E. et al. Diagnosis and quantitative evaluation of parvovirus B19 infections by real-time PCR in the clinical laboratory. **J Med Virol**, 67, (2), 275-81, 2002.
- MANNING, A. et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. **J Infect Dis**, 194, (9), 1283-90, 2006.
- MAPLE, P. A. et al. Identification of past and recent parvovirus B19 infection in immunocompetent individuals by quantitative PCR and enzyme immunoassays: a dual-laboratory study. **J Clin Microbiol**, 52, (3), 947-56, 2014.
- MARANO, G. et al. Human Parvovirus B19 and blood product safety: a tale of twenty years of improvements. **Blood Transfus**, 13, (2), 184-96, 2015.
- MARTÍNEZ GONZÁLEZ, J. et al. [An exceptional cause of acute hepatitis in an adult: parvovirus B19]. **Gastroenterol Hepatol**, 35, (10), 697-9, 2012.

- MENDELSON, E. et al. Laboratory assessment and diagnosis of congenital viral infections: Rubella, cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), herpes simplex virus (HSV), parvovirus B19 and human immunodeficiency virus (HIV). **Reprod Toxicol**, 21, (4), 350-82, 2006.
- MENDONÇA, M. C. et al. Genotyping of human parvovirus B19 in clinical samples from Brazil and Paraguay using heteroduplex mobility assay, single-stranded conformation polymorphism and nucleotide sequencing. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 106, (4), 502-4, 2011.
- MIHALY, I. et al. [Observations on human parvovirus B19 infection diagnosed in 2011]. **Orv Hetil**, 153, (49), 1948-57, 2012.
- MILLER, E. et al. Immediate and long term outcome of human parvovirus B19 infection in pregnancy. **Br J Obstet Gynaecol**, 105, (2), 174-8, 1998.
- MIYAGAWA, E. et al. Infection of the erythroid cell line, KU812Ep6 with human parvovirus B19 and its application to titration of B19 infectivity. **J Virol Methods**, 83, (1-2), 45-54, 1999.
- MIYAMOTO, K. et al. Outbreak of human parvovirus B19 in hospital workers. **J Hosp Infect**, 45, (3), 238-41, 2000.
- MOGENSEN, T. H. et al. Chronic hepatitis caused by persistent parvovirus B19 infection. **BMC Infect Dis**, 10, 246, 2010.
- MOHAN, A. et al. Carbimazole-induced agranulocytosis. **J Pharmacol Pharmacother**, 6, (4), 228-30, 2015.
- MOLENAAR-DE BACKER, M. W. et al. Validation of new real-time polymerase chain reaction assays for detection of hepatitis A virus RNA and parvovirus B19 DNA. **Transfusion**, 56, (2), 440-8, 2016.
- MOMOEDA, M. et al. A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. **J Virol**, 68, (12), 8443-6, 1994.
- MOREY, A. L. et al. Clinical and histopathological features of parvovirus B19 infection in the human fetus. **Br J Obstet Gynaecol**, 99, (7), 566-74, 1992.
- MOREY, A. L. et al. Parvovirus B19 infection and transient fetal hydrops. **Lancet**, 337, (8739), 496, 1991.
- MORITA, E. et al. Human parvovirus B19 nonstructural protein (NS1) induces cell cycle arrest at G(1) phase. **J Virol**, 77, (5), 2915-21, 2003.
- MORTIMER, P. P. et al. A human parvovirus-like virus inhibits haematopoietic colony formation in vitro. **Nature**, 302, (5907), 426-9, 1983.
- MUIR, K. et al. Viral-associated haemophagocytosis with parvovirus-B19-related pancytopenia. **Lancet**, 339, (8802), 1139-40, 1992.
- MUNSHI, N. C. et al. Successful replication of parvovirus B19 in the human megakaryocytic leukemia cell line MB-02. **J Virol**, 67, (1), 562-6, 1993.
- MUSIANI, M. et al. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of B19 parvovirus DNA in human immunodeficiency virus patients. **J Med Virol**, 40, (2), 157-60, 1993.
- MUSIANI, M. et al. Persistent B19 parvovirus infections in haemophilic HIV-1 infected patients. **J Med Virol**, 46, (2), 103-8, 1995.
- NASCIMENTO, J. P. et al. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 32, (1), 41-5, 1990.
- NGUYEN, Q. T. et al. Novel human erythrovirus associated with transient aplastic anemia. **J Clin Microbiol**, 37, (8), 2483-7, 1999.

- NGUYEN, Q. T. et al. Detection of an erythrovirus sequence distinct from B19 in a child with acute anaemia. **Lancet**, 352, (9139), 1524, 1998.
- NGUYEN, Q. T. et al. Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. **Virology**, 301, (2), 374-80, 2002.
- NIGRO, G. et al. Parvovirus infection in children with AIDS: high prevalence of B19-specific immunoglobulin M and G antibodies. **AIDS**, 6, (7), 679-84, 1992.
- NIGRO, G. et al. Active or recent parvovirus B19 infection in children with Kawasaki disease. **Lancet**, 343, (8908), 1260-1, 1994.
- NOCTON, J. J. et al. Human parvovirus B19-associated arthritis in children. **J Pediatr**, 122, (2), 186-90, 1993.
- NORJA, P. et al. Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103, (19), 7450-3, 2006.
- NOUR, B. et al. Parvovirus B19 infection in pediatric transplant patients. **Transplantation**, 56, (4), 835-8, 1993.
- NUESCH, J. P. et al. Molecular pathways: rodent parvoviruses--mechanisms of oncolysis and prospects for clinical cancer treatment. **Clin Cancer Res**, 18, (13), 3516-23, 2012.
- NUNOUE, T. et al. Human parvovirus (B19) and erythema infectiosum. **J Pediatr**, 107, (1), 38-40, 1985.
- OKOCHI, K. et al. Nakatani antigen and human parvovirus (B19). **Lancet**, 1, (8369), 160-1, 1984.
- OLIVEIRA, S. A. et al. The aetiology of maculopapular rash diseases in Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil: implications for measles surveillance. **Epidemiol Infect**, 127, (3), 509-16, 2001.
- OPALEYE, O. O. et al. Prevalence and association of human parvovirus B19V with hepatitis B and C viruses in Nigeria. **J Med Virol**, 83, (4), 710-6, 2011.
- OSUGI, Y. et al. Antithymocyte globulin and cyclosporine for treatment of 44 children with hepatitis associated aplastic anemia., 2007.
- OTTO, T. D. et al. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. **Genet Mol Res**, 7, (3), 861-71, 2008.
- OZAWA, K. et al. Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. **J Virol**, 61, (8), 2395-406, 1987.
- OZAWA, K.; YOUNG, N. Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. **J Virol**, 61, (8), 2627-30, 1987.
- PARDI, D. S. et al. Hepatitis-associated aplastic anemia and acute parvovirus B19 infection: a report of two cases and a review of the literature. **Am J Gastroenterol**, 93, (3), 468-70, 1998.
- PARSYAN, A. et al. Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. **J Gen Virol**, 88, (Pt 2), 428-31, 2007.
- PATOU, G.; AYLIFFE, U. Evaluation of commercial enzyme linked immunosorbent assay for detection of B19 parvovirus IgM and IgG. **J Clin Pathol**, 44, (10), 831-4, 1991.
- PATOU, G. et al. Characterization of a nested polymerase chain reaction assay for detection of parvovirus B19. **J Clin Microbiol**, 31, (3), 540-6, 1993.
- PATTISON, J. R. et al. Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. **Lancet**, 1, (8221), 664-5, 1981.

