

MARIA ANGELA BELLOMO BRANDÃO

***PESQUISA DA FREQUÊNCIA DO CITOMEGALOVÍRUS NA
COLESTASE NEONATAL INTRA-HEPÁTICA, POR MEIO
DOS SEGUINTE MÉTODOS: SOROLOGIA, REAÇÃO EM
CADEIA DE POLIMERASE, IMUNOHISTOQUÍMICA E
HISTOLOGIA***

CAMPINAS

2006

MARIA ANGELA BELLOMO BRANDÃO

***PESQUISA DA FREQUÊNCIA DO CITOMEGALOVÍRUS NA
COLESTASE NEONATAL INTRA-HEPÁTICA, POR MEIO
DOS SEGUINTE MÉTODOS: SOROLOGIA, REAÇÃO EM
CADEIA DE POLIMERASE, IMUNOHISTOQUÍMICA E
HISTOLOGIA***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, área
de concentração em Pediatria.*

ORIENTADOR: PROF. DR. GABRIEL HESSEL

CO-ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

CAMPINAS

2006

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

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

B733p	Brandão, Maria Angela Bellomo Pesquisa da frequência do citomegalovírus na colestase neonatal intra-hepática, por meio dos seguintes métodos : sorologia, meio dos seguintes métodos: sorologia, reação em cadeia de polimerase, imunohistoquímica e histologia / Maria Angela Bellomo Brandão. Campinas, SP : [s.n.], 2006. Orientadores : Gabriel Hessel, Sandra Cecília Botelho Costa Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Neonatologia. 2. Hepatite por virus. 3. Citomegalovirus. I. Hessel, Gabriel. II. Costa, Sandra Cecília Botelho. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.
-------	---

Título em inglês : CMV frequency in neonatal intrahepatic cholestasis by following diagnostic tests: serology, polimerase chain reaction, immunohistochemistry and histology

Keywords: • Neonatology

- Hepatitis
- CMV

Área de concentração : Pediatria

Titulação: Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente

Banca examinadora: Prof Dr Gabriel Hessel

Prof Dr Antonio Fernando Ribeiro

Prof Dr Cláudio Rabelo Coelho

Profa. Dra. Elizete Aparecida Lomazi da Costa Pinto

Profa. Dra. Irene Kazue Miura

Data da defesa: 28-09-2006

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. GABRIEL HESSEL

Membros:

1. Prof. Dr. ANTÔNIO FERNANDO RIBEIRO

2. Prof. Dr. CLÁUDIO RABELO COELHO

3. Profa. Dra. ELIZETE APARECIDA LOMAZI DA COSTA PINTO

4. Profa. Dra. IRENE KAZUE MIURA

Curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/09/2006

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Zelindo Bellomo (in memoriam), um homem que acreditava no valor da educação.

À minha mãe, Therezinha Demartini Bellomo, meu alicerce por trás da aparente fragilidade.

Ao meu marido, Marcelo Barciela Brandão, amado e querido companheiro, exemplo de superação e inspiração.

Aos meus filhos, Giovanna Bellomo Brandão e André Bellomo Brandão, sempre alegres, de bem com a vida e extremamente simples.

Esse trabalho de tese só se tornou possível com a inestimável colaboração dessas pessoas. Muito obrigada!

À minha co-orientadora, Prof. Dra Sandra Cecília Botelho Costa, que muito contribuiu para a realização deste trabalho, sempre com determinação, conhecimento e muita vontade de ensinar.

À Prof. Dra Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, que, mesmo em meio a tribulações, realizou a revisão de lâminas comigo sempre com generosidade e disposição.

Ao Prof. Dr José Vassalo, que me apresentou à imuno-histoquímica e colaborou com a obtenção de materiais indispensáveis a esse projeto.

À Prof. Dra Elizete A. Lomazi Da-Costa-Pinto, minha orientadora do Mestrado. Qualquer texto que escrevo tem um pouco de seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr Edgard Ferro Collares, que sempre foi minha inspiração. Desde o quinto ano.

À Prof. Dra Adriana Maria Alves De Tommaso, pelas dedicadas orientações no início da minha incursão pelas técnicas de laboratório.

À Prof. Dra Gilda Porta, por tornar possível o estudo muticêntrico.

À Bióloga Paula D. Andrade, responsável pelo Laboratório de Investigação em Doenças Infecciosas por Biologia Molecular. Por sua experiência e dedicação na realização dos testes de PCR e também pela boa vontade.

À Bióloga Marisa de Almeida Matsura, responsável pela pesquisa do Laboratório de Patologia Experimental do CAISM, pela ajuda prestada e pela persistência na realização da imuno-histoquímica.

Às minhas colegas da Pós-Graduação: Ana Maria Sampaio, Carolina Guardia, Gláucia Marcon, Keila Biffi, e Renata Maria Borges Peres. Obrigada pela generosidade em compartilhar conhecimento e a devoção ao trabalho de pesquisa.

Às técnicas em laboratório Cristiane de Almeida e Caroline Delmonte, sempre prestativas e de bom humor.

Aos meus amigos: Liliane Cury, Simone C. B. Souza Lima, Alexandre E. Souza Lima, Celize B. Almeida, Armando A. Almeida Jr, Marcela S. Amaral Fernandes, Roberto J. Negrão Nogueira e Vera Gil. Contem sempre comigo e obrigada pelo apoio e incentivo.

À Maria Cristina Fernandes Alvim, técnica em laboratório, pela disposição e entusiasmo.

Aos estatísticos Andréa F. Semolin e Helymar Machado, pela análise de dados.

Aos funcionários da Anatomia Patológica e do DAME, que me auxiliaram no levantamento dos blocos e das lâminas e dos prontuários.

À Secretária da Pós-Graduação da Pediatria, Simone Cristina Ferreira, pelas orientações e inestimável auxílio.

Ao Prof. Dr. Gabriel Hessel:

Muitas vezes, em nossas discussões da prática clínica (e também na elaboração dessa tese), suas mãos permanecem unidas apenas pelas pontas dos dedos. Sinal de que sua alma é de conformidade com seus pensamentos. Agradeço a boa vontade, a generosidade, o apoio e o carinho demonstrados ao longo desta jornada e, principalmente, a confiança.

“A vida é curta, a Arte é longa, a oportunidade fugidia, a experiência enganadora, o julgamento difícil. É preciso fazermos, não somente o que é conveniente, mas, fazermos também com que o doente , os assistentes e as coisas exteriores concorram para isto.”

Hipócrates – Primeiro Aforismo

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xv</i>
ABSTRACT.....	<i>xvii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	19
1.1- Objetivos.....	30
2- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	31
2.1- Pacientes.....	32
2.2- Métodos diagnósticos.....	34
2.2.1- Sorologia para CMV.....	34
2.2.2- N-PCR.....	35
2.2.3- Imunohistoquímica.....	39
2.2.4- Avaliação histológica.....	42
2.3- Análise Estatística.....	43
3- RESULTADOS.....	44
4- DISCUSSÃO.....	55
5- CONCLUSÃO.....	64
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
7- APÊNDICES.....	82

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
BD	bilirrubina direta
CIH	colestase intra-hepática
CEH	colestase extra hepática
CMV	citomegalovírus
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FA	fosfatase alcalina
g/dl	grama por decilitro
GGT	gamaglutamiltransferase
HE	hematoxilina-eosina
HIS	hibridização <i>in situ</i>
IgM	imunoglobulina M
IgG	imunoglobulina G
IHQ	imuno-histoquímica
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
mg/dl	miligrama por decilitro
N-PCR	<i>Nested-Polymerase Chain Reaction</i>
RFC	Reação de fixação do complemento
RT-PCR	<i>Real time PCR</i>

Tabela 1-	Valores individuais das características clínicas obtidas na primeira avaliação: gênero, idade na ocasião da biópsia (meses), peso ao nascimento (gramas), peso na primeira consulta (gramas), estatura ao nascimento (centímetros) e a presença ou ausência de icterícia, acolia ou hipocolia fecal, colúria, hepatomegalia e esplenomegalia.....	86
Tabela 2-	Valores individuais dos exames laboratoriais (ALT = alanina aminotransferase, AST = aspartato aminotransferase, FA = fosfatase alcalina, GGT = gamaglutamiltransferase, albumina, INR = <i>International Normalized Ratio</i> e BD = bilirrubina direta) realizados no início da investigação, expressos em valores absolutos e em número de vezes o limite superior da normalidade (x).....	89
Tabela 3-	Características clínicas dos pacientes na primeira avaliação, incluindo os valores de peso ao nascimento (gramas); peso na primeira avaliação (gramas), mediana da estatura ao nascimento (em centímetros), e a presença de icterícia, acolia ou hipocolia fecal, colúria, hepatomegalia e esplenomegalia, distribuídos de acordo com os grupos (Subgrupos 1A e 1B e Grupo 2).....	92
Tabela 4-	Resultados dos exames laboratoriais (ALT = alanina aminotransferase, AST = aspartato aminotransferase, FA = fosfatase alcalina, GGT = gamaglutamiltransferase, albumina, INR = <i>International Normalized Ratio</i> e BD = bilirrubina direta) realizados no início da investigação, expressos em mediana, distribuídos de acordo com os grupos (Subgrupos 1A e 1B e Grupo 2). A mediana das enzimas hepáticas foi estabelecida em número de vezes o limite superior da normalidade.....	93

Tabela 5-	Características clínicas e resultados dos exames realizados nos 7 pacientes com diagnóstico de colestase intra-hepática pelo CMV, mostrando o gênero, peso ao nascimento, resultado das sorologias CMV, PCR no plasma e antigenemia (quando realizados), N-PCR no tecido hepático, IHQ e presença ou ausência de microabscesso.....	94
Tabela 6-	Resultados dos exames obtidos na pesquisa do CMV: sorologia para o CMV (IgM-CMV) positivo, N-PCR, IHQ e revisão da histologia (presença de células de inclusão citomegálica e microabscesso) e a distribuição dos mesmos de acordo com os grupos (Subgrupos 1A e 1B e Grupo 2).....	46
Tabela 7-	Número de casos em que foram realizados os exames laboratoriais de sorologia IgM-CMV, N-PCR, revisão histológica e IHQ para pesquisa de citomegalovírus.....	50
Tabela 8-	Resultados dos exames laboratoriais sorologia IgM-CMV, N-PCR, Microabscesso (Microab.) e IHQ mostrados individualmente.....	95
Tabela 9-	Resultados obtidos por meio dos métodos N-PCR e sorologia IgM-CMV e o número de amostras em que foram realizados.....	51
Tabela 10-	Cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VP+), valor preditivo negativo (VP-) e acurácia, utilizando-se a comparação entre os métodos N-PCR e sorologia IgM-CMV, com intervalo de confiança inferior e superior (95%).....	51
Tabela 11-	Resultados obtidos através dos métodos N-PCR e a pesquisa de microabscessos e o número de amostras em que foram realizados.....	52

Tabela 12-	Cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VP+), valor preditivo negativo (VP-) e acurácia, utilizando-se a comparação entre os métodos N-PCR e pesquisa de microabscesso, com intervalo de confiança inferior e superior (95%).....	52
Tabela 13-	Resultados obtidos através dos métodos N-PCR e a associação dos métodos de pesquisa de microabscesso e sorologia IgM-CMV e o número de amostras em que foram realizados.....	53
Tabela 14-	Cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VP+), valor preditivo negativo (VP-) e acurácia, utilizando-se a comparação entre os métodos N-PCR e a associação dos resultados dos métodos sorologia IgM-CMV e pesquisa de microabscesso, com intervalo de confiança inferior e superior (95%).....	53
Tabela 15-	Avaliação da concordância entre os métodos diagnósticos, através do cálculo do coeficiente de kappa (k).....	54
Tabela 16-	Características dos casos de colestase intra-hepática com N-PCR positiva para o CMV, mostrando o gênero, diagnóstico inicial, peso ao nascimento (gramas), resultado da sorologia IgM-CMV, IHQ e presença ou ausência de microabscesso.....	54

	<i>Pág.</i>
Figura 1- Corte histológico com reação IHQ positiva para o CMV.....	41
Figura 2- Corte histológico em HE, mostrando célula de inclusão citomegálica.....	42
Figura 3- Foto do resultado da β -globina na eletroforese em gel de agarose....	47
Figura 4- Foto do resultado da N-PCR na eletroforese em gel de agarose.....	47
Figura 5- Corte histológico da imunohistoquímica positiva, demonstrando a imunomarcção preferencial dos núcleos com coloração marrom.....	48
Figura 6- Corte histológico em HE, mostrando microabscesso.....	49



RESUMO

A colestase neonatal pode ser a manifestação inicial de um grupo muito heterogêneo de doenças. O citomegalovírus (CMV) está entre as possíveis etiologias e os critérios para o diagnóstico não estão ainda definidos. A frequência do CMV como causa de colestase intra-hepática (CIH) varia em função do método utilizado para o diagnóstico. O objetivo do presente estudo foi estabelecer a frequência do CMV na colestase neonatal intra-hepática por meio dos seguintes métodos: sorologia para CMV (IgM-ELISA), N-PCR e imunohistoquímica no fragmento da biópsia hepática parafinada, e indicadores de histologia (célula de inclusão citomegálica e microabscesso) e verificar a concordância entre os métodos diagnósticos citados. Participaram do estudo 101 pacientes com o diagnóstico de CIH e que realizaram biópsia hepática. A idade dos pacientes na 1ª consulta variou de 13 dias a 7 meses, com mediana de 1 mês e 21 dias. Para determinar a frequência da infecção por citomegalovírus foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia, considerando o método de N-PCR como referência. Para verificar a concordância entre os métodos, foi calculado o coeficiente kappa. A frequência de positividade para o CMV por meio da sorologia foi de 8% (5/62), por PCR foi também de 8% (6/77), por imunohistoquímica foi de 2% (1/44). Pela avaliação histológica, nenhum em 84 pacientes apresentava células de inclusão citomegálica e 17/84 (20%) apresentavam microabscesso. A sensibilidade da sorologia em relação à N-PCR foi nula, a especificidade de 88,89%, o valor preditivo positivo nulo, o valor preditivo negativo de 90,91% e a acurácia foi de 81,63. Na pesquisa de microabscessos a sensibilidade foi de 50% em relação à N-PCR, a especificidade de 77,05%, o valor preditivo positivo de 17,65%, o valor preditivo negativo de 94% e a acurácia de 74,63%. Não houve concordância para a pesquisa de CMV entre os métodos de sorologia (ELISA-IgM) e N-PCR e fraca concordância entre os demais métodos isolados ou agrupados. Conclusões: 1. A frequência de positividade para o citomegalovírus variou de 2% a 20% dependendo do método diagnóstico empregado, 2. Não houve concordância entre os métodos, 3. Não foram encontradas células de inclusão citomegálica e a imunohistoquímica foi positiva em apenas 1/44 casos, 4. A sorologia (ELISA-IgM) e a presença de microabscessos não foram sensíveis em relação à N-PCR para a determinação do diagnóstico de CMV na CIH, mas foram úteis, quando negativos, para prever resultado negativo da N-PCR.

Palavras chaves: lactente, hepatite.



ABSTRACT

A heterogeneous group of diseases may present initially as neonatal cholestasis, a syndrome made up of jaundice, coluria and fecal hypo or acolia. Cytomegalovirus (CMV) is one of the most common causes of neonatal intrahepatic cholestasis (IHC), but the CMV best diagnostic criteria is not yet established since the positivity of different diagnostic tests varies considerably. The aim of this study was to determine the CMV frequency in neonatal intrahepatic cholestasis and to compare results of different diagnostic tests: IgM by ELISA test, IHQ and PCR in paraffin-embedded hepatic biopsy sample and a review of liver histological features (liver microabscess and cytomegalic inclusion cells). The study has included 101 patients neonatal IHC patients who had been submitted to a liver biopsy during investigation. Median age at the first medical visit was 1 month and 21 days (13 days to 7 months). Sensibility, specificity, negative predictive value, positive predictive value and accuracy were calculated of each test in relation to N-PCR. To analyze concordance among laboratorial methods Kappa (κ) coefficient was calculated. Frequency of CMV positive tests: CMV ELISA - IgM was positive in 5/62 (8%), N-PCR in 6/77 (8%), and IHQ in 1/44 (2%). Liver histological features showed 0/84 cytomegalic inclusion cells and 17/84 (20%) liver microabscess. Sensibility of serology was null, specificity was 88,98%, negative predictive value was 90,91%, positive predictive value was null, and accuracy was 81,63%. Sensibility of searching for microabscess was 50%, specificity was 77,05%, negative predictive value was 17,65%, positive predictive value was null 94%, and accuracy was 74,63%. There was no concordance between ELISA-IgM and N-PCR (Value of $\kappa = -0,1$) and weak concordance between other methods when considered as a group or individually. Conclusions: 1. Frequency of CMV varied of 2% to 20%, according the diagnostic test. 2. There was no concordance among tests. 3. Searching for inclusion cells was null and IHQ was 2% (1/44). 4. ELISA-IgM and microabscess sensitivity were poor in relation to N-PCR, but if these methods are negative, probably N-PCR will be negative too.

Key words: hepatitis, infant



1- INTRODUÇÃO

“A colestase é definida fisiologicamente como a redução do fluxo biliar canalicular, primariamente manifestada como hiperbilirrubinemia conjugada” (Dellert e Balistreri, 2000).

A formação e excreção da bile são essenciais para a manutenção da função hepática normal. Ambos os processos são regulados pela unidade funcional formada pelos hepatócitos e colangiócitos, que mantêm continuidade com os ductos biliares extra-hepáticos. A secreção biliar é um processo dinâmico, regulada pelos ácidos biliares e demais componentes da bile (Nathanson e Boyer, 1991). O fluxo biliar inicia-se com a captação de solutos no sangue pelos hepatócitos, continuando com o transporte intracelular entre as organelas e as reações catalisadas por enzimas, a secreção de novos substratos formados através da membrana canicular e a excreção da bile na luz duodenal por meio dos ductos biliares (Balistreri et al. 1983).

O lactente apresenta-se particularmente suscetível a diferentes formas de acometimento no processo de formação e excreção da bile (Suchy, 1993; Balistreri, 1999). Nos primeiros 3 a 4 meses de vida, a conjugação de ácido biliar no hepatócito e a excreção de bile são imaturas. Além disso, a captação de ácidos biliares e outros ânions orgânicos pelos hepatócitos é ineficiente. Há elevadas concentrações de ácidos biliares no sangue e a captação ileal dos ácidos biliares ainda está em desenvolvimento, levando à perda de ácidos biliares (Suchny et al., 1981; Balistreri et al., 1983). Essa imaturidade da função excretora do fígado neonatal cria condições para que haja dificuldades de excreção secundárias a lesões de causas metabólicas e infecciosas, que muitas vezes favorecem uma sobreposição de agentes agressores, o que torna mais difícil um diagnóstico etiológico (Weisbrodt, 1981; Dellert e Balistreri, 2000).

