



The prevalence of congenital cytomegalovirus infection in newborn infants at an intensive care unit in a public hospital

Prevalência de infecção congênita por citomegalovírus em recém-nascidos de uma unidade de tratamento intensivo de um hospital público

Clarissa Schreiner Miura¹, Ernani Miura², Alice Beatriz Mombach³, Marisa Chesky⁴

Resumo

Objetivo: Determinar a prevalência da infecção congênita por citomegalovírus em recém-nascidos internados na unidade de terapia intensiva neonatal de um hospital público de Porto Alegre.

Métodos: Estudo transversal, incluindo 261 recém-nascidos que nasceram em um hospital público da cidade de Porto Alegre no ano de 2003 e foram internados na unidade de terapia intensiva neonatal. Foi coletada amostra de urina nos primeiros 7 dias de vida e realizado o teste de reação em cadeia da polimerase para a pesquisa do DNA do citomegalovírus.

Resultados: A prevalência de infecção congênita por citomegalovírus na população estudada foi de 0,8% (IC 95%: 0,097-2,86). Devido à baixa prevalência, não foi possível associar fatores de risco.

Conclusões: A prevalência de infecção congênita por citomegalovírus em uma unidade de terapia intensiva neonatal de um hospital público de Porto Alegre não foi considerada elevada, sendo semelhante à prevalência encontrada em outros estudos realizados.

J Pediatr (Rio J). 2006;82(1):46-50: Citomegalovírus, citomegalovírus congênito, reação em cadeia da polimerase, recém-nascido.

Abstract

Objective: To determine the prevalence of congenital cytomegalovirus infection in newborn infants admitted to an intensive care unit in a public hospital in Porto Alegre.

Methods: A cross-sectional study of 261 newborn infants born at a public hospital in the city of Porto Alegre in 2003 and admitted to the intensive care ward. Urine samples were collected within 7 days of birth and a polymerase chain reaction-PCR performed to test for cytomegalovirus DNA.

Results: The prevalence of congenital cytomegalovirus infection among the study population was 0.8% (95% CI: 0.097-2.86). It was not possible to assess risk factors because this prevalence was so low.

Conclusions: The prevalence of congenital cytomegalovirus infection in an intensive care unit at a public hospital in Porto Alegre was not considered elevated and was comparable with prevalence rates found by other studies.

J Pediatr (Rio J). 2006;82(1):46-50: Cytomegalovirus, congenital cytomegalovirus, polymerase chain reaction, newborn, neonate.

Introdução

O citomegalovírus (CMV) pertence à família dos herpesvírus e é causa freqüente de infecção nos seres humanos. Esse vírus sofre períodos de ativação e latência e, uma vez que a mulher é infectada, o vírus permanece

indefinidamente no corpo do hospedeiro, podendo haver uma reativação a qualquer momento¹.

A transmissão fetal ocorre durante a gestação, por via transplacentária. Quanto mais precoce a transmissão da infecção da mãe para o feto, pior é o prognóstico e maior a chance de malformações (MF) graves. A infecção materna pode ser primária (em mulheres que nunca tiveram a infecção) ou recorrente (por reativação viral ou reinfeção por outras cepas virais)². Quando a infecção é primária, a chance de transmissão para o feto e da existência de seqüelas mais graves é maior.

Dentre os recém-nascidos (RN) infectados, 10% serão sintomáticos. Nesse grupo, a mortalidade pode atingir até 30%, e 90% poderão ter seqüelas graves³. As principais características da infecção sintomática são: petéquias, hepatoesplenomegalia, icterícia, microcefalia, retardo de crescimento intra-uterino, prematuridade, calcificações

1. Mestre. Médica neonatologista, Serviço de Neonatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS.
2. Doutor. Professor adjunto, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Médico assistente, Serviço de Neonatologia, HCPA, Porto Alegre, RS.
3. Bioquímica, Serviço de Patologia Clínica, HCPA, Porto Alegre, RS.
4. Mestre. Bioquímica, Serviço de Patologia Clínica, HCPA, Porto Alegre, RS.

Fonte financiadora: FIPE-HCPA.

Artigo submetido em 19.05.05, aceito em 24.08.05.

