

SILVANA VARELLA PARMIGIANI

**ACURÁCIA DA SOROLOGIA EM COMPARAÇÃO À REAÇÃO
EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) NO DIAGNÓSTICO DE
INFECÇÃO MATERNA PELO CITOMEGALOVÍRUS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Mestre em
Tocoginecologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO BARINI
CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

UNICAMP
1999

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

P241a Parmigiani, Silvana Varella
Acurácia da sorologia em comparação à reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico de infecção materna pelo citomegalovírus/ Silvana Varella Parmigiani. Campinas, S.P.: [s.n.], 1999.

Orientadores: Ricardo Barini, Sandra Cecília Botelho Costa

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Viroses. 2. Feto. I Ricardo Barini. II. Sandra Cecília Botelho Costa. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: SILVANA VARELLA PARMIGIANI

Orientador: Prof. Dr. RICARDO BARINI

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

Membros:

1.

2.

3.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 17/12/99

Dedico esta tese ...

*... ao meu querido marido Alessandro,
pelo seu incentivo, companheirismo,
compreensão e amor, a todo instante.*

*... aos meus pais, Benedito e Maria,
pela confiança e estímulo
que sempre me deram.*

*... aos meus irmãos,
que de uma forma ou de outra,
sempre estiveram ao meu lado,
confiando e apoiando.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ricardo Barini, meu orientador, exemplo de inteligência e capacidade profissional, minha gratidão pelo incentivo e, principalmente, por ter acreditado na minha pessoa e na capacidade do trabalho científico.

À Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa, co-orientadora, pelo profissionalismo e ajuda inestimável.

Ao Prof. Dr. Antonio Fernandes Moron e Prof. Dr. José Carlos Gama, que concederam-me a honra de integrar a Banca Examinadora dessa dissertação de Mestrado.

Ao Prof. Dr. Renato Passini Jr. e Profa. Dra. Eliana Amaral, pelas suas valiosas contribuições.

Ao Dr. Emílio F. Marussi, minha gratidão e admiração pelos seus ensinamentos e pela confiança depositada em minha pessoa.

À Profa. Dra. Cleide Mara M. O. Franzin, exemplo de conduta e capacidade profissional, pelo carinho, confiança e valiosos ensinamentos. Minha gratidão pelo incentivo e amizade.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, pelo companheirismo e considerações durante o curso.

Aos meus colegas de trabalho, Milton, Kléber, Regina, Fernanda e às residentes Simone e Cristiane, meu agradecimento pela ajuda e compreensão no dia-a-dia.

À enfermeira Zoraide F. P. Gregório, pela sua colaboração e presteza durante a fase de coleta de dados.

À Paula Durante e à toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular, pela seriedade e dedicação na realização dos exames.

Ao Dr. Cláudio, do Departamento de Patologia Clínica, pela atenção e disponibilidade em relação à pesquisa.

Às amigas Eliana e Verônica, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho, pelo carinho e incentivo na vida diária.

Às amigas Jandira, Marilza, Dirce, Eunice, Ana Lúcia, Tereza e Norberta, pela colaboração e incentivo.

À Dra. Lys Cabral A. Borsoi, pela colaboração fundamental na coleta de dados.

À Dra. Renata Zaccaria e Dra. Carolina Leite Drummond, pela colaboração na fase final da coleta de dados e incentivo.

À Sueli Chaves, chefe da ASTEC, pelo companheirismo, apoio e amizade.

À Rosário e William, pelo carinho e atenção na elaboração deste trabalho.

À Margarete Donadon, por sua amizade e incentivo.

Aos amigos e funcionários da ASTEC, meu agradecimento por tão grande competência.

Às minhas pacientes, pela infindável contribuição, minha gratidão e reconhecimento.

“Não se pode ensinar tudo a alguém, pode-se apenas ajudá-lo a encontrar por si mesmo.”

Galileu Galilei

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Resumo

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3. Casuística e Métodos.....	18
3.1 Critérios e procedimentos para seleção dos sujeitos.....	18
3.2 Desenho do estudo.....	19
3.3 Variáveis em estudo.....	20
3.3.1 Variáveis de controle.....	20
3.4 Ficha para coleta de dados.....	21
3.5 Coleta de dados.....	21
3.6 Técnica Laboratorial.....	22
3.7 Processamento de Dados.....	22
3.8 Aspectos Éticos.....	23
4. Resultados.....	26
5. Discussão.....	38
6. Conclusões.....	56
7. Summary.....	58
8. Referências Bibliográficas.....	60
9. Bibliografia de Normatizações.....	69
10. Anexos.....	70

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CMV	citomegalovírus
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
E	especificidade
IgG	imunoglobulina classe G
IgM	imunoglobulina classe M
ml	mililitro
MF	malformação
PCR	reação em cadeia da polimerase
PNE	Pré-natal especializado
RCIU	retardo de crescimento intra-útero
rpm	rotações por minuto
RV	razão de verossimilhança
S	sensibilidade
SAS	Statical analysis system
SNC	sistema nervoso central
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a acurácia do teste sorológico *ELISA* (*Enzyme linked immunosorbent assay*) no diagnóstico de infecção materna pelo citomegalovírus (CMV) em comparação à reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi realizado um estudo descritivo, do tipo validação de teste diagnóstico, no qual foram admitidas 243 gestantes atendidas no Ambulatório de Pré-Natal Especializado do Centro de Assistência Integral à Saúde da Mulher (PNE/CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Todas as gestantes tinham indicação de análise sanguínea fetal. As pacientes foram submetidas à coleta de sangue para pesquisa de CMV, utilizando-se comparativamente o teste sorológico em relação à PCR. Neste estudo, o padrão-ouro utilizado foi o teste de PCR em sangue. As principais indicações para a análise fetal foram diagnóstico de malformação do sistema nervoso central (25,5%), toxoplasmose materna (25,5%) e isoimunização pelo fator Rh (14,8%). A frequência de infecção pregressa pelo CMV foi de 94,6% na população estudada. Duas das pacientes apresentavam suspeita de infecção pelo CMV. Comparando os testes diagnósticos em sangue materno,

encontramos uma sensibilidade de 94% e especificidade de 6% da IgG materna; a sensibilidade e especificidade da IgM materna foram 4,0% e 100%, respectivamente. Em conclusão, os testes sorológicos mostraram baixa acurácia diagnóstica em relação à PCR na identificação de gestantes com infecção ativa pelo citomegalovírus na população estudada.

1.1 Introdução

O citomegalovírus (CMV) um DNA vírus, da família do herpes vírus, extremamente termolábil e de ciclo lento de crescimento. Produz típicos corpúsculos de inclusão intranucleares e citoplasmáticos durante sua multiplicação tissular (STAGNO et al.,1982).

O CMV pode infectar pessoas de todas as faixas etárias, raças e níveis socioeconômicos (NELSON & DEMMLER, 1997). A infecção pelo citomegalovírus ocorre praticamente em todas as regiões do mundo. A prevalência de anticorpos aumenta com a idade, atingindo níveis máximos após os 25 anos. Existe nítida relação entre prevalência de anticorpos numa determinada população adulta e seu nível socioeconômico. Em população de alto nível socioeconômico, a prevalência tem variado nos diversos países estudados de 40% a 60%, enquanto em população de nível socioeconômico mais baixo, a prevalência é maior variando de 80% a 100% (HO, 1990). Crianças que não foram infectadas congenitamente ou no período perinatal pelo citomegalovírus, geralmente serão

infectadas durante o período pré-escolar. O citomegalovírus também pode ser adquirido na puberdade ou adolescência (YOW, 1989).

Descrito originalmente na década de 50 como "doença de inclusão citomegálica", a infecção pelo citomegalovírus é conhecida como causa de doenças no feto e em recém-nascidos, sendo a maioria das infecções assintomáticas até o nascimento. Entretanto, em alguns casos pode se manifestar com gravidade no feto ou determinar seqüelas tardias (STAGNO et al., 1982; ALFORD et al., 1990).

A transmissão do citomegalovírus ocorre através de contato íntimo (sexual, secreção nasofaríngea), por via transplacentária (infecção congênita), secreções do canal de parto, leite materno (infecção neonatal), transfusões e transplantes (DEMMLER, 1992).

A infecção primária pelo CMV, primeiro contato com o agente infeccioso, é freqüentemente seguida por infecção persistente e/ou recorrente, neste último caso pela reativação do vírus latente. O fator que determina a reinfecção é, provavelmente, devido às características de diversidade antigênica do citomegalovírus. Na grande maioria dos casos, a infecção é subclínica. No entanto, sob certas condições específicas, como em crianças com infecção congênita, a apresentação clínica pode ser grave e conduzir à morte (HO, 1990).

Durante a gestação, a infecção primária pelo citomegalovírus ocorre em 0,7% a 4,1% das gestações, com taxas de transmissão ao feto variando entre

24% a 75% com média de 40% (STAGNO et al.,1982; STAGNO et al., 1986; YOW, 1989; ALFORD et al., 1990; GRIFFITHS et al.,1991; DEMMLER, 1992).

O vírus pode ser encontrado na urina, em secreções de orofaringe, secreções cervical e vaginal, sêmen, leite materno, sangue e órgãos transplantados (STAGNO et al.,1975). Tanto as secreções cervicais como o sêmen são importantes reservatórios de citomegalovírus para transmissão da infecção durante a atividade heterossexual. Uma vez acometida a cérvix uterina, a infecção pode se cronificar. A prevalência parece ser maior em pessoas com múltiplos parceiros sexuais, entre as mulheres mais jovens e em estágios avançados de gravidez (GRIFFITHS et al.,1982).

A presença de anticorpos maternos contra o citomegalovírus não previne a transmissão fetal, mas parece ter efeito protetor em relação à doença fetal (FOWLER et al., 1992).

O CMV foi considerado por STAGNO et al. em 1977, como o agente mais comum de infecção intra-uterina. Em publicação de 1990, reafirmaram que o citomegalovírus era a causa mais comum de infecção intra-uterina, afetando cerca de 1% de todos os nascidos vivos nos Estados Unidos (STAGNO et al.,1977; STAGNO,1990). Em estudo de NEWTON (1999), o CMV foi a segunda infecção mais freqüente (a primeira causa foi infecção pelo Estreptococo do grupo B). Em 3,8 milhões de partos nos Estados Unidos, foram identificados 1552 recém-nascidos infectados pelo CMV.

Quando ocorrem, os sintomas da infecção materna podem permanecer por dias ou semanas e incluem: febre, fadiga, cefaléia, mialgias, diarreia, náusea, linfadenomegalia cervical ou generalizada e, mais raramente, hepatoesplenomegalia e rash cutâneo. Na análise laboratorial pode-se encontrar linfopenia ou linfocitose, linfócitos atípicos, aumento das transaminases hepáticas e trombocitopenia. Geralmente, os anticorpos IgG e IgM específicos para o citomegalovírus se mantêm positivos até final dos sintomas (ALFORD et al., 1990).