- POLCZ, M. E. et al. Increased IL-6 detection in adult and pediatric lymphoid tissue harboring parvovirus B19. **J Clin Virol**, 57, (3), 233-8, 2013.
- PONGRATZ, G. et al. Persistent parvovirus B19 infection detected by specific CD4+ T-cell responses in a patient with hepatitis and polyarthritis. **J Intern Med**, 266, (3), 296-301, 2009.
- POOLE, B. D.; KARETNYI, Y. V.; NAIDES, S. J. Parvovirus B19-induced apoptosis of hepatocytes. **J Virol**, 78, (14), 7775-83, 2004.
- POOLE, B. D. et al. Apoptosis of liver-derived cells induced by parvovirus B19 nonstructural protein. **J Virol**, 80, (8), 4114-21, 2006.
- POSFAY-BARBE, K. M. M., M. G. Parvovirus B19 in organ transplant recipients : Current Opinion in Organ Transplantation. **Current Opinion in Organ Transplantation**, 8, (4), 283-287, 2003.
- QIU, J.; SODERLUND-VENERMO, M.; YOUNG, N. S. Human Parvoviruses. **Clin Microbiol Rev**, 30, (1), 43-113, 2017.
- RAO, S. P.; MILLER, S. T.; COHEN, B. J. Transient aplastic crisis in patients with sickle cell disease. B19 parvovirus studies during a 7-year period. **Am J Dis Child**, 146, (11), 1328-30, 1992.
- RAUFF, B. et al. Hepatitis associated aplastic anemia: a review. **Virol J**, 8, 87, 2011.
- ROLLAG, H.; SOLHEIM, B. G.; SVENNEVIG, J. L. Viral safety of blood derivatives by immune neutralization. **Vox Sang**, 74 Suppl 1), 213-7, 1998.
- SAARINEN, U. M. et al. Human parvovirus B19-induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. **Blood**, 67, (5), 1411-7, 1986.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**, 4, (4), 406-25, 1987.
- SANABANI, S. et al. Sequence variability of human erythroviruses present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus B19-related hematological symptoms. **J Clin Microbiol**, 44, (2), 604-6, 2006.
- SAÚDE, M. D. **Plano de erradicação do Sarampo e controle da Rubéola e Síndrome da Rubéola congênita.** SAÚDE, F. N. D. Brasília 1999.
- SCHILD, R. L. et al. Intrauterine management of fetal parvovirus B19 infection. **Ultrasound Obstet Gynecol**, 13, (3), 161-6, 1999.
- SCHMIDT, I. et al. Parvovirus B19 DNA in plasma pools and plasma derivatives. **Vox Sang**, 81, (4), 228-35, 2001.
- SCHORLING, S. et al. Quantification of parvovirus B19 DNA using COBAS AmpliPrep automated sample preparation and LightCycler real-time PCR. **J Mol Diagn**, 6, (1), 37-41, 2004.
- SERVANT, A. et al. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. **J Virol**, 76, (18), 9124-34, 2002.
- SERVANT-DELMAS, A.; MORINET, F. Update of the human parvovirus B19 biology. **Transfus Clin Biol**, 23, (1), 5-12, 2016.
- SETÚBAL, S. et al. Viremic blood donor found by a rapid screening method in a season of high human parvovirus B19 activity in Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 99, (1), 95-9, 2004.
- SEVALL, J. S.; RITENHOUS, J.; PETER, J. B. Laboratory diagnosis of parvovirus B19 infection. **J Clin Lab Anal**, 6, (4), 171-5, 1992.

- SHADE, R. O. et al. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. **J Virol**, 58, (3), 921-36, 1986.
- SHAN, Y. S. et al. Fibrosing cholestatic hepatitis possibly related to persistent parvovirus B19 infection in a renal transplant recipient. **Nephrol Dial Transplant**, 16, (12), 2420-2, 2001.
- SHIMOMURA, S. et al. First continuous propagation of B19 parvovirus in a cell line. **Blood**, 79, (1), 18-24, 1992.
- SHIRAIISHI, H. et al. Laboratory infection with human parvovirus B19. **J Infect**, 22, (3), 308-10, 1991.
- SHNEERSON, J. M.; MORTIMER, P. P.; VANDERVELDE, E. M. Febrile illness due to a parvovirus. **Br Med J**, 280, (6231), 1580, 1980.
- SKJÖLDEBRAND-SPARRE, L. et al. Parvovirus B19 infection: association with third-trimester intrauterine fetal death. **BJOG**, 107, (4), 476-80, 2000.
- SLAVOV, S. N. et al. Frequent human parvovirus B19 DNA occurrence and high seroprevalence in haemophilic patients from a non-metropolitan blood centre, Brazil. **Transfus Med**, 24, (2), 130-2, 2014.
- SLAVOV, S. N. et al. Genotyping of Human parvovirus B19 among Brazilian patients with hemoglobinopathies. **Can J Microbiol**, 58, (2), 200-5, 2012.
- SMITH, S. B. et al. Gloves and socks syndrome: early and late histopathologic features. **J Am Acad Dermatol**, 47, (5), 749-54, 2002.
- SÖDERLUND, M. et al. Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. **Lancet**, 349, (9058), 1063-5, 1997.
- SÖDERLUND-VENERMO, M. et al. Persistence of human parvovirus B19 in human tissues. **Pathol Biol (Paris)**, 50, (5), 307-16, 2002.
- SODJA, I. et al. [Seroprevalence of IgG antibodies against parvovirus B19 in the population of the Czech Republic]. **Epidemiol Mikrobiol Imunol**, 44, (4), 171-4, 1995.
- SOKAL, E. M. et al. Acute parvovirus B19 infection associated with fulminant hepatitis of favourable prognosis in young children. **Lancet**, 352, (9142), 1739-41, 1998.
- SPEYER, I.; BREEDVELD, F. C.; DIJKMANS, B. A. Human parvovirus B19 infection is not followed by inflammatory joint disease during long term follow-up. A retrospective study of 54 patients. **Clin Exp Rheumatol**, 16, (5), 576-8, 1998.
- SQUIRES, R. H. Autoimmune hepatitis in children. **Curr Gastroenterol Rep**, 6, (3), 225-30, 2004.
- SUN, L.; ZHANG, J. C. Acute fulminant hepatitis with bone marrow failure in an adult due to parvovirus B19 infection. **Hepatology**, 55, (1), 329-30, 2012.
- SUN, L.; ZHANG, J. C.; JIA, Z. S. Association of parvovirus B19 infection with acute icteric hepatitis in adults. **Scand J Infect Dis**, 43, (6-7), 547-9, 2011.
- TAILLAN, B. et al. Pure red-cell aplasia due to parvovirus B19 infection in a patient with AIDS-related complex. **Ann Med**, 24, (2), 137, 1992.
- TAKAHASHI, T. et al. DNA replication of parvovirus B 19 in a human erythroid leukemia cell line (JK-1) in vitro. **Arch Virol**, 131, (1-2), 201-8, 1993.
- TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method.), 2004.