Como citar este artigo: Miura CS, Miura E, Mombach AB, Chesky M. The prevalence of congenital cytomegalovirus infection in newborn infants at an intensive care unit in a public hospital. *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82:46-50.

cerebrais periventriculares, aborto, hérnia inguinal e coriorretinite⁴. Nos RN assintomáticos, 10 a 15% poderão apresentar manifestações clínicas tardias, como surdez, retardo mental e coriorretinite, podendo ocorrer ao longo dos 2 primeiros anos de vida^{5,6}.

O diagnóstico é estabelecido pelo isolamento do vírus através da cultura viral. O local preferencial é a amostra urinária, porque na urina o CMV é encontrado em elevados títulos. A técnica de cultura tecidual viral é considerada padrão-ouro e leva 2 a 6 semanas para a replicação e identificação. O método de identificação do DNA viral através da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem também alta sensibilidade e especificidade. O método de PCR apresenta algumas vantagens, como resultados mais rápidos (em 24 a 48 horas), menor quantidade de amostra necessária para o teste e possibilidade de congelamento e armazenamento das amostras coletadas⁷.

A infecção congênita por CMV é atualmente a infecção intra-uterina mais comum em todo o mundo, tendo uma prevalência de 0,2 a 2,2%. Além disso, é a principal causa infecciosa de MF do sistema nervoso central (SNC) e a principal causa de surdez e dificuldade de aprendizado na infância, tendo um impacto social muito grande^{8,9}. Em populações selecionadas, como em RN de uma unidade de terapia intensiva neonatal (UTIN), essa prevalência pode ser ainda maior, principalmente porque os RN gravemente enfermos têm associação com fatores de risco. Vários estudos associam mãe adolescente, raça negra, atividade sexual com múltiplos parceiros, estado civil solteira, multiparidade, baixa condição socioeconômica e contato com fontes de CMV (em creches, por exemplo) com um maior risco de infecção congênita^{2,10}.

A prevalência dessa infecção em nosso meio ainda não é conhecida. Existem alguns trabalhos realizados no Brasil, nos quais a prevalência variou, conforme a população estudada, entre 0,39 e 6,8%¹¹⁻¹⁴.

O diagnóstico precoce dessa infecção torna-se importante tanto para intervenção terapêutica, minimizando morbidade e mortalidade nos RN sintomáticos, quanto para a determinação de risco de seqüelas futuras nos RN assintomáticos¹⁵.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a prevalência da infecção congênita por CMV em RN da UTIN de um hospital público de Porto Alegre.

Pacientes e métodos

Foi realizado um estudo transversal de prevalência, envolvendo todos os RN que nasceram e foram internados na UTIN de um hospital público de Porto Alegre entre maio e dezembro de 2003. O tamanho da amostra baseou-se em um estudo em que a prevalência dessa infecção em uma UTIN foi de 6,8%¹³. Realizou-se um cálculo amostral no programa Epi-Info 6.0, no qual, para um intervalo de confiança de 95% e uma margem de erro de 3%, seriam necessários 241 pacientes. O estudo foi realizado no período de 5 de maio de 2003 a 4 de dezembro de 2003. Toda criança nascida nesse hospital e que foi internada na

UTIN foi elegível para o estudo. Pacientes externos não entraram no estudo para evitar vício de amostra, pois o hospital em estudo é um hospital de referência para infecções congênitas.

Uma alíquota de urina de todos os RN que participaram do estudo foi obtida através de saco coletor, sob condições assépticas, na primeira semana de vida, e enviada para o Serviço de Patologia Clínica (Unidade de Microbiologia), onde foi armazenada em *freezer* até seu processamento. Nessa amostra de urina, foi pesquisado o DNA viral pela técnica de PCR, sendo considerados infectados todos os RN com positividade no exame que foi realizado em duplicata. Foi empregada uma metodologia de PCR *in-house*, desenvolvida e utilizada em diagnósticos no Serviço de Patologia Clínica do hospital em estudo e validada pelo serviço através da comparação com a cultura viral na urina (padrão-ouro).