Assim, a colestase neonatal pode ser a manifestação inicial de um grupo muito heterogêneo de doenças que, embora de diferentes etiologias, apresentam quadro clínico semelhante, que inclui icterícia, acolia, colúria, hepatomegalia e, em alguns casos, diminuição da capacidade de síntese pelos hepatócitos (Dellert e Balistreri, 2000).

A frequência da colestase neonatal varia de 1:2500 a 1:9000 nascidos vivos (Danks, 1977; Dick e Mowat, 1985; Balistreri, 1985). O mais comum é a classificação, do ponto de vista anatômico, em colestase intra-hepática e colestase extra-hepática. A abordagem inicial é voltada para o diagnóstico diferencial entre causas intra-hepáticas e extra-hepáticas, uma vez que as causas extra-hepáticas requerem intervenção cirúrgica precoce (Moyer et al, 2004).

Quando descartadas as causas extra-hepáticas, o diagnóstico diferencial ainda inclui variadas etiologias. Pode-se afirmar que, em geral, a colestase intra-hepática responde por 2/3 dos casos de colestase neonatal (Henriksen et al., 1981; Mowat, 1991; Dellert e Balistreri, 2000; Fischler et al., 2001; Yaccha e Sharma, 2005).

Há muitas etiologias possíveis para a colestase neonatal que se relacionam com fatores exógenos ou condições patológicas específicas, porém, o diagnóstico de atresia de vias biliares extra-hepáticas e hepatite neonatal idiopática respondem por 55% a 65 % dos casos de colestase neonatal e a etiologia precisa dos mecanismos de lesão do trato biliar em ambas as situações permanece não determinada (Balistreri, 1985).

De acordo com a etiologia, podemos fazer a seguinte classificação das possíveis causas da colestase neonatal intra-hepática (adaptado de Dellert e Balistreri, 2000):

1. Infecciosa:

- Bacteriana: sepse, listeriose, sífilis, tuberculose
- Viral: rubéola, citomegalovírus, herpes, coxsackie, echovírus, hepatite B e C, vírus da imunodeficiência humana e parvovírus B19
- Protozoário: toxoplasmose, Doença de Chagas

2. Genéticas - metabólicas:

- Distúrbios do metabolismo dos carboidratos: galactosemia, intolerância hereditária à frutose, glicogenose tipo IV.

- Deficiência de alfa 1-antitripsina
- Mucoviscidose
- Tirosinemia
- Distúrbios do metabolismo dos lipídeos: doença de Wolman, doença de Niemann-Pick tipo C, doença de Gaucher.
- Síndrome de Down, Síndrome de Donahue
- Síndrome de Alagille
- Colestase intra-hepática familiar progressiva dos tipos 1, 2 e 3
- Erros inatos do metabolismo dos sais biliares
- Doença de Zellweger

3. Doenças endocrinológicas:

- Hipopituitarismo
- Hipotireoidismo

4. Miscelânea:

- Drogas
- Nutrição parenteral
- Choque
- Histiocitose das células de Langerhans
- Obstrução intestinal
- Lúpus neonatal

5. Idiopática

Na classificação de causa não determinada, também denominada idiopática, há alterações inflamatórias no fígado, de causa desconhecida, sem evidência de obstrução de via biliar e tendo sido descartados agentes infecciosos ou erros metabólicos que possam explicar a colestase (Balistreri, 1985). Entre as causas de origem intra-hepática, a maioria das casuísticas apresenta um percentual significativo de pacientes nesse grupo com valores de frequência de 47% a 61% (Eliot, 1977; Mowat, 1991; Hessel et al., 1994).

Dentre as causas conhecidas, as mais comuns são as infecciosas. Quando há acometimento sistêmico, como no caso de septicemia, a manifestação de sinais e sintomas de origem hepática representa apenas um componente do envolvimento de múltiplos órgãos, cujo tratamento adequado oferece a melhor oportunidade de recuperação (Bezerra, 2003). Qualquer infecção bacteriana grave no período neonatal pode resultar em icterícia (Tiker et al., 2006), mas parece haver uma associação mais frequente com infecções do trato urinário, especialmente a *Escherichia coli* (Garcia e Nager, 2002). Além dessas infecções, outras têm sido observadas como sífilis, toxoplasmose, rubéola e citomegalovírus (CMV) (Felber e Sinatra, 1987; Prado et al., 1999).

O CMV pertence à família dos *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae* e gênero *citomegalovirus*. É caracterizado por possuir ciclos reprodutivos longos, aumento das células infectadas e múltiplos sítios de latência (Prober, 2003). Em crianças saudáveis e em adultos, a infecção é geralmente assintomática, algumas vezes acompanhada por sintomas não específicos e leves (Pass, 2003; American Academy of Pediatrics, 2003).

A prevalência da infecção pelo CMV varia com a idade, nacionalidade e nível sócio-econômico (Boppana et al., 1999; Suassuna et al., 2000; Boppana et al., 2001; Fowler et al., 2003). Estudos soro-epidemiológicos demonstram que as infecções são mais frequentes quanto mais baixo o nível sócio-econômico da população estudada (Pass, 1985) e, também, que há grupos mais suscetíveis (Murph et al., 1998; Canto et al., 2000; Santos et al. 2000). Em algumas regiões da África, a frequência atinge cerca de 80% a 90% da população aos 10 anos de idade, enquanto que nos EUA e Grã-Bretanha fica abaixo de 20% aos 15 anos (Stagno, 2001).

No Brasil, a citomegalovirose é altamente prevalente na população e ocorre precocemente já no primeiro ano de vida (Pannuti et al., 1985; Machado et al., 1991; Santos et al., 2000; Almeida et al., 2001). Yamamoto et al. (1999) observaram prevalência da infecção congênita de 2,6% na população estudada (5 em 189), sendo que 95% das mães apresentaram IgG anti-CMV, dados similares aos encontrados nos estudos realizados em populações de soro-prevalência elevada.

Em indivíduos infectados, o CMV pode ser isolado de secreções como urina, saliva, muco cervical, sêmen, sangue, leite materno e lágrimas. A forma de transmissão pode ser transplacentária (principalmente quando é devida a primo-infecção materna), durante o trabalho de parto (microorganismos presentes nas secreções genitais maternas) ou durante o período neonatal através do leite materno ou contato com secreções maternas por hábitos de higiene inadequados (urina, saliva, etc.). Fora do período neonatal, a transmissão é interpessoal, por contato com secreções infectadas (Pass, 2003).

As infecções pelo CMV se diferenciam pelo momento em que ocorreu a infecção. Se a criança com menos de 3 semanas de vida apresenta os sinais e sintomas clínicos citados e a infecção é confirmada através de testes laboratoriais, o diagnóstico de infecção congênita pelo CMV pode ser estabelecido. Após o primeiro mês de vida até os 12 meses, o diagnóstico é de probabilidade de infecção congênita (Istas et al., 1995). Em lactentes imunocompetentes, a infecção adquirida é habitualmente assintomática ou apresenta leve manifestação clínica. A exceção da regra é que neonatos de baixo peso que adquiriram a infecção pela transfusão sangüínea podem apresentar evolução fatal da doença (Gerhz, 1991).

Apesar de a infecção congênita ser decorrente tanto da infecção primária materna (taxa de transmissão vertical de 40% a 50%) como recorrência (taxa de transmissão vertical de 0,5% a 2%), as manifestações clínicas da infecção congênita por CMV são quase exclusivas de recém-nascidos de mães que tiveram a infecção primária durante a gestação (Raynor, 1993).

Cerca de 15% das crianças nascidas de mães que tiveram a infecção primária pelo CMV durante a gestação terão uma ou mais seqüelas da infecção (Stagno, 1986; Rivera et al., 2002). O quadro clínico é caracterizado por petéquias, ventriculite, hepatoesplenomegalia, icterícia, microcefalia, coriorretinite, podendo ocorrer prematuridade e baixo peso ao nascer (Yamamoto et al, 1994; Boppana et al., 1999; Liberek et al, 2002; Pass, 2003).

Na forma sintomática da infecção pelo CMV em lactentes, a icterícia é observada em 30% a 60% dos pacientes (Yamamoto et al., 1998; Liberek et al, 2002).

O método diagnóstico considerado padrão-ouro da infecção congênita pelo CMV é o resultado positivo da cultura do vírus nas primeiras três semanas de vida (American Academy of Pediatrics, 2003). O vírus geralmente está presente na urina e o isolamento viral em cultura de fibroblastos humanos é o método convencional e as culturas são comumente positivas após três a cinco dias. Essa técnica requer assepsia rigorosa na coleta de urina, manutenção da amostra a 4°C até o processamento, que deve ser iniciado até 12 horas após a coleta do material (Yamamoto et al., 1998).

O isolamento do vírus em pacientes com mais de 3 semanas de vida pode representar infecção congênita ou adquirida. O diagnóstico da infecção adquirida se faz em crianças que não tinham eliminação do vírus na urina ao nascimento e passam a apresentá-lo com 4 a 12 semanas de vida. A excreção viral permanece por vários anos nos casos de infecção congênita ou adquirida (Stagno, 2001; Pass, 2003).

Vários métodos podem ser utilizados para o diagnóstico como sorologias (dosagem das imunoglobulinas anti-CMV das classes IgM e IgG), exames histológicos, isolamento do vírus, identificação de antígenos virais e ácidos nucleicos (American Academy of Pediatrics, 2003).

O diagnóstico sorológico é realizado pela detecção de anticorpos produzidos contra o CMV. Apesar dos testes sorológicos serem solicitados rotineiramente por diversos métodos (reação de fixação do complemento, ELISA, radioimunoensaio e imunofluorescência indireta), as detecções de IgM e IgG têm papel limitado, uma

vez que 30% a 89% das crianças sabidamente infectadas intra-útero apresentarão anticorpos IgM anti-CMV ao nascimento, não permitindo afastar ou confirmar esta infecção na ausência de detecção viral (Demmler, 1996).

O exame por meio da técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é um dos testes empregados para detectar anticorpos no sangue, inicialmente como análise quantitativa da IgG (Engvall e Perlmann, 1971). A técnica foi modificada, permitindo a diferenciação da IgG e da IgM (Schmitz et al., 1977; Duermeier e van der Veen, 1978; Krech e Wilhelm, 1979). Vários estudos foram realizados na pesquisa da IgM-CMV e melhorias na técnica têm surgido desde então. Um dos métodos mais utilizados é o teste de captura híbrida para CMV, que se baseia na hibridização molecular em microplaca e leitura por quimioluminescência e pode ser qualitativo ou quantitativo (Schmitz et al., 1977; Van Loon et al., 1981; Nielsen et al., 1986, 1987, 1988; Lazzarotto et al., 1998; Maine et al., 2000, Souza et al., 2003).

Uma vez que a IgM materna não atravessa a barreira placentária e os fetos produzem seus próprios anticorpos, a detecção de IgM fetal é altamente sugestiva de infecção congênita (Demmler, 1996). Podem ocorrer falsos negativos por competição dos altos níveis de IgG materna com os relativamente baixos níveis de IgM fetal, e os falsos positivos pela ocorrência de fatores reumatóides (Stagno, 2001). Em pacientes imunocomprometidos, a redução da resposta imune representa uma limitação a esses métodos (Costa, 1999). A menor sensibilidade do ELISA-IgM ocorre nos casos de lactentes com infecção congênita nascidos de mães que apresentaram reativação da infecção ou reinfecção durante a gestação. Nessa situação, a sensibilidade é de 43% (Stagno et al., 1985).

O desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (Saiki et al., 1985) tornou possível a detecção em amostras com pequeno número de cópias virais, uma vez que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA de substratos complexos em pequenas concentrações (Chen et al., 1992; Costa e Costa, 1992). Yamamoto et al (1998) aplicaram a técnica da PCR na urina no diagnóstico de infecção congênita por CMV, comparando-a com a técnica de isolamento viral em cultura celular, demonstrando sensibilidade e especificidade comparáveis ao isolamento

viral. O mesmo grupo pesquisou o CMV através da PCR na saliva e na urina em recém-nascidos na primeira semana de vida e obteve resultados equivalentes (Yamamoto et al., 2006).

A amplificação de seqüências de ácidos nucleicos em tecidos parafinados pode trazer informações mesmo retrospectivamente. Dries et al. (1999) avaliaram pacientes com anticorpo positivo para o vírus C (anti-HCV positivo) e RNA negativo no soro, e encontraram positividade para o HCV com a técnica da RT-PCR em 27 de 44 biópsias (61%). Porém, a quebra do ácido nucleico durante o processamento, o tamanho da amostra e o tempo de estocagem podem resultar em dificuldades para a realização da PCR (Soguero et al., 2000). A presença do vírus no órgão-alvo representa uma forte evidência que a doença é causada pela infecção pelo CMV (American Academy of Pediatrics, 2003).

A RT-PCR é um outro método, no qual é utilizada a transcriptase reversa. Através da detecção do RNA é possível determinar se o genoma viral é latente ou ativo. Além da técnica qualitativa, onde se pesquisa a presença do vírus, a técnica pode ser quantitativa (*real time* PCR), onde se pesquisa a carga viral (Gouarin et al., 2002).

A antigenemia é um método direto de diagnóstico de infecção ativa pelo CMV, realizado em sangue fresco, baseado na detecção imunocitoquímica direta de proteínas estruturais do vírus (o antígeno pp65) em leucócitos do sangue periférico, utilizado principalmente em pacientes submetidos a transplante de órgãos (Patel et al., 1996; Amorim et al., 2001; Piiparinen et al., 2004).

Os achados histológicos mais característicos na pesquisa do CMV são as células volumosas, com núcleos largos pleomórficos que contêm inclusões intranucleares basofílicas. A inclusão pode ter o diâmetro da metade do núcleo, circundada por um halo claro nitidamente demarcado da membrana nuclear. As inclusões e necroses focais podem ser identificadas em qualquer órgão. Essas alterações podem estar presentes no hepatócito e nas células de revestimento dos ductos biliares dos espaços porta, assim como em necrose focal e hematopoiese extramedular (Von Lichtenberg, 1984; Santos et al., 1998; Aktas et al., 2003; White e Dehner, 2004).

Freqüentemente as inclusões citoplasmáticas não são encontradas, notando-se, porém, necrose focal com agrupamentos de polimorfonucleares neutrófilos, denominados microabscessos (Thung e Gerber, 1995). Esses, são encontrados principalmente em pacientes imunossuprimidos e transplantados e, embora não específicos, são considerados achados histológicos significativos nesses casos (Mac Donald et al., 1997; Lamps et al., 1998; Seehofer et al., 2002).

Em indivíduos imunocomprometidos, as lesões intranucleares características nos tecidos pesquisados podem não são encontradas (apesar da presença de lesões histopatológicas extensas), levando à necessidade de identificar os casos da infecção pelo CMV com métodos mais acurados, como a imunohistoquímica (IHQ) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Einsele et al., 1995; Rimza et al., 1996; Magalhães et al., 2001).

A IHQ consiste num método que localiza antígenos específicos em tecidos ou células, baseado na reação antígeno-anticorpo (Taylor et al., 2006). São utilizados anticorpos primários (monoclonais ou policlonais) e um coquetel de polímero marcado com peroxidase conjugado com imunoglobulina de cabra (anticoelho e anticamundongo). A imunoglobulina se liga ao anticorpo primário formando um complexo entre os anticorpos primários, secundários e polímero. A evidenciação da peroxidase ocorre na reação com o agente cromógeno. A positividade da reação caracteriza-se pela imunomarcação preferencial dos núcleos, notando-se também partículas no citoplasma. Se a reação é positiva, devem-se identificar quais as células que expressam o antígeno viral, com o intuito de se caracterizar a latência, colonização ou se o CMV está diretamente provocando a lesão (Vassalo et al., 1999; Taylor et al., 2006). Apesar de ser conhecido desde a década de 1940, apenas na década de 1990 passou a ter o uso difundido (Taylor et al., 1994; Taylor, 1994).

Muir et al. (1998) compararam os métodos de hematoxilina-eosina, imunohistoquímica, hidribização *in situ* (HIS) e reação em cadeia da polimerase (PCR) em biópsia do trato gastrointestinal de pacientes submetidos a transplante cardíaco e obtiveram maior sensibilidade e especificidade com o método da PCR na comparação entre os métodos.

Em doadores de transplante de medula óssea foram comparadas as técnicas de PCR e a sorologia do CMV (IgM), notando-se menor sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo da sorologia quando relacionada à PCR (Roback et al., 2005). Bordils et al. (2005) estudaram técnicas diagnósticas de detecção precoce da infecção pelo CMV em pacientes submetidos a transplante renal, utilizando dosagem de anticorpo IgM e IgG, antigenemia e PCR quantitativo, indicando que a PCR é a técnica mais sensível.

Vários estudos abordam o envolvimento do CMV nos casos de CEH por diferentes métodos apresentam resultados bastante diversos variando de 7 % a 39% (Chang et al., 1992; Fischler et al., 1998, De Tommaso et al., 2005) ou até mesmo em 8/10 pacientes com atresia de vias biliares com resultados positivos para o CMV (Fjær et al., 2005).

A frequência do CMV na CIH varia de 3% a 47%, dependendo da época em que o estudo foi realizado e do método diagnóstico utilizado (Eliot et al., 1977; Danks et al., 1977; Henriksen et al., 1982; Chang et al., 1992; Zerbini et al., 1997).

Chang et al. (1992) encontraram DNA de CMV por meio de PCR no tecido hepático em 23 de 50 crianças com hepatite neonatal, 2 em 26 com atresia de vias biliares extra-hepáticas e nenhum caso positivo no grupo controle. Em outro estudo, empregando a mesma metodologia, os autores encontraram 2 casos positivos em 10 crianças com diagnóstico de hepatite neonatal e nenhum caso positivo no grupo controle (Domiat-Saad et al., 2000).

Shibata et al (2005) avaliaram 26 crianças não-colestáticas, de 1 a 24 meses, que apresentavam evidências de lesão hepatocelular (definida como elevação da ALT acima do percentil 97,5) através da detecção da carga viral do CMV e de outros vírus que poderiam estar implicados na gênese da hepatite em crianças. Foi utilizada a técnica do PCR quantitativo (PCR *real time*) no plasma e encontraram positividade para o CMV em 4 pacientes (15,4%) e em nenhum dos controles.