- TOAN, N. L. et al. Phylogenetic analysis of human parvovirus B19, indicating two subgroups of genotype 1 in Vietnamese patients. **J Gen Virol**, 87, (Pt 10), 2941-9, 2006.
- TOLFVENSTAM, T.; RUDÉN, U.; BROLIDEN, K. Evaluation of serological assays for identification of parvovirus B19 immunoglobulin M. **Clin Diagn Lab Immunol**, 3, (2), 147-50, 1996.
- VON POBLOTZKI, A. et al. Antibodies to the nonstructural protein of parvovirus B19 in persistently infected patients: implications for pathogenesis. **J Infect Dis**, 172, (5), 1356-9, 1995.
- WANG, C. et al. Intrahepatic long-term persistence of parvovirus B19 and its role in chronic viral hepatitis. **J Med Virol**, 81, (12), 2079-88, 2009.
- WANG, J. H. et al. Detection of human parvovirus B19 in papillary thyroid carcinoma. **Br J Cancer**, 98, (3), 611-8, 2008.
- WEI, Q. et al. [Prevalence of anti-human parvovirus B19 IgG antibody among blood donors in Jilin province]. **Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi**, 20, (2), 60-2, 2006.
- WEIGEL-VAN AKEN, K. A. Pharmacological activation of guanine nucleotide exchange factors for the small GTPase Rap1 recruits high-affinity beta1 integrins as coreceptors for parvovirus B19: improved ex vivo gene transfer to human erythroid progenitor cells. **Hum Gene Ther**, 20, (12), 1665-78, 2009.
- WEILAND, H. T. et al. Prolonged parvovirus B19 infection with severe anaemia in a bone marrow transplant patient. **Br J Haematol**, 71, (2), 300, 1989.
- WONG, S.; YOUNG, N. S.; BROWN, K. E. Prevalence of parvovirus B19 in liver tissue: no association with fulminant hepatitis or hepatitis-associated aplastic anemia. **J Infect Dis**, 187, (10), 1581-6, 2003.
- WONG, S. et al. Ex vivo-generated CD36+ erythroid progenitors are highly permissive to human parvovirus B19 replication. **J Virol**, 82, (5), 2470-6, 2008.
- WOOLF, A. D. Human parvovirus B19 and arthritis. **Behring Inst Mitt**, (85), 64-8, 1990.
- WOOLF, A. D. et al. Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. **Arch Intern Med**, 149, (5), 1153-6, 1989.
- WRIGHT, C.; HINCHLIFFE, S. A.; TAYLOR, C. Fetal pathology in intrauterine death due to parvovirus B19 infection. **Br J Obstet Gynaecol**, 103, (2), 133-6, 1996.
- YAEGASHI, N. et al. Serologic study of human parvovirus B19 infection in pregnancy in Japan. **J Infect**, 38, (1), 30-5, 1999.
- YAEGASHI, N. et al. The incidence of, and factors leading to, parvovirus B19-related hydrops fetalis following maternal infection; report of 10 cases and meta-analysis. **J Infect**, 37, (1), 28-35, 1998.
- YAEGASHI, N. et al. Characterization of monoclonal antibodies against human parvovirus B19. **Microbiol Immunol**, 33, (7), 561-7, 1989.
- YANG, S. H. et al. Parvovirus B19 infection-related acute hepatitis after rituximab-containing regimen for treatment of diffuse large B-cell lymphoma. **Ann Hematol**, 91, (2), 291-4, 2012.
- YOTO, Y. et al. Incidence of human parvovirus B19 DNA detection in blood donors. **Br J Haematol**, 91, (4), 1017-8, 1995.
- YOUNG, N. Hematologic and hematopoietic consequences of B19 parvovirus infection. **Semin Hematol**, 25, (2), 159-72, 1988.
- YOUNG, N. S. Parvovirus infection and its treatment. **Clin Exp Immunol**, 104 Suppl 1), 26-30, 1996.
- YOUNG, N. S.; BROWN, K. E. Parvovirus B19. **N Engl J Med**, 350, (6), 586-97, 2004.

YOUNG, N. S. et al. Characterization of a virus that causes transient aplastic crisis. **J Clin Invest**, 73, (1), 224-30, 1984.

ZÁDORI, Z. et al. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. **Dev Cell**, 1, (2), 291-302, 2001.

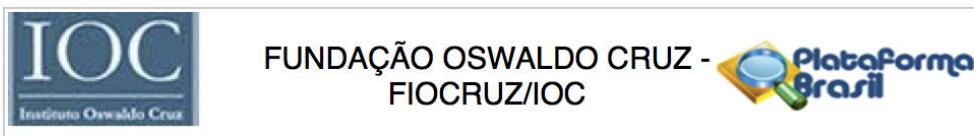
ZERBINI, M. et al. Different syndromes associated with B19 parvovirus viraemia in paediatric patients: report of four cases. **Eur J Pediatr**, 151, (11), 815-7, 1992.

ZHI, N. et al. 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 Virol**, 80, (12), 5941-50, 2006.

ZUFFI, E. et al. Identification of an immunodominant peptide in the parvovirus B19 VP1 unique region able to elicit a long-lasting immune response in humans. **Viral Immunol**, 14, (2), 151-8, 2001

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1 – Projeto do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Infecções por Parvovírus humano B19 associados a casos de hepatite aguda, crônica e fulminante

Pesquisador: Luciane Almeida Amado

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 46074815.0.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Instituto Oswaldo Cruz-RJ

DADOS DO PARECER

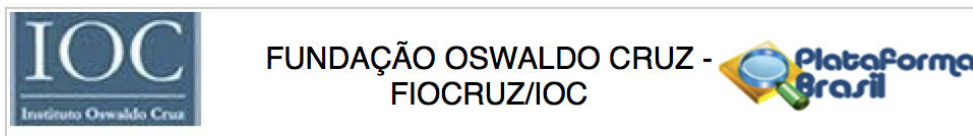
Número do Parecer: 1.896.353

Apresentação do Projeto:

As hepatites agudas e fulminantes se caracterizam pelo processo inflamatório hepático e podem originar-se de diversos agentes causais. Entre os vírus classicamente hepatotrópicos, estão os vírus das hepatites com via de transmissão entérica como o vírus da hepatite A (HAV) e vírus da hepatite E (HEV) e parenteral (HBV e HCV) que podem estar associados com casos de hepatite fulminante com falência hepática. Contudo, estudos recentes relatam a ocorrência de hepatite aguda em pacientes adultos imunocompetentes infectados com parvovírus B19, com achados bioquímicos compatíveis com hepatites virais, entretanto, com testes sorológicos e moleculares negativos para detecção dos agentes comumente implicados na causa de hepatite (os vírus das hepatites A, B, C e E).

As manifestações hepáticas por B19 variam desde alterações bioquímicas no fígado à falência hepática fulminante (FHF). Pode acontecer mesmo que de maneira rara formas severas de hepatite associada à anemia aplástica. Esse tipo de hepatite não-A, -B, -C, -E ocorre em cerca de 28% dos pacientes que receberam transplante de fígado, sugerindo que o B19 pode, portanto, ser subdiagnosticado. Estes achados sugerem fortemente uma associação entre infecção por parvovírus B19 e o desenvolvimento de hepatites agudas, sendo, portanto, uma possível etiologia para hepatite aguda. Hepatites agudas/crônicas de causas não definidas constituem um problema

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.896.353

na prática médica e clínica, e que mesmo com o desenvolvimento de testes laboratoriais sofisticados, uma proporção significativa das hepatites (17%) ainda permanece com causa não determinada, e apresentando aspectos que sugerem etiologia viral (hepatites não A-E).

O parvovírus B19 tem sido proposto como a causa de insuficiência hepática fulminante em pacientes com ou sem anemia aplástica, baseando-se no isolamento e caracterização do genoma do B19 em tecido hepático de pacientes com FHF, no entanto, os mecanismos de injúria hepática causada por B19 ainda não são conhecidos. O Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia (LADTV) do Instituto Oswaldo Cruz apresenta linhas de pesquisa nas áreas de inovação tecnológica, desenvolvimento de métodos e uso de modelos experimentais para estudos sobre virologia, imunologia, epidemiologia molecular e patologia das hepatites de transmissão entérica A e E. A pesquisa constituiu-se em um estudo observacional analítico do tipo transversal de base populacional. Serão avaliados um total de 200 pacientes e amostras biológicas de crianças, adolescentes e jovens-adultos e adultos com quadro clínico e/ou laboratorial de hepatite aguda, crônica e/ou fulminante.

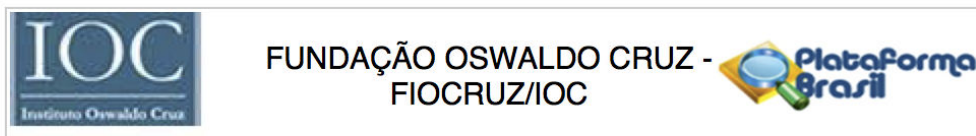
O presente estudo será realizado nos seguintes grupos populacionais: (i) 50 amostras biológicas (sangue e tecido hepático) provenientes de um banco de amostras de pacientes com hepatite fulminante, sem etiologia conhecida (hepatite não-A, B, C ou E), testadas previamente e armazenados pelo Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia; (ii) 100 amostras de soro provenientes de um banco de amostras de pacientes com hepatite A aguda, hepatites B ou C (agudas e/ou crônicas) armazenadas no LDTV, (iii) Serão convidados a participar do estudo 50 pacientes com quadro clínico agudo de hepatite sem etiologia conhecida (não-A, B, C e E). A partir das amostras de soro e tecido hepático serão realizados exames sorológicos e moleculares para pesquisa de anticorpos específicos contra o B19V e detecção e caracterização molecular do vírus. Este modelo de estudo permitirá a realização de análise estatística rica com análise de regressão logística e multivariada, assim como permite estudar eventuais fatores de risco e diferenças sócio-biológicas entre os pacientes. A validação dos ensaios moleculares será conduzida de acordo com instruções internacionais (Burd, 2010) e nacionais (RDC no. 27, de 17 de maio de 2012 – ANVISA). Experimentos serão conduzidos para determinar a sensibilidade analítica, especificidade analítica, precisão e acurácia da técnica.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Diagnosticar e caracterizar molecularmente a infecção pelo parvovírus humano B19 em pacientes com hepatites agudas, crônicas e fulminantes e avaliar seu papel na patogênese dessas doenças.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.896.353