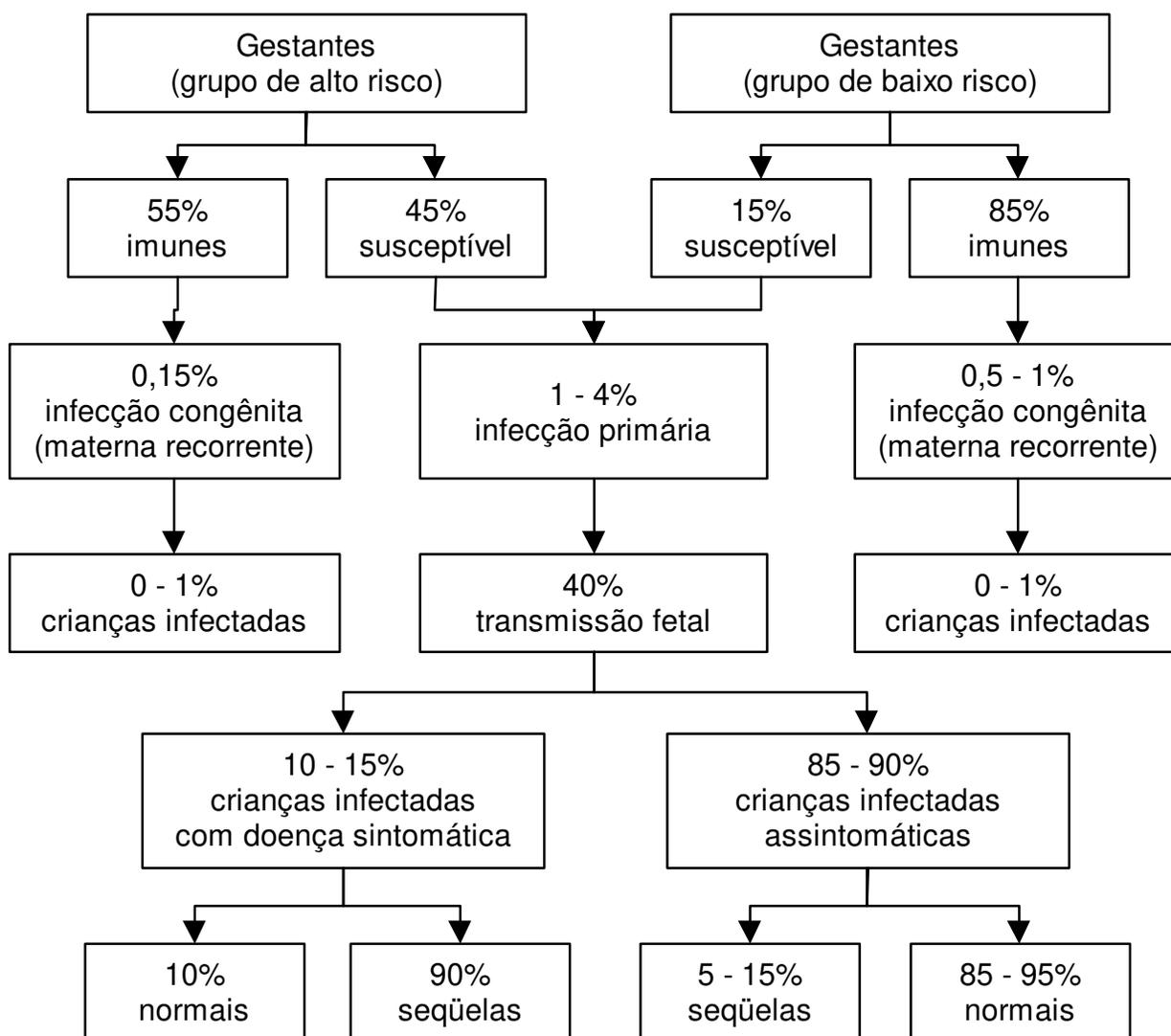
O grau de imunidade entre mulheres em idade reprodutiva é um importante fator na determinação da incidência e significância da infecção congênita e perinatal pelo citomegalovírus (STAGNO, 1990). Cerca de 30% a 40% das gestantes com infecção primária pelo citomegalovírus transmitem o vírus a seus fetos. No caso de infecção recorrente, a transmissão fetal é em torno de 0,5 à 1%. A infecção recorrente provavelmente resulta da reativação do vírus materno durante a gravidez (STAGNO et al., 1986). A transmissão do citomegalovírus da mãe para o feto pode ocorrer em qualquer fase da gestação, porém o comprometimento fetal é mais severo na primeira metade da gestação (STAGNO et al., 1986; YOW, 1989; GRIFFITHS et al., 1991).

As seqüelas congênitas são mais graves em associação à infecção primária (STAGNO et al., 1982). Em geral, 10% dos fetos são sintomáticos ao nascimento, 20% a 30% dos fetos vão à óbito, e a maioria apresenta manifestações tardias. Seqüelas neurológicas tardias ocorrem em 5% a 15% dos recém-nascidos

assintomáticos (STAGNO & WHITLEY, 1985). Os fetos acometidos pós infecção primária materna geralmente apresentam sinais mais graves ao nascimento que os afetados por infecção recorrente. Também apresentam maior incidência de manifestações identificadas mais tardiamente como surdez neurossensorial bilateral e retardo mental. A infecção congênita resultante da reativação do citomegalovírus tem se mostrado comum especialmente em populações com imunidade comprovada (FOWLER et al., 1992).

DIAGRAMA

Características da infecção por citomegalovírus na gestação
(Stagno & Whitley, 1985)



Alguns achados ecográficos podem sugerir infecção pelo citomegalovírus no seguimento de rotina da gestante: oligo ou polidrâmnio, hidropisia não imune, ascite fetal, retardo de crescimento intra-uterino, ventriculomegalia ou hidrocefalia, calcificações intracranianas e hepáticas e hepatoesplenomegalia (DONNER et al., 1993).

Em estudo de HOHLFELD et al. (1991), após a infecção primária, o risco de transmissão ao feto foi estimado em torno de 40%, de maneira semelhante a STAGNO et al., (1986). A maioria dos recém-nascidos apresentava-se normal ao nascimento, 10% apresentavam sinais e sintomas e cerca da metade apresentava doença de inclusão citomegálica generalizada. Os achados mais comuns em recém-nascidos acometidos por citomegalovírus congênito são petéquias, hepatoesplenomegalia, microcefalia, retardo de crescimento intra-uterino e coriorretinite (LYNCH et al.,1991).

Os estudos que, isoladamente, abordam o diagnóstico pré-natal da infecção, são essenciais na detecção dos fetos de risco e na avaliação de sinais e sintomas tardios (GROSE & WEINER, 1990; LAMY et al., 1992). A presença de trombocitopenia, linfopenia e aumento das transaminases hepáticas sugerem que a doença pelo citomegalovírus pode estar presente tanto na mãe como no feto (HOHLFELD et al., 1991).

Os métodos diagnósticos utilizados para detecção do citomegalovírus na vida intra-uterina e pós-natal, podem ser citológicos e histopatológicos,

isolamento do vírus, sorológicos, identificação de antígenos virais e identificação de ácidos nucleicos (CHOU, 1990).

Os métodos sorológicos são mais comumente utilizados no diagnóstico de infecção pelo citomegalovírus.

Os métodos sorológicos detectam anticorpos produzidos contra o citomegalovírus e nas gestantes, em geral, não apresentam grande complexidade de execução. O requisito principal para a obtenção de resultados positivos é a capacidade do paciente apresentar resposta imunológica humoral adequada contra o citomegalovírus (HOHLFELD, 1991). Os métodos modernos discriminam anticorpos IgM e IgG, sendo mais comumente utilizados os de imunofluorescência indireta e imunoensaio enzimático. A presença de anticorpo IgM específico sugestiva de infecção ativa.

A presença de IgM específica em sangue fetal identifica infecção fetal. Em estudo de DONNER et al., (1993), a sensibilidade variou de 20% a 75% dependendo da performance do teste sorológico usado. Contudo, a sorologia negativa não exclui a possibilidade de infecção fetal pelo citomegalovírus.

Na infecção primária, o anticorpo IgM aparece primeiro que o IgG e pode ser encontrado uma a duas semanas após o início da doença, persistindo por seis a nove meses (Figura 1). Também tem sido encontrado IgM em reativação ou reinfecção. A detecção de IgM específica através do método Elisa se mostra

mais sensível e específico quando comparado à imunofluorescência indireta (RASMUSSEN et al.,1982; PANNUTI et al.,1987).

Os testes sorológicos são de mais fácil execução que os métodos virológicos. Contudo, sua correta interpretação é quase sempre complicada pela presença de anticorpos IgG que normalmente são transmitidos da mãe para o feto. A detecção de anticorpos IgM fetais é, teoricamente, o método mais prático de diagnóstico de infecção congênita. Resultados falso-negativos podem derivar da competição entre altos níveis de IgG maternos, níveis relativamente baixos de IgM fetal e imaturidade do sistema imune fetal (STAGNO et al., 1985).

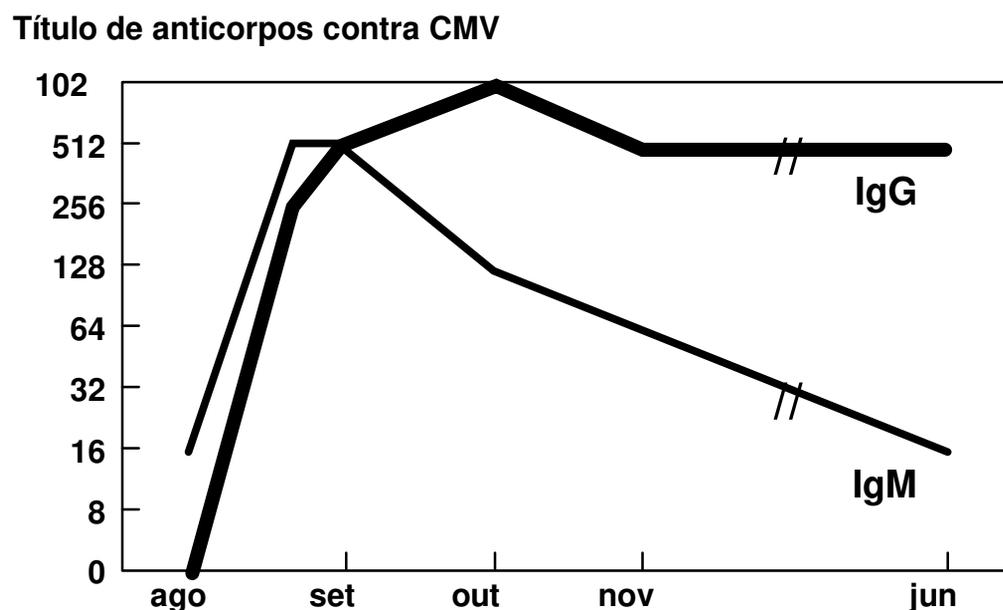


Figura 1. Curva de IgG e IgM em CMV(materno)

Em estudo diagnóstico de citomegalovírus em sangue materno utilizando detecção de anticorpos IgM através das técnicas sorológicas de ELISA e radioimunoensaio, STAGNO & WHITLEY (1985), encontraram uma especificidade próxima de 95% e sensibilidade de 70%.

Em estudo de DONNER et al., de 1993, a sensibilidade do IgM específico em sangue fetal foi de 69% e, em estudo de SIMONCINI, de 1999, a sensibilidade foi próxima de 70%.