Diante dos resultados das pesquisas sobre a participação do CMV na colestase neonatal intra-hepática, é possível questionar que pacientes com diagnóstico de colestase de causa não-determinada possam, na verdade, ter o diagnóstico de hepatite neonatal causada por CMV e que não foram adequadamente investigados. Também, pode ter ocorrido que infecções atribuídas ao CMV tenham sido erroneamente diagnosticadas devido à falta de disponibilidade de métodos diagnósticos adequados. Além disso, mesmo pacientes com diagnóstico etiológico definido poderiam ter infecção pelo CMV associada. Dessa forma, há necessidade de novos estudos para definir o real papel do CMV na colestase neonatal intra-hepática.

1.1- Objetivos

1. Estabelecer a frequência do CMV em pacientes com colestase neonatal intra-hepática por meio dos seguintes métodos: sorologia, N-PCR, histologia e imuno-histoquímica.
2. Estabelecer a concordância entre esses métodos.



2- CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1- Pacientes

Foram revistos, pela mesma pesquisadora (Maria Angela Bellomo Brandão), os prontuários de pacientes com diagnóstico de colestase intra-hepática admitidos no período de 03/1982 a 12/2005. A colestase foi definida, do ponto de vista laboratorial, se o nível da bilirrubina direta fosse maior que 1,0 mg/dL quando a bilirrubina total é menor que 5,0 mg/dL. Se o valor da bilirrubina total fosse maior que 5 mg/dL, colestase foi definida quando a bilirrubina direta representasse mais que 20% do valor da bilirrubina total conforme o consenso de 2004 (Moyers et al., 2004). A natureza intra-hepática da colestase foi estabelecida pela biópsia hepática e pela evolução. Os critérios de inclusão foram:

- História de icterícia com início até 3 meses de idade;
- Realização da biópsia hepática no Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP ou no Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da USP durante o primeiro ano de vida;
- Possibilidade de se obter material do bloco da biópsia.

Foram incluídos 101 pacientes (84 do HC-UNICAMP e 17 do Instituto da Criança da USP), que preenchiam os critérios de inclusão. Os diagnósticos foram baseados na análise dos prontuários, mas foram revistos pela autora.

Na ficha de obtenção dos dados (Anexo 1), constaram as seguintes informações: identificação, data de nascimento, data da primeira consulta, antecedentes neonatais, características clínicas obtidas na primeira consulta (gênero, idade, peso ao nascimento, peso na primeira consulta, estatura ao nascimento, icterícia, acolia ou hipocolia, colúria, hepatomegalia e esplenomegalia), exames subsidiários, biópsia hepática e data da realização da biópsia. Foram revistos os valores das dosagens de bilirrubina, aminotransferases, fosfatase alcalina, gamaglutamil transferase, albumina, INR (*International Normalized Ratio*) em valores absolutos e, para as enzimas hepáticas, em número de vezes o limite superior da normalidade, realizados na primeira consulta do paciente no HC-UNICAMP ou Icr-USP.

Para estabelecer as etiologias da CIH foram revistos os seguintes exames: os métodos sorológicos, resultado e data de sorologia do CMV, resultados das demais sorologias realizadas (HIV, EBV, rubéola, toxoplasmose, HBV, HCV, sífilis, etc.), hemocultura, urocultura, dosagem de alfa-1-antitripsina, dosagens de sódio e cloro no suor, pesquisa de erros inatos do metabolismo e dosagens hormonais.

Para estabelecer as etiologias da CIH foram revistos os resultados dos seguintes exames: sorologia para CMV, identificando o método sorológico e a data da coleta, as demais sorologias realizadas (sífilis, rubéola, toxoplasmose e hepatite B), urocultura, e dosagem de alfa-1-antitripsina. Também foram realizados, em um percentual menor de casos, quando indicado e disponível os seguintes exames: sorologia para HIV, sorologia para EBV, hemocultura, pesquisa de erros inatos do metabolismo, dosagens de sódio e cloro no suor e dosagens hormonais.

A Tabela 1, em apêndice, apresenta os valores individuais das características clínicas desses pacientes, obtidas a partir da revisão dos prontuários.

Os casos foram divididos em grupos, de acordo com o diagnóstico estabelecido.

O Grupo 1 (45 casos) incluiu pacientes com colestase de origem definida com os seguintes diagnósticos:

Subgrupo 1 A: causas infecciosas (24 casos):

1. Seps neonatal: 9
2. CMV: 7
3. Infecção do trato urinário: 4
4. Lues: 2
5. Toxoplasmose: 2

Subgrupo 1 B: causas genético-endócrino-metabólicas (21 casos):

1. Deficiência de alfa1-antitripsina: 5
 2. Galactosemia: 4
 3. Síndrome de Allagile: 2
 4. Doença metabólica não-especificada: 5
 5. Doença de Byler: 1
 6. Fibrose cística: 1
 7. Secundária ao uso de nutrição parenteral: 1
 8. Síndrome de Down: 1
 9. Panhipopituitarismo: 1
- O Grupo 2 incluiu 56 pacientes com diagnóstico de colestase intra-hepática de causa não determinada.

2.1.1- Aspectos éticos: o estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética e Pesquisa das Faculdades de Ciências Médicas da Unicamp e da FMUSP, dispensando-se o termo de consentimento.

2.2- Métodos diagnósticos: Os resultados das sorologias realizadas no processo de investigação da colestase foram obtidos retrospectivamente a partir dos dados dos prontuários. Os exames da N-PCR e IHQ foram realizados utilizando-se os blocos de parafina das biópsias hepáticas realizadas durante a investigação da colestase. A revisão da histologia foi realizada nas lâminas das biópsias hepáticas. Em alguns casos, houve necessidade de novos cortes histológicos ou mesmo novas colorações.

2.2.1- Sorologia para CMV

Os resultados das sorologias para o CMV foram obtidos na revisão dos prontuários, assim como a data em que os exames foram realizados. Foram excluídos resultados de testes realizados em outros serviços e foi considerada apenas a técnica ELISA por ser a mais freqüentemente utilizada nos serviços incluídos nesse estudo. Nos casos do HC-UNICAMP foram utilizados os kits SORIN e BIOLAB-MEURIUEX. Nos casos do Icr-USP foram utilizados os kits COBAS CORE MEIA (Roche) e AXSYM MEIA (Abbot).

Na técnica ELISA a fase sólida é composta pelas cavidades de tira de microtitulação, que estão cobertas com culturas de células com antígenos do CMV. Na primeira etapa, os anticorpos específicos presentes nas amostras se ligam aos antígenos da fase sólida. O tampão de diluição contém anticorpos anti-humano IgG para evitar a interferência do fator reumatóide e da IgG específica. Após a incubação, componentes não ligados são retirados na etapa de lavagem. Para a segunda incubação, o conjugado anti-IgM (anticorpos anti-IgM humanos, peroxidase) é adicionado ligando-se especificamente aos anticorpos da classe IgM, formando imunocomplexos típicos. Há uma segunda etapa de lavagem para remover o excesso de conjugado. Ocorre o desenvolvimento de coloração azul, que muda para amarela depois da adição de ácido para finalização da reação. A absorbância das amostras e dos controles é determinada pelo uso de leitoras de placas ou tiras de microtitulação, ou ainda por sistemas automatizados.

2.2.2- N-PCR

Foram utilizadas 2 técnicas de extração de DNA nos blocos de parafina. A técnica 1 foi utilizada em 74 amostras e a técnica 2 em 49 amostras.

Técnica 1- Foram realizados cortes nos blocos das biópsias parafinadas e foram colocadas em tubos de 1,5ml (*eppendorf*). Para retirar a parafina adicionou-se 1 ml de xileno a cada *eppendorf* e agitou-se em vortex por cerca de 3 minutos. Após, foram centrifugados por 5 minutos a 14000 rpm (rotações por minuto). Desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se, no material decantado, o mesmo procedimento. Para se retirar o xileno colocou-se, no material decantado, 500 µl de álcool absoluto (ETOH 100%) e procedeu-se à centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm. Após, desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se o mesmo procedimento com uso de 500 µl de ETOH a 95% e 500 µl de ETOH a 70%. Desprezou-se o sobrenadante e deixado o material decantado para secar 5 minutos. Adicionou-se proteinase K e buffer (quantidades já padronizadas) e deixou-se o material em banho-maria a 55° C por 72 horas, procedendo-se então à segunda etapa (extração com Fenol/Clorofórmio).

A extração com Fenol/Clorofórmio foi feita da seguinte maneira:

- ◆ Fenol: adicionou-se 430 µl de fenol a cada amostra e agitou-se por 5 minutos. Após, centrifugou-se por 15 minutos a 14000 rpm e transferiu-se o sobrenadante para outro *eppendorf* com descarte do material decantado.
- ◆ Fenol/Clorofórmio: Adicionou-se a cada amostra, 215 µl de fenol + 215 µl de clorofórmio e agitou-se por 5 minutos. Após, centrifugou-se por 15 minutos a 14000 rpm e transferiu-se o sobrenadante para outro *eppendorf*. Repetiu-se, esse passo, mais uma vez.
- ◆ Clorofórmio + álcool isopropílico (24:1): adicionou-se 40 µl da solução e agitou-se por 5 minutos. Após, foi centrifugado por 15 minutos a 14000 rpm e transferido o sobrenadante para outro *eppendorf*. Ao final, adicionou-se a cada amostra 75 µl de acetato de amônio 10 M + 750 µl de ETOH a 100% e agitou-se por alguns minutos, sendo o material levado ao freezer a -80° C por uma semana. As amostras foram então retiradas do freezer e centrifugadas por 30 minutos a 14000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol a 100% gelado. Após a secagem das amostras em temperatura ambiente, foram adicionados 50 µl de água estéril, 10µM Tris (pH=8) e 1 mM EDTA. O material foi estocado a -20°C até sua utilização para a reação de amplificação do DNA.

Técnica 2 (Kit comercial Daneasy-Qiagen) - Neste procedimento colocou-se cerca de 20mg de amostra de tecido hepático parafinado obtida através de cortes da amostra da biópsia em *eppendorf*, adicionado 1200µl de xileno e agitado em vórtex. Centrifugou-se o material por 5 minutos na velocidade de 14000 rpm em temperatura ambiente. Removeu-se então o sobrenadante e adicionou-se 1200µl de ETOH a 100%, agitou-se delicadamente e procedeu-se a centrifugação da mesma forma da etapa anterior. Após, foi removido o etanol e repetido a mesma etapa. Para a evaporação do etanol, o *eppendorf* foi deixado aberto por cerca de 15 minutos a 37°C. Colocou-se então 180µl de *buffer* ATL e foi acrescentado 20µl de proteinase K, homogeneizado e deixado para incubar a 55° C por

72 horas, até que o tecido estivesse completamente lisado. Agitou-se por 15 segundos e colocou-se 200µl de *buffer* AL. Foi então homogeneizado e incubado por 10 minutos a 70° C. Acrescentou-se 200µl de ETOH 100%, homogeneizado e aplicado ao sistema de mini-coluna do tubo de 2 ml fornecido no Kit. Centrifugou-se por 1 minuto a 8.000 rpm, descartado o filtrado e colocou-se a mini-coluna em novo tubo coletor, onde foram adicionados 500µl de *buffer* AW1, centrifugou-se por 1 minuto a 8.000 rpm. O filtrado foi descartado e novamente a mini-coluna foi transferida para um novo *ependorf*, onde foi adicionado 500µl de *buffer* AW2 e centrifugado a 14.000 rpm por 3 minutos. Removeu-se novamente a mini-coluna, acrescentou-se diretamente na membrana 100µl de *buffer* AE. O material foi incubado em temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm. Repetiu-se novamente a última etapa e obteve-se, assim, o material para a próxima fase.

Todas as amostras foram submetidas à leitura no espectrofotômetro. Os resultados variaram de 0,1 a 5,6µg/ µl, com mediana de 1,6 µg/ µl.

Cuidados para evitar contaminação

As amostras foram manipuladas em salas diferentes:

1. sala de extração do DNA;
2. sala pré-PCR para preparação do mix;
3. sala de amplificação e
4. sala de eletroforese.

Todos os reagentes e materiais pré e pós-PCR foram preparados e utilizados em ambientes diferentes.

As recomendações de Kwok e Higuchi (1989) foram seguidas para evitar a contaminação das amostras. Quando amostras consecutivas tiveram resultado positivo, foram então separadas e repetidas as reações, para excluir contaminação cruzada.

Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase seguiu, com algumas modificações, o método descrito por Saiki et al (1985), Shibata et al (1988) e Demmler et al (1988). Cada reação de amplificação continha de 0,5 a 1 µg do DNA a ser estudado, em volume total de 20 µl, contendo 50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris (pH8. 4), 2.5 mM de cloreto de magnésio, 0.1 mM de cada *primer* do CMV e da β-globina, 200 mM da mistura desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 2 unidades de Taq DNA polimerase. Foram completados 30-35 ciclos de amplificação para cada amostra. Os ciclos foram realizados em equipamento apropriado (PTC100, MJ Research, Inc).

A sequência dos *primers* utilizados para detecção do gene da β-globina foram:

Primer	Seqüência
PCO3	5'CTT CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3
PCO4	5'TCA CCA CCA ACT TCA TCC ACG TTC ACC 3

Quando se obtém a amplificação do gene da β-globina se comprova a integridade da amostra e se exclui a presença de inibidores da Taq DNA polimerase. Das 101 amostras, em 74 foi aplicada a técnica 1 para a extração do DNA no material parafinado e em 45 delas foi obtida a positividade para β globina. As 27 amostras restantes foram testadas com a Técnica 2 (o *kit* comercial), obtendo-se positividade para a β globina em 20 amostras. Vinte e duas amostras que haviam sido testadas com a Técnica 1 foram testadas novamente com a Técnica 2 e obtido positividade para a β globina em 12 amostras. Portanto, em 77 amostras foram observados fragmento de 110 pares de bases, correspondente ao gene da β-globina.

Método de diagnóstico pela “NESTED PCR” (N-PCR):

Iniciadores (*primers* externos): foram usados dois iniciadores que flanqueiam uma região constante do CMV.

Primer	Seqüência
MIE4	CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C
MIE5	CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTG G

N-PCR: uma alíquota de DNA amplificado na primeira reação foi reamplificado com o par de “primers” interno:

Primer	Seqüência
IE1	CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC
IE2	CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC

Em cada reação foi incluído um controle positivo com DNA CMV AD 169 e um controle negativo contendo água destilada. Após as reações de amplificação e re-amplificação, 5 µl do produto final foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio para visualização do fragmento em luz ultravioleta. Para controle interno da reação foi utilizado o gene da β -globina.

2.2.3- Técnica de imunohistoquímica

Cortes Histológicos: seções de 4 micrômetros (um) foram colocadas em lâminas previamente lavadas e desengorduradas, tratadas em solução de organosilano a 20% em acetona (3-Aminopropil-trietoxi-silano, SIGMA, código A3648, St. Louis, MA, USA). As lâminas com os cortes foram colocadas 1 hora à 110°C e a seguir utilizadas para o processamento imunohistoquímico.

Técnica da Imunohistoquímica (IHQ): foram utilizados anticorpos primários: os monoclonais ou policlonais e um coquetel de polímero marcado com peroxidase conjugado com imunoglobulina de cabra anticoelho e anticamundongo. A imunoglobulina se liga ao anticorpo primário formando um complexo entre os anticorpos primários, secundários e polímero. A evidenciação da peroxidase ocorre na reação com o agente cromógeno.

Desparafinação: Foi utilizado um banho de xilol a 110° C seguidos de 2 banhos de xilol a temperatura ambiente para retirar o excesso de parafina.

Hidratação: Foi realizada em gradiente decrescente de álcoois (três banhos de álcool absoluto, banho em álcool a 80% por dois minutos), álcool 50%. Seguiu-se lavagem em água corrente e passagem em água destilada.

Inibição da peroxidase endógena: Foi realizada por meio de 3 banhos de 3 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 10%, à temperatura ambiente, lavagem em água corrente e passagem por água destilada.

Desmascaramento de antígenos: Foi realizado mediante imersão das lâminas em cuba plástica apropriada para panela a vapor com 10mM, pH6. 0 durante 30 minutos. Após isso, deixado esfriar dentro da panela a vapor durante 15 a 20 minutos. Em seguida, foi realizada lavagem em H₂O corrente, passagem em H₂O destilada e deixado no tampão PBS durante 5 minutos.

Reação antígeno-anticorpo primário: Foram utilizados os anticorpos anti-citomegalovírus clone CCH2 (código M757, Dakocytomation, Carpinteria, CA, USA) e clone DDG9/CCH2 (Novocastra, Newcastle, UK). Foi então realizado incubação com anticorpo por 30 minutos em estufa a 37°C, após incubar overnight a 4°C em câmara úmida. Na manhã seguinte, retirou-se o excesso do anticorpo primário e foram feitas 3 lavagens em PBS de 5 minutos cada, à temperatura ambiente.

Reação com o anticorpo secundário: Foi dirigida contra o anticorpo secundário (cabra anticoelho e cabra anticomundongo) conjugados com estreptavidina peroxidase (LSAB, Dakocytomation) ou polímero conjugado à peroxidase (Novolink Max Polymer Deteccion, Novocastra) durante 1h em câmara úmida, à 37°C. Retirou-se o excesso e foram feitas 3 lavagens em PBS, 5 minutos cada, à temperatura ambiente.

Coloração: realizada com DAB (3,3 tetra-hidrocloreto de diamino-benzidina, código D5637, SIGMA), cromógeno de cor marrom impregnado no local onde ocorre reação: $H_2O_2 + \text{peroxidase} \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$. Preparo: 60mg (0,06g) de DAB em 100ml de tampão PBS e 500µl de peróxido de hidrogênio 30% e 1000µl DMSO (dimetilsulfoxido), a 37°C. A seguir foram feitas lavagem em água corrente e passagem em água destilada.

Contra-coloração: realizada com hematoxilina de Mayer, durante 1 minuto, à temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas lavagem em água corrente (devem ser colocadas algumas gotas de amoníaco na água para melhor evidenciar a contra-coloração e obter-se melhor contraste). Após a lavagem em água corrente, passou-se em água destilada.

Desidratação: Foi realizada mediante 3 passagens em álcool absoluto e passagens em 3 xilóis. Em seguida, montagem das lâminas com Entellan (Merck, cód. 7961).

Foram realizados controles positivo (Figura 1), constituído por um corte de tecido de um caso onde havia imunorreatividade comprovada para o CMV, e negativo (o mesmo corte histológico do controle positivo, omitindo-se o anticorpo primário) a cada reação. A reação positiva caracteriza-se pela imunomarcação preferencial no núcleo e citoplasma em tons marrons.