Objetivo Secundário:

Estabelecer a técnica de PCR em tempo real para detecção e quantificação de B19 DNA em amostras de soro, plasma e fígado visando o diagnóstico molecular da infecção;
Avaliar as metodologias de PCR estabelecidas para a detecção e quantificação do B19 DNA no diagnóstico laboratorial utilizando amostras de soro de pacientes com hepatites agudas, crônicas e fulminantes;
Determinar a prevalência de B19-DNA e anti-B19 IgM e IgG em pacientes com hepatites agudas, crônicas e fulminantes;
Determinar os genótipos do B19 circulantes nos pacientes com hepatites agudas, crônicas e fulminantes;
Avaliar a frequência de co-infecção pelo B19 e os vírus das hepatites A, B, e C em infecções agudas e crônicas;
Investigar o papel da infecção pelo parvovirus B19 na patogênese dos casos de falência hepática fulminante com e sem etiologia definida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, dor ou roxidão o local, que serão controladas por uma coleta de sangue realizada dentro das normas de biossegurança.

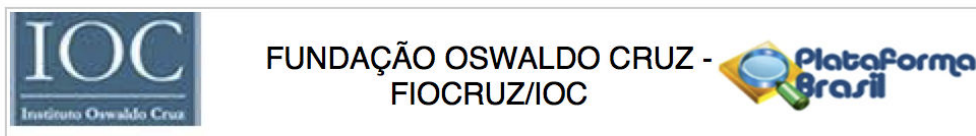
Benefícios:

Os pacientes receberão informações sobre os resultados da pesquisa entretanto vale ressaltar que os benefícios resultantes deste projeto aos participantes serão em termos de retorno social e acesso a futuros procedimentos laboratoriais de diagnóstico diferencial do Parvovírus B19 em casos de hepatites, uma vez que este estudo irá fornecer dados sobre o papel da infecção pelo parvovírus B19 nos casos de falência hepática fulminante com e sem etiologia definida, e com isso determinar a importância de considerar a infecção pelo B19 no diagnóstico diferencial de casos de hepatites. Além disso, o reconhecimento precoce da doença permitirá o tratamento adequado e se necessário, a transferência imediata para um centro transplantador para abordagem multidisciplinar e monitorização intensiva.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se da quarta versão deste projeto, as pendências vem sendo respondidas parcialmente como podem ser vistas no parecer consubstanciado do CEP Fiocruz/IOC de número 1.649.283,

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.896.353

datado de 26 de julho de 2016. Na carta de resposta às pendências foram incluídos comentários, justificativas e/ou modificações feitas às pendências. Nos documentos modificados foram ressaltadas as alterações feitas. Abaixo estão listadas todas as pendências e sua atual situação baseadas em carta resposta enviada pela pesquisadora em 11 de outubro de 2016:

1. A folha de rosto não está no formato da Plataforma Brasil nem especifica o patrocinador como sendo o Instituto Oswaldo Cruz.

Apresentada nova folha de rosto.

Pendência atendida

2. Projeto:

a. O desenho no formato plataforma Brasil é o Delineamento do estudo, a parte que especifica os procedimentos que serão avaliados, as unidades experimentais, a variável em análise e o modo como os procedimentos serão designados às unidades experimentais. Descrever claramente o tipo de estudo, os grupos experimentais, procedimentos e indicadores de resultado.

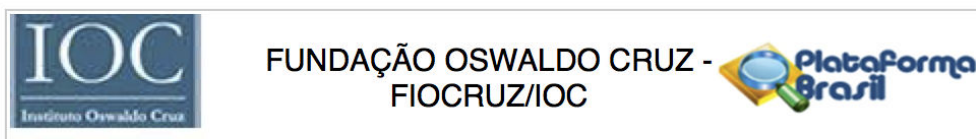
Pendência atendida

b. Na metodologia, esclarecer a população de estudo (cada um dos grupos que será avaliado) e o cálculo do tamanho da amostra de 200, se 150 pacientes serão abordados pessoalmente, recrutados ou sofrerão intervenção de 150, mas que serão divididos em 2 grupos de 50 cada, provenientes de biorrepositório (hepatites fulminantes) e de coleta de sangue (hepatites criptogênicas). Explicar o processo de seleção dos pacientes, os critérios de inclusão e exclusão, o processo de recrutamento e de entrega de resultados e tratamento caso necessário, esclarecer o grau de vulnerabilidade dos participantes e medidas protetoras propostas. Especificar o momento e forma em que serão aplicados os instrumentos de coleta de dados pelos profissionais de saúde.

Pendência atendida

c. Dos riscos e benefícios: em se tratando de pesquisas em seres humanos, considera-se que toda pesquisa apresenta riscos ao participante, ie. existe a probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo. Risco é a possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer fase de uma pesquisa e dela decorrente. O retorno dos resultados dos exames e tratamento se necessário é direito do participante e responsabilidade do pesquisador principal,

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.896.353

portanto não é considerado benefício direto.

Pendência atendida

d. Esclarecer o local em que será aplicado e o momento de aplicação do TCLE;

Pendência atendida

e. Cronograma: Visto que o cronograma indica que a pesquisa teria início em 1/7/2015, é preciso que os pesquisadores garantam que a pesquisa não teve início. Caso tenha sido iniciada o parecer deste CEP não terá validade.

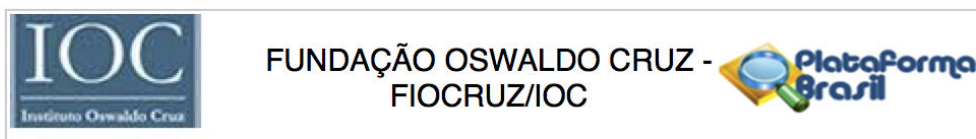
Pendência atendida em parecer anterior.

f. Apresentar orçamento como estabelecido no item 3.3 da Norma Operacional 01/2013 do CNS, detalhando os recursos, fontes e destinação; forma e valor da remuneração do pesquisador em moeda nacional; apresentar previsão de ressarcimento de despesas do participante e seus acompanhantes, quando necessário, tais como transporte e alimentação e compensação material nos casos ressalvados no item II.10 da Resolução do CNS 466/12.

Pendências atendida em parecer anterior.

3. Os TCLEs apresentam redação em primeira pessoa, parcialmente conforme à Res. 466/12, em linguagem relativamente acessível à compreensão dos possíveis participantes da pesquisa. Apresentadas a forma e momento de aplicação do TCLE, esclarecendo que será aplicado antes da coleta das amostras e serão entregue via de igual teor ao participante. Adicionar, em linguagem adequada ao nível sócio-cultural e acessível à compreensão dos participantes da pesquisa, e preferivelmente, redigido em terceira pessoa, breve descrição do tipo de doença e opções de tratamento (explicitar qual o procedimento que será seguido caso o participante estiver infectado pelo parvovirus), as características do estudo, objetivos e justificativa, os procedimentos a serem realizados, como e por quem será realizada a coleta de amostra biológica humana e se haverá armazenamento. Além do consentimento de autorização para a coleta, deve conter consentimento

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



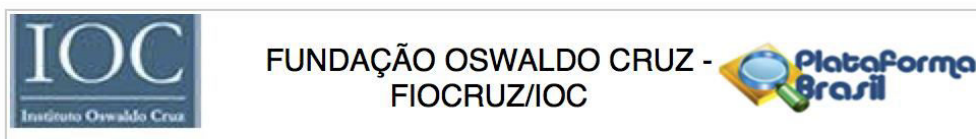
Continuação do Parecer: 1.896.353

para o depósito, armazenamento e utilização do material biológico coletado. É necessário descrever também os prováveis riscos e desconfortos, garantias de minimização dos riscos, detalhar os benefícios diretos e indiretos prováveis, forma de acompanhamento e assistência, como serão garantidas a confidencialidade e privacidade (retirar os dados de identificação do participante) e indicar os responsáveis e encarregados pelas entrevistas e as capacitações. Ainda, deixar claro a garantia de esclarecimento constante, a voluntariedade, liberdade de desistir, que não haverá bônus financeiro pela participação, a possibilidade (ou não) de ressarcimento e indenização. Indicar a versão e data última revisão do TCLE, o endereço e telefones de contato com membros das equipes locais, incluindo a possibilidade de ligar a cobrar e que o oferecer o contato com o CEP em caso de questionamentos sobre os aspectos éticos do estudo.