Nos últimos anos, vários métodos tem sido desenvolvidos para a quantificação do CMV principalmente em pacientes imunocomprometidos (transplantados e pacientes HIV positivos). Os métodos mais importantes e mais usados clinicamente para diagnóstico e quantificação do CMV no sangue são: viremia (quantificação de antígenos em leucócitos no sangue periférico); antigenemia (quantificação pelo número de células, geralmente leucócitos, positivas para o CMV); avides de anticorpos (poder de fixação antígeno/anticorpo); PCR com análise da carga viral (detecção por ml da quantidade de vírus na amostra estudada) (GERNA et al., 1998).

Estes métodos visam, principalmente, uma monitorização da infecção/doença em pacientes transplantados ou HIV positivos. Em estudo de LIPSON et al., de 1998, a antigenemia para CMV serviu como marcador de infecção pelo CMV no seguimento e monitorização do tratamento de pacientes transplantados.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA (Figura 2), a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas (SAIKI, SCHARF, FALOONA,1985). A elevada sensibilidade da PCR permite a detecção de quantidades reduzidas de partículas virais (DNA ou RNA), facilitando assim o diagnóstico de indivíduos doentes com pequeno número de células infectadas que, com métodos sorológicos disponíveis, seria de difícil concretização (WRIGHT & WYNFORD, 1990; GERNA et al.,1995).

Em estudo de WARREN et al., (1992), a sensibilidade do teste PCR foi de 89,2% e a especificidade de 95,8% e, havendo seleção de *primers* (*seqüência de nucleotídeos*) e condições adequadas, o PCR pode ter resultados comparáveis aos da cultura de tecidos que é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da infecção pelo CMV. A cultura viral em líquido amniótico é o melhor método usado para o diagnóstico de infecção fetal pelo citomegalovírus (DREW, 1988; DONNER et al., 1993). Em estudo de SIMONCINI (1999) a sensibilidade da PCR em líquido amniótico foi de 83% quando comparada à cultura e, em urina, a sensibilidade foi de 100% (a especificidade foi de 100% tanto em líquido como em urina).

A detecção do DNA do citomegalovírus em líquido amniótico ou sangue fetal através da PCR é um método bastante sensível e valioso no diagnóstico pré-natal desta infecção (REVELLO et al., 1995; 1998).

1. marcador de peso molecular
2. controle de cepa negativo
3. controle de cepa positivo
4. bandas de β -globina
5. casos positivos

Figura 2. PCR (eletroforese)

Em pacientes transplantados, a detecção de DNA viral do CMV através da PCR está significativamente associada com presença de infecção ativa e desenvolvimento de doença pelo CMV (LAO et al., 1997).

Em estudo de PROSCH et al., 1992, o PCR foi mais sensível e mais precoce que a cultura no diagnóstico de infecção pelo CMV em pacientes transplantados, quando usados na monitorização da eficácia da terapia antiviral.

Entretanto em estudo de KANDA et al., em 1998, o teste de PCR positiva discriminou pacientes com replicação viral do CMV mas, isoladamente não estimou o risco para o desenvolvimento da doença.

O PCR pode ser usado qualitativamente no diagnóstico de infecção ativa pelo CMV e, quantitativamente, para prognóstico da infecção, através da carga viral que reflete o número de células infectadas e a quantidade de DNA do vírus em cada célula (BOIVIN et al., 1999).

Em estudo de AITKEN et al., 1999, cargas virais mais altas foram detectadas em pacientes sintomáticos e/ou em casos de infecção primária, que em pacientes assintomáticos e/ou em casos de infecção recorrente por reativação ou reinfeção.

REVELLO et al., em 1995 e 1998, usaram IgM específica para CMV, PCR em líquido amniótico e cultura viral em estudo para avaliar qual o teste que permitiria o diagnóstico mais precoce e preciso de infecção pelo CMV. O objetivo era avaliar o teste que poderia reduzir o intervalo entre diagnóstico de infecção materna e a infecção fetal. O diagnóstico materno foi documentado através da soroconversão, sintomas clínicos e aumento das transaminases hepáticas. A cultura viral em líquido amniótico detectou nove dos 13 fetos infectados; o PCR detectou 10 dos 13 casos; o IgM específico detectou cinco dos 13 casos (as sensibilidades encontradas foram: 69,2%, 76,9% e 55,5%, respectivamente). Os autores deste estudo concluíram que a combinação de técnicas com boa sensibilidade poderia melhorar o diagnóstico pré-natal e propuseram a realização de estudos prospectivos para estudar a performance dos testes diagnósticos na identificação de infecção pelo CMV em gestantes e fetos para se

optar pelo melhor teste que poderia reduzir o intervalo entre diagnóstico da infecção materna e fetal.

Estudos como este, comparando a performance do teste sorológico em relação à PCR no diagnóstico de citomegalovírus, podem vir a determinar a validade da sorologia materna e nos casos com infecção permitir uma melhor avaliação do risco de transmissão e desenvolvimento de doença fetal.

Objetivos

2. *Objetivos*

2.1 Objetivo Geral

Estudar a acurácia dos testes sorológicos em comparação à PCR em sangue no diagnóstico de gestantes com infecção pelo CMV.

2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar a soroprevalência de CMV em gestantes atendidas no ambulatório de pré-natal especializado com indicação de estudo sanguíneo fetal.
2. Determinar a sensibilidade e especificidade do marcador sorológico IgG no diagnóstico de infecção materna ativa pelo CMV.
3. Determinar a sensibilidade e especificidade do marcador sorológico IgM no diagnóstico de infecção materna ativa pelo CMV.

Casuística e Métodos

3. Casuística e Métodos

3.1 Critérios e procedimentos para seleção dos sujeitos

Foram admitidas ao estudo gestantes atendidas no PNE do CAISM/UNICAMP com indicação de análise sangüínea fetal. A idade gestacional mínima para coleta de exames foi 21 semanas. As indicações para análise fetal foram:

- ? Achado ultra-sonográfico de malformação fetal.
- ? Suspeita de infecção congênita (CMV, toxoplasmose, rubéola).
- ? Suspeita e/ou antecedente de doença cromossômica.
- ? Isoimunização materno-fetal.
- ? Retardo de crescimento intra-uterino.

As pacientes, cujos fetos tinham indicação de cordocentese, foram convidadas a participar do presente estudo.

3.2 Desenho do estudo

Estudo descritivo do tipo validação de teste diagnóstico. O cálculo do tamanho amostral foi feito à partir da referência de STAGNO et al., (1985) e SNEDECOR & COCHRAN (1980).

- ? **P:** Proporção de verdadeiros-positivos (sensibilidade) no exame sorológico “ELISA” comparado à PCR na urina do recém-nascido.
- ? **D:** Diferença desejada entre a proporção amostral e populacional (absoluta, em pontos percentuais).
- ? **alfa:** coeficiente de confiança.

TAMANHOS DE AMOSTRA SEGUNDO DIFERENÇA DESEJADA E ERRO TIPO L (p= 69%)

D	alfa=0,10	Alfa=0,05	alfa= 0,01
3	643	913	1577
4	362	514	887
5	231	329	568
6	161	223	394

STAGNO, et al., (1985)

O tamanho amostral segundo diferença desejada (D=6), coeficiente de confiança (alfa=0,05) foi de 223 casos.

3.3 Variáveis em estudo

Tratando-se de estudo descritivo do tipo validação de teste diagnóstico, a variável utilizada como padrão-ouro foi o resultado do teste PCR. O padrão-ouro foi definido segundo FLETCHER, FLETCHER, WAGNER (1996) como um indicador mais fiel para saber se a doença está ou não realmente presente. O teste diagnóstico avaliado foi o teste sorológico através do IgG e IgM pelo método de ELISA.

3.3.1 Variáveis de controle

As variáveis de controle foram:

- ? **Idade materna:** idade em anos dividida em faixas etárias até 20 anos, de 21 a 30 anos, de 31 a 40 anos e acima de 41 anos.
- ? **Raça:** as pacientes foram divididas em raça branca e não branca.
- ? **Estado civil:** as pacientes foram divididas em parceiro fixo (casadas/amasiadas) e parceiro não fixo (solteira).
- ? **Escolaridade:** utilizada como parâmetro sócio-econômico e classificada em nenhuma escolaridade, até primeiro grau, até segundo grau e nível superior.
- ? **Número de parceiros até o momento do estudo:** número de parceiros sexuais até o momento da entrevista de entrada ao estudo.
- ? **Número de gestações:** definido como o número de gestações até o momento de entrada no estudo.

- ? **Indicação de análise sangüínea fetal:** razão pela qual havia indicação da análise sangüínea fetal. Esta variável de controle foi definida como achado de malformação fetal, suspeita de infecção congênita, suspeita e/ou antecedente de doença cromossômica, isoimunização Rh, RCIU.
- ? **Sintoma clínico:** presença/ausência de sintoma clínico associado a infecção pelo CMV. Os sinais e sintomas observados foram: cefaléia, mialgia, febre e linfadenomegalia durante a gestação até o momento da entrada no estudo.

3.4 Ficha para coleta de dados

Foi desenvolvida uma ficha para coleta de dados cujo modelo encontra-se no ANEXO 2.

3.5 Coleta de dados

Na admissão ao estudo, foi preenchida um ficha individual para cada voluntária que foi complementada posteriormente com os dados relativos aos exames laboratoriais.

As voluntárias incluídas no estudo foram submetidas a coleta de 10 ml de sangue de veia periférica com seringa e agulha descartáveis, por profissional treinado para a coleta dos testes diagnósticos. A amostra de sangue para a realização do teste sorológico ELISA foi coletada em tubo seco e para o teste PCR, o sangue foi coletado em tubo com EDTA (5ml para cada teste).

O sangue foi coletado no dia em que a paciente compareceu ao PNE para a realização de cordocentese imediatamente antes do procedimento.

3.6 Técnica Laboratorial

Neste estudo, foram realizados dois tipos de testes diagnósticos para identificação de infecção pelo CMV: a técnica sorológica tipo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para a detecção de anticorpos da classe IgG e IgM contra o CMV e a reação em cadeia catalisada pela polimerase tipo *nested* (“*Nested PCR*”) para a detecção de partículas virais no sangue. A descrição das técnicas referentes a cada teste diagnóstico estão no ANEXO 1.

3.7 Processamento de Dados

As fichas foram arquivadas segundo o número do caso. Um programa de entrada de dados e de consistência lógica foi elaborado para permitir a criação de um arquivo. O programa de entrada de dados utilizado foi o Epi-info versão 6. A análise dos resultados foi feita utilizando-se programa de cálculo estatístico denominado SAS. O teste utilizado para caracterização estatística foi o teste exato de Fisher.

3.8 Aspectos Éticos

As gestantes atendidas no Ambulatório de Pré-Natal Especializado e que tinham indicação de análise sangüínea fetal, realizaram coleta de amostra sangüínea para a realização dos testes diagnósticos de ELISA e PCR.

Na admissão ao estudo, as voluntárias foram informadas sobre os objetivos e métodos da pesquisa e só foram admitidas se concordassem, assinando um “Consentimento informado” (ANEXO 3).