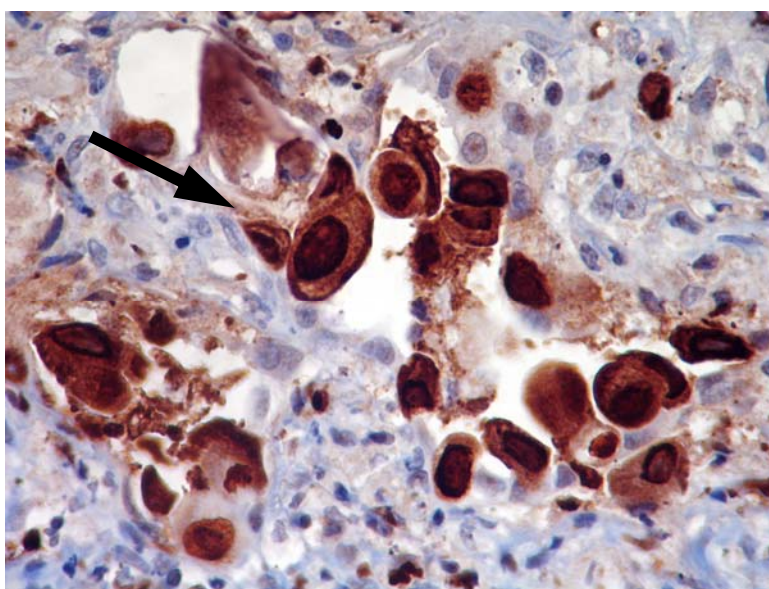


Figura 1- Corte histológico com reação IHQ positiva para o CMV, demonstrando a imunomarcação preferencial dos núcleos (coloração marrom) notando-se também partículas no citoplasma (640X).

2.2.4- Avaliação histológica

A análise histológica foi realizada por uma única patologista (Dra. Cecília A.F. Escanhoela) que não teve conhecimento a respeito do diagnóstico etiológico da colestase neonatal intra-hepática. Foi aplicado um protocolo para avaliação e graduação das possíveis alterações histológicas (Anexo 2 em Apêndices).

Foram avaliados 84 fragmentos de tecido hepático, dos quais 5 foram obtidos por procedimento cirúrgico e 79 por biópsia percutânea.

Foram considerados sugestivos para o diagnóstico histológico do CMV: a presença de células de inclusão citomegálica e a presença de pelo menos um microabscesso. Apenas foram considerados como positivos os microabscessos presentes em casos de biópsia percutânea, pois, na biópsia cirúrgica, pode haver falso positivo pelo processo inflamatório decorrente do próprio procedimento.

A Figura 2 mostra um exemplo da presença de células de inclusão citomegálica.

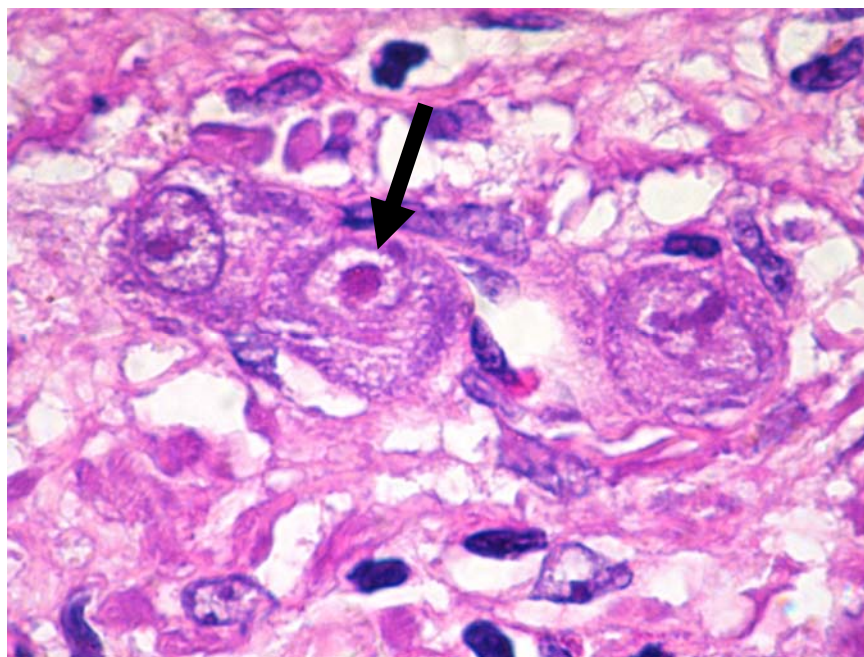


Figura 2 - Corte histológico em HE, mostrando célula de inclusão citomegálica (400X).

2.3- Análise estatística

A comparação dos grupos em relação aos métodos diagnósticos foi realizada pelo teste exato de Fisher (Siegel, 1975). O nível de significância adotado foi de 5%.

Para verificar a concordância entre os métodos PCR, IgM e Microabscesso, foi calculado o coeficiente de kappa (k). Esse coeficiente pode assumir valores de -1 a $+1$. Valores próximos de $+1$ indicam total concordância entre os métodos, enquanto que valores próximos de -1 indicam total discordância. Valores maiores que 0.75 representam ótima concordância e valores de kappa abaixo de 0.40 indicam uma fraca concordância. Os valores de kappa nesse intervalo (de 0.40 a 0.75) representam uma concordância intermediária (Conover, 1971).

Considerando o método de N-PCR no tecido como referência, foram calculados os valores de Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo (VP+), Valor Preditivo negativo (VP-) e Acurácia, de acordo com as seguintes definições:

- Sensibilidade: proporção dos indivíduos com a doença que tem um teste positivo para a mesma.
- Especificidade: proporção dos indivíduos sem a doença que tem um teste negativo.
- Acurácia: proporção de todos os resultados corretos do teste, tanto os positivos quanto os negativos.
- Valor Preditivo Positivo: probabilidade de doença em paciente com o resultado do teste positivo.
- Valor Preditivo Negativo: probabilidade de não ter a doença quando o resultado do teste é negativo.

O intervalo de confiança foi de 95%.

O programa computacional utilizado foi: The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 8.02. SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, USA.



3- RESULTADOS

A partir da ficha de coleta de dados, foram obtidas informações de 101 pacientes incluídos neste estudo.

Quatro pacientes evoluíram para óbito, sendo 3 do subgrupo 1B (2 com doença metabólica sem causa definida e biópsia mostrando intensa esteatose e 1 com Síndrome de Alagille) e 1 paciente do grupo 2 (etiologia idiopática). A necropsia deste último paciente mostrou necrose hepatocelular intensa. Apresentava também sorologia positiva para o vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV) e a pesquisa do HIV no tecido hepático pela técnica da PCR foi negativa.

Os resultados individuais das características clínicas e os exames laboratoriais obtidos dos 101 pacientes na primeira avaliação nos serviços de referência são apresentados na íntegra respectivamente nas Tabelas 1 e 2 em Apêndices.

Na Tabela 3 em Apêndices, são apresentadas as avaliações das características clínicas obtidas na primeira consulta (gênero, idade, peso ao nascimento, peso na primeira consulta, estatura ao nascimento, icterícia, acolia ou hipocolia, colúria, hepatomegalia e esplenomegalia) dos subgrupos 1A, 1B e do Grupo 2.

A Tabela 4 (Apêndices) mostra os resultados dos seguintes exames laboratoriais realizados no início da investigação: ALT, AST, FA, GGT, bilirrubina direta, albumina e INR.

A causa da CIH não foi estabelecida em 56% dos casos.

Os 7 casos com diagnósticos previamente estabelecidos de CIH pelo CMV estão apresentados na Tabela 5 em Apêndices. O tratamento com ganciclovir foi realizado em 2 casos: um apresentado na Tabela 5 em Apêndices (caso n°. 5) e um caso que foi inicialmente tratado com ganciclovir, mas posteriormente foi diagnosticado como deficiência de alfa-1-antitripsina.

A mediana da idade na primeira consulta foi de 1 mês e 21 dias (variou entre 13 dias a 7 meses). A mediana da idade na ocasião da biópsia foi de 2 meses e 14 dias (variou de 13 dias a 9 meses e 5 dias).

As análises estatísticas das variáveis N-PCR positiva e microabscesso presente não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos 1 A, 1B e Grupo 2 ($p>0,05$) pelo teste exato de Fisher. A sorologia IgM foi excluída da análise. A pesquisa de célula de inclusão citomegálica foi excluída da análise por não apresentar nenhum resultado positivo. A IHQ foi excluída da análise por apresentar apenas 1 exame positivo. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6– Resultados dos exames obtidos na pesquisa do CMV: sorologia para o CMV (IgM-CMV) positivo, N-PCR, IHQ e revisão da histologia (presença de células de inclusão citomegálica e microabscesso). Os números de exames realizados em cada grupo são apresentados entre parênteses. As variáveis N-PCR positiva e microabscesso presente são avaliadas entre os grupos pelo teste exato de Fisher.

Exames laboratoriais	Subgrupo1A	Subgrupo1B	Grupo 2	Total	p
IgM –CMV positivo	4 (15)	1 (12)	0 (35)	62	
N-PCR positiva	1 (20)	2 (16)	3 (41)	77	0,73*
Imunohistoquímica positiva	0(11)	1(9)	0 (24)	44	
Microabscesso presente	5 (18)	4 (16)	8 (50)	84	0,45*
Célula de inclusão citomegálica presente	0 (18)	0 (16)	0 (50)	84	

*Teste exato de Fisher

Dos 101 pacientes, 62 realizaram sorologia IgM-CMV por meio do teste ELISA no HC-UNICAMP e no Icr-USP e somente esses foram considerados na avaliação sorológica. Observou-se 5 casos positivos, sendo 4 no subgrupo 1A e 1 no subgrupo 1B. A mediana da idade na época da coleta da sorologia foi de 2 meses e 10 dias (variou de 2 dias de vida a 24 meses).

No teste da N-PCR da biópsia parafinada, o resultado foi inconclusivo em 24 (não houve positividade para reação da β globina). Dessa forma, somente puderam ser avaliadas 77 amostras, sendo o resultado positivo em 6 e negativo em 71.

As Figuras 3 e 4 são fotos da eletroforese em gel de agarose, com visualização em luz ultravioleta do fragmento da biópsia hepática na reação β -globina (Figura 1) e na reação da N-PCR-CMV (Figura 2).

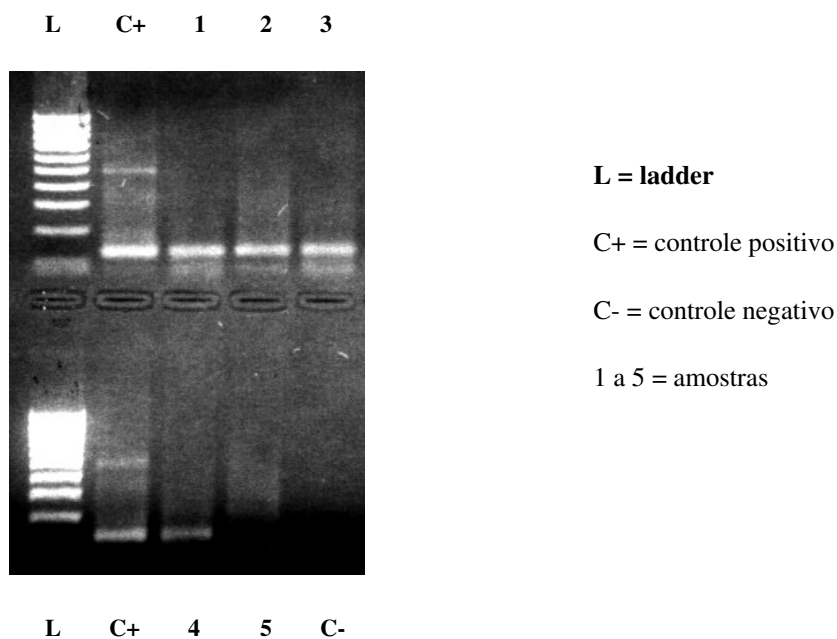


Figura 3- Foto do resultado da β -globina na eletroforese em gel de agarose, com visualização do fragmento em luz ultravioleta, positiva nas amostras de biópsia hepática 1, 2, 3 e 4.

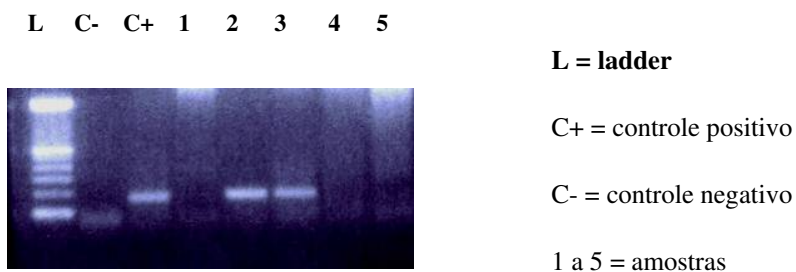


Figura 4 - Foto do resultado da N-PCR na eletroforese em gel de agarose, com visualização do fragmento em luz ultravioleta, positiva nas amostras de biópsia hepática 2 e 3.

No teste da IHQ não se obteve positividade em nenhum caso utilizando inicialmente o anticorpo CCH2 (Dako) em 59 amostras. Posteriormente, empregou-se o anticorpo clone DDG9/CCH2 (Novocastra) e obteve-se positividade em 1 de 44 amostras.

A Figura 5 mostra a foto da lâmina da imunohistoquímica, em que houve imunomarcagem em tons marrons, principalmente dos núcleos, no único caso em que houve positividade do teste.

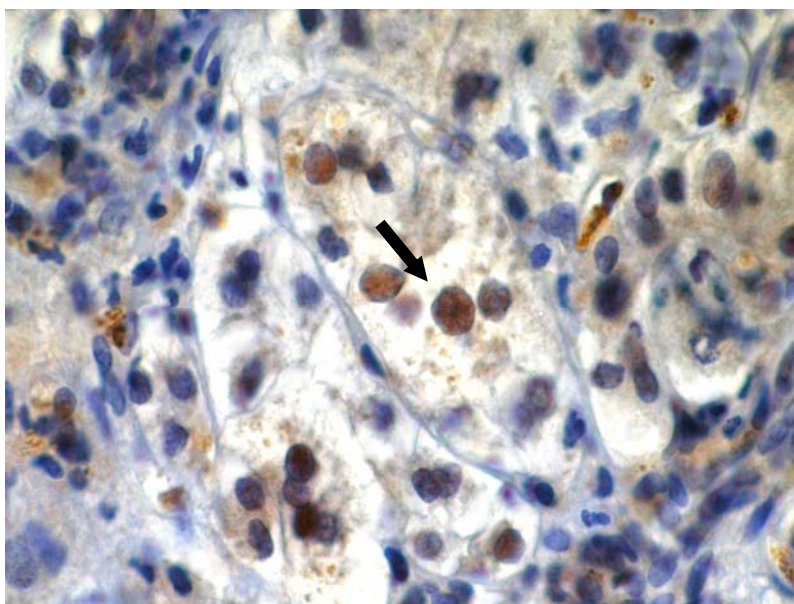


Figura 5– Corte histológico com reação IHQ positiva para o CMV, demonstrando a imunomarcagem preferencial dos núcleos em coloração marrom (640X).

Na revisão histológica, baseada nas variáveis listadas no Anexo 2 em Apêndices, considerou-se como sugestivo do CMV a presença de microabscessos (presentes em 17/84 amostras), e as células de inclusão citomegálica (0/84).

A Figura 6 mostra corte histológico com a presença de microabscesso, representado por pequeno agrupamento de neutrófilos e eosinófilos.

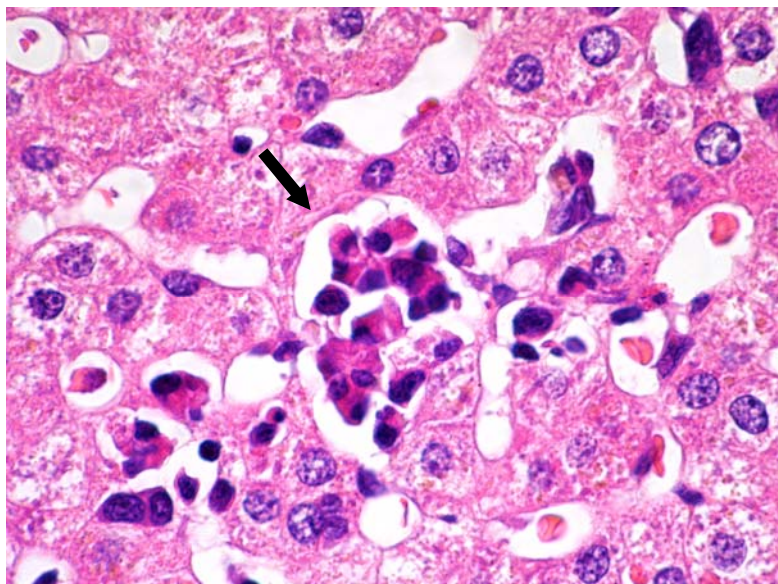


Figura 6– Microabscesso: necrose focal de hepatócitos, com agrupamentos de polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos (HE-400X).

A Tabela 7 apresenta a quantidade de casos nos quais foram executados os diferentes exames para pesquisa de citomegalovírus. Os 4 exames (IgM-CMV, N-PCR, IHQ e revisão da histologia) foram realizados em 26 casos, 3 exames foram realizados em 31 casos, 2 exames foram realizados em 26 casos e apenas 1 exame em 18 casos. Os resultados individuais dos exames de todos os pacientes são apresentados na Tabela 8 em Apêndices.

Tabela 7 - Número casos em que foram realizados os exames laboratoriais de sorologia IgM-CMV, N-PCR, revisão histológica e IHQ para pesquisa de citomegalovírus.

<i>Exame</i>	<i>N</i>
IgM-CMV	5
N-PCR	5
revisão histológica	6
IHQ	2
IgM-CMV+N-PCR	2
IgM-CMV+ revisão histológica	6
IgM-CMV+IHQ	0
N-PCR+ revisão histológica	13
N-PCR+IHQ	2
revisão histológica +IHQ	3
IgM-CMV+N-PCR+ revisão histológica	20
IgM-CMV+N-PCR+ IHQ	1
IgM-CMV+ revisão histológica +IHQ	2
N-PCR+ revisão histológica +IHQ	8
IgM-CMV+NPCR+ revisão histológica +IHQ	26

As Tabelas 9, 10, 11, 12, 13 e 14 apresentam os resultados obtidos pelos diferentes métodos diagnósticos e os testes de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VP+), valor preditivo negativo (VP-) e acurácia de cada método considerando como referência o método N-PCR.

Tabela 9- Resultados obtidos por meio dos métodos N-PCR e sorologia IgM-CMV e o número de amostras em que foram realizados.

<i>N-PCR</i> <i>IgM-CMV</i>			
	+	-	Total
+	0	5	5
-	4	40	44
Total	4	45	49

Tabelas 10 - Cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VP+), valor preditivo negativo (VP-) e acurácia, utilizando-se a comparação entre os métodos N-PCR e IgM-CMV, com intervalo de confiança (IC) inferior e superior de 95%.