A detecção do CMV é baseada na amplificação de uma seqüência de DNA específica do gene da glicoproteína B desse vírus, usando a técnica de PCR dupla (*Nested-PCR*). O PCR duplo emprega duas reações de amplificação com dois pares de *primers* diferentes (externo e interno) para o mesmo genoma, resultando em um método mais sensível e específico.

As reações de PCR contêm 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCL (pH 8,8 a 25 °C), 1,5 mM MgCl₂, 0,01% (w/v) de Tween-20 (tampão de PCR, Advanced Biotechnologies), 0,25 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (Advanced Biotechnologies Ltd.), 0,1 µM de cada *primer* específico (R&D Systems Ltd.) e 0,625 unidades de Taq polimerase (Advanced Biotechnologies Ltd.). Para a purificação do material genético da amostra, utilizou-se 140 µl de urina empregando o kit Qiagen QIAamp, conforme especificações do fabricante. Na reação de PCR, foram utilizados 10 µl do DNA extraído para a primeira amplificação, que totalizou um volume final de reação de 50 µl. A amplificação com *primers* internos aconteceu em mistura idêntica à anterior, excetuando-se o fato de que o volume total foi de 25 µl e que 2 µl da primeira reação foram adicionados como amostra. As duas etapas de amplificações foram realizadas em termociclador Techne (Flexigene®). Todas as amostras foram testadas em duplicata. A amplificação da primeira reação de PCR foi executada nas seguintes condições: uma desnaturação inicial de 1 minuto e 40 segundos a 94 °C, seguida de 33 ciclos de 20 segundos a 94 °C, para desnaturação, 20 segundos a 50 °C para anelamento e 20 segundos a 72 °C para extensão. A amplificação da segunda reação de PCR foi executada nas seguintes condições: uma desnaturação inicial de 45 segundos a 94 °C, seguida de 33 ciclos de 20 segundos a 94 °C para desnaturação, 20 segundos a 50 °C para o anelamento e 30 segundos a 72 °C para extensão. Os produtos de amplificação foram detectados por eletroforese, utilizando-se 10 µl da segunda reação de PCR em gel de agarose a 2%, contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio. As bandas de DNA foram visualizadas no gel, por meio de transiluminador com luz ultravioleta. A execução dos testes levou, em média, 6 horas¹⁵.

O banco de dados foi criado em Excel, e a análise de dados foi feita através do programa SPSS versão 12.0.

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética de nossa instituição e, em todos os casos, foi obtido consentimento informado do responsável.

Resultados

No período em que foi realizado o estudo, ocorreram 261 internações de RN na UTIN. Foram excluídos dois pacientes por transfusão de hemoderivados antes da coleta de urina (0,76%), dois por ausência de consentimento dos pais (0,76%), um por perda de amostra de urina (0,38%), dois por óbito antes da coleta (0,76%) e quatro (1,5%) por alta precoce (antes da coleta).

A população estudada caracterizou-se por 145 RN do sexo masculino (58%) e 105 de RN do sexo feminino (42%). Os principais motivos de internação foram: prematuridade (111 casos, 44,4%), disfunção respiratória (64 casos, 25,6%), sepse (31 casos, 12,4%) e hipoglicemia (21 casos, 8,4%). A média de peso da população de RN estudada foi $2,412 \pm 900$ g, e a idade gestacional média foi de $35,7 \pm 3,7$ semanas. O crescimento intra-uterino da maioria dos RN foi adequado (67,9%); 26,9% eram pequenos para a idade gestacional e 5,2% grandes para a idade gestacional. A idade das mães variou de 14 a 48 anos (média $25,8 \pm 7,3$ anos). Mais de 80% da população de gestantes era casada ou tinha união estável. Das 250 gestantes que participaram do estudo, 237 (94,8%) realizaram pré-natal. Destas, 175 fizeram quatro ou mais consultas durante a gestação, e 62, de uma a três consultas.

Dos 250 RN que entraram no estudo, dois apresentaram PCR para CMV na urina positiva, o que correspondeu a uma prevalência de 0,8% (IC 95%: 0,097-2,86). Nenhum dos testes, realizados em duplicata, apresentou discordância.