As fichas das pacientes foram identificadas em folha na qual constaram nome, HC, número do estudo e data. Após a coleta de todos os dados, esta folha foi eliminada, persistindo nas fichas apenas o número da voluntária no estudo, sem identificação da mesma. As fichas foram preenchidas pelo investigador e arquivadas em fichário próprio, sendo posteriormente preparadas para digitação.

Na admissão ao estudo, foi preenchida uma ficha individual para cada voluntária que foi complementada posteriormente com os dados relativos aos exames laboratoriais.

Os resultados dos exames colhidos foram afixados no prontuário individual de cada voluntária que foram devidamente informadas.

A identificação da gestante foi mantida em sigilo. Os respectivos nomes e registros foram anotados em um caderno à parte, que ficou em poder do pesquisador até o fim do estudo. Os dados obtidos foram mantidos em

segurança e somente tiveram acesso a eles o pesquisador e o pessoal envolvido diretamente na pesquisa.

Respeitaram-se os termos da DECLARACIÓN DE HELSINKI (1990) e da RESOLUÇÃO 196 (CNS 196/96) em relação às diretrizes e normas de pesquisa envolvendo seres humanos.

As gestantes que participaram do estudo não receberam qualquer tipo de remuneração por esta participação.

R esultados

4. Resultados

Inicialmente serão apresentadas as características descritivas da população estudada com os resultados referentes à distribuição das pacientes segundo a faixa etária, raça, estado civil, escolaridade, número de parceiros, número de gestações, sintomas clínicos e indicação da investigação.

A seguir, serão apresentados os resultados dos testes diagnósticos utilizados em relação às variáveis de controle estudadas.

Finalmente serão apresentados os resultados referentes aos cálculos de sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos em relação à PCR.

A tabela 1, mostra a distribuição das pacientes segundo a faixa etária. A maioria das pacientes se encontrava entre 21 e 30 anos de idade (51,4%) com média de idade de 26 anos.

Tabela 1. DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES POR FAIXA ETÁRIA

Idade (anos)	n	%
≤ 20	54	22,2
21-30	125	51,4
≥ 31	64	26,3
Total	243	100

A tabela 2 mostra as características sociodemográficas das pacientes. A maioria das pacientes era de raça branca, tinha parceiro fixo (casadas ou amasiadas) e havia cursado ou estava cursando o primeiro grau. Cerca de 80,1% das pacientes referiam apenas um ou dois parceiros sexuais até o momento da entrevista, com porcentagens de 50,6% e 30,5% respectivamente. Em relação ao número de gestações, 70,4% das pacientes referiam pelo menos duas gestações e 29,6% eram primigestas. Quando questionadas sobre a presença de sintomas que pudessem estar associados à infecção pelo CMV, 10 pacientes (4,1%) referiam presença de sintomas.

Tabela 2. DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES POR RAÇA, ESTADO CIVIL, ESCOLARIDADE, NÚMERO DE PARCEIROS, NÚMERO DE GESTAÇÕES E SINTOMAS CLÍNICOS

Características	n	%
Raça		
Branca	182	74,9
Não branca	61	25,1
Estado civil		
Casada/amasiada	208	85,6
Solteira	35	14,4
Escolaridade		
Nenhuma	8	3,3
Até 1º grau	166	68,3
Até 2º grau	63	25,9
Superior	6	2,5
Número de parceiros		
1	123	50,6
2	74	30,5
3 ou mais	46	18,9
Número de gestações		
1 gestação	72	29,6
≥ 2 gestações	171	70,4
Sintoma clínico		
Presente	10	4,1
Ausente	233	95,9
Total	243	100

As indicações para o estudo fetal estão descritas na tabela 3. As principais indicações foram malformação do sistema nervoso central (25,5%), suspeita de infecção por toxoplasmose (25,5%) e isoimunização pelo fator Rh (14,8%). Duas das pacientes estudadas apresentavam suspeita de infecção por CMV. Estas pacientes foram referidas ao PNE com teste sorológico com IgM específica para o CMV reagente.

Outras indicações foram malformações cardíacas, torácicas, do trato gastrointestinal, hidropisia fetal não imune, rubéola, idade materna, antecedente de malformação fetal ou cromossomopatia, translucência nucal alterada, consangüinidade e RCIU.

Tabela 3. DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES POR INDICAÇÃO DA INVESTIGAÇÃO

Indicação da investigação	n	%
MF de SNC	62	25,5
Toxoplasmose	62	25,5
Isoimunização RH	36	14,8
Outras MF	31	12,8
Hidropisia não imune	8	3,3
CMV	2	0,8
Rubéola	7	2,9
RCIU	4	1,6
Outras	31	12,8
Total	243	100

A tabela 4 mostra a distribuição resultados dos testes diagnósticos. Encontramos 94,6% de IgG reagente, 0,8% de IgM reagente e 21,9% de PCR positiva.

Tabela 4. DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DOS TESTES DIAGNÓSTICOS

Resultado	IgG		IgM		PCR	
	n	%	n	%	n	%
Positivo	230	94,6	2	0,8	49	21,9
Negativo	13	5,4	241	99,2	174	78,1
Total	243	100	243	100	223	100

A tabela 5 mostra a distribuição dos resultados reagentes e não-reagentes de IgG em relação às variáveis de controle estudadas.

Utilizando-se o IgG como marcador sorológico de infecção pregressa, encontramos uma soroprevalência de 94,6% na população de gestantes estudada.

Em relação à faixa etária, observamos um aumento da freqüência de IgG reagente com o aumento da idade. A freqüência de IgG reagente até 20 anos foi de 90,7% chegando a 100% em pacientes acima de 31 anos. Este dado foi significativo ($p= 0,03$).

Não houve diferença entre a distribuição de freqüência de IgG reagente entre pacientes brancas e não-brancas e entre pacientes com ou sem parceiro fixo. Em relação à escolaridade, observamos 100% de freqüência de IgG reagente em pacientes que não haviam freqüentado a escola e esta freqüência foi diminuindo conforme aumentava o grau de escolaridade. Analisando o

número de parceiros sexuais, encontramos aumento da frequência de IgG reagente com o aumento do número de parceiros. Houve também aumento da frequência de IgG reagente pacientes que referiam mais que uma gestação. Nenhum destes dados atingiu significância estatística.

Das dez pacientes que referiam sintomas clínicos, nove tinham IgG reagente porém este dado não foi significativo.

Tabela 5. RELAÇÃO DO IgG COM AS VARIÁVEIS ESTUDADAS

Variável	IgG não-reagente		IgG reagente		p
	n	%	n	%	
Idade (anos)					0,03*
≤ 20	5	9,8	49	90,7	
21-30	8	6,4	117	93,6	
≥ 31	-	-	64	100	
Raça					1,00
Branca	10	5,5	172	94,5	
Não branca	3	5,1	58	95,1	
Estado civil					0,11
Casada/amasiada	11	5,3	197	94,7	
Solteira	2	5,7	33	94,3	
Escolaridade					0,04
Nenhuma	-	-	8	100	
Até 1º grau	5	3,0	161	97	
Até 2º grau	7	11,1	56	89	
Superior	1	16,6	5	84	
Número de parceiros					0,75
1	8	6,5	115	93,5	
2	3	4,0	71	95,9	
3 ou mais	2	4,3	44	95,7	
Número de gestações					0,06
1 gestação	7	9,7	65	90,3	
≥ 2 gestações	6	3,5	165	96,5	
Sintoma clínico					0,42
Presente	1	10	9	90	
Ausente	12	5,2	221	94,8	

Teste exato de Fisher

*p<0,05

A tabela 6 mostra a relação dos resultados do IgG em relação às indicações da investigação fetal. Observamos que o IgG foi reagente na maior parte das indicações.

Tabela 6. RELAÇÃO DO IgG COM A INDICAÇÃO DA INVESTIGAÇÃO

Investigação materna	IgG não-reagente		IgG reagente	
	n	%	n	%
Malformação de SNC	2	3,2	60	96,8
Toxoplasmose	5	8,1	57	91,9
Isoimunização Rh	3	8,3	33	91,7
CMV	-	-	2	100
Rubéola	1	14,3	6	85,7
Hidropisia não-imune	-	-	8	100
Outras malformações	-	-	31	100
Outras	2	6,45	29	93,5
RCIU	-	-	4	100
Total	13		230	

Teste exato de Fisher

p=0,53

Na amostra de gestantes estudada encontramos dois casos de IgM reagente (0,8%). Segue a descrição dos dois casos.

Uma das pacientes tinha 39 anos, era não branca, casada, referia o primeiro grau incompleto, um parceiro sexual, tinha cinco gestações anteriores e referia sintomas que poderiam estar associados à infecção pelo CMV. Foi

encaminhada ao PNE por apresentar, em exame sorológico de outro serviço, IgG e IgM específica para o CMV reagente.

A outra paciente com IgM reagente tinha 17 anos, era branca, solteira, referia o segundo grau incompleto, um parceiro sexual, era primigesta e não apresentava sintomas clínicos que pudessem estar associados à infecção por CMV. Esta paciente foi encaminhada ao PNE por suspeita de toxoplasmose através de sorologia, de outro serviço, com IgM específica reagente.

Utilizando-se o PCR como indicador da presença de infecção ativa pelo CMV, encontramos uma freqüência de 21,9% de pacientes com replicação viral durante a gestação.

A tabela 7 mostra a relação entre os resultados da PCR e as variáveis estudadas. Não houve diferença significativa na freqüência de PCR positivo em relação à idade, raça, escolaridade e número de parceiros. A PCR positiva foi mais freqüente em pacientes que tinham mais que 21 anos de idade. Não houve diferença entre a freqüência de PCR positiva entre pacientes brancas e não brancas e entre pacientes com ou sem parceiro fixo. A PCR positiva foi mais freqüente em pacientes que referiam ter estudado até o primeiro e segundo grau. Analisando o número de parceiros, encontramos aumento da freqüência de PCR positiva da acordo com o aumento do número de parceiros sexuais.

A distribuição da frequência de testes PCR positivos em relação ao número de gestações foi significativa: em pacientes que tinham mais que uma gestação encontramos a maior porcentagem de PCR positiva.

Em relação aos sintomas clínicos que pudessem estar associados ao à infecção pelo CMV, das dez pacientes que referiam sintomas seis tinham PCR positiva, dado estatisticamente significativo.

Tabela 7. RELAÇÃO DA PCR COM AS VARIÁVEIS ESTUDADAS

Variável	PCR negativa		PCR positiva		p
	n	%	n	%	
Idade (anos)					0,14
≤ 20	45	88,2	6	11,8	
21-30	84	73,7	30	26,3	
≥ 31	45	77,6	13	22,4	
Raça					0,71
Branca	129	78,7	35	21,3	
Não branca	45	76,3	14	23,7	
Estado civil					0,97
Casada/amasiada	149	78,0	42	22,0	
Solteira	25	78,1	7	21,9	
Escolaridade					0,96
Nenhuma	7	87,5	1	12,5	
Até 1º grau	116	77,9	33	22,1	
Até 2º grau	46	76,7	14	23,3	
Superior	5	83,3	1	16,7	
Número de parceiros					0,70
1	93	79,5	24	20,5	
2	51	77,3	15	22,7	
3 ou mais	30	75,0	10	25	
Número de gestações					0,01*
1 gestação	60	88,2	8	11,8	
≥ 2 gestações	114	73,6	41	26,4	
Sintoma clínico					<0,01
Presente	4	40	6	60	
Ausente	170	79,8	43	20,2	

Teste exato de Fisher *p<0,05

Dentre as várias indicações da investigação fetal, observamos que o maior número de gestantes com PCR positiva foi encontrada em pacientes que tinham suspeita de infecção por toxoplasmose e isoimunização Rh (tabela 8).