	<i>IC (95%)</i>	
Sensibilidade	0,00	0,00; 60,42.
Especificidade	88,89	75,15; 95,84
VP+	0,00	0,00; 53,71
VP-	90,91	77,42; 97,05
Acurácia	81,63	67,50; 90,76

Tabela 11 - Resultados obtidos através dos métodos N-PCR e a pesquisa de microabscesso e o número de amostras em que foram realizados.

Microabscesso \ N-PCR	N-PCR		Total
	+	-	
+	3	14	17
-	3	47	50
Total	6	61	67

Tabela 12 - Cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VP+), valor preditivo negativo (VP-) e acurácia, utilizando-se a comparação entre os métodos N-PCR e a pesquisa de microabscesso, com intervalo de confiança (IC) inferior e superior de 95%.

		<i>IC (95%)</i>
Sensibilidade	50,00	13,95; 86,05
Especificidade	77,05	64,20; 86,46
VP+	17,65	4,67; 44,20
VP-	94,00	82,46; 98,44
Acurácia	74,63	62,27; 84,12

Tabela 13 - Resultados obtidos através dos métodos N-PCR e a associação dos métodos de pesquisa de microabscesso e sorologia IgM-CMV e o número de amostras em que foram realizados.

		<i>N-PCR</i>		Total
		+	-	
Microabscesso e IgM-CMV	+	3	17	20
	-	1	28	29
	Total	4	45	49

Tabela 14 - Cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VP+), valor preditivo negativo (VP-) e acurácia, utilizando-se a comparação entre os métodos N-PCR e a associação dos resultados dos métodos sorologia IgM-CMV e pesquisa de microabscesso, com intervalo de confiança (IC inferior) e superior de 95%.

		<i>IC (95%)</i>
Sensibilidade	75,00	21,94; 98,68
Especificidade	62,22	46,54; 75,84
VP+	15,00	3,96; 38,86
VP-	96,55	80,37; 99,82
Acurácia	63,27	48,25; 76,21

Para verificar a concordância entre os métodos PCR, IgM-CMV e microabscesso, foi calculado o coeficiente de kappa (k), conforme demonstrado na Tabela 15.

Tabela 15 - Avaliação da concordância entre os métodos diagnósticos, através do cálculo do coeficiente de kappa (k).

Métodos	k	Conclusão
IgM-CMV/ N-PCR	-0,10	Discordância
IgM-CMV / Microabscesso	0,11	Concordância fraca
N-PCR / Microabscesso	0,15	Concordância fraca
N-PCR/ Microabscesso / IgM-CMV	0,13	Concordância fraca
Microabscesso / N-PCR/ IgM-CMV	0,20	Concordância fraca
IgM-CMV / N-PCR/ Microabscesso	0,07	Concordância fraca

A Tabela 16 apresenta as características dos casos que apresentaram a pesquisa com a N-PCR positiva para o CMV.

Tabela 16 – Características dos casos de colestase intra-hepática com N-PCR positiva no tecido hepático para o CMV, mostrando o gênero, diagnóstico inicial, peso ao nascimento, resultado da sorologia IgM-CMV, IHQ e presença ou ausência de microabscesso.

Caso	Sexo	Diagnóstico inicial	Peso de Nascimento	IgM-CMV	IHQ	Microabscesso
1	M	Fibrose Cística*	3460g	NR	NR	Ausente
2	F	Idiopática	2500g	Negativa	Negativa	Presente
3	M	D.Byler **	3320g	NR	Positiva	Ausente
4	M	Idiopática	2700g	Negativa	NR	Ausente
5	F	Idiopática	1500g	Negativa	Negativa	Presente
6	M	Sepse neonatal	2570g	Negativa	NR	Presente

NR = não realizado

Obs: * O caso 1 apresentava na época da biópsia PCR+ e antigenemia + (12) para o CMV. A sorologia para CMV (IgM e IgG positivas) foi realizada em outro serviço, por isso não foi considerada aqui. ** O caso 3 foi o único paciente cuja imunohistoquímica foi positiva para o CMV.



4- DISCUSSÃO

A colestase neonatal é uma síndrome que desafia o médico do ponto de vista do diagnóstico etiológico. É sempre considerada patológica e exige uma rápida investigação (Silveira e Pires, 1991; Hessel e Sawamura, 2001; Moyer et al., 2004).

A frequência na população é de difícil avaliação. Na literatura, obtêm-se relatos de incidências em nascidos vivos de 1/2500 (Dick e Mowat, 1985), 1/5000 (Danks et al., 1977) e 1/9000 (Henriksen et al., 1982). O foco na abordagem inicial é a diferenciação entre colestase intra-hepática (CIH) e extra-hepática e pode ser realizada em 90% a 95% dos casos por meio de diversos métodos diagnósticos (Moyer et al., 2004).

A CIH representa cerca de 2/3 de todos os casos de colestase neonatal (Eliot et al., 1977; Dick e Mowat, 1985; Dellert e Balistreri, 2000; Fischler et al., 2001; Yaccha e Sharma, 2005). Uma vez estabelecido que a colestase é de natureza intra-hepática, passa-se para um novo desafio que é estabelecer o diagnóstico etiológico. Na classificação proposta por Dellert e Balistreri (2000), há cerca de 40 possíveis etiologias para a CIH. Apesar disso, uma boa porcentagem dos casos permanece como etiologia não determinada.

Balistreri (1985) afirma que, para que seja firmado o diagnóstico de CIH idiopática, é necessário que tenham sido investigadas todas as causas possíveis com os métodos diagnósticos disponíveis. Com maior disponibilização e acurácia dos métodos diagnósticos, é possível a redução do percentual de CIH de causa não-determinada. No presente estudo, 3 dos 6 pacientes com N-PCR positiva para CMV, tiveram diagnóstico prévio de CIH de causa não determinada.

Assim como já descrito, o segundo grupo etiológico em frequência foi o das causas infecciosas, encontrado em 24 dos 45 casos com etiologia definida (53%), semelhante ao descrito por Danks et al. (1977). Desses 24 casos, 9 foram atribuídos a seps neonatal. A colestase também pode estar relacionada à asfixia neonatal e outras intercorrências neonatais, associadas à imaturidade da secreção biliar (Vajro et al., 1997; Jacquemim et al., 1998).

Tiker et al. (2006) estudaram 42 bebês com aumento de bilirrubina conjugada admitidos em unidade de terapia intensiva neonatal antes de 1 mês de idade. Em 15 casos havia cultura positiva, em 10 deles foi identificado *Escherichia coli*, que foi considerado o agente causal da colestase neonatal. No presente estudo, os pacientes vieram encaminhados para investigação em ambulatório especializado, o que pode justificar as diferenças entre as casuísticas.

Entre os agentes infecciosos virais pesquisados, na presente casuística, predominou o CMV com frequências que variaram de 2% a 20% em função do método diagnóstico empregado. Na literatura, essas frequências variam de 5% a 46%, também relacionadas com diferentes metodologias utilizadas na investigação do CMV na CIH (Eliot et al., 1977; Danks et al., 1977; Chang et al., 1992, Zerbini et al. 1997).

A prova da infecção congênita requer a cultura positiva do vírus obtida até 3 semanas de vida. A detecção após essa idade pode indicar tanto infecção intra-uterina quanto adquirida (American Academy of Pediatrics, 2003). Yamamoto et al. (1999), estudando a prevalência da infecção congênita por CMV em Ribeirão Preto (SP), obtiveram uma positividade em recém-nascidos de 5 casos em 189 (2,6%), empregando como método o isolamento viral em urina através da inoculação em cultura de fibroblastos humanos.

O diagnóstico de hepatite neonatal por CMV habitualmente é feito em bases clínicas e com resultado de sorologia IgM positivo, porém apenas 30% a 89% das crianças sabidamente infectadas intra-útero apresentarão anticorpos IgM anti-CMV ao nascimento (Demmler, 1996). Na revisão dos prontuários, foram anotados 7 casos atribuídos ao CMV entre os 101 selecionados (Tabela 7). Observa-se que, em um dos casos, há resultado positivo de sorologia apenas da fração IgG (ELISA) e outro com positividade na reação de fixação do complemento, um teste pouco sensível (American Academy of Pediatrics, 2003). Na época eram os exames disponíveis. Dessa forma, por um lado, poderia haver superestimação do diagnóstico do citomegalovírus como agente etiológico da colestase intra-hepática. Por outro lado, poderia haver subestimação pela falta de outros exames mais sensíveis e mais específicos.

Na presente casuística, a frequência de positividade para o CMV por meio da técnica sorológica ELISA-IgM foi de 8%. Fischler et al. (1998) encontraram uma alta frequência de infecção pelo CMV em pacientes suecos com colestase neonatal intra-hepática, que apresentavam IgM-CMV positivo em 11/38 pacientes (28,9%) comparados com IgM-CMV positivo em 2 de 35 controles (6%). Em outro estudo, o mesmo grupo estudou os fatores etiológicos implicados na colestase neonatal intra-hepática e obtiveram positividade para CMV, por meio de sorologia e/ou isolamento do vírus em amostra de urina, em 19/54 pacientes (35%). Observou-se que 4 de 11 pacientes portadores de deficiência de alfa-1-antitripsina apresentavam resultado positivo para infecção pelo CMV. Os autores sugerem, para esses casos, o termo colestase neonatal associada ao CMV até que o real papel do CMV na colestase neonatal seja esclarecido (Lai et al., 1992).

A frequência de positividade do CMV através da N-PCR no tecido hepático foi de 8% (6 positivos, 71 negativos). Seis pacientes apresentaram N-PCR positivo: 3 de causa não determinada, 1 com fibrose cística, 1 com doença de Byler e 1 com sepse neonatal. Uma variedade de condições pode ocorrer em pacientes com infecção congênita pelo CMV e algumas delas podem refletir condições coincidentes. Pacientes com outras doenças como hérnia inguinal, alterações músculo-esqueléticas, toxoplasmose, sífilis, herpes vírus, HIV podem também ter exames positivos que indicam infecção pelo CMV, assim como pacientes com doenças metabólicas, tornando difícil a diferenciação do que realmente é causado pelo CMV (Bale, 1994; Demmler, 1996).

A comparação desses dados é dificultada pela escassez de estudos semelhantes na literatura e pelas diferenças entre as investigações em relação ao tipo de material no qual o método de PCR foi pesquisado (tecido, sangue e urina), à idade na ocasião da biópsia, à apresentação clínica e à prevalência do CMV nas populações estudadas (Chang et al., 1992; Fischler et al., 1999; Shibata et al., 2005).

No estudo de Chang et al. (1992), encontrou-se PCR positivo para CMV no tecido hepático em 23 de 50 crianças com diagnóstico de hepatite neonatal e em nenhum tecido hepático de 30 pacientes sem colestase. Dos 23 positivos, 19 tinham evidências clínicas sugestivas de CMV, 13 tinham sorologia sugestiva de infecção aguda, 9 apresentaram sorologia negativa e em 1 caso, a

sorologia era desconhecida. Entre os 27 pacientes com PCR negativo, 21 tinham sorologias negativas e 6 eram positivas. A mediana da idade na ocasião da biópsia foi de 2 meses e 3 dias.

Uma análise retrospectiva de 39 pacientes avaliou a presença do CMV através da PCR-CMV em papel de filtro coletados com 3 dias de vida. Os pacientes apresentavam diagnóstico de hepatite neonatal associada ao CMV, diagnosticados em cultura de sangue ou urina ou pela positividade da PCR-CMV no fígado (16 com CEH e 23 CIH), coletados entre 30 e 220 dias de vida. A maior parte desses pacientes (37/39) não apresentou viremia ao nascimento, indicando que a infecção foi adquirida (Fischler et al., 1999).

Shibata et al. (2005) avaliaram 26 crianças não-colestáticas, de 1 a 24 meses, que apresentavam evidências de lesão hepato-celular (definida como elevação da ALT acima do percentil 97,5) através da detecção da carga viral do CMV e de outros vírus que poderiam estar implicados na gênese da hepatite, por meio da técnica do PCR quantitativo (PCR *real time*) no plasma. Foi encontrada positividade para o CMV em 4 pacientes (15,4%) e em nenhum dos controles. Três pacientes que apresentaram IgM-CMV positivo não apresentaram PCR positivo. Contudo, nem todos os casos puderam ser atribuídos à infecção congênita devido à idade dos pacientes.

Os estudos de Chang et al.(1992), Fischler et al. (1999) e Shibata et al. (2005) foram realizados em áreas consideradas de baixa prevalência do CMV (Shen et al, 1992; American Academy of Pediatrics, 2003). No Brasil, a infecção pelo CMV é altamente prevalente na população e ocorre precocemente já no primeiro ano de vida (Yamamoto et al., 1999; Santos et al., 2000; Almeida et al., 2001). Em populações em que a maioria das mulheres em idade reprodutiva tem anticorpos contra o CMV, há uma maior taxa de infecção congênita (quando comparados a populações com baixa prevalência de anticorpos contra o CMV) mas não de doença clínica. Embora a presença do anticorpo materno não previna a transmissão do CMV, parece proteger ou então pode ser um marcador de outro fator que protege o feto (Fowler et al., 1992). Portanto, apesar de haver maior prevalência de infecção congênita na população brasileira, na maior parte dos casos não se trata de infecção materna primária, o que determina menor número casos com doença clínica, o que pode explicar a diferença da presente casuística e os estudos citados.

A associação do CMV com anormalidades histológicas no tecido hepático pode ser estabelecida em infecções congênitas e adquiridas (Kosai et al, 1991). Não foi detectado no presente trabalho nenhum caso que apresentasse inclusão citomegálica na revisão da microscopia óptica, assim como observado também em casos de CEH (Tarr et al., 1996; Jevon e Dimmick, 1999; De Tommaso et al., 2005). Lurie et al. (1987) estudando 4 casos fatais de hepatite neonatal por CMV, descrevem a presença de células de inclusão citomegálica em tecido hepático em 2 casos.

Como deve haver pouca replicação viral no fígado, principalmente ao se considerar que não se trata de um paciente imunossuprimido, a procura por microabscessos e a IHQ foram utilizadas na tentativa de evidenciar a presença do vírus no tecido hepático (Thung e Gerber, 1995; Mac Donald et al, 1997; Magalhães et al. 2001). Geralmente a IHQ não é positiva se não houver célula de inclusão citomegálica na microscopia óptica (Lucas, 2002). Porém, no presente trabalho, mesmo com a ausência de inclusão citomegálica, foi possível a detecção em apenas um caso, que também apresentava N-PCR positiva.

Rimza et al. (1996) estudaram os métodos de IHQ e hibridização *in situ* (HIS) em tecidos parafinados de autópsia de pacientes com diagnóstico de infecção pelo CMV, observaram excelente correlação com os achados histológicos de inclusão viral. Em pacientes que tiveram cultura positiva para o CMV, porém na ausência de inclusão viral, mostrou uma reatividade da IHQ de 60%, com boa correlação com a HIS. Em uma avaliação entre histologia, IHS e IHQ, Niedobitek et al. (1988), estudando pacientes imunossuprimidos, demonstraram que a detecção das células infectadas pelo CMV é mais fácil e o número de células infectadas é maior na IHQ e na HIS que nos achados histológicos. Na presente casuística, essas informações não foram reproduzidas. A IHQ não se mostrou um bom exame no diagnóstico da infecção pelo CMV na colestase neonatal.

Em relação aos microabscessos, na presente casuística observou-se a presença em 17 de 84 biópsias. Na literatura, esse achado é descrito como sugestivo da infecção por CMV, principalmente em pacientes imunossuprimidos (Thung e Gerber, 1995; Mac Donald et al., 1997; Seehofer et al., 2002). Infelizmente, não há na literatura avaliação dessas variáveis histológicas em pacientes com colestase neonatal intra-hepática.

Poucos estudos têm sido realizados comparando os diferentes métodos de diagnóstico da infecção pelo CMV na colestase neonatal intra-hepática. Embora a frequência de diagnóstico de infecção pelo CMV pelo método de sorologia e N-PCR seja a mesma (8%), há completa discordância entre os métodos. Quando se comparam os outros métodos, observa-se fraca correlação.

O método considerado padrão-ouro no diagnóstico de infecção congênita por CMV é a cultura do vírus na urina nas primeiras três semanas de vida (American Academy of Pediatrics, 2003). O vírus geralmente está presente na urina e o isolamento viral em cultura de fibroblastos humanos é o método convencional e as culturas são comumente positivas após três a cinco dias. A PCR na urina nas 3 primeiras semanas de vida apresenta resultados equivalentes (Yamamoto et al., 1998). Infelizmente, a idade em que os pacientes com CIH neonatal foram referidos aos centros de investigação terciários inviabilizou a realização desses métodos (mediana de 1 mês e 21 dias).

Tendo em vista a falta de um padrão-ouro e considerando os trabalhos na literatura que correlacionam de forma positiva a pesquisa do vírus na urina por cultura com o PCR no sangue, optou-se em adotar a pesquisa do PCR no tecido como padrão de referência (Nelson et al., 1995; Yamamoto et al., 1998). Também, a presença do vírus no órgão alvo pode representar uma evidência de que a doença é causada por esse vírus (Chang et al., 1992).

A pesquisa do CMV em tecido conservado em parafina em amostras mais antigas requer o uso de *primers* que gerem produtos com menor número de pares de bases, como o utilizado neste estudo (Greer et al., 1991). De acordo com alguns autores, é considerado mais sensível que a histologia (Rogers et al., 1990) ou testes sorológicos (Dries et al., 1999).

É preciso destacar que pode haver falsos positivos na PCR por contaminação com material de DNA fragmentado. Para se evitar a contaminação do material fragmentado utilizou-se a técnica Nested (N-PCR), que amplifica o DNA alvo em duas etapas: na primeira, um par de *primers* é usado para gerar uma sequência longa que contém a sequência do DNA alvo. Uma pequena amostra desse produto é utilizada numa segunda

etapa de amplificação, com os *primers* do DNA alvo final. A eficiência da segunda amplificação é aumentada por causa da desnaturação mais rápida e mais completa dos produtos da primeira reação, quando comparados com o genoma total. Dessa forma, o método utilizado no presente trabalho evitaria os resultados falso-positivos (Porter-Jordan et al., 1990).

Quando se compara o resultado da sorologia com o resultado do PCR no tecido hepático, observa-se uma sensibilidade nula, um valor preditivo positivo nulo e uma acurácia baixa (Tabela 11). De fato, vários trabalhos apresentam resultados mostrando que a sorologia tem valor limitado no diagnóstico de infecção por CMV na faixa etária pediátrica (Chang et al, 1992; Nelson et al., 1995; Fischler et al., 1998; Shibata et al., 2005). Nelson et al. (1995) compararam a sorologia (IgM-CMV) com a cultura de urina em crianças com infecção congênita e obtiveram sensibilidade da sorologia de 22%.