Em relação aos pacientes com infecção por CMV, um deles era de mãe adolescente (16 anos), estudante, com parceiro fixo, preta, primeira gestação, planejada, pré-natal sem intercorrências, parto vaginal com peso 3.105 g, a termo, exame normal, SNAPE-PE (*Score for Neonatal Acute Physiology-Perinatal Extension*) 0, sexo masculino e disfunção respiratória com boa evolução. Perdeu-se o contato com essa mãe para manutenção do acompanhamento.

O outro paciente tinha mãe de 30 anos, do lar, casada, branca, segunda gestação, planejada, pré-natal com infecção ovular, gestação gemelar com um feto morto. O parto foi vaginal, peso de nascimento 1.260 g, 30 semanas de idade gestacional, SNAPE-PE 0, sexo masculino. Apresentou petéquias ao nascimento e taquipnéia persistente durante vários dias. Esse paciente manteve-se em acompanhamento em nosso serviço. Com 1 ano e 6 meses, ainda excretava CMV na urina, tinha desenvolvimento neurológico normal para a idade corrigida e exames ocular e auditivo normais.

Discussão

A infecção congênita por CMV é a infecção congênita de maior prevalência no mundo, variando de 0,2 a 2,2%. Um estudo realizado por Santos et al., em Minas Gerais,

mostrou uma prevalência de infecção congênita por CMV em UTIN de 6,8%¹³, diferente da encontrada por nós, que foi de 0,8% (dois casos de 250 pacientes). Um estudo na Finlândia detectou uma prevalência de infecção congênita por CMV de 4,8% em RN prematuros, abaixo de 34 semanas em uma UTIN, onde RN a termo não entraram no estudo¹⁶. Em Milão, Itália, a prevalência encontrada na população geral de uma UTIN foi de 1%¹⁷. No Japão, em uma UTIN, foi encontrada prevalência de 10% de infecção congênita por CMV. Os bebês com testes positivos eram pequenos para idade gestacional (PIG) ou prematuros. Também nesse estudo não são citados dados populacionais importantes, como caracterização das mães e realização de pré-natal¹⁸. Outro estudo, realizado na Hungria, encontrou, em uma UTIN, prevalência de 16,7% em RN prematuros e 14,7% em RN a termo¹⁹. Esses estudos, realizados em UTIN, mostram uma prevalência bastante variável, sem detalhar as características da cada população. Da mesma forma, estudos de prevalência realizados com todos nascimentos mostram resultados também muito variáveis. Panutti et al. estudaram, em São Paulo, populações de classe média e baixa e encontrou uma prevalência de 0,39 e 0,98%, respectivamente. Foram usadas duas técnicas diagnósticas diferentes (sorologia e cultura viral na urina), sendo demonstrada uma maior prevalência em classes socioeconômicas desfavorecidas e também a superioridade da cultura viral sobre a detecção de IgM no sangue como teste diagnóstico¹¹. Em Ribeirão Preto (SP), Yamamoto et al. mostraram uma prevalência de infecção congênita (diagnosticada por isolamento viral na urina) de 2,6%¹⁴. O mesmo grupo, também em Ribeirão Preto (SP), encontrou uma prevalência semelhante entre filhos de gestantes HIV positivas (2,7%) e gestantes HIV negativas¹². Esses pesquisadores também demonstraram não haver diferença na prevalência dessa infecção entre RN a termo (1,8%) e RN pré-termo (1%)²⁰. Trabalhos recentes realizados no Japão, México e Israel encontraram prevalências de 0,31, 0,89 e 0,7% respectivamente²²⁻²⁴. Parte dessas diferenças encontradas nos estudos de prevalência parece estar mais associada às características da população do que às características dos RN. Os trabalhos de Ribeirão Preto^{12,20} mostram que não houve uma maior prevalência de CMV congênito em gestantes HIV positivas, nem em RN prematuros. As características da população por nós estudada justificam uma menor prevalência de infecção congênita por CMV, mesmo em estudo realizado dentro de uma UTIN. Apesar de ser um hospital público, a população que o frequenta parece ser bem diferenciada. Apenas 11% das gestantes que participaram do estudo tinham menos de 18 anos; em torno de 80%, eram casadas ou tinham uma união estável, excluindo dois importantes fatores de risco para a infecção por CMV, a saber, a gestante adolescente e a promiscuidade sexual. Além disso, a grande maioria das gestantes (94,8%) fez um pré-natal adequado, recebendo orientações quanto aos cuidados necessários durante a gestação. Portanto, podemos atribuir às realizações das consultas durante o pré-natal a diferença nessa prevalência mais baixa. É sabido que a idade materna baixa, estado civil solteira, classes socioeconômicas desfavorecidas, atividade sexual com múltiplos