Das 62 pacientes que tinham suspeita de infecção por toxoplasmose, 15 apresentaram PCR positiva para CMV. Estas pacientes foram referidas ao PNE por apresentarem exame sorológico, realizado em outro serviço, reagente (IgM específica para toxoplasmose reagente).

Os dois casos com suspeita de infecção por CMV apresentaram PCR positiva.

Tabela 8. RELAÇÃO DA PCR COM A INDICAÇÃO DA INVESTIGAÇÃO

Indicação da Investigação materna	PCR negativa		PCR positiva	
	n	%	n	%
Malformação de SNC	46	88,5	6	11,5
Toxoplasmose	45	75,0	15	25,0
Isoimunização Rh	25	75,8	8	24,2
CMV	-	-	2	100
Rubéola	5	71,4	2	28,6
Hidropisia não-imune	4	66,7	2	33,3
Outras malformações	23	74,2	8	25,8
Outras	24	80,0	6	20,0
RCIU	2	100	-	-
Total	174	78,0	49	22,0

Teste exato de Fisher

p=0,32

Nas tabelas 9 e 10, relacionamos os resultados dos testes sorológicos com o PCR para o cálculo da sensibilidade e especificidade.

Comparando os testes diagnósticos em amostras de sangue materno, dos 49 casos com PCR positiva, 46 casos tinham IgG reagente com uma sensibilidade de 94%. Dos 174 casos com PCR negativa, 10 tinham IgG não reagente com uma especificidade de 6% (tabelas 9).

Tabela 9. RESULTADOS DOS TESTES DIAGNÓSTICOS EM SANGUE MATERNO

IgG materno	PCR positiva	PCR negativa
Positivo	46	164
Negativo	3	10
Total	49	174

Sensibilidade= $46/49=94\%$ (intervalo de confiança de 82-98%)

Especificidade= $10/174=6\%$ (intervalo de confiança de 3-11%)

Dos 49 casos em que a PCR foi positiva, dois casos tinham IgM reagente com uma sensibilidade da sorologia de 4% em relação à PCR. Dos 174 casos de PCR negativa, encontramos 174 IgM não-reagentes com uma especificidade de 100% (tabela 10).

Tabela 10. RESULTADOS DOS TESTES DIAGNÓSTICOS EM SANGUE MATERNO

IgM materno	PCR positiva	PCR negativa
Positivo	2	-
Negativo	47	174
Total	49	174

Sensibilidade= $2/49 = 4\%$ (intervalo de confiança de 0-15%)

Especificidade= 100% (intervalo de confiança de 99,7-100%)

5. Discussão

A proposição principal deste estudo foi avaliar a acurácia do teste sorológico, através do método ELISA, no diagnóstico de infecção pelo CMV em comparação ao teste PCR. A população estudada foram gestantes atendidas no PNE-CAISM que tinham indicação de análise sanguínea fetal.

Como o CMV é um vírus oportunista capaz de estabelecer infecção latente e causar danos ao feto tanto em primoinfecção como em infecção recorrente, o diagnóstico de gestantes infectadas implica na identificação de fetos com risco para desenvolvimento da doença.

Partiu-se da hipótese de que os testes sorológicos usados para o rastreamento da infecção pelo CMV em gestantes não eram capazes de identificar todas as gestantes que poderiam estar infectadas pelo CMV.

Acreditou-se que o mais apropriado seria comparar os testes sorológicos com um padrão-ouro para melhor avaliação de sua capacidade diagnóstica.

Os resultados mostram uma baixa capacidade diagnóstica dos testes sorológicos na identificação de gestantes com infecção pelo CMV.

O conhecimento desta baixa capacidade diagnóstica da sorologia, quando comparada à PCR, é fundamental pois mostra que uma gestante com IgM não-reagente para o CMV, não afasta a possibilidade desta paciente estar sofrendo uma replicação viral através de infecção recorrente ou reativação viral.

Analisando as principais características da população estudada, encontramos pacientes na faixa etária entre 21 e 30 anos de idade, de raça branca e com parceiro fixo (casadas ou amasiadas) e tendo cursado até o primeiro grau. Na média, 5% desta população era susceptível à primoinfecção por apresentarem IgG não reagente.

Estas características, no entanto, não são específicas para pacientes com suspeita de infecção por CMV e, sim, características gerais de um grupo de gestantes atendidas no PNE.

O pequeno número de pacientes com suspeita de infecção pelo CMV e as várias indicações para a análise sangüínea fetal diferem dos achados na literatura porque os testes diagnósticos foram aplicados em gestantes que estavam sendo investigadas por outras indicações e não somente pela suspeita de infecção pelo CMV. As gestantes selecionadas tinham indicação de análise sangüínea fetal por vários tipos de malformações, suspeita de infecção por toxoplasmose e rubéola, isoimunização Rh, retardo de crescimento intra-uterino,

antecedente de cromossomopatias, idade materna e translucência nucal alterada.

Na verdade, a proposta inicial deste estudo era a avaliação simultânea do sangue materno e fetal (obtido através de cordocentese). Todas as gestantes selecionadas tinham indicação de realização de cordocentese para análise sangüínea fetal. Para cada caso foi proposto coleta de sangue materno e fetal, no entanto, durante a coleta de dados, observamos muita dificuldade técnica para a extração de quantidades adequadas de DNA fetal para a realização da PCR.

Ao final da coleta de dados, tínhamos 223 amostras de sangue materno em que a análise sorológica e da PCR estavam adequadas porém, somente em metade dos casos o sangue fetal havia sido analisado com sucesso, o que trouxe o foco de atenção deste trabalho para a análise do sangue materno.

Nesta amostra, encontramos soroprevalência de infecção pregressa de aproximadamente 95%. Este valor é compatível com o observado na literatura segundo DEMMLER (1992) onde a soroprevalência do CMV em mulheres em idade reprodutiva é de 40 a 60% em países de alto nível socioeconômico e 80 a 100% em países de baixo nível econômico.

Observamos que a soroprevalência do CMV aumentava com a idade, atingindo níveis máximos após os 25 anos (HO, 1990) e, realmente, encontramos a maior porcentagem de história pregressa de infecção pelo CMV acima de 31 anos.

Tomando a escolaridade como parâmetro de nível socioeconômico, observamos que 100% das mulheres com IgG reagente não haviam freqüentado a escola. A porcentagem de pacientes com IgG reagente foi diminuindo conforme aumentava a graduação escolar, o que corrobora com a observação da associação de baixo nível socioeconômico e a maior freqüência de infecção pelo CMV.

Como a maior parte das gestantes atendidas no PNE pertencem a baixo nível sócio econômico, estes dados refletem as características populacionais onde é mais freqüente a infecção pregressa pelo CMV.

Cerca de 95% das pacientes com IgG reagente referiam pelo menos dois parceiros sexuais. Como a atividade heterossexual também é responsável pela transmissão da infecção, nossos dados confirmam a observação anterior de que mulheres com maior número de parceiros ou sem parceiro fixo apresentam freqüência maior de infecção pregressa pelo CMV.

Encontramos a maior porcentagem de IgG reagente, em pacientes que referiam mais que quatro gestações. Este dado está provavelmente associado à maior faixa etária nas pacientes que referiam mais que quatro gestações.

Na maioria das indicações de investigação, encontramos altas porcentagens de IgG reagente.

Analisando o anticorpo IgM como marcador de infecção aguda, encontramos apenas duas gestantes com IgM reagente. Não pôde ser

observada nenhuma característica específica em relação ao perfil dessas pacientes. Apenas uma destas paciente referia sintomas que poderiam estar associados à infecção por CMV. Esta mesma paciente foi encaminhada ao PNE por suspeita de infecção pelo CMV.

A outra paciente apresentava suspeita de infecção por toxoplasmose. Portanto não pôde ser observado um perfil característico nos casos positivos.

O anticorpo IgM vírus-específico geralmente se eleva durante as primeiras duas a três semanas de infecção e persiste durante várias semanas a meses, sendo eventualmente substituída por anticorpo IgG. Um título elevado de anticorpo IgM específico identifica infecção recente, seja primária ou recorrente. Isto pode ser evidenciado ainda pela demonstração de uma queda no anticorpo IgM em soros colhidos subseqüentemente (GRIFFITHS et al., 1982; 1991).

Várias limitações de interpretação devem ser lembradas em relação ao IgM. As respostas do anticorpo IgM específico não são restritas às infecções primárias, pois a reativação ou reinfeção podem resultar em ascensão dos títulos de IgM (PANNUTI et al., 1987). Outras desvantagens incluem títulos de IgM falsamente baixos ou negativos causados por competição de alto título de anticorpo IgG por locais de ligação do antígeno e reações falso-positivas resultantes do fator reumatóide (STAGNO, 1990).

O diagnóstico sorológico da maioria das infecções virais baseia-se na demonstração de uma soroconversão. Entretanto, podem não ser observadas

soroconversões em algumas populações de pacientes ou quando o soro inicial é coletado tardiamente no curso da doença (STAGNO et al., 1985; STAGNO, 1990).

Diferente de outros vírus, o CMV não confere imunidade materna suficiente para proteção contra futuras transmissões verticais. A infecção congênita pelo CMV é secundária à primoinfecção ou à reinfecção com reativação de focos virais latentes durante o período gestacional. A doença clássica em recém-nascidos acometidos caracteriza-se por hepatomegalia, coriorretinite, microcefalia, calcificações periventriculares, anemia hemolítica e pneumonia intersticial. As crianças gravemente afetadas apresentam alto índice de mortalidade e de seqüelas, como surdez, cegueira, déficit mental e paralisias diversas.

Em muitos serviços, o CMV congênito é considerado como um problema não muito significativo (DEMMLER, 1992). A infecção recorrente é mais freqüente na gestação (1-14%) mas somente em 0,2-2% dos casos causa infecção congênita. A incidência de sintomatologia neonatal na infecção recorrente é baixa (menos de 1%) mas as seqüelas a longo prazo podem ocorrer em 5-10% dos casos (REVELLO et al., 1995).

Dadas as dificuldades diagnósticas somente com a sorologia, outros métodos devem ser usados para melhorar a acurácia diagnóstica desta patologia. Neste trabalho, utilizamos a PCR como padrão-ouro para o

diagnóstico de infecção, uma vez que o teste da PCR positiva significa replicação viral e a replicação viral identifica as gestantes com risco de transmitir o CMV aos respectivos fetos.

A PCR foi positiva em 21,9% das 223 pacientes em que foi possível a extração e análise do DNA. Não houve predomínio de raça, as pacientes tinham entre 21 e 30 anos, faixa etária onde houve maior porcentagem de história de infecção pregressa identificada pelo anticorpo IgG reagente. Isto pode significar que, a maior parte das pacientes com diagnóstico de replicação viral através da PCR positiva estavam tendo um quadro de infecção recorrente através de reinfecção e/ou reativação viral ou, ainda, identificadas numa fase tardia da doença onde só o IgG estaria presente. A infecção recorrente pode ocorrer quando o paciente previamente infectado sofre uma reativação do vírus latente ou é reinfestado por uma nova variedade do vírus (STAGNO et al., 1982; DEMMLER, 1992) o que não pôde ser discriminada no teste de PCR utilizado neste trabalho.