Os resultados indicam, nessa casuística e considerando como referência a pesquisa de CMV no tecido por PCR, que um resultado positivo de sorologia não significa que o paciente tenha hepatite por CMV, resultado equivalente foi obtido por Fischler et al, 2001, os quais encontraram 4 pacientes com diagnóstico de deficiência de alfa-1-antitripsina em 11 pacientes com o diagnóstico de CMV.

Habitualmente, os pacientes com colestase neonatal são inicialmente atendidos em ambulatórios de serviços secundários e as sorologias são frequentemente solicitadas na investigação de um diagnóstico etiológico. Há necessidade de uma análise crítica dos resultados porque a positividade da sorologia (IgM) não indica necessariamente que o paciente apresenta CIH pois há associação de CMV com atresia biliar em um percentual significativo de casos (Chang et al. 1992, Fischler et al, 2001; De Tommaso et al, 2005) e, também, a positividade não deve excluir a investigação de outras etiologias de colestase intra-hepática. Por outro lado, o valor preditivo negativo foi alto indicando que tem maior valor prático um resultado negativo do que positivo. Mesmo nessa situação, em um percentual pequeno de casos, a sorologia (IgM) foi negativa e o paciente apresentava N-PCR positivo no tecido. Uma explicação para essa discordância é de que os pacientes podem ainda não produzir quantidades adequadas de anticorpo devido à imaturidade do sistema imune e também resultados falsos negativos de IgM fetal por competição

com os altos níveis de IgG materna decorrentes da passagem transplacentária (Stagno, 1985; Demmler, 1996).

Quando se compara o resultado da presença de microabscesso com o resultado da N-PCR, observa-se também baixa sensibilidade (50%), baixo valor preditivo positivo (17%) e alto valor preditivo negativo (94%). Na tentativa de melhorar esses índices, procurou-se comparar o método de referência com a presença de microabscesso e/ou sorologia (IgM). Houve pouca mudança nos resultados, permanecendo como significativo o valor preditivo negativo alto (96%). Dessa forma, quando esses 2 métodos são associados, o valor preditivo negativo é alto, indicando que quando esses 2 exames são negativos, é provável que o PCR no tecido também seja.

Na última década, alguns trabalhos têm sido publicados relacionados com o tratamento da infecção neonatal por CMV. Inicialmente foi avaliado apenas em lactentes com evidência de envolvimento do SNC (Whitley et al., 1997, Kimberlin et al., 2003, Michaels et al., 2003) e, mais recentemente, mesmo em pacientes apenas com comprometimento hepático (Fischeler et al., 2002, Libereck et al., 2002, Vancinková et al., 2004). É interessante essa última referência, na qual, no título, os pesquisadores perguntam: tratar ou não tratar a hepatite por citomegalovírus? Em vista dos resultados do presente estudo, há questionamentos anteriores: como diagnosticar, de forma acurada, a hepatite por citomegalovírus? Outra questão pertinente foi feita no editorial de Persing e Rakela (1992), comentando o artigo de Chang et al. (1992): “Quando a detecção de um agente infeccioso se torna inequivocamente o agente etiológico de uma condição específica?”.

Em conclusão, a frequência do CMV na CIH neonatal é variável dependente dos métodos diagnósticos utilizados e eles não são concordantes. Há necessidade de estudos prospectivos de investigação, de preferência com pacientes nas três primeiras semanas de vida para se estabelecer a real frequência do CMV nessa síndrome e poder focar metas em relação à terapêutica e evolução desses pacientes.



5- CONCLUSÃO

1. A frequência de positividade para o citomegalovírus na CIH por meio da sorologia IgM pela técnica de ELISA foi de 8% (5/62), por meio da técnica da N-PCR na biópsia hepática foi de 8% (6/77) e pela imunohistoquímica foi de 2% (1/44). Pela avaliação histológica, nenhum em 84 pacientes apresentava células de inclusão citomegálica e 17/84 (20%) apresentavam microabscesso.
2. Não houve concordância para a pesquisa de CMV entre os métodos de sorologia (IgM) e N-PCR e fraca concordância entre os demais métodos isolados ou agrupados.
3. Não foram encontradas células de inclusão citomegálica e a imunohistoquímica foi positiva em apenas 1/44 casos.
4. A sorologia (ELISA-IgM) e a presença de microabscessos não foram sensíveis para a determinação da CIH pelo CMV, mas foram úteis como valores preditivos negativos.



6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTAS S, DINIZ G, ORTAC R. Quantitative analysis of ducts proliferation, proliferative activity, Kupffer cell proliferation and angiogenesis in differential diagnosis of biliary atresia and neonatal hepatitis. *Hepatogastroenterology* 2003; 50(54):1811-3.

ALMEIDA LNB, AZEVEDO RS, AMAKUB M, MASSAD E. Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community of Sao Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pública* 2001; 35(2):124-9.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Cytomegalovirus infection. In: Pickering LK. *Redbook 2003: report of the Committee on Infectious Diseases*. 26th edition. Elk Grove Village (IL): American Academy of Pediatrics; 2003. p. 259–62.

AMORIM ML, CABEDA JM, SECA R, MENDES AC, CASTRO AP, AMORIM JM. CMV infection of liver transplant recipients: comparison of antigenemia and molecular biology assays. *BMC Infectious Diseases* 2001 1:2 <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/1/2>.

BALE J. Conditions mimicking congenital infections. *Semin Neurol* 1994; 1:63-70

BALISTRERI WF, HEUBI JE, SUCHY FJ. Immaturity of the enterohepatic circulation in early life: factors predisposing to ‘physiologic’ maldigestion and cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nut* 1983; 18: 346-54.

BALISTRERI WF. Neonatal cholestasis: medical progress. *Journal of Pediatrics* 1985; 106: 171-84. .

BALISTRERI WF. Inborn errors of bile acid biosynthesis and transport: novel forms of metabolic liver disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28: 145–72.

BEZERRA J. Colestase neonatal. In: Ferreira CT, Carvalho E, Silva LR. *Gastroenterologia e hepatologia em pediatria*. Rio de Janeiro São Paulo Belo Horizonte: Medsi; 2003. p. 582-97.

BOPPANA SB, FOWLER KB, BRITT WJ, STAGNO S, PASS RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* 1999; 104: 55-60.

BOPPANA SB, RIVERA LB, FOWLER KB BRITT WJ, STAGNO S, PASS RF. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* 2001; 344:1366-71.

BORDILS A, PLUMED JS, RAMOS D, BENEYTO I, MASCAROS V, MOLINA JM, et al. Comparison of quantitative PCR and antigenemia in cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37(9):3756-9.

CANTO CLM, GRANATO CFH, GARCEZ E, VILLAS BOAS LS, FINK MCDS, ESTEVAM MP et al. Cytomegalovirus infection in children with Down syndrome in a day-care center in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2000; 42(4): 179-83.

CAPPEL R., CUYPER F, BRAEKELEER J. Rapid detection of IgG and IgM antibodies for cytomegalovirus by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Arch Virol* 1978; 58:253-8.

CHANG MH, HUANG HH, HUANG ES, KAO CL, HSU HY, LEE CY. Polymerase chain reaction to detect human cytomegalovirus in livers of infants with neonatal hepatitis. *Gastroenterology* 1992; 103(3):1022-5.

CHEN YT, MERCER GO, CHEIGH JS, MOURADIAN JA. Cytomegalovirus infection of renal allografts. *Transplantation* 1992; 53(1):99-102.

CONOVER WJ. *Practical Nonparametric Statistics*. New York: John Wiley & Sons; 1971. P.1-462.

COSTA FF, COSTA SCB. Reação em cadeia da polimerase (PCR): princípios e aplicações clínicas. *Rev Bras Reumatol* 1992; 32 (3): 142-6.

COSTA SCB. Infecção por citomegalovírus (CMV): epidemiologia, diagnóstico e tratamento. *Rev Bras Clin Terap* 1999; 25 (1):18-28.

DANKS DM. Studies of the etiology of neonatal hepatitis and biliary atresia. Arch Dis Child 1977; 52: 360-7.

DE TOMMASO AMA, ANDRADE PD , COSTA SCB, ESCANHOELA CAF, HESSEL G. High frequency of human cytomegalovirus DNA in the liver of infants with extrahepatic neonatal cholestasis. BMC Infectious Diseases 2005, 5:108. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/5/108>.

DEMMLER GJ. Congenital cytomegalovirus infection and disease. Adv Pediatr Infect Dis 1996; 11:135-62.

DEMMLER GJ, BUFFONE GJ, SCHIMBOR CM, MAY RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. J Infect Dis 1988; 158: 1177-84.

DELLERT SF, BALISTRERI WF. Neonatal cholestasis. In: Walker WA, Durie PR, Hamilton JR, Walker-Smith JA, Watkins JB. Pediatric Gastrointestinal Disease 3^a edition. Canada: B.C. Decker; 2000. P.880-94.

DICK MC, MOWAT AP. Hepatitis syndrome in infancy: an epidemiology survey with 10-year follow up. Arch Dis Child 1985; 60: 512-6.

DOMIAT-SAAD R, DAWSON DB, MARGRAF LR, FINEGOLD MJ, WEINBERG AG, ROGERS BB. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6, but not human papillomavirus, are present in neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia. Pediatr Dev Pathol 2000; 3 (4): 367-73.

DRIES V, VON BOTH I, MULLER M, GERKEN G, SCHIRMACHER P, ODENTHAL O, BARTENSCHLAGER R, et al. Detection of hepatitis C virus in paraffin-embedded liver biopsies of patients negative for viral RNA in serum. Hepatology 1999; 29: 223-9.

DUERMEYER W., VAN DER VEEN J... ELISA for specific IgM and application for anti-hepatitis A IgM detection. 1978. Lancet ii: 684-685.

EINSELE G, EHNINGHER H, HERBART H. Polimerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood* 1995; 86: 2815-20.

ENGVAL E, PERLMANN P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay for immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8:871-4.

ELIOT N. Analyze statistique des donnees cliniques, biologiques et histologiques dans 288 observations de cholestase neonatale. *Arch Franç Pédiatr* 1977; 34 (II Suppl): 213-20.

FJÆR RB, BRUU AL, NORDBØ SA. Extra hepatic bile duct atresia and viral involvement. *Pediatr Transplantation* 2005; 9: 68–73.

FELBER S, SINATRA M. - Systemic disorders associated with neonatal cholestasis. *Semin Liver Dis* 1987; 7: 108-18.

FISCHLER B, EHRNST A, FORSGREN M, ORVELL C, NEMETH A. The viral association of neonatal cholestasis in Sweden: a possible link between cytomegalovirus infection and extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 27 (1): 57-64.

FISCHLER B, RODENSIÖ P, NEMETH A, FORSGREN M, LEWENSOHN-FUCHS I. Cytomegalovirus DNA detection on Guthrie cards in patients with neonatal cholestasis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 1999; 80(2):130-4.

FISCHLER B, PAPADOOGIANNAKIS N, NEMETH A. Aetiological factors in neonatal cholestasis. *Acta Paediatr* 2001; 90: 88-92.

FISCHLER B, CASSWALL TH, MALMBORG P, NEMETH A. Ganciclovir treatment in infants with cytomegalovirus infection and cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 34(2):154-7.

FLEISS JL. Statistical Methods for Rates and Proportions. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1981.p.1-321.

FOWLER KB, STAGNO S, PASS RF. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. N Engl J Med 1992; 326: 663-7.

FOWLER KB, STAGNO S, PASS RF. Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. JAMA 2003; 289:1008-11.

GARCIA FJ, NAGER AL. Jaundice as an early sign of urinary tract infection in infancy. Pediatrics 2002; 109: 846-51.

GENTA RM, BLEYZER I, CATE TR, TANDON AK, YOFFE B. In situ hybridization and immunohistochemical analysis of cytomegalovirus-associated ileal perforation. Gastroenterology 1993; 104: 1822-7.

GERHZ RC. Human cytomegalovirus: biology and clinical perspectives. Adv Pediatr 1991; 38:203-31.

GOUARIN S, GAULT E, VABRET A, COINTE D, ROZENBERG F, GRANGEOT-KEROS L, et al Real-Time PCR Quantification of Human Cytomegalovirus DNA in Amniotic Fluid Samples from Mothers with Primary Infection. J Clin Microbiol 2002; 40(5):1767-72.

GREER CE, PETERSON SL, KIVIAT NB, MANOS MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues – effects of fixative and fixation time. Am J Clin Pathol 1991; 95(2):117-24.

HART MH, KAUFMAN SS, VANDERHOOF JA, ERDMAN S, LINDER J, MARKIN RS, et al. Neonatal hepatitis and extrahepatic biliary atresia associated with cytomegalovirus infection in twins. Am J Dis Child 1991; 145 (3):302-4.

HENRIKSEN NT, DRABLOS PA, AAGENAES O. Cholestatic jaundice in infancy. The importance of familial and genetic factors in aetiology and prognosis. Arch Dis Child 1981; 56:622-27.

HESSEL G, YAMADA RM, ESCANHOELA CAF, BUSTORFF-SILVA J, TOLEDO, RJ. Valor da ultra-sonografia abdominal e da biópsia hepática percutânea no diagnóstico diferencial da colestase neonatal. *Arq Gastroenterol* 1994; 31:75-81.

HESSEL G, SAWAMURA R. Colestase do lactente. In: Barbieri D e Palma D. *Gastroenterologia e Nutrição. Série Atualizações Pediátricas*. São Paulo Rio de Janeiro Belo Horizonte: Atheneu 2001.p.143-57.

ISTAS AS, DEMMELER GL, DOBBINS JG. Surveillance for congenital cytomegalovirus disease. A rapport from the national cytomegalovirus disease registry. *Clin Inf Dis* 1995; 20:665-70.

JACQUEMIN E, LYKAVIERIS P, CHAOUI N, HADCHOUEL M, BERNARD O. Transient neonatal cholestasis: origin and outcome. *J. Pediatr* 1998; 133:563-7.

JEVON GP, DIMMICK JE. Biliary atresia and cytomegalovirus infection: a DNA study. *Pediatr Dev Pathol* 1999; 2(1):11-4.

KIMBERLIN D, LIN CY, SANCHEZ PJ. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized controlled trial. *J Pediatr* 2003; 143(1):16-25.

KOSAI K, KAGE M, KOJIRO M. Clinicopathological study of liver involvement in cytomegalovirus infection in infant autopsy cases. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6(6):603-8.

KRECH, U, WILHELM JA. A solid-phase immunosorbent technique for the rapid detection of rubella IgM by haemagglutination inhibition. *J Gen Virol* 1979; 44:281-6.

KWOK S, HIGUCHI R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339:237-8.

LAI MW, CHANG MH, LEE CY, HSU HC, KAU CL. Cytomegalovirus-associated neonatal hepatitis. *Acta Paediatr* 1992; 33:264-72.

LAMPS LW, PINSON CW, RAIFORD DS, SHYR Y, SCOTT MA, WASHINGTON MK. The significance of microabscesses in liver transplant biopsies: a clinicopathological study. *Hepatology* 1998; 28(6):1532-7.

LATCHMAN DS. PCR: applications in pathology. Principles and practice. New York: Oxford University Press, 1995.p.6-53.

LAZZAROTTO T, RIPALTI A, BERGAMINI G, BATTISTA MC, SPEZZACATENA P, CAMPANINI F, et al. Development of a new Cytomegalovirus (CMV) immunoglobulin M (IgM) immunoblot for Detection of CMV-Specific IgM. *J Clin Microbiol* 1998; 36(11):3337-41.

LIBERECK A, RYTLEWSKA M, SZLAGATYS-SIDORKIEWICZ A, BAKO W, LUCZAK G, SIKORSKA-WISNIEWSKA G, et al. Cytomegalovirus disease in neonates and infants--clinical presentation, diagnostic and therapeutic problems--own experience. *Med Sci Monit.* 2002; 8(12):815-20.

LUCAS SB. Other viral and infectious diseases and HIV-related liver disorders. In: MAC SWEEN RNM, BUD AD, PORTMAN BC, ISHAK KG, SCHEUER PJ, ANYHONY PP. *Pathology of the liver.* 4th ed. London- Edinburgh-Saint Louis-New York-Philadelphia-Sydney-Toronto: Churchill Livingston Elsevier; 2002. p.364-414.

LURIE M, ELMALACH I, SCHUGER L, WEINTRAUB J. Liver findings in infantile cytomegalovirus infection: similarity to extrahepatic biliary obstruction. *Histopathology* 1987; 11(11):1171-80.

MAC DONALD GA, GREENSON JK, DELBUONO EA, GRADY WM, MERION RM, FRANK TS, LUCEY MR, APPELMAN HD. Mini-microabscess syndrome in liver transplant recipients. *Hepatology* 1997; 26(1):192-7.

MACHADO CM, FINK MCDS, VILLAS BOAS LS, SUMIT LM, WEINBERG A, SHIGUEMATSU K, et al. Infecção perinatal pelo citomegalovírus em hospital público do município de São Paulo: estudo prospectivo. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1991; 33(2):169-76.

MAGALHÃES SM, DUARTE FB, VASSALO J, COSTA SCB, LORAND-METZE I. Multiple lymphoid nodules in bone marrow biopsy in immunocompetent patient with cytomegalovirus infection: an immunohistochemical analysis. Rev Soc Br Med Trop 2001; 34 (4):365-8.

MAINE GT, STRICKER R, SCHULER M, SPESARD J, BROJANAC S, IRIARTE B, et al. Development and clinical evaluation of a recombinant-antigen-based cytomegalovirus Immunoglobulin M automated immunoassay using the Abbott AxSYM Analyzer. J Clin Microbiol 2000; 38(4):1476-81.

MICHAELS MG, GREENBERG DP, SABO DL, WALD ER. Treatment of children with congenital cytomegalovirus infection with ganciclovir. Pediatr Infect Dis J 2003; 22(6): 504-9.

MONTGOMERY DC. Design and Analysis of Experiments 3rd ed... New York: John Wiley & Sons; 1991.p.1-649.

MOWAT AP. Hepatite e colestase em lactentes: Afecções intra-hepáticas. In: Mowat AP. Doenças Hepáticas em Pediatria, 2^a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1991. p.41-80.

MOYER V, FREESER DK, WHITINGTON PF, OLSON AD, BREWER F COLLETTI RR et al. Guideline for the evaluation of cholestatic jaundice in infants: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2004; 39(2):115-28

MUNRO C, HALL B, WHYBIN L R, LEADER L, ROBERTSON P, MAINE GT, et al. Diagnosis of and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women. J Clin Microbiol 2005; 43(9): 4713–8.