Pendencia Atendida

Redigir o documento na forma de um convite para participação no projeto de pesquisa específico, evitando linguagem impessoal e impositiva. O TCLE redigido em primeira pessoa (no singular e plural) o que resulta em imposição e confunde. Explicar o significado dos termos técnicos de maneira a permitir o entendimento por pessoas leigas, por exemplo, o que é hepatite, qual a diferença entre hepatites agudas, crônicas e fulminantes, o que é parvovirus B19, que doenças pode causar? A estrutura do texto deve ter uma legibilidade acessível ao grau de escolaridade dos potenciais participantes da pesquisa; descrever as características básicas do projeto, em especial os objetivos e as justificativas do estudo; descrever os procedimentos de pesquisa a serem realizados durante a participação no estudo, esclarecendo a duração esperada, incluindo número de visitas, exames e procedimentos realizados, assim como o tempo destinado para realização dos exames e procedimentos, e demais informações relevantes ao participante. Oferecer o contato com o CEP somente em caso de questionamentos sobre os aspectos éticos do estudo. Em relação a "O resultado de exames laboratoriais para Parvovírus B19 serão entregues por correspondência, acompanhados de esclarecimentos sobre o significado dos resultados de maneira confidencial e o paciente será encaminhado para unidades de saúde, nos casos em que um tratamento se fizer necessário." Enviar o resultado por correspondência é impessoal e caso o resultado for positivo pode levar a preocupação para o paciente ou familiar sem ter o respaldo adequado. O resultado positivo para parvovirose deverá ser entregue diretamente ao participante para acompanhar devidamente ao paciente em consulta

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.896.353

no centro de recrutamento.

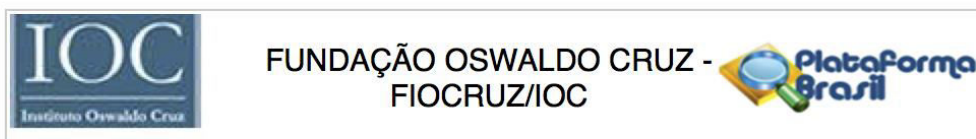
Pendencia Atendida

_ Considerando que os pacientes serão recrutados através do contato com profissionais de saúde do Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Oswaldo Cruz (LAHEP) e no Setor de Infectologia Pediátrica do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) da UFF, entende-se que são estas instituições que deverão fornecer tratamento e acompanhamento aos pacientes participantes sob responsabilidade da equipe proponente do estudo, e não como escrito no TCLE, que o participante será "encaminhado (a) a um ambulatório especializado de hepatologia da rede pública para acompanhamento". Reescrever.

Pendência atendida

4. Devido à participação de crianças e/ou adolescentes, entre 5 e 18 anos, deverá ser apresentado termo de assentimento (TALE) segundo faixa etária. Embora caiba aos representantes legais dos sujeitos (familiar, tutor) ter conhecimento e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é necessária a obtenção do consentimento do próprio sujeito, mesmo se em situação de limitação de competência para decisões autônomas, portanto recomendamos seja incluído o Termo de assentimento para os menores que estejam dentro dos critérios de inclusão do estudo. Apresentados TALEs segundo faixas etárias 14 a 18 anos, 11 a 13 anos, e 7 a 10 anos, redigidos em primeira pessoa, sem local para rubrica, nem paginação, ou versão, em linguagem técnica não adequada a faixa etária.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.896.353

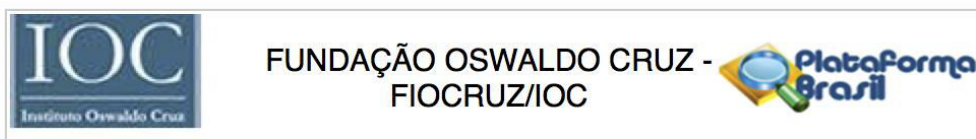
Pendência Atendida.

5. Apresentar TCLE de projeto anterior no qual pacientes "consentiram que amostras do tecido hepático (explante) fossem retiradas após o transplante do fígado, e parte do sangue que já seria coletada" para exames de rotina, "fossem utilizados para a pesquisa", no Serviço de transplante Hepático do Hospital Federal de Bonsucesso-RJ, do Hospital Estadual da Criança-RJ e Hospital da Ordem Terceira da Penitência -RJ, assim como os das amostras armazenadas no LADTV/IOC.

Pendência Atendida.

Conforme Resolução CNS 441/11, itens 2.II e 6; Portaria MS 2.201/11, Capítulo II, Artigos 5º e Capítulo III, Artigo 8, o TCLE apresentado contém consentimento de autorização para a coleta, o depósito, armazenamento e utilização do material biológico humano, no entanto esta utilização é atrelada ao projeto de pesquisa específico "Avaliação dos aspectos imunopatológicos envolvidos em quadros de hepatite aguda com evolução para falência hepática fulminante". No entanto, segundo a mesma Resolução, item 6 e Portaria MS 2.201/11, capítulo II, artigo 5 e capítulo IV, seção II, artigos 17, 18 e 22, embora o TCLE informe ao participante a possibilidade de utilização futura da amostra armazenada, o uso da mesma estará condicionado obrigatoriamente, ao re consentimento do participante de pesquisa por meio de um TCLE específico referente ao novo projeto de pesquisa (Resolução CNS 441/11). Esclarecer como será obtido o re consentimento ou justificar a isenção do mesmo.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.896.353

Pendência Atendida

6. Apresentar os instrumentos de coleta de dados. Instrumento não apresentado nem comentado na carta resposta.

Pendência Atendida.

Também ausentes termo de compromisso de Instituição co-participante "Instituto Biomédico" (UFF) e declaração da responsável Rita de Cassia Cubel Garcia, descrito em Considerações sobre termos de apresentação obrigatória em parecer anterior.

Pendencia Atendida

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Carta resposta ao CEP;

Cartas de anuência das instituições co-participantes;

Declarações de colaboração;

TCLE responsável

Termos de Assentimento.

Recomendações:

Qualquer modificação ou emenda ao projeto deverá ser submetida à apreciação do CEP FIOCRUZ/IOC.

Deverão ser apresentados relatórios parciais e relatório final.

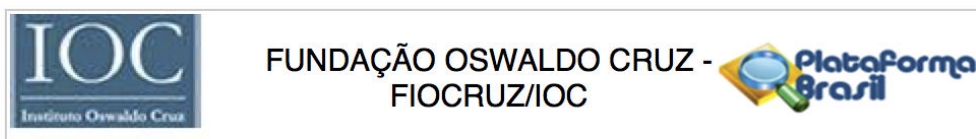
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 223ª Reunião Ordinária, realizada em 17.01.2017, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido -TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