Ainda que não significativo estatisticamente, a maioria das pacientes com PCR positiva, tinham tido três ou mais parceiros sexuais até o momento da entrevista. Este dado é semelhante ao da maioria dos estudos onde a maior frequência de infecção pelo CMV foi entre pessoas com múltiplos parceiros (GRIFFITHS et al.,1982).

As pacientes com PCR positiva, haviam cursado até o primeiro e segundo grau e referiam de duas a três gestações anteriores. Como foi discutido anteriormente, o grupo de gestantes analisado pertencia a nível sócio-econômico mais baixo onde é esperado encontrarmos maior freqüência de infecção pregressa pelo CMV. O fato das pacientes referirem duas a três gestações anteriores pode significar que a PCR positiva na gestação atual poderia estar identificando infecção recorrente, pois na gestação é comum a recorrência do CMV, como foi observado em estudo de REVELLO et al., em 1995.

Em relação aos sintomas que pudessem estar associados à infecção pelo CMV, 60% das pacientes que referiam sintomas tinham PCR positiva. Este é um achado incomum pois a infecção pelo CMV em gestantes geralmente é assintomática. Ressalva-se que como a sintomatologia não é exclusiva para infecção pelo CMV, esse achado não pode ser assumido como parâmetro específico para esta infecção.

Se estudos futuros, por exemplo com aplicação da pesquisa de carga viral, demonstrarem a utilidade da PCR na caracterização das gestações com risco de transmissão vertical a valorização da sintomatologia poderá ser um indicador da razão para pesquisar infecção pelo CMV através da PCR.

O maior número de gestantes com PCR positiva foi encontrada em pacientes que tinham suspeita de infecção por toxoplasmose, em pacientes com diagnóstico de isoimunização Rh, malformações diversas e malformações do

SNC. A diversidade das indicações pode ser explicada porque o teste diagnóstico foi aplicado em gestantes que não tinham, exclusivamente, suspeita de infecção pelo CMV.

Cabe ressaltar que, dentre as 62 pacientes que tinham suspeita de infecção por toxoplasmose, 15 apresentaram PCR positiva para CMV. As pacientes com suspeita de infecção por toxoplasmose foram referidas ao PNE por apresentarem exame sorológico reagente (IgM detectado por imunofluorescência).

Questionamos portanto se a elevada sensibilidade desta técnica na identificação de pequenas quantidades de IgM específico para toxoplasmose não estaria, na verdade, representando resposta imunológica à reativação por CMV pois o teste PCR se mostrou positivo em 1/4 dessas pacientes.

Na literatura há a descrição de um caso em que foi diagnosticada a dupla soroconversão pelo CMV e *Toxoplasma gondii* na 27^a semana de gestação. O diagnóstico da infecção por toxoplasmose foi feito através de método imunoenzimático que revelou a presença de IgM e IgG reagentes no sangue da paciente. A inoculação de sangue fetal e líquido amniótico para cultura em fibroblastos foi negativa e optou-se pela pesquisa de outras infecções. O PCR para CMV em líquido amniótico foi positivo e várias amostras sangüíneas da paciente mostraram IgG e IgM específicas para o CMV reagentes (AUBARD et al., 1998). Portanto a pesquisa para CMV deve ser lembrada quando a paciente

tiver suspeita de toxoplasmose, como neste caso em que a infecção por toxoplasmose não foi confirmada, identificando-se infecção por CMV.

O teste de ELISA, usado para detecção de infecção ativa através de IgM específica, apresentou baixa sensibilidade em relação à PCR. A sensibilidade encontrada foi em torno de 4%, mais baixa que a sensibilidade encontrada em estudos de GRIFFITHS et al. (1982); STAGNO & WHITLEY (1985); DONNER et al., (1993) cuja sensibilidade variou de 20% até 80% em diferentes fases da gestação. Esses autores, entretanto, pesquisavam pacientes com suspeita clínica para infecção pelo CMV.

Os testes sorológicos foram úteis para determinar a soroprevalência da infecção pelo CMV e o antecedente de infecção pregressa através do IgG reagente. Em relação à infecção ativa e recorrente, a presença de IgM específica relacionou-se pouco com a replicação viral pois, de 49 casos com PCR positiva, apenas em dois deles a IgM foi reagente. Em estudo de STAGNO et al. (1985), 73% das gestantes com infecção primária foram diagnosticadas através de IgM e nos casos de infecção secundária, 11% das gestantes foram detectadas através do IgM, em grupo de pacientes com suspeita clínica para infecção pelo CMV. Nossos dados são, portanto, muito diferentes daqueles demonstrados na literatura.

O quadro clínico da infecção pelo CMV raramente fornece dados suficientes para a confirmação do diagnóstico pois a maioria dos pacientes são

assintomáticos. Este fato obriga os médicos e obstetras a buscarem técnicas mais apuradas no diagnóstico de CMV.

Dentre as técnicas diagnósticas para identificação de infecção pelo CMV, o isolamento do vírus constitui a forma mais específica do diagnóstico. O vírus pode ser isolado na urina, em *swab* da mucosa oral e de cérvix uterino e em tecidos de biópsias. O maior obstáculo para o uso do método é o seu alto custo e a relativa demora dos resultados, uma vez que o vírus tem crescimento lento e demora de quatro a seis semanas para se multiplicar em tecidos de cultura.

A pesquisa de anticorpos é, na prática, a técnica mais empregada, pela sua fácil execução e baixo custo. Contudo, como pôde ser observado nas gestantes incluídas neste estudo, a análise dos anticorpos IgG e IgM específicos sofre sérias limitações de interpretação. Nem sempre é possível demonstrar a soroconversão, podem ocorrer reações cruzadas com antígenos relacionados e o soro pode ser coletado em um momento no curso da doença, quando não apareceram ainda os anticorpos específicos.

Em teoria, o diagnóstico da infecção materna é feito pela soroconversão, elevação dos títulos de IgG ou aparecimento do IgM. Entretanto, a história sorológica materna geralmente não é conhecida antes da gestação e o diagnóstico da soroconversão é raro. A verificação do aumento dos títulos de IgG e o aparecimento do IgM necessitaria de uma análise com coleta seriada de

amostras sanguíneas a cada duas a quatro semanas para acompanhar as curvas dos anticorpos IgG e IgM.

A sorologia mostrou-se um teste menos sensível que a PCR para detecção de viremia pelo CMV. Através da PCR positiva detectou-se a replicação viral do CMV sem IgM. Esta observação foi feita também por JIWA et al., (1989). Talvez isso seja decorrência de uma baixa resposta na produção do IgM nesta população.

O teste ELISA, mostrou boa acurácia na identificação da história pregressa de infecção pelo CMV através do IgG, o que já havia sido demonstrado em vários estudos sorológicos. O IgM, contudo, teve baixa sensibilidade para identificação de infecção ativa (GRIFFITHS et al., 1982; STAGNO & WHITLEY, 1985; ALFORD et al., 1990; CHOU, 1990) o que foi verificado neste estudo, onde apenas dois casos com IgM positivo foram identificados dentre 49 que apresentaram replicação viral.

Qual seria o verdadeiro valor da comparação entre sorologia e o PCR na detecção de infecção pelo CMV?

Ao se comparar a sorologia com o PCR no diagnóstico do CMV, é preciso lembrar que a sorologia é um teste diagnóstico que detecta anticorpos circulantes identificando história de infecção pregressa através do IgG e infecção aguda através do IgM. A PCR é um teste diagnóstico que detecta a presença DNA viral dentro das células. O resultado positivo da PCR durante a gestação

discrimina pacientes com replicação viral dentro das células, mas não esclarece o risco de desenvolvimento de doença e o risco de transmissão fetal. É necessário saber se a viremia detectada pela técnica molecular significa risco elevado de transmissão fetal e, ocorrendo transmissão fetal, se esta viremia causaria danos graves ao feto. A carga viral, isto é, a quantidade de partículas virais medida em mililitros no material enviado, complementaria a informação fornecida pelo resultado positivo da PCR qualitativa.

Em estudo de AITKEN et al., (1999), cargas virais mais altas foram encontradas em pacientes com infecção primária que em pacientes com infecção recorrente. Como em gestantes a infecção recorrente é mais comum, a carga viral poderia não ser suficiente para transmissão vertical.

A baixa sensibilidade na detecção de infecção ativa através da IgM em relação à PCR, nesta pesquisa, deve ser cuidadosamente interpretadas. O PCR é um teste mais sensível que a sorologia e, ao detectar replicação viral em pacientes com o IgM não reagente, pode estar diagnosticando infecção recorrente com baixo risco de transmissão fetal. Como os dois casos que apresentaram IgM reagente apresentaram também IgG reagente, tratava-se, provavelmente de infecção recorrente ou eventualmente fase da infecção em que tanto IgG como IgM estavam presentes.

O aumento gradual das observações clínicas sobre a infecção pelo CMV, tem dado condições para o desenvolvimento das técnicas laboratoriais, bem

como, o momento certo para usá-las e qual técnica a ser escolhida. O isolamento do vírus, a primeira técnica desenvolvida com sucesso, foi a mais sensível até a recente aplicação dos métodos por PCR, técnica que se mostrou mais sensível quando comparada à sorologia nesta população estudada.

A sorologia, por sua vez, vem sendo aprimorada com técnicas sofisticadas. A antigenemia, por exemplo, permite a quantificação do número de células infectadas pelo antígeno. A avidéz de anticorpos identifica aproximadamente o período da provável infecção, uma vez que, quanto mais o tempo passa, há aumento do poder de fixação do anticorpo ao antígeno. Com isto é possível selecionar com maior precisão, os casos mais prováveis de infecção vertical.

Portanto, a escolha entre os testes laboratoriais deve ser feita levando-se em consideração as diferentes situações clínicas.

Como os testes diagnósticos foram realizados no mesmo momento, a baixa sensibilidade do IgM pode ser devida à baixa carga viral, que ainda assim pode ser diagnosticada pela PCR positiva. Este evento pode estar presente numa infecção recorrente ou à uma fase da infecção em que não havia a presença de anticorpos IgM e, somente IgG.

Porém, nos casos em que o PCR foi positivo e o IgG e o IgM foram não reagentes, a sorologia mostrou-se ineficaz no diagnóstico de gestantes com infecção e risco de transmissão fetal. Dentre as 49 pacientes com PCR positiva,

três tinham IgG não reagente e a IgM era negativa nestes casos. Portanto tratavam-se de casos em que, através da PCR, identificamos infecção primária pelo CMV.

O achado de que cerca de 21% das pacientes estudadas apresentavam replicação viral pelo CMV (diagnosticada através da PCR) e apenas duas foram identificadas pelo IgM reagente foi inesperado.