parceiros, multiparidade e confinamento populacional aumentam o risco de infecção congênita por CMV^{2,10}. Lansky et al. realizaram uma revisão da literatura sobre fatores que poderiam diminuir a mortalidade perinatal e concluíram que uma boa assistência pré-natal seria um deles²⁵. Um outro fator que contribui para isso é o fato de pacientes encaminhados de outros hospitais terem sido excluídos do estudo, pois nosso serviço é de referência e é comum recebermos RN com suspeita de infecção congênita. Se esses pacientes fossem incluídos, a prevalência seria mais alta, distorcendo a realidade de nosso serviço e caracterizando um viés de seleção. Apesar de o estudo de Santos et al. não citar se houve exclusão de pacientes externos, observou-se que 70% da população estudada tinha peso abaixo de 2.500 g, e a maioria era PIG, contra 57,2% de RN prematuros em nossa amostra e apenas 26,9% de PIG. É provável que os estudos citados com alta prevalência de CMV em UTIN tenham incluído pacientes externos provenientes de outras regiões, distantes desses serviços^{16,18,19}.

O método diagnóstico, por meio da técnica de PCR na urina para a pesquisa do DNA viral, tem alta sensibilidade e especificidade, facilidade de coleta e resultado rápido. Para evitar contaminação de amostras e resultados falso-positivos, foram usadas ponteiros com filtros de barreira e quatro ambientes distintos para as diversas etapas do exame, além do uso de controles negativos em cada amplificação. Também foram usados controles positivos para evitar falso-negativos. Todas as amostras foram testadas em duplicata. No momento, parece ser o exame mais confiável para o diagnóstico de infecção no RN^{7,23}. Esse método tem um custo-benefício valorizado, comparado ao grande prejuízo social causado pelas seqüelas neurológicas e auditivas conseqüentes à doença, as quais poderiam ser amenizadas por um diagnóstico precoce, ao contrário dos testes sorológicos disponíveis, que produzem resultados falsos, tanto positivo quanto negativo, como demonstrou o estudo de Neto et al. em 2004, realizado com o teste do pezinho feito em diversas áreas do Brasil através da sorologia ELISA-IgM para CMV para 15.873 RN estudados. Destes, 39 tiveram IgM positiva para CMV (0,2%). Esses RN e suas mães foram retestados para confirmação do exame, sendo que somente 16 (0,1%) tiveram o teste confirmado²⁶. Concluindo, afirmamos que o diagnóstico precoce dessa infecção possibilitaria um tratamento dos casos graves, a orientação dos familiares, o acompanhamento multidisciplinar dos bebês sintomáticos, o rastreamento e diagnóstico precoce das complicações nos bebês assintomáticos, trazendo mais esperança em relação ao futuro dessas crianças.