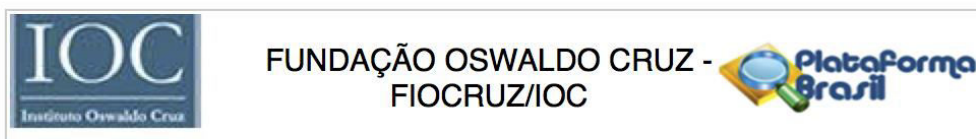
Continuação do Parecer: 1.896.353

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE aponto sua assinatura na última página do referido Termo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_535117.pdf	11/10/2016 11:58:52		Aceito
Outros	carta_resposta_V03_pg04.pdf	11/10/2016 11:57:06	Luciane Almeida Amado	Aceito
Outros	carta_resposta_V03_pg03.pdf	11/10/2016 11:56:19	Luciane Almeida Amado	Aceito
Outros	carta_resposta_V03_pg02.pdf	11/10/2016 11:55:38	Luciane Almeida Amado	Aceito
Outros	carta_resposta_V03_pg01.jpg	11/10/2016 11:54:51	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_14_18_anos_04out16.doc	11/10/2016 11:34:59	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_11_13_anos_04out16.doc	11/10/2016 11:34:35	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_7_10_anos_04out16.doc	11/10/2016 11:34:20	Luciane Almeida Amado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_B19_04out16.doc	11/10/2016 11:33:59	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_anuencia_Rita_UFF.jpg	11/10/2016 11:33:24	Luciane Almeida Amado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_CEP_B19_FHF_04out16.doc	11/10/2016 11:28:26	Luciane Almeida Amado	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_intituicao_Pesquisa_Rita_Cubel_UFF.pdf	13/06/2016 16:28:21	Luciane Almeida Amado	Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.896.353

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE FHF.pdf	10/08/2015 11:51:35		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto_assinada.pdf	10/08/2015 11:48:22		Aceito
Outros	termo compromisso e confidencialidade.pdf	12/06/2015 12:27:04		Aceito
Parecer Anterior	Parecer CEP Fiocruz_Hepatite fulminante.pdf	12/06/2015 11:16:18		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaração Anuencia_Marcelo.pdf	12/06/2015 11:07:34		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaração Anuencia_Claudete.pdf	12/06/2015 11:07:17		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaração Anuencia Elisabeth.pdf	12/06/2015 11:06:59		Aceito
Outros	Carta autorização HUAP_Projeto_Parvovirus_FIOCRUZ_09062015.pdf	12/06/2015 11:06:43		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 23 de Janeiro de 2017

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

9.2 Anexo 2 – Sequências protótipos de B19V utilizadas para a construção de árvore filogenética

Número Genbank	Genótipo	Isolado	Origem	Referência
M13178	1a	B19-Au	EUA	Shade et al., 1986
M24682	1a	B19-Wi	Reino Unido	Blundel et al., 1987
U38546	1a	Brill	RJ/Brasil	Cruz et al., 1988
U38508	1a	IRE1	Irlanda	Erdman et al., 1996
Z68146	1a	Stu	Alemanha	Hicks et al., 1996
AF162273	1a	HV	Finlândia	Hokynar et al., 2000
DQ293995	1a	C39	Bélgica	Parsyan et al., 2006
EF089179	1a	PA79055BR	PA/Brasil	Freitas et al., 2007
EF089209	1a	PA91018BR	PA/Brasil	Freitas et al., 2007
EU478562	1a	S2337GerB05	Alemanha	Norja et al., 2008
EU478578	1a	S2827GerB04	Alemanha	Norja et al., 2008
JN211168	1a	176937	Holanda	De Backer et al., 2012
KC013321	1a	09BRSP6896	SP/Brasil	Da Costa et al., 2013
KP115293	1a	RJ011	RJ/Brasil	Pereira et al., 2014
KP115298	1a	RJ667	RJ/Brasil	Pereira RFA, 2014
KP115303	1a	RJ676	RJ/Brasil	Pereira RFA, 2014
KP115304	1a	RJ677	RJ/Brasil	Pereira RFA, 2014
KP115308	1a	RJ695	RJ/Brasil	Pereira RFA, 2014
KP115309	1a	RJ696	RJ/Brasil	Pereira RFA, 2014
KP115310	1a	RJ730	RJ/Brasil	Pereira RFA, 2014
KP115312	1a	RJ772	RJ/Brasil	Pereira RFA, 2014
KP115316	1a	RJ816	RJ/Brasil	Pereira RFA, 2014
KP115318	1a	RJ903	RJ/Brasil	Pereira RFA, 2014
KP115319	1a	RJ1409	RJ/Brasil	Pereira RFA, 2014
KP115321	1a	RJ1445	RJ/Brasil	Pereira RFA, 2014
KP115322	1a	RJ1452	RJ/Brasil	Pereira RFA, 2014
KP115323	1a	RJ1515	RJ/Brasil	Pereira RFA, 2014
KP115324	1a	RJ1524	RJ/Brasil	Pereira RFA, 2014
DQ357064	1b	Vn147	Vietnã	Toan et al., 2006
DQ357065	1b	Vn115	Vietnã	Toan et al., 2006
AY044266	2	LaLi	Finlândia	Hokynar et al., 2002
AY064475	2	A6	Itália	Nguyen et al., 2002
AY064776	2	A6	Itália	Nguyen et al., 2002
AJ717293	2	Berlin	Alemanha	Liefeldt et al., 2004
AY903437	2	IM-81	Alemanha	Blumel et al., 2005
DQ333426	2	BN31.2	Alemanha	Schneider et al., 2008
AJ249437	3a	V9	França	Nguyen et al., 1999
AY582125	3a	Gh3051	Gana	Parsyan et al., 2007
DQ234775	3a	D1599	Gana	Parsyan et al., 2007
DQ234769	3a	R0416	Gana	Parsyan et al., 2007
DQ234771	3a	R0277	Gana	Parsyan et al., 2007
AY083234	3b	D91.1	França	Servant et al., 2002
DQ408304	3b	BN60.3	Alemanha	Schneider et al., 2008
DQ408303	3b	BN59.3	Alemanha	Schneider et al., 2008
DQ408305	3b	BN30.3	Alemanha	Schneider et al., 2008
DQ408302	3b	BN58.3	Alemanha	Schneider et al., 2008
DQ234778	3b	R0693	Gana	Parsyan et al., 2007
DQ234779	3b	R0748	Gana	Parsyan et al., 2007
AY582124	3b	Gh2768	Gana	Parsyan et al., 2007

9.3 Anexo 3 – Submissão de artigo científico com os dados levantados por essa dissertação

The Pediatric Infectious Disease Journal
PARVOVIRUS B19 INFECTION IN A FATAL CASE OF ACUTE LIVER FAILURE
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PIDJ-216-1105
Full Title:	PARVOVIRUS B19 INFECTION IN A FATAL CASE OF ACUTE LIVER FAILURE
Article Type:	Brief Reports
Corresponding Author:	Arthur Daniel Rocha Alves, Msc. Fundacao Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Fundacao Oswaldo Cruz
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Luciane Almeida Amado Leon, Ph.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Luciane Almeida Amado Leon, Ph.D.
	Arthur Daniel Rocha Alves, Msc.
	Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia, Ph.D.
	Juliana Gil Melgaço, Ph.D.
	Vanessa Salete de Paula, Ph.D.
	Marcelo Alves Pinto, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	B19V has been proposed as a new etiological agent for viral hepatitis, mainly in children, but it is a rare clinical occurrence. We reported a case of non-A-E acute liver failure (ALF), in immunocompetent child, with B19 infection. The detection of anti-B19 IgG, B19 DNA and mRNA in liver indicates a persistent infection and suggests a diagnosis of parvovirus B19-associated ALF.

Title Page

**PARVOVIRUS B19 INFECTION IN A FATAL CASE OF ACUTE LIVER
FAILURE**

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Luciane Almeida Amado Leon^{1*}, Arthur Daniel Rocha Alves¹, Rita de Cassia Nasser Cubel Garcia², Juliana Gil Melgaço¹, Vanessa Salete de Paula, Marcelo Alves Pinto¹

¹ Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

² Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil

Corresponding author: Arthur Daniel Rocha Alves
Email: arthur.alves@ioc.fiocruz.br

Key-words: acute liver failure, B19V, child, fatal outcome

Abstract

Abstract

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

B19V has been proposed as a new etiological agent for viral hepatitis, mainly in children, but it is a rare clinical occurrence. We reported a case of non-A-E acute liver failure (ALF), in immunocompetent child, with B19 infection. The detection of anti-B19 IgG, B19 DNA and mRNA in liver indicates a persistent infection and suggests a diagnosis of parvovirus B19-associated ALF.

INTRODUCTION

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Infection of parvovirus B19 (B19V) is globally prevalent and is mostly common in childhood. B19V infection in many instances is subclinical or may cause a wide spectrum of clinical manifestations in immunocompetent hosts such as erythema infectiosum in children, arthropathy in adults, transient aplastic anemia crisis in patients with hemolytic disorders and nonimmune hydrops during pregnancy. The hepatic manifestations of B19V infection range most commonly from transient increase of transaminases to rarely acute liver failure (ALF) (1).