Como a detecção de replicação viral através da PCR identificaria as gestantes com risco de transmitir o CMV aos fetos, poderia ser estabelecido um seguimento adequado desses fetos com risco de infecção. Como nos primeiros quatro anos de vida podem ser observadas manifestações tardias em cerca de 10% das crianças assintomáticas ao nascimento, porém infectadas pelo CMV, seria interessante investigar a chance de seqüelas nessas crianças. Tendo em vista este resultado, sugerimos às pacientes que tivessem seus recém-nascidos acompanhados com esta finalidade.

A importância em se observar a baixa acurácia da sorologia em diagnosticar infecção ativa pelo CMV está na proposta de se utilizar um teste com maior capacidade diagnóstica. Um teste mais sensível poderia identificar gestantes com infecção pelo CMV e permitiria uma melhor avaliação dos fetos que, se infectados poderiam desenvolver a doença e apresentar seqüelas tardias. Isto significa que um teste diagnóstico com melhor performance que a sorologia poderia permitir um seguimento adequado a estas crianças. E

pensando também na possibilidade de, no futuro, serem desenvolvidas drogas mais eficazes para tratamento que poderia ser aplicado na gestação, evitando a lesão fetal e seqüelas a longo prazo.

A surdez neurosensorial é o déficit permanente mais comum observado em crianças com infecção congênita assintomática. A incidência varia entre 5 e 56% (média de 13%-15%) dependendo da população estudada (DEMMLER, 1992).

O diagnóstico é feito usando teste audiométrico. É importante lembrar que as crianças com teste único e normal, inicialmente, podem vir a desenvolver o problema, já que a surdez neurosensorial tende a ser progressiva.

Em estudo de DEMMLER, 1992, o retardo mental é outra seqüela que pode ser observada depois da infecção assintomática. Problemas visuais também podem ser observados em crianças assintomáticas ao nascimento: coriorretinite (3,9%), estrabismo (1,5%), nistagmo (0,9%) e atrofia do nervo óptico (0,31%).

Torna-se necessário avaliar a utilização e interpretação correta dos testes diagnósticos. Não é possível, neste momento, pensar-se apenas em aplicar o teste PCR como rastreamento em todas as gestantes. É preciso propor um rastreamento com um enfoque mais amplo, viável financeiramente.

É importante lembrar que a avaliação dos testes diagnósticos foi feita a partir de uma única amostra sangüínea. Se fosse realizada uma coleta seriada

com intervalos mais relacionados ao tempo de aparecimento de IgG e IgM, talvez a sorologia apresentasse uma melhor sensibilidade.

A utilização da sorologia para o rastreamento de CMV em gestantes, não foi suficiente para detecção das gestantes com risco de transmitir CMV aos fetos numa única análise sangüínea. O PCR, sendo um teste bastante sensível, pode ter detectado replicação viral em casos de infecção recorrente com baixa carga viral e baixo risco de infecção.

Baseado no resultado deste estudo, a sorologia mostrou baixa capacidade diagnóstica na identificação e rastreamento de gestantes com infecção pelo CMV e com risco de transmissão fetal, quando comparada à PCR. Contudo, a correta interpretação da positividade da PCR e do risco de transmissão fetal poderia ser complementada com a realização de análise seriada da sorologia da paciente e/ou estudo da antigenemia e carga viral.

Particularmente, as técnicas baseadas em biologia molecular devem estabelecer os padrões futuros de rastreamento para infecção pelo CMV na gravidez.

Seria necessário também dispor de propostas concretas sobre o que fazer com estes casos de PCR positivas em termos de seguimento e conduta clínica, o que não está definido na literatura.

Os resultados perinatais destes 49 casos com PCR positiva e dos dois casos com IgM reagente poderiam elucidar a aplicabilidade destes testes diagnósticos, pois mostrariam a presença ou não de doença.

Este não foi o objetivo deste trabalho, mas pela sua indiscutível importância no rastreamento de infecção pelo CMV, aventa-se a possibilidade para um novo estudo da avaliação dos resultados perinatais e também do seguimento adequado das crianças que poderiam apresentar seqüelas tardias.

A correlação entre positividade dos testes e desenvolvimento de doença poderá ser, então, melhor estabelecida.

6. Conclusões

1. A acurácia dos testes sorológicos em diagnosticar a gestante com infecção pelo CMV e com risco de transmissão fetal foi baixa em relação à PCR.
2. A soroprevalência de infecção pregressa pelo CMV foi de 94,6% na população estudada.
3. O marcador sorológico IgG específico para o CMV apresentou alta sensibilidade e baixa especificidade na detecção de infecção materna ativa.
4. O marcador sorológico IgM de infecção ativa para o CMV apresentou baixa sensibilidade e alta especificidade na detecção de infecção materna ativa.

Summary

7. Summary

The objective of this study was to evaluate the accuracy of the serological test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) for the diagnosis of cytomegalovirus (CMV) infection, compared to polymerase chain reaction (PCR). A descriptive study was performed selecting 243 pregnant women at PNE/CAISM/UNICAMP. All had indication for fetal blood sampling for reasons other than suspicion for CMV infection and also for suspicion of CMV infection. This group of women were studied through venous blood samples tested for CMV. Serological tests were run and compared to PCR, used as gold standard. The rate of CMV infection determined through IgG was 94,6%. The main reasons for study inclusion were fetal SNC malformation (25,5%), maternal toxoplasmosis (25,5%) and Rh incompatibility (14,8%). Only two women were included because of suspected of CMV. The sensitivity and specificity of serological tests were 94% and 6% for IgG; and 4,0% and 100% for IgM. We concluded that the serological tests had lower sensitivity compared to PCR test in the diagnosis of infection of CMV. Future consequences of positive PCR and negative IgM women is unknown.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

AITKEN, C.; BARRETT-MUIR, W.; MILLAR, C.; TEMPLETON, K.; THOMAS, J.; SHERIDAN, F.; JEFFRIES, D.; YAQOOB, M.; BREUER, J. – Use of molecular assays in diagnosis and monitoring of disease following renal transplantation. *J. Clin. Microbiol.*, **37**:2804-7, 1999.

ALFORD, C.A.; STAGNO, S.; PASS, R.F.; BRITT, W.J. - Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev. Infect. Dis.*, **12 (Suppl 7)**:745-53, 1990.

AUBARD, Y.; ROGEZ, S.; DARDE, M.L.; FERMEAUX, V.; SERVAUD, M.; LIENHARDT, A. – Double maternal seroconversion to cytomegalovirus and *Toxoplasma gondii*. *Eur. J. Obstet. Gynecol.*, **80**, 275-8, 1998.

BOIVIN, G.; HANDFIELD, J.; TOMA, E.; LALONDE, R.; BERGERON, M.G. - Expression of the late cytomegalovirus (CMV) pp150 transcript in leukocytes of AIDS patients is associated with a high DNA load in leukocytes and presence of CMV DNA in plasma. *J. Infect. Dis.*, **179**:1101-7, 1999.

CHOU, S.- Newer methods for diagnosis of cytomegalovirus infection. *Rev. Infect. Dis.*, **12 (Suppl 7)**:727-36, 1990.

DECLARACIÓN DE HELSINKI. Recomendaciones para guiar los médicos en la investigación biomédica em seres humanos. **Bol of Sanit Panam, 108:** 626-37, 1990.

DREW, W.L. – Diagnosis of cytomegalovirus infection. **Rev. Infect. Dis., 10:**468-76, 1988.

DEMMLER, G. - Acquired cytomegalovirus. In:FEIGIN, R.D. & CHERRY, J.D. (eds.). - **Textbook of pediatric infectious diseases**. 3ed., Philadelphia, WB Saunders, 1992. p1532-47.

DONNER, C.; LIESNARD, C.; CONTENT, J.; BUSINE, A .; ADERCA, J.; RODESH, F. - Prenatal diagnosis of 52 pregnancies at risk for congenital cytomegalovirus infection. **Obstet. Gynecol., 82:**481-6, 1993.

FLETCHER, R.H.; FLETCHER,S.W .; WAGNER, E.H. Diagnóstico. In: **Epidemiologia clínica: elementos essenciais**. Ed. Artes Médicas, 1996. p.52-83.

FOWLER, K.B.; STAGNO, S.; PASS, R.F.; BRITT, W.J.; BOLL, T.J.; ALFORD, C.A .J.- The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. **New Engl. J Med., 326:**663-7, 1992.

GERNA,G.; FURIONE, M.; BALDANTI, F.; PERCIVALLE, E.; COMOLI, P.; LOCATELLI, F. Quantitation of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients. **Br. J. Haematol., 91:**674-83, 1995.

GERNA, G.; PERCIVALLE, E.; BALDANTI, F.; SARASINI, A; ZAVATTONI, M.; FURIONE, M.; TORSELLINI, M.; REVELLO, M.G. –Diagnostic significance and clinical impact of quantitative assays for diagnosis of human cytomegalovirus infection/disease in immunocompromised patients. **New Microbiol., 21:**293-308, 1998.

- GRIFFITHS, P.D.; STAGNO, S.; PASS, R.F.; SMITH, R.J.; ALFORD, C.A .J.- Infection with cytomegalovirus during pregnancy: specific IgM antibodies as a marker of recent primary infection. **J. Infect. Dis.**, **145**:647-53, 1982.
- GRIFFITHS, P.D.; BABOONIAN, D.; RUTTER, D.; PECKHAM, C. – Congenital and maternal cytomegalovirus infection in a London population. **Br. J. Obstet. Gynecol.**, **98**:135-40, 1991.
- GROSE, C. & WEINER, C.P. - Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: two decades later. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **163**:447-50, 1990.
- HO, M. - Epidemiology of cytomegalovirus infections. **Rev. Infect. Dis.**, **12(Suppl 7)**:701-10, 1990.
- HOHLFELD, P.; VIAL, Y. MAYLLARD-BRIGNON, M.; VAUDAUX, B.; FAWER, C.L.- Cytomegalovirus fetal infection: prenatal diagnosis. **Obstet. Gynecol.**, **78**:615-8, 1991.
- JIWA, N.M.; VAN GEMERT, G.W .; RAAP, A K.; VAN DE RIJKE, F.M.; MULDER, A; LENS, F.P.; SALIMANS, M.M.; ZWAAN, F.E.; VAN DORP, W.- Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leucocytes of viremic transplant recipients by polymerase chain reaction. **Transplantation.**, **48**:72-6,1989.
- KANDA, Y.; CHIBA, S.; SUZUKI, T.; KAMI, M.; YASAKI, Y.; HIRAI, H. - Time course analysis of semi-quantitative PCR and antigenemia assay for prevention of cytomegalovirus disease after bone marrow transplantation. **Br. J. Haematol.**, **100**:222-5, 1998.