MURPH JR, SOUZA IE, DAWSON JD, BENSON P, PETHERAM SJ, PFAB D et al. Epidemiology of congenital cytomegalovirus infection: maternal risk factors and molecular analysis of cytomegalovirus strains. Am J Epidemiol. 1998; 147(10):940-7.

NARIQI S. Cytomegaloviroses. In: Textbook of Human Virology. 2nd ed. St Louis, 1991. p.889-924.

NATHANSON MH, BOYER JL. Mechanism and regulation of bile secretion. *Hepatology* 1991; 14: 551-66.

NELSON CT, ISTAS AS, WILKERSON MK, DEMMLER GJ. PCR detection of cytomegalovirus DNA in serum as a diagnostic test for congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1995; 33(12):3317-8.

NIEDOBITEK G, FINN T, HERBST H, GERDES J, GRILLNER L, LANDQVIST M, et al. Detection of cytomegalovirus by in situ hybridization and immunohistochemistry using new monoclonal antibody CCH2: a comparison of methods. *J Clin Pathol* 1988; 41:1005-9.

NIELSEN SL, RØNHOLM E, SØRENSEN I, ANDERSEN HK. Detection of immunoglobulin G antibodies to cytomegalovirus antigens by antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin Microbiol* 1986; 24:998-1003.

NIELSEN SL, RØNHOLM E, SØRENSEN I, JAEGER P, ANDERSEN HK. Improvement of serological diagnosis of neonatal cytomegalovirus infection by simultaneously testing for specific immunoglobulin E and M by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 1987. 25:1406-10.

NIELSEN SL, SØRENSEN I, ANDERSEN HK. Kinetics of specific immunoglobulins M, E, A and G in congenital, primary, and secondary cytomegalovirus infection studied by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1988; 26(4): 654-61.

PANNUTI CS, VILLAS BOAS LS, CARVALHO RPS, SEGRE CAM. Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in two socioeconomically distinct populations of a developing country. *Rev Inst Med trop Sao Paulo* 1985; 27(2):105-7.

PASS RF. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J Infect Dis* 1985; 152:243-8.

PASS R. F... Cytomegalovirus. In: Long SS, Pickering LK, Prober CG, editors. Principles and practice of pediatric infectious diseases. 2nd edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2003. p. 1050-8.

PATEL R, SYNDMAN DR, RUBIN RH. Cytomegalovirus prophylaxis in solid organ transplant recipients. Transplantation, 1996; 61: 1279-89.

PERSING DH, RAKELA J. Polymerase chain reaction for the detection of hepatitis viruses: panacea or purgatory?

PIIPARINEN H, HOCKERSTEDT K, GRONHAGEN-RISKA C, LAUTENSCHLAGER I. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. J Clin Virol 2004; 30(3):258-66.

PORTER-JORDAN K, ROSENBERG EI, KEISER JF, GROSS JD, NASIM S, GARRETT CT. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA. J Med Virol 1990; 30:85-91.

PRADO ET, ARAUJO MDEF, CAMPOS JV. Colestase neonatal prolongada: estudo prospectivo. Arq Gastroenterol 1999; 36(4):185-94.

PROBER CG. Introduction to Herpesviridae. In: Long SS, Pickering LK, Prober CG, editors Principles and practice of pediatric infectious diseases. 2nd edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2003. p. 1031-2.

RAYNOR DB. Cytomegalovirus infection in pregnancy. Semin Perinatol 1993; 17: 394-402.

RIVERA LB, BOPPANA SB, FOWLER KB, BRITT WJ, STAGNO S, PASS RF. Predictors of hearing loss in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. Pediatrics 2002; 110:762-7.

RIMZA ML, VELA EE, FRUTIGER MY, RANGEL CS, SOLANO M, RICHTER LC, et al. Rapid automated combined in situ hybridization and immunohistochemistry for sensitive detection of cytomegalovirus in paraffin-embedded tissue biopsies. Clin Microbiol Infect Dis 1996; 106:544-8.

ROBERTS EA. A criança icterica. In: Kelly DA. Doenças hepáticas e do sistema biliar em crianças. São Paulo: Livraria Santos Editora; 2001.p.11-45.

ROGERS BB, ALPERT LC, HINE EAS, BUFFONE GJ. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by polymerase chain reaction. Am J Pathol 1990; 136: 541-8?

SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, ERLICH HA. Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230:1350-4.

SANTOS JL, ALMEIDA H, CERSKI CTS, SILVEIRA TR. Histopathological diagnosis of intra and extra-hepatic cholestasis. Br J Med Res 1998; 31:911-9.

SANTOS DVV, SOUZA MMR, GONÇALVES SHL, COTTA ACS, MELO LAO, ANDRADE GMQ et al. - Congenital cytomegalovirus infection in a neonatal intensive care unit in Brazil evaluated by PCR and association with perinatal aspects. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 2000; 42(3):129-32.

SCHMITZ HHW, DOERR DK, VOGT A. Solid-phase enzyme immunoassay for immunoglobulin M antibodies to cytomegalovirus. J Clin Microbiol 1977; 5: 629-34.

SEEHOFER D, RAYES N, TULLIUS SG, SCHMIDT CA, NEUMANN UP, RADKE C, SETTMACHER U et al. CMV hepatitis after liver transplantation: incidence, clinical course, and long-term follow-up. Liver Transpl 2002; 8(12):1138-46.

SHAFFER EA, ZAHAVI I, GALL DG. Postnatal development of hepatic bile formation in the rabbit. Dig Dis Ce 1985; 30:558–562.

SHEN CY, CHANG WW, CHANG SF, CHAO MF, HUANG ES, WU CS. Seroepidemiology of cytomegalovirus infection among children between the ages of 4 and 12 years in Taiwan. J Med Virol 1992; 37(1):72-5.

SHERLOCK S. Colestase. In: Doenças do fígado e do sistema biliar 7ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara.1988.p.197-229.

SHIBATA D, MARIN WJ, APPLEMAN MD, CAUSEY DM, LEEDOM JM, ARNHEIN N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. J Infect Dis 1988; 158 (6):1185-92.

SHIBATA Y, KITAJIMA N, KAWADA J, SUGAYA N, NISHIKAWA K, MORISHIMA T, KIMURA H. Association of cytomegalovirus with infantile hepatitis. Microbiol Immunol 2005; 49 (8):771-7.

SIEGEL S. Estatísticas não-paramétricas para as ciências do comportamento. São Paulo: McGraw-Hill. 1975.p.106-16.

SILVEIRA TR, PIRES ALG. Icterícia colestática neonatal. In: Gastroenterologia Pediátrica 2ª. Edição. Rio de Janeiro: Guanabara. 1991.p.465-87.

SMITH KL, DUNSTAN RA. PCR detecção de cytomegalovirus: a review. Br J Haematol 1993; 84(2):187-190.

SOGUERO C, CAMPO E, RIBALTA T, SANCHEZ-TAPIAS JM, SAIZ JC, BRUGUERA M. Assessment of genotype and molecular evolution of hepatitis C virus in formalin-fixed paraffin-embedded liver tissue from patients with chronic hepatitis C virus infection. Lab Invest 2000; 80(6):851-6.

SOUZA S, BONON SHA, COSTA SCB, ROSSI CL. Evaluation of an in-house specific immunoglobulin G (IgG) avidity ELISA for distinguishing recent primary from long-term human cytomegalovirus (HCMV) infection. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 2003; 45(6):323-6.

STAGNO S, TINKER MK, ELROD C, FUCCILLO DA, CLOUD G, O'BEIRNE AJ. Immunoglobulin M Antibodies detected by enzyme-linked Immunosorbent assay and radioimmunoassay in the diagnosis of cytomegalovirus infections in pregnant women and newborn infants. J Clin Microbiol 1985; 21(6): 930-5.

STAGNO S, PASS RF, CLOUD G, DWORSKY ME, ALORDC A. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. JAMA 1986; 256:1904 – 8.

STAGNO S. Cytomegalovirus. In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 5th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. p. 389– 424.

SUASSUNA JHR, LEITE LL, VILLELA LHC. Prevalence of cytomegalovirus infection in different patient groups of an urban university in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 1995; 28:105-8.

SUCHY FJ, BALISTRERI WF, HEUBI JE, SEARCY JE, LEVIN RS. Physiologic cholestasis: elevation of the primary serum bile acid concentration in normal infants. Gastroenterology 1981; 80:1037-41.

SUCHY FJ: Hepatocelular transport of bile acids. Semin Liver Dis 1993; 13:235–247.

TARR PI; HAAS JE; CHRISTIE DL. Biliary atresia, cytomegalovirus and age at referral. Pediatrics 1996; 97(6):828-31.

TAYLOR CR. An exaltation of experts: concerted efforts in the standardization of immunohistochemistry. Human Pathol 1994 Jan; 25(1):2-11.

TAYLOR CR, SHI SR, CHAIWUN B, YOUNG L, IMAM SA, COTE RJ. Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques. Hum Pathol. 1994; 25(3):263-70.

TAYLOR CR, SHI SR, BARR NJ, WU N. Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls and standization. In: Dallas D. Diagnostic Immunohistochemistry 2nd edition. London- Edinburgh-Saint Louis-New York-Philadelphia-Sydney-Toronto: Churchill Livingstone Elsevier; 2006.p.1-42.

TARR PI, HASS JE, CHRISTIE DL. Biliary atresia, cytomegalovirus and age at referral. Pediatrics 1996; 97(6): 828-31.

TIKER F, TARCAN A, KILICDAG H, GURAKAN B. Early onset conjugated hiperbilirrubinemia in newborn infants. Indian J Pediatr 2006; 73:409-12.

THUNG NS, GERBER MA. Acute viral hepatitis: hepatotropic vs. nonhepatotropic viruses In: Thung NS, Gerber MA. Differential diagnosis in pathology. New York- Tokyo: Igakey-Shoin; 1995.p. 4-5.

TRAUNER M, MEIER PJ, BOYER JL: Molecular pathogenesis of cholestasis. N Engl J Med 1998; 339:1217-27.

VAN LOON AM, HEESSEN FWA, VAN DER LOGT JTM, VAN DER VEEN J. Direct enzyme-linked Immunosorbent assay that uses peroxidase-labeled antigen for determination of immunoglobulin M antibody to cytomegalovirus. J Clin Microbiol 1981; 13 (3):416-22.

VANCINKOVÁ Z, KUČEROVÁ T, PELIKAN L, ZIKMUNDOVÁ L, PRIGLOVÁ M. Perinatal cytomegalovirus hepatitis: to treat or not to treat with ganciclovir. J Pediatric Child Health 2004; 40: 444-8.

VARJO P, AMELIO A, STAGNI A, PALUDETTO R, GENOVESE E, GIUFFRÉ M, et al. Cholestasis in newborn infants with perinatal asphyxia. Acta Paediatr 1997; 86:895-8.

VASSALO J, PINTO GA, ANDRADE LAA. Detecção de antígenos virais- Citomegalovírus. In: Ferreira VA, Bacchi CE, Vassalo J. Manual de imunohistoquímica. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999 p: 196.

VON LICHTENBER G. Doenças por vírus, clamídia, rickettsias e bactérias. In: Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Patologia estrutural e funcional 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara; 1984.p.267-386.

WEISBRODT NW. Bile production, secretion and storage. In: Johnson LR. Gastrointestinal physiology. St Louis-Toronto-London: Mosby Company; 1981.p. 84-92.

WHITE FV, DEHNER LP. Viral diseases of the liver in children: diagnostic and differential diagnostic considerations. *Pediatr Dev Pathol* 2004; 7:552-67.

WHITLEY RJ, CLOUD G, GRUBER W. Ganciclovir treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of a Phase II study. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis* 1997; 175:1080-6.

YACHHA SK, SHARMA A. Neonatal cholestasis in India. *Indian Pediatr* 2005; 42(5): 491-2.

YAMAMOTO AY, GONÇALVES AL, FIGUEIREDO LTM, CARLUCCI RH. Aspectos clínicos observados em crianças apresentando anticorpos IgM para citomegalovírus através do teste da imunofluorescência. *J Pediatr* 1994; 70(4): 215-9.

YAMAMOTO AY, AQUINO VH, FIGUEIREDO LTM, MUSSI-PINHATA MM. Diagnosis of congenital and perinatal cytomegalovirus infection by using the polymerase chain reaction. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31:19-26.

YAMAMOTO AY, FIGUEIREDO LTM, MUSSI-PINHATA MM. Prevalência e aspectos clínicos da infecção congênita por citomegalovírus 1999; 75(1): 23-8.

YAMAMOTO AY, FIGUEIREDO LTM, MUSSI-PINHATA MM. Infecção perinatal por citomegalovírus: muito freqüente, mas pouco diagnosticada *J Pediatr* 1999; 75(2): 126-30.

YAMAMOTO AY, MUSSI-PINHATA MM, MARIN LJ, BRITO RM, OLIVEIRA PF, COELHO TB. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? *J Clin Virol* 2006; 36(3):228-30.

ZERBINI MC, GALLUCCI SD, MAEZONO R, UENO CM, PORTA G, MAKSOUD JG, et al. Liver biopsy in neonatal cholestasis: a review on statistical ground. *Mod Pathol* 1997; 10(8): 793-9.



7- APÊNDICES

PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

HD:

- Nome.....HC... Sexo:
- Data nascimento
Data na 1^a consulta no HC-UNICAMP:.....

I. Antecedentes neonatais

- Peso ao nascimento:
- Estatura ao nascimento:
- Intercorrências neonatais:

II. Quadro clínico (anotar se Ausente ou Presente)

- Icterícia ()
- Acolia ou hipocolia fecal ()
- Colúria ()

III. Exame físico

- Peso atual (1^a consulta):.....
- Hepatomegalia ()
- Esplenomegalia ()

- Linfonodomegalia ()
- Fundo de olho ()
- Retardo neuromotor ()

IV. Exames subsidiários e valores de referência

- Bilirrubina Direta:.....
- Bilirrubina Indireta:.....
- AST (TGO):.....
- ALT (TGP):.....
- Fosfatase alcalina:.....
- GamaGT:.....
- Sorologia para CMV (data e método):
- Outras sorologias:.....
- Ecografia abdominal:.....

PROTOCOLO DE REVISÃO DAS BIÓPSIAS HEPÁTICAS

Variáveis graduadas em: ausente (0), leve (1), moderada (2) e intensa (3):

- Colestase ()
- Nódulos ()
- Transformação em células gigantes ()
- Eosinófilos ()
- Metaplasia mielóide ()

Variáveis gradudas em: A (ausente) e P (presente):

- Célula de inclusão citomegálica ()
- Fibrose portal ()
- Septos ()
- Microabscessos ()

Siderose = 0 (ausente), I (grau I), II (grau II) e III (grau III).

Tabela 1– Valores individuais das características clínicas obtidas na primeira avaliação: gênero, idade na ocasião da biópsia (meses), peso ao nascimento (gramas), peso na primeira consulta (gramas), estatura ao nascimento (centímetros), icterícia, acolia ou hipocolia, colúria, hepatomegalia e esplenomegalia.

Caso	gênero	idadebx	idadesoro	ictericia	acolia	colúria	Peso nasc	peso1	Estat nas	hepatom	espleno
1	M	5,92	,	P	P	A	2500	4800	,	P	P
2	M	6,22	,	P	A	A	1600	,	35		
3	M	0,95	,	A	A	P	3350	3350	48	P	A
4	M	3,88	,	A	A	A	2900	3230	45	P	A
5	M	4,93	,	P	P	P	1800	4380	39	P	A
6	F	3,09	,	P	P	P	3100	4510	57	P	P
7	M	6,32	,	P	P		2590	4000	43,5	P	P
8	F	2,11	,	P	P	P	3300	3900	52,5	P	A
9	M	3,68	,	P	P	P	3280	5300	50		
10	M	3,72	,	P	P	P	3300	5300	48	P	P
11	M	1,55	,		A		1750	1870	42	P	P
12	M	2,7	,	P	P	P	3950	4580	51	P	P
13	F	3,62	,	P	P	P	2700	4950	,	P	P
14	M	3,45	,	A	A	A	2100	3250	,	P	P
15	M	2,66	7,34	P	P	P	2800	4570	46	P	P
16	M	2,14	,	P	P		1650	2960	,	P	P
17	m	3,45	,	A	A	A	2100	3250	,	P	P
18	M	2,5	2,99	P	P	P	3310	,	,	P	A
19	M	2,3	,	P	P	P	3500	5240	,	P	P
20	F	6,35	,	P	P		3350	,	,		P
21	F	2,14	,	P	P	P	2000	3700	52	A	A
22	F	6,28	,	P	P		2600	,	,		
23	M	2,89	,	A	A		2310	,	,	P	A
24	F	2,96	,	P	P	P	2460	4100	55,5	P	P
25	M	2,53	,	P	P		3180	4500	48	P	A
26	M	2,4	,	P	P		3780	5780	51	P	P
27	F	2,93	,	P	P		2500	3160	45	P	A
28	M	3,98	3,82	P	A	A	3080	5000	,	P	P
29	M	1,84	,	P	P	P	2520	2740	,		
30	M	2,2	,	A	A		2310	,	,	P	A
31	F	2,99	1,58	P	A	A	1960	2290	,	A	A
32	F	2,8	,	P	P	P	3450	4460	54,5	P	P
33	M	2,43	13,78	P	P	P	2460	2310	47	P	A
34	M	2,6	2,6	P	P	P	2410	3350	38	P	A
35	M	0,43	0,39	P	P	P	1750	1870	42	P	A
36	M	4,21	6,97	P	P	P	1570	2450	39	P	P
37	M	0,86	0,86	P	A	P	2750	,	47	A	A
38	M	1,78	2,5				1840	,	,		