Referências

- Casteels A, Naessens A, Gordts F, De Catte L, Bougateg A, Foulon W. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infections. *J Perinat Med*. 1999;27:116-21.
- Stagno S, Pass RF, Cloud GA, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, et al. Primary cytomegalovirus infection: incidence, transmission to the fetus, and clinical outcome. *JAMA*. 1986;256:1904-8.
- Berenberg W, Nankervis G. Long-term follow-up of cytomegalic inclusion disease of infancy. *Pediatrics*. 1970;37:403.
- Pass RF, Stagno S, Myers GJ, Alford CA. Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of long-term longitudinal follow-up. *Pediatrics*. 1980;66:758-62.
- Reynolds DW, Stagno S, Stubbs KG, Dahle AJ, Livingston MM, Saxon SS, et al. Inapparent congenital cytomegalovirus infection with elevated cord IgM levels: Causal relationship with auditory and mental deficiency. *N Engl J Med*. 1974;290:291-6.
- Stagno S, Reynolds DW, Amos CS, Dahle AJ, McCollister FP, Mohindra I, et al. Auditory and visual defects resulting from symptomatic and subclinical congenital cytomegalovirus and toxoplasma infections. *Pediatrics*. 1977;59:669-78.
- Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus and newborn infant. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:680-715.
- Conboy T, Pass RF, Stagno S, Alford CA, Myers GJ, Britt WJ, et al. Early clinical manifestations and intellectual outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 1987;111:343-8.
- Stagno S, Pass RF, Dworski ME, Alford CA. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Semin Perinatol*. 1983;7:31-42.
- Murph JR, Souza LE, 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;147:940-7.
- Panutti CS, Vilas-Boas LS, Angelo MJ, Carvalho RP, Segre CM. Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in two socioeconomically distinct populations of a developing country. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1985;27:105-7.
- Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Figueiredo LT, Cervi MC, Duarte G. Congenital and perinatal cytomegalovirus infection in infants born to mothers infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr*. 1998;132:285-90.
- Santos DV, Souza MM, Gonçalves, SH, Cotta AC, Melo LA, Andrade GM, et al. Congenital cytomegalovirus infection in a neonatal intensive care unit in Brazil evaluated by pcr and association with perinatal aspects. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000;42:129-32.
- Yamamoto AY, Figueiredo LT, MussiPinhata MM. Prevalência e aspectos clínicos da infecção congênita por citomegalovírus. *J Pediatr (Rio J)*. 1999;75:23-8.
- Demmler GJ. Infectious Diseases Society of America and Centers for Disease Control. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. *Rev Infect Dis*. 1991;13:315-29.
- Read SJ, Jeffery KJ, Bangham CR. Aseptic meningitis and encephalitis: the role of PCR in the diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol*. 1977;35:691-6.
- Panhani S, Heinonen K. Screening for congenital cytomegalovirus infection among preterm infants born before the 34th gestational week in Finland. *Scand J Infect Dis*. 1994;26:375-8.
- Barbi M, Cappellini D, Ferrante P, Ruggeri M, Lattanzio M, Ferliga A, et al. Infezioni congenite da cytomegalovirus in una unita' di patologia neonatale. *Boll Ist Sieroter Milan*. 1985;64:262-8.
- Oda K, Oki S, Tsumura N, Nakao M, Motohiro T, Kato H. Detection of cytomegalovirus DNA in urine from newborns in NICU using a polymerase chain reaction. *Kurume Med J*. 1995;42:39-44.
- Nagy A, Endreffy E, Streitman K, Pinter S, Pusztai R. Incidence and outcome of congenital cytomegalovirus infection in selected groups of preterm and full-term neonates under intensive care. *In Vivo*. 2004;18:819-23.
- Yamamoto AY, MussiPinhata MM, Pinto PC, Figueiredo LT, Jorge SM. Congenital cytomegalovirus infection in preterm and full-term newborn infants from a population with a high seroprevalence rate. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20:188-92.
- Noyola DE, Elizondo AR, Lima JM, Canseco-Lima JM, Allende-Carrera R, Hernansez-Salinas AE, et al. Congenital cytomegalovirus infection in San Luis Potosi, Mexico. *Pediatr Infect Dis J*. 2003;22:89-90.
- Numazaki K, Fujikawa T. Chronological changes of incidence and prognosis of children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection in Sapporo, Japan. *BMC Infect Dis*. 2004; 4: 22 doi:10.1186/1471-2334-4-22. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/4/22>.

24. Schlesinger Y, Halle AI, Eidelman D, Reich D, Dayan D, Rudesnky B, et al. Urine polymerase chain reaction as a screening tool for the detection of congenital cytomegalovirus infection. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2003;88:F371-4.
25. Lansky S, França E, Leal MC. Perinatal mortality and evitability: a review. Rev Saude Publica. 2002;36:759-72.
26. Neto EC, Rubin R, Schulte J, Giugliani R. Newborn screening for congenital infectious disease. Emerg Infect Dis. 2004;10:1069-73.

Correspondência:

Clarissa Miura
Rua 17 de Junho, 482/501, Menino Deus
CEP 90110-170 – Porto Alegre, RS