Detection of B19 virus (B19V) DNA and specific antibodies in patients with hepatitis has implicated B19V as an etiological agent for acute (1-7), chronic (8) and ALF hepatitis (3, 9-12). ALF etiology is usually attributed to viral agents and factors which may include common hepatitis viruses A-E or other non classic hepatotropic virus such as herpes simplex, cytomegalovirus, Dengue, yellow fever, and Epstein-Barr (1). Pathogenic viruses accounts for 50% of the ALF cases which has a mortality rate greater than 70% (13). ALF as a result of B19V infection, can be manifested in immunocompetent or immunodeficient patients, with or without hemolytic disorders (3). It remains a rare clinical occurrence, but it is mostly reported in children, which the disease is found to be more severe (12, 14).

Here, we present a case of immunocompetent child who developed ALF of unknown etiology. The patient was hospitalized to undergo to a liver transplantation and died some days after the surgical intervention. Therefore,

1 we investigated if the B19 could be involved with this clinical manifestation of
2 the ALF.
3
4
5

6 **METHODS**

7
8
9

10 ***Case presentation***

11 We studied archived liver tissue and serum samples obtained during liver
12 transplantation (LT) procedure, from a 9-year-old female child. The pediatric
13 patient was hospitalized to undergo to LT due to an ALF. The diagnosis of ALF
14 was evidenced by grade II of encephalopathy, prothrombin time (PT) of 10%,
15 International Normalized Ratio (INR) of 8.8. The laboratory tests revealed at
16 least, three times elevated transaminases (TGO= 81 and TGP= 377 U/L), direct
17 bilirubin of 20mg/dL, alkaline phosphatase (AF) of 183 mg/dL, and gama
18 glutamil transferase (GGT) of 64U/L. Analysis of inflammatory cytokines levels
19 demonstrated elevation of interleukin 8 (IL-8): 136.61 pg/ml (normal value
20 <16pg/mL); of IL-10: 32.92 (normal value: 3.96 pg/mL) and of IL-6: 47.4 (normal
21 value: 30.2).
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 To investigate the etiology of the ALF, serological tests for hepatitis A
42 virus (HAV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), hepatitis E virus
43 (HEV), human immunodeficiency virus (HIV), cytomegalovirus (CMV), human
44 herpes virus 6 (HHV-6), herpes simplex virus (HSV) 1 and 2, Epstein–Barr
45 virus, dengue virus, syphilis and leptospirosis were performed. Autoimmune
46 diseases were investigated using chemiluminescent ELISA antinuclear
47 antibodies (ANA). All of these tests were negative and the ALF was considered
48 to be of unknown etiology (cryptogenic).
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

During transplant surgery, blood analysis showed thrombocytopenia, anemia, and leukocytosis (13.500 mm³) (Table 1). At the day of fatal outcome (21 days after LT) the biochemical and hematological parameters showed a severe anemia and an increase in the levels of transaminases, AF and GGT (Table 1).

Ethical permission for collecting and testing samples was provided by the FIOCRUZ Ethical Committee (440.614).

Serologic and molecular tests for B19

Anti-B19 IgG and IgM antibodies were evaluated by commercial ELISA (Biotrin - International, Ltd, Mount Merrion, Dublin, Ireland). The serum and liver tissue samples were analyzed for the presence of B19-DNA by conventional PCR and real-time PCR.

Briefly, after DNA extraction using QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen, Maryland, EUA), a semi-nested PCR using the primer pairs P12/P16 (4127-4689) and P13/P16 (4214-4689) for partial amplification of the VP1/VP2 capsid gene was performed (15).

For B19V genotyping, the 427 bp amplicon was purified and subjected to direct sequencing using the BigDye terminator v. 1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, CA, USA) and a Gene Amp PCR System 9700 sequencing apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA). A 427-bp sequence of VP1/VP2 was used to construct a neighbor-joining tree based on Kimura-2 parameter distances in the program MEGA, using reference sequences from Genbank, including the genotype IA, IB, II, IIIA and IIIB.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

B19V load was determined by real-time PCR using the TaqMan system (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, CA, USA). To absolute quantification, a synthetic standard curve of B19 NS1 region [custom synthesized by IDT® (Coralville, USA)] was designed (nt 1905-1987, genbank: NC_000883.2). Primers for NS1 region (nt 1905F and 1987R) and a single labelled 5' FAM probe (nt 1925-1948, genbank: NC_000883.2) were used.

In order to evaluate B19V replication in the liver tissue we tried to investigate the presence of mRNA in this sample. Besides, a liver sample from non-human primate (cynomolgus monkey) experimentally infected with hepatitis A (HAV) (strain HAF-203) was used, as a negative control. mRNA was extracted from these samples using Ambion-MicroPoly(A)Purist™ (Thermo Fisher Scientific Inc.), that selects mRNA from total RNA preparations. The purified RNAm was further subjected to digestion by DNase I treatment (final concentration, 90U/mL) (Promega Co., Madison, WI) to eliminate amplification of residual DNA, before cDNA synthesis with superscript III (ssIII) reverse transcriptase (Life Technologies, Gaithersburg, MD) and PV1R (nt 3882-3901) antisense primer (16). The cDNA obtained was subjected to nested PCR using primers designed for VP1 nonspliced transcripts detection PV1/PV1R (nt 3520-3901) for the 1st PCR, and PV2/PV2R (nt 3541-3867) for the 2nd PCR (17). As control of DNA contamination, the cDNA synthesis was also carried without superscript reverse transcriptase, following the nested PCR for transcripts detection. All products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

RESULTS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Anti-B19V IgG was found by ELISA, whereas IgM anti-B19V was negative. B19V DNA was detected by semi-nested PCR, only in the liver sample. Through real time PCR, B19V DNA was detected in serum and liver specimens, with a viral load of 8.52×10^3 copies/mL and 2.64×10^5 copies/mg, respectively. Phylogenetic analysis based on the partial VP1/VP2 region, showed that the virus belongs to genotype 1a.

In order to evaluate active viral infection, liver tissue was also tested by RT-PCR for the presence of B19V transcripts. It was possible to detect in this site VP1 nonspliced transcripts of 326pb, demonstrating viral replication in the liver from child. No amplification signals were detected in liver sample infected with HAV, neither in control sample of cDNA synthesized in absence of SSIII reverse transcriptase.

DISCUSSION

In the current study, we described a fatal case of non A-E ALF, in a 9-year old patient, with B19V infection and concomitant anemia. There are few cases reported in the literature of B19-associated acute hepatitis, with and without associated anemia (1, 2, 4-7). However, B19V infection as a single causative agent of ALF has been rarely reported and is still controversial (18, 19)). The virus isolated in this study belongs to genotype 1a, which was responsible for two distinct outbreaks occurred in the municipality of Niterói, Rio de Janeiro, Brazil, during 1999-2000 and 2004-2005, respectively (20).