Caso	gênero	idadebx	idadesoro	ictericia	acolia	colúria	Peso nasc	peso1	Estat nas	hepatom	espleno
39	F	1,97	1,97	P	P	P	3220	4580	55,5	P	P
40	F	2,34	10,1	P	P	P	2530	2780	48,6	A	A
41	M	3,85	9,8	P	P	P	,	5640	61,5	P	A
42	M	1,55	2,8	P	P	P	3660	5520	43,4	P	A
43	M	1,81	,	P	A	A	1600	2030	42	P	A
44	F	0,69	1,51	P	A	A	3005	,	49	P	A
45	M	2,47	,	P	A	A	1820	2600	,	P	A
46	F	0,49	,	P	P	P	4760	3750	,	P	P
47	F	1,78	24,9	P	P	P	2860	4220	47	P	A
48	M	1,12	1,91	P	P	P	3300	3100	48	P	A
47	M	1,38	1,15	P	P	P	2920	2830	49,5	P	A
50	F	2,47	,	P	A	A	2330	5700	44,5	P	A
51	M	2,11	3,16	P	A	A	3030	2730	,	P	P
52	F	3,06	14,7	P	p	p	2330	5700	44,5	A	A
53	F	2,63	3,32	P	A	A	1566	2110	42	A	A
54	M	1,45	1,45	P	P	P	3630	4360	52	P	A
55	M	3,09	3,03	P	P	P	,	,	,	P	A
56	M	6,55	7,47	P	A	P	2465	2750	50	P	P
57	M	1,48	1,45	P	A	A	4435	3800	49,5	P	A
58	F	2,4	0,99	P	P	A	1720	3290	42	A	A
59	F	1,74	,	P	A	A	2650	2450	47,7	P	A
60	M	5,46	5,46	P	P	P	930	,	35		
61	M	2,17	2,07	P	P	P	3590	4950	48,5	A	A
62	F	2,53	,	P	P	P	4045	3855	53	P	A
63	F	1,68	1,68	P	P	P	2310	2270	45	A	A
64	M	2,17	2,04	P	P	P	2525	,	44	A	A
65	M	1,68	0,95	A	A	A	,	3890	,	A	A
66	M	1,35	1,25	P	P	A	3455	3200	51,5	P	A
67	F	0,43	2,34	P	P	P	3400	,	48,5	P	A
68	M	4,01	1,71	P		A	1095	2010	38,5	A	A
69	M	1,84	2,01	P	P		3600	3970	47	P	A
70	F	1,38	0,53	P	A	A	1980	2480	,	P	P
71	M	2,93	4,28	P	A	A	3390	4735	48,5	A	A
72	M	9,18	3,52	P	P	P	1790	3210	40	P	P
73	F	2,37	7,2	P			1705	2770	,	P	P
74	M	1,61	1,64	P	A	A	3080	3080	,	A	A
75	M	2,43	2,5	P	P		3660	5050	50	P	P
76	M	2,43	2,11	P	P	P	3865	5020	49	P	P
77	M	1,81	1,38	P	A	P	3865	4200	49	P	A
78	M	3,16	2,96	P	A	A	3460	3560	47	P	A
79	F	3,95	2,96				2550	,	45	P	A
80	M	5,39	5,07	P	A	A	2250	4910	,	P	A
81	M	2,43	1,88	P	P	P	1520	2180	44,5	P	P
82	F	1,78	,	P	A	A	2740	,	,	P	A
83	F	1,97	0,39	P		P	2570	2190	,	P	
84	M	2,2	1,64	P	A	A	2650	3960	46	P	P
85	F	1,81	1,09	P	P		1820	2130	47	P	A

Caso	gênero	idadebx	idadesoro	ictericia	acolia	colúria	Peso nasc	peso1	Estat nas	hepatom	espleno
86	F	2,24	2,43	P	P	A	2500	,	45	P	A
87	M	3,22	3,42	P	P	P	1330	3800	40	P	P
88	M	2,24	0,07	P	P	A	3000	4160	49	P	A
89	M	2,07	2,04	P	P	P	2450	5085	43	P	P
90	M	2,96	2,83	P	P		2780	3450	,	P	
91	M	1,78	1,71	P	A	A	2900	4090	48	P	A
92	M	3,03	,	P	A	A	3320	4370	49	P	P
93	M	0,99	1,09	P	A	P	,	,	,	P	A
94	F	2,99	2,3	P	P		2000	2610	,	P	A
95	M	1,91	1,58	P	A	A	2700	4450	47	A	A
96	M	1,84	0,56	P	P	P	3310	,	47	P	A
97	M	1,91	1,55	P	A	A	2570	3360	48	P	A
98	F	4,7	4,61	P	P		1500	2800	,	P	P
99	M	2,96	3,22	P			3890	,	,	P	P
100	M	2,04	,	P	P	P	2780	3040	,	P	A
101	M	2,14	,	P			2160	,	44	P	P

Tabela 2 – Valores individuais dos exames laboratoriais (ALT = alanina aminotransferase, AST = aspartato aminotransferase, FA = fosfatase alcalina, GGT = gamaglutamiltransferase, albumina, INR = *International Normalized Ratio* e BD = bilirrubina direta) realizados no início da investigação, expressos em valores absolutos e em número de vezes o limite superior da normalidade (x).

Caso	BD	AST	xAST	ALT	xALT	INR	albumina	FA	xFA	GGT	xGGT
1	2,2	90	2,57	57	1,43	1	4,16	1120	1,56	,	,
2	6,92	310	8,86	139	3,48	,	4,36	600	0,83	,	,
3	19,6	15	0,43	4	0,1	,	,	120	0,17	,	,
4	4,55	156	4,46	91	2,28	,	3,62	565	0,79	,	,
5	6,16	100	2,86	94	2,35	,	,	,	,	,	,
6	6,9	270	7,71	270	6,75	1	3,91	690	0,96	,	,
7	5,65	259	7,4	250	6,25	,	4,8	1249	1,74	69	1,73
8	3,2	142	4,06	178	4,45	,	2,5	,	,	,	,
9	2	520	14,86	560	14	,	4,29	590	0,82	,	,
10	7,4	300	8,57	160	4	,	,	,	,	180	4,5
11	11,6	15	0,43	15	0,38	,	,	,	,	,	,
12	10,04	390	11,14	650	16,25	,	,	1160	1,61	,	,
13	4,6	146	4,7	,	,	1	4,5	481	10,4	,	,
14	2,98	48	1,37	33	0,83	,	1,9	206	0,29	,	,
15	6,7	80	2,29	80	2	,	3,5	,	,	,	,
16	6,19	200	5,71	160	4	,	3,7	107	0,15	,	,
17	2,98	48	1,37	33	0,83	,	1,9	206	0,29	,	,
18	7,4	190	5,43	190	4,75	,	2,5	,	,	,	,
19	3,4	44	1,26	44	1,1	1	,	790	1,1	38	0,95
20	1,6	142	4,06	142	3,55	,	4,6	414	0,58	151	4,31
21	8,7	150	4,29	122	3,05	0,9	4,4	,	,	,	,
22	6,4	142	4,06	178	4,45	,	2,5	,	,	,	,
23	7,8	365	10,43	210	5,25	,	,	773	1,08	84	2,1
24	3,84	110	3,14	81	2,03	,	3,77	,	,	99	2,83
25	4,3	49	1,4	70	1,75	,	,	427	0,59	59	1,48
26	3,8	251	7,17	251	6,28	,	3,21	870	1,21	133	3,33
27	6,3	135	3,86	134	3,35	1,09	2,2	263	0,37	263	7,51
28	6,6	93	2,66	93	2,33	1,18	4,24	1212	1,69	,	,
29	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,
30	7,8	365	10,43	210	5,25	,	,	773	1,08	84	2,1
31	4,88	333	9,51	77	1,93	1,5	1,68	947	1,32	148	4,23
32	3,4	191	5,46	143	3,58	1,44	,	1195	1,66	137	3,91
33	3,1	166	4,5	46	1,2	1,43	,	1110	3,2	282	5,7
34	6,4	369	10,54	213	5,33	1,34	,	1463	2,03	189	4,73
35	16,5	47	0,8	12	0,3	1,16	3,78	502	0,8	53	1,1

Caso	BD	AST	xAST	ALT	xALT	INR	albumina	FA	xFA	GGT	xGGT
36	4,2	199	5,37	,	,	1,21	,	1620	2,5	608	12,16
37	8,8	315	9	195	4,87	1	,	470	0,7	49	0,98
38	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,	,
39	6,45	129	3,69	89	2,23	1,24	,	987	1,37	362	10,34
40	7,1	178	5,09	96	2,4	1,03	,	1376	1,91	,	,
41	5,2	169	4,83	169	4,23	1,23	5,2	2010	2,8	,	,
42	5,3	202	5,77	106	2,65	,	3,34	1505	2,09	272	6,8
43	11,3	623	17,8	222	5,55	1,39	3,3	2232	3,1	89	2,23
44	16,4	133	4	229	6,7	1,29	3,76	1400	201	254	7,9
45	1,44	92	,	,	,	1	3,79	176	0,48	324	8,2
46	16,5	1540	46,6	730	22	1,16	3,78	502	0,78	53	1,6
47	6,5	179	5,11	172	4,3	1	,	498	0,69	243	6,94
48	13,5	466	13,31	161	4,03	1,21	4,24	884	1,23	240	6
47	6,9	181	,	,	,	1	4,16	715	,	123	,
50	4,1	70	2,5	34	1,2	1	4,6	924	23,1	490	15,3
51	2,2	63	1,8	60	1,5	1,04	,	992	1,5	466	9,32
52	6,2	242	6,9	132	3,3	1,22	4,5	1349	2,1	161	5
53	5	180	5,1	71	1,7	1,15	3,68	1359	2,1	500	5,6
54	1,4	1045	26,86	690	17,25	1,29	,	2149	5,84	89	2,22
55	4,3	335	9,57	277	6,92	1	,	2091	3,26	179	3,58
56	11,4	579	16,5	295	7,4	1,11	4,51	972	1,5	53	1,1
57	6,5	119	6,98	,	,	1,1	,	439	0,61	444	11,1
58	6,17	52	2,03	72	1,6	1,17	3,93	808	3	66	1,65
59	18,6	234	6,69	129	6,69	1,9	2,6	986	1,37	17	0,49
60	7,2	95	2,7	,	,	,	4,2	,	,	70	1,75
61	19,6	521	14,89	265	6,63	1,25	,	3270	12,1	43	1,07
62	5,4	194	5,54	92	2,3	1,11	,	1353	1,88	73	2,09
63	11,1	354	4,6	185	3,36	1	,	1020	1,41	140	4
64	15	20	,	82	,	2,64	,	2280	8,47	55	1,37
65	,	303	2,05	143	3,58	1,18	4,6	270	2,09	371	9,27
66	6,89	261	7,6	130	2,9	2,13	,	377	3,09	50,3	1
67	11,8	603	19,4	435	14,5	1	,	,	,	,	,
68	5,8	54	1,7	40	1,3	1,11	3,22	779	3,5	100	2,8
69	7,4	220	7,1	80	2,7	1,27	,	1264	,	227	6,5
70	13,8	504	16,2	116	3,7	1	3,92	378	,	350	10
71	0,7	303	9,8	143	4,8	1,18	4,16	270	2,09	371	10,6
72	2,8	167	5,4	99	3,3	1	3,25	809	,	332	9,5
73	8,2	321	10,4	166	5,5	1	3,46	540	5,19	365	10,4
74	8,5	424	13,7	196	6,5	1,37	,	392	,	49	1,4
75	11,6	275	8,9	89	3	1,73	3,4	217	,	582	16,6
76	18,6	413	11,8	142	4,05	3,1	2,5	816	6,32	41	1,2
77	11,2	245	6,1	198	3	,	,	,	,	245	6,1
78	4,2	138	3,7	153	3,8	1,56	2,28	329	2,5	866	21,65
79	6,27	211	6,8	124	4,1	1	5,01	1010	4,5	733	21
80	1,2	83	2,4	87	2,5	1	,	123	0,8	189	6
81	6	528	12	102	2,1	1	3,5	528	4	1028	25,7
82	9,25	394	10,4	155	5	1	3,25	618	4,4	405	10,8
83	6,26	29	32	19	31	1	3,08	2212	3,42	24	0,75

Caso	BD	AST	xAST	ALT	xALT	INR	albumina	FA	xFA	GGT	xGGT
84	12,5	1298	64,9	307	15,35	0,93	4,2	825	1,65	117	6,15
85	8,5	145	33,63	118	55,9	1,02	,	520	1,04	319	11,4
86	3,9	37	0,8	40	1,21	1	,	100	0,29	27	0,79
87	5,1	78	1,95	73	3,65	1,04	3,8	684	1,37	114	4,07
88	9,71	151,4	75	189,9	78,4	,	,	836	1,68	85	1,7
89	7,2	115	20,9	49,5	2	,	3,9	584,5	1,17	774	40,7
90	8,4	192	4,8	123	3,07	1,15	3,85	550	1,1	227	8,1
91	8,52	455	11,1	260	5,65	1,14	3,7	1270	2,12	85	1,7
92	5,4	200	6,45	114	3,17	1,79	3,2	428	0,86	130	4,33
93	7,25	172	8,6	123,5	6,18	1,07	4,15	,	,	54	2,84
94	3	57,5	2,88	55	2,75	0,92	3,65	351	0,7	120	4
95	3,3	93	4,65	73	3,65	1,08	,	439	0,88	113	5,95
96	8,3	97	2,4	78	3,9	1	3,92	957,5	2,39	74	2,64
97	8,7	44	2,2	28,5	1,43	1,23	3,6	419	0,84	111	3,7
98	2,37	54	3	40	2,22	1	4,8	332	1,64	189	6,75
99	18,3	165	8,25	142	7,1	,	,	2265	4,53	46	0,92
100	7,9	212	10,6	150	7,5	1,45	3,6	526	1,05	523	10,6
101	6,3	33	0,83	24	1,25	,	,	644	1,29	74	2,64

Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes na primeira avaliação, incluindo os valores de peso ao nascimento (gramas); peso na primeira avaliação (gramas), mediana da estatura ao nascimento (em centímetros), e a presença de icterícia, acolia ou hipocolia fecal, colúria, hepatomegalia e esplenomegalia, distribuídos de acordo com os grupos (Subgrupos 1A e 1B e Grupo 2). Os números entre parênteses correspondem ao número de pacientes.

Variável	N	1A (24)	1B (21)	2(56)
Gênero M/F	101	17/7	13/8	39/17
Peso ao nascimento em gramas (mediana)	96	2160(21)	2820(20)	2750(55)
Peso na primeira consulta em gramas (mediana)	81	3105(20)	3725(18)	3970(43)
Estatura ao nascimento em centímetros (mediana)	69	44,5 (13)	47 (12)	48 (44)
Icterícia	98	21 (23)	19 (21)	51 (54)
Acolia	94	12 (20)	10 (19)	38(55)
Colúria	80	10 (19)	8 (17)	30 (44)
Hepatomegalia	94	20(22)	15 (20)	44 (52)
Esplenomegalia	93	11 (22)	5 (19)	19 (52)

Tabela 4 – Resultados dos exames laboratoriais (ALT = alanina aminotransferase, AST = aspartato aminotransferase, FA = fosfatase alcalina, GGT = gamaglutamiltransferase, albumina, INR = *International Normalized Ratio* e BD = bilirrubina direta) realizados no início da investigação, expressos em mediana. A mediana das enzimas hepáticas foi estabelecida em número de vezes o limite superior da normalidade, distribuídos de acordo com os grupos (Subgrupos 1A e 1B e Grupo 2). Os números em parênteses correspondem ao número de pacientes.

Variável	N	Grupo 1A	Grupo 1B	Grupo 2
ALT (mediana)	92	3,62 (20)	3,80 (21)	3,48 (51)
AST (mediana)	96	5,28 (20)	6,69 (21)	5,4 (55)
FA (mediana)	80	1,67 (18)	1,39 (18)	1,50 (44)
GGT(mediana)	76	3,91 (17)	5,57 (18)	4,31 (41)
Albumina (g/dl, mediana)	62	3,70 (17)	3,27 (12)	3,91 (33)
INR (mediana)	70	1,04 (15)	1,24 (15)	1,10 (40)
Bilirrubina direta (mg/dl, mediana)	78	5,73 (22)	6,55(20)	6,91(56)

Tabela 5 - Características clínicas e resultados dos exames realizados nos 7 pacientes com diagnóstico de colestase intra-hepática pelo CMV, mostrando o gênero, peso ao nascimento, resultado das sorologias CMV, PCR no plasma e antigenemia (quando realizados), N-PCR no tecido hepático, IHQ e presença ou ausência de microabscesso.

Caso	Sexo	Peso de Nascimento	Teste(s) utilizado(s)	IHQ	N-PCR	Microabscesso
1	M	2590g	IgG(ELISA) +	Negativa	Negativa	Ausente
2	M	1650g	Reação de fixação de complemento +	Negativa	Negativa	NR*
3	M	3320g	IgM + e IgG + (ELISA)	Negativa	Negativa	Ausente
4	M	4435g	IgM - e IgG + (ELISA) e PCR no plasma+	Negativa	NR	Ausente
5	F	1980g	IgM + e IgG + (ELISA), PCR no plasma +, antigenemia + em 208 células	Negativa	Negativa	Ausente
6	F	1705g	IgM - e IgG + (ELISA) e PCR no plasma+	NR	Negativa	Ausente
7	M	1520g	IgM + e IgG + (ELISA), PCR no plasma+, antigenemia + em 50 células	Negativa	Negativa	Presente

*NR = não realizado

Tabela 8 - Resultados dos exames laboratoriais IgM, N-PCR, Microabscesso (Microab.) e IHQ, mostrados individualmente, onde 0 = negativo e 1 = positivo para pesquisa de citomegalovírus.

Caso	IgM	N-PCR	Microab.	IHQ
1			0	
2		0	0	
3		0		
4			0	
5		0		
6		0	0	0
7		0	0	0
8			0	
9			0	0
10			0	
11			0	0
12		0	0	0
13			0	
14		0	0	
15	0	0	0	
16		0		0
17				0
18	0		0	
19		0	0	
20		0		
21		0	0	
22		0	0	
23				0
24			0	
25		0	0	
26		0	0	
27		0		
28	0			
29		0	0	
30		0		0
31	0	0	1	0
32	1	0		
33	0			
34	0	0	0	
35	0	0	0	
36	0			
37	0	0	0	0
38	1	0	1	0
39	1	0	0	
40	0	0	0	0
41	0		0	0
42	0	0	0	

Caso	IgM	N-PCR	Microab.	IHQ
43		0	0	
44	0		0	
45	0	0		
46		0		
47	0			
48	0	0	0	
47	0	0	0	
50		0	1	0
51	0	0	0	
52	0		0	
53	0		0	
54	0		0	
55	0	0	0	0
56	0		0	0
57	0	0	0	
58	0	0	0	0
59		0	0	
60	0	0	1	0
61	0	0	0	
62			0	0
63	0	0	1	0
64	0	0	0	0
65	0		0	
66	0			
67	0	0	0	
68	0	0	0	0
69	0	0	0	
70	1	0	0	0
71	0	0	0	0
72	0	0	0	0
73	0	0	0	
74	0	0	0	
75	0	0		0
76	0	0	0	
77	0	0	1	0
78		1	0	
79	0	0	0	
80	0	0	0	
81	1	0	1	0
82		0	0	0
83	0	0	0	0
84	0	0	1	0
85		0	0	0
86	0	1	1	0
87	0	0	1	0
88	0	0	1	
89	0	0	1	0
90	0	0	1	0

Caso	IgM	N-PCR	Microab.	IHQ
91	0	0	0	0
92		1	0	1
93	0	0	0	0
94	0	0	1	0
95	0	1	1	
96	0	0	0	0
97	0	1	0	
98	0	1	1	0
99		0	1	0
100		0	0	
101		0	0	