In the available literature, most of the B19V-associated ALF cases reported, showed favorable outcome, and were made on the basis of both

1 positive serology (IgM and IgG anti-B19) and DNA detection for B19 (3, 6, 12,
2 21). In the present study, the anti-B19 IgG and B19 DNA in serum and liver
3 were found.
4
5

6
7 The B19V DNA detection in liver (10^5 copies/mg), matched to serum IgG
8 anti-B19V positivity, without IgM detection, associated with the low viremia (10^3
9 copies/mL) indicates a persistent, not acute infection. Previous studies have
10 reported an association between B19V infection and ALF from patients with non
11 A-E liver failure with or without red cell aplasia, based on positive PCR for B19V
12 in liver biopsy, without evidence of IgM anti-B19 (9, 10, 22). Other authors have
13 justified the undetectable IgM in B19V infection due antibodies against the
14 capsid proteins VP1 and VP2 may be complexed with B19V-particles, thereby
15 becoming undetectable in diagnostic tests (23, 24)
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 In order to determine whether the detected B19V DNA represented
30 replicating virus in liver, we attempted to detect B19 transcripts in this tissue. It
31 was evidenced a viral gene expression in liver, by detection of nonspliced
32 transcripts for VP1 in these persistently infected cells. Amplification of B19V
33 DNA did not take place in control sample (liver infected with HAV) and in cDNA
34 carried out without SSIII, demonstrating the specificity of the RT-PCR for B19V-
35 VP1 transcripts detection and the absence of DNA contamination. These data
36 suggest that B19 infection probably takes place in the liver.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 The finding of B19V DNA and mRNA in the liver of the patient with non-
49 A-E ALF is suggestive of B19V involvement in liver damage. According to
50 Karenyi et al. (6), the detection of B19V mRNA for capsid proteins provides
51 strong evidence for B19V infection during the course of non-A-E ALF and
52 suggests a role of B19V virus in liver injury.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The case reported here showed a persistent severe anemia and thrombocytopenia, with unfavorable outcome, after liver transplantation. These findings of abnormal hematological parameters associated to the detection of B19V DNA and mRNA in a liver biopsy specimen suggests a diagnosis of parvovirus B19-associated acute failure hepatitis. However, further studies comparing the prevalence of parvovirus B19V in liver samples from patients with ALF and from normal control subjects would be necessary to determine the association of B19V persistent infection and ALF development, in specific conditions or circumstances.

Since it is a rare finding, parvovirus B19 is likely under-diagnosed as a cause of acute hepatic injury. Therefore, this data highlights the importance to consider this virus into differential diagnosis of ALF in patients with hematological abnormalities, mostly in children, where the disease is usually more severe.

Reference

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1. Bihari C, Rastogi A, Saxena P, Rangegowda D, Chowdhury A, Gupta N, et al. Parvovirus b19 associated hepatitis. *Hepat Res Treat.* 2013;2013:472027.
2. Hatakka A, Klein J, He R, Piper J, Tam E, Walkty A. Acute hepatitis as a manifestation of parvovirus B19 infection. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3422-4.
3. Krygier DS, Steinbrecher UP, Petric M, Erb SR, Chung SW, Scudamore CH, et al. Parvovirus B19 induced hepatic failure in an adult requiring liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2009;15(32):4067-9.
4. Karrasch M, Felber J, Keller PM, Kletta C, Egerer R, Bohnert J, et al. Primary Epstein-Barr virus infection and probable parvovirus B19 reactivation resulting in fulminant hepatitis and fulfilling five of eight criteria for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Int J Infect Dis.* 2014;28:143-6.
5. Larsen L. [Parvovirus B19 acute hepatitis in an immunocompetent adult]. *Ugeskr Laeger.* 2011;173(43):2719-20.
6. Díaz F, Collazos J. Hepatic dysfunction due to parvovirus B19 infection. *J Infect Chemother.* 2000;6(1):63-4.
7. Pongratz G, Lindner J, Modrow S, Schimanski S, Schölmerich J, Fleck M. Persistent parvovirus B19 infection detected by specific CD4+ T-cell responses in a patient with hepatitis and polyarthritits. *J Intern Med.* 2009;266(3):296-301.
8. Arista S, De Grazia S, Di Marco V, Di Stefano R, Craxì A. Parvovirus B19 and "cryptogenic" chronic hepatitis. *J Hepatol.* 2003;38(3):375-6.
9. Sokal EM, Melchior M, Cornu C, Vandenbroucke AT, Buts JP, Cohen BJ, et al. Acute parvovirus B19 infection associated with fulminant hepatitis of favourable prognosis in young children. *Lancet.* 1998;352(9142):1739-41.
10. Karetnyi YV, Beck PR, Markin RS, Langnas AN, Naides SJ. Human parvovirus B19 infection in acute fulminant liver failure. *Arch Virol.* 1999;144(9):1713-24.
11. Ho JK, Tha SP, Coupland R, Dalal BI, Bowie WR, Sreenivasan GM, et al. Parvovirus B19 in an immunocompetent adult patient with acute liver failure: an underdiagnosed cause of acute non-A-E viral hepatitis. *Can J Gastroenterol.* 2005;19(3):161-2.
12. Sun L, Zhang JC. Acute fulminant hepatitis with bone marrow failure in an adult due to parvovirus B19 infection. *Hepatology.* 2012;55(1):329-30.
13. Dwivedi M, Manocha H, Tiwari S, Tripathi G, Dhole TN. Coinfection of parvovirus b19 with other hepatitis viruses leading to fulminant hepatitis of unfavorable outcome in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(7):649-50.
14. Gutiérrez-González E, Alvarez-Pérez A, Sánchez-Aguilar D, Toribio J. Sweet's syndrome and acute parvovirus B19 infection. *Int J Dermatol.* 2013;52(12):1611-3.
15. Durigon EL, Erdman DD, Gary GW, Pallansch MA, Torok TJ, Anderson LJ. Multiple primer pairs for polymerase chain reaction (PCR) amplification of human parvovirus B19 DNA. *J Virol Methods.* 1993;44(2-3):155-65.
16. Abe K, Kiuchi T, Tanaka K, Edamoto Y, Aiba N, Sata T. Characterization of erythrovirus B19 genomes isolated in liver tissues from patients with fulminant hepatitis and biliary atresia who underwent liver transplantation. *Int J Med Sci.* 2007;4(2):105-9.
17. Yoto Y, Kudoh T, Haseyama K, Suzuki N, Chiba S. Human parvovirus B19 infection associated with acute hepatitis. *Lancet.* 1996;347(9005):868-9.
18. Bernuau J, Durand F, Valla D. Parvovirus B19 infection and fulminant hepatitis. *Lancet.* 1999;353(9154):754-5.

19. 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.

20. Garcia RCNC, Pereira RFA, Azevedo KML, Castro TX, Mello FCAS, S., Siqueira MM, et al. Molecular diversity of human parvovirus B19 during two outbreaks of erythema infectiosum in Brazil. 2016.

21. Huang RJ, Varr BC, Triadafilopoulos G. Acute fulminant hepatic failure associated with parvovirus B19 infection in an immunocompetent adult. *Dig Dis Sci.* 2012;57(11):2811-3.

22. Langnas AN, Markin RS, Cattral MS, Naides SJ. Parvovirus B19 as a possible causative agent of fulminant liver failure and associated aplastic anemia. *Hepatology.* 1995;22(6):1661-5.

23. Bredl S, Plentz A, Wenzel JJ, Pfister H, Möst J, Modrow S. False-negative serology in patients with acute parvovirus B19 infection. *J Clin Virol.* 2011;51(2):115-20.

24. Leon LA, Marchevsky RS, Gaspar AM, Garcia ReC, Almeida AJ, Pelajo-Machado M, et al. Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) experimentally infected with B19V and hepatitis A virus: no evidence of the co-infection as a cause of acute liver failure. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(4):258-66.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 1

Table 1: Laboratory parameters and viral markers of the FHF case at the day of liver transplantation and at the day of obit.

Laboratory parameters (normal values)	Day of liver transplantation	Day of obit
Biochemical parameters		
GOT (10–32 U/L)	81	353
GPT (0–30 U/L)	377	690
GGT (11-50 U/L)	64	494
INR (0.8–1.2)	1.2	3.1
Alk. Phosphatase (30–120 U/L)	183	558
Bilirubin (0.2–1.2mg/dL)	13.3	21.5
Hematological parameters		
Platelets (150.000-450.000)	59.000	-
RBC (4.0-4.7 miles/mm ³)	2.85	0.163
Hemoglobin (11-13 g/dL)	8.2	5.91
Hematocrit (36-44%)	23.1	17.1
MCV (82-94 fl)	35.5	84.3
Leukocyte (4500-11000 mm ³)	13.500	NA
Viral markers		
IgM anti-B19V	negative	NA
IgG anti-B19V	positive	NA
Serum B19 DNA load	8.52 x 10 ³ (copies/mL)	NA
Liver B19 DNA load	2.64 x 10 ⁵ (copies/mg)	NA
B19 mRNA	positive	NA

NA: Non analyzed

GOT: glutamic oxaloacetic transaminase; GPT: glutamic pyruvic transaminase

GGT: gama glutamil transferase; INR: International Normalized Ratio; RBC: red blood cell; MCV: Mean corpuscular volume.