- LAO, W.C.; LEE, D.; BURROUGHS, A.K.; LANZANI, G.; ROLLES, K.; EMERY, V.C.; GRIFFITHS, P.D. - Use of polymerase chain reaction to provide prognostic information on human cytomegalovirus disease after liver transplantation. **J. Med. Virol.**, **51**:152-8, 1997.
- LAMY, M.E.; KIPANGA, M.N.; GADISSEUX, J.F.; LYON, G.; GAUDY, V.; LIERDE, M.V. - Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infection. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **166**:91-4, 1992.
- LIPSON, S.M.; MATCH, M.E.; TORO, A. I.; KAPLAN, M.H.; SHEPP, D.H. - Application of standardized cytomegalovirus antigenemia assay in the management of patients with AIDS. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **32**:75-9, 1998.
- LYNCH, L.; DAFFOS, F.; EMANUEL, D.; GIOVANGRANDI, Y.; MEISEL, R.; FORESTIER, F.; CATHOMAS, G.; BERKOWITZ, R.L. - Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infection. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **165**:714-8, 1991.
- MURRAY, P.R.; DREW, W.L.; KOBAYASHI, G.; THOMPSON JR, J. - **Microbiologia médica**. 2ed., St. Louis, 1990. 502p.
- NELSON, C.T. & DEMMLER, G.J. – Cytomegalovirus infection in the pregnant mother, fetus, and newborn infant. **Clin. Perinatol.**, **24**:151-9, 1997.
- NEWTON, E.R. – Diagnosis of perinatal TORCH infection. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **42**:59-70, 1999.
- PANNUTI, C.S.; VILASBOAS, L.S.; AMATO NETO, V.A. ; ANGELO, M.J.; SABBAGA, E. - Detecção de anticorpos IgM nas infecções primárias e secundárias pelo CMV em pacientes- submetidos a transplante renal. **Rev. Inst. Med. Trop.**, **29**:317-22, 1987.

- PROSCH, S.; KIMEL, V.; DAWYDOWA, I.; KRUGER, D.H. - Monitoring of patients for cytomegalovirus after organ transplantation by centrifugation culture and PCR. *J. Med. Virol.*, **38**:246-51, 1992.
- RASMUSSEN, C.S.; KENSSAL, D.; NELSON, R.; CARNEY, W.; HIRSH, M.; WINSTON, D.; PREIKSAITIS, J.; MERIGAN, T.C.- Virus specific IgG and IgM antibodies in normal and immunocompromised subjects infected with cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.*, **145**:119-29, 1982.
- RESOLUÇÃO CNS 196/96: Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, CONEP, 1996. 9p.
- REVELLO, M.G.; BALDANTI, F.; FURIONE, M.; SARASINI, A; PERCIVALLE, E.; ZAVATTONI, M.; GERNA, G.- Polymerase chain reaction for prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection. *J. Med. Virol.*, **47**:462-6, 1995.
- REVELLO, M.G.; SARASINI, A.; ZAVATTONI, M.; BALDANTI, F.; GERNA, G. - Improved prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection by a modified nested-PCR. *J. Med. Virol.*, **56**:99-103, 1998.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, A .F. - Enzymatic amplification of beta globin genome sequences and restriction site analysis for diagnoses of sickle cell anemia. *Science.*, **230**:1350-4, 1985.
- SIMONCINI, L. - Diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody in blood of fetuses and newborns with congenital HCMV infection. *J. Clin. Virol.* **12**:175-6, 1999.
- SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. G. – **Statistical methods**. 7ed., Ames: Iowa State University Press, 1980. 503p.

- STAGNO, S.; REYNOLDS, D.W.; TSIANTOS, A.; FUCCILLO, D.A.; LONG, W.; ALFORD, C.A. - Comparative serial virologic and serologic studies of symptomatic and subclinical congenital and natively acquired cytomegalovirus infections. *J. Infect. Dis.*, **132**:568-77, 1975.
- STAGNO, S.; REYNOLDS, D.W.; HUANG, E.S.; THAMES, S.D.; SMITH, R.J.; ALFORD, C.A. - Congenital cytomegalovirus infection: occurrence in a naive immune population. *New Engl. J. Med.*, **2**:1254-8, 1977.
- STAGNO, S.; PASS, R.F.; DWORSKY, M.E.; HENDERSON, M.D.; MOORE, E.G.; WALTON, P.D.; ALFORD, C.A. - Congenital cytomegalovirus infection. *New Engl. J. Med.*, **16**:306-9, 1982.
- STAGNO, S.; TINKER, M.K.; ELROD, C.; FUCCILLO, D.A.; CLOUD, G.; O'BEIRNE, A.J. - 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.*, **21**:930-5, 1985.
- STAGNO, S. & WHITLEY, J.R. - Herpesvirus infections of pregnancy. Part I: Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *New Engl. J. Med.*, **14**:1270-2, 1985.
- STAGNO, S.; CLOUD, G.; BRITT, W.J.; HENDERSON, R.E.; WALTON, P.D.; VEREN, D.A.; PAGE, F.; ALFORD, C.A. - Primary cytomegalovirus infection in pregnancy: incidence, transmission to fetus and clinical outcome. *JAMA.*, **256**:1904-8, 1986.
- STAGNO, S. - Cytomegalovirus. In: REMINGTON, J.S. & KLEIN, J.O. (eds.) **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. Philadelphia: WB Saunders, 1990. p.241-81.

WARREN, W.P.; BALCAREK, K.; SMITH, R.; PASS, R.F. - Comparision of rapid methods of detection of cytomegalovirus in saliva with isolation in tissue culture. **J. Clin. Microbiol.**, **4**:786-9, 1992.

WRIGHT, P.A . & WYNFORD, T.D. - The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitatios in diagnosis and research. **J. Pathol.**, **162**:99-117, 1990.

YOW, M.D. Congenital cytomegalovirus disease: now problem. **J. Infect. Dis.**, **159**:163-7, 1989.

Bibliografia de Normatizações

9. Bibliografia de Normatizações

1. HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses.
BIREME, São Paulo, 1991. 45p.
2. Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD - OF. CIR/ PRPG/06/95 - Normas ABNT. 1995. 8p.

10. Anexos

ANEXO 1

Técnica laboratorial

Neste estudo, foram realizados dois tipos de métodos para diagnóstico de CMV: **técnica sorológica tipo ELISA** para detecção de anticorpos da classe IgG e IgM contra o CMV e **reação em cadeia catalisada pela polimerase tipo *nested* (“*Nested-PCR*”)** para detecção de partículas virais no sangue. O resultado da amplificação da “*Nested-PCR*” foi analisado por visualização direta em gel de agarose 2%. Para confirmação do resultado obtido na visualização direta, foi realizado o seqüenciamento gênico.

1. Detecção de partículas virais no sangue pela “*nested-PCR*”

- **Extração de DNA:** a extração de DNA genômico de leucócitos foi feita à partir de 5-10 ml de sangue periférico em frasco estéril, utilizando-se como anticoagulante EDTA, na concentração de 1,5 mg/ml. A amostra foi centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos para separação do plasma. Após o descarte do

plasma, os eritrócitos foram lisados com uma mistura de soluções de cloreto de amônio NH₄Cl 0,0114 M (5 vezes o volume de células) e bicarbonato de amônio NH₄HCO₃ M (5 vezes o volume de células). Após 15 minutos em repouso à temperatura ambiente, o hemolisado foi centrifugado duas vezes a 2500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado de leucócitos lisado em solução de NaCl 0,3 M EDTA 10 mM, Tris-HCL 10 mM (pH 7,5), 4,2 g de uréia, 1ml de duodecil sulfato de sódio (SDS) 20%, por 16 horas a 37°C. Uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico foi adicionada (volume/volume). Após agitação, seguiu-se a centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. A fase aquosa superior foi transferida para outro tubo estéril, repetindo-se o procedimento acima. Uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foi então adicionada (volume/volume) repetindo-se a centrifugação. Seguindo-se à transferência da fase aquosa para um novo tubo, a precipitação do ácido-nucléico foi conduzida pela adição de acetato de sódio 3M pH 5,3 (10% do volume) e etanol absoluto gelado (três vezes o volume). O DNA foi solubilizado em água destilada, deionizada e estéril, sendo deixado oito horas em banho-maria à 37°C. Sua concentração foi estimada em espectrofotômetro, através do valor de densidade óptica em comprimento de onda=260nm.

- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR): a

reação em cadeia da polimerase seguiu o método descrito por SAIKI et al. (1985) com algumas modificações. Cada reação de amplificação conteve de 0,1 a 1

micrograma do DNA a ser estudado, (obtido das amostras de sangue, das quais foram extraídas o DNA por método já descrito) em volume total de 20 microgramas, contendo 50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris (pH 8,4), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 0,1 mM de cada “*primer*”, 200 mM da mistura desoxiribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e duas unidades de Taq DNA polimerase. Foram complementados 30 ciclos de amplificação para cada amostra e cada ciclo se constitui-se de: separação das hélices de DNA por aquecimento a 94 graus centígrados durante um minuto; ligação complementar entre os “*primers*” e o DNA em temperatura de 55 graus centígrados por 1 minuto; síntese do DNA pela Taq polimerase, em temperatura de 72 °C por um minuto. Cerca de 30 ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“*DNA Thermal Cycler*” Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA). As amostras foram aquecidas inicialmente a 94°C por 7 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que pudesse interferir com a reação enzimática e, no último ciclo o período de extensão (72 graus centígrados) foi de sete minutos.

- **iniciadores (“*primers*”)**: foram usados dois iniciadores que flanqueiam uma região conservada nas diversas cepas de vírus, sendo específicas para o CMV, não amplificando DNA de outros herpes-vírus:

-“Nested-PCR”:

Utilizando-se do mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação foi reamplificado com o par de “primers” interno.

As condições da reação foram as mesmas usadas para fazer a primeira amplificação (PCR).

- detecção do fragmento amplificado: após as duas reações de amplificação e reamplificação, cinco microlitros do “*nested -PCR*” foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio para visualização do fragmento com luz ultra-violeta. Nas amostras positivas foram observados um fragmento de DNA de 159 pares de bases ao passo que não foi amplificado nenhum fragmento nas amostras negativas.

Em todos os experimentos feitos, sempre foi usado como controle positivo da reação a cepa AD-169 do CMV e como controle negativo a água.

-amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com controle interno da reação (utilização de “*primers*” que detectam o gene da beta-globina):

? condições da reação: a reação em cadeia da polimerase com controle interno da reação seguiu o método descrito por SAIKI et al. (1985).

- ? iniciadores (*“primers”*): foram usados dois iniciadores que flanquearão uma região constante do gene da beta-globina.
- ? *“nested-PCR”*: utilizando-se do mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação foi reamplificado com o par de *“primers”* internos.

As condições da reação foram as mesmas usadas para fazer a primeira amplificação (PCR) e as condições de detecção também foram as mesmas. Nas amostras positivas para o CMV foram observados um fragmento de DNA de 159 pares de bases ao passo que não foi amplificado nenhum fragmento nas amostras negativas, enquanto que em todas as amostras foram observados um fragmento de 257 pares de bases correspondente ao gene da beta-globina.

Os seguintes cuidados especiais foram tomados para se evitar contaminação das amostras durante a reação:

- ? todas as amostras amplificadas foram manipuladas em sala diferente (sala pré-PCR) de onde a amplificação foi feita (sala pós-PCR).
- ? todos os reagentes e materiais pré-PCR e pós-PCR foram preparados e utilizados em ambientes diferentes.

- ? antes da abertura de tubos de microcentrífuga foi efetuada rápida centrifugação para concentrar o líquido contido no tubo, na região inferior e evitar sua dispersão por aerosol.
- ? todo o material plástico (ponteiras e ependorffs) utilizados foi novo e não autoclavado.
- ? trocas constantes de luvas foram feitas durante todo o procedimento.

2. Método sorológico: ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

A determinação de IgM e IgG anti-CMV por ELISA: para as reações sorológicas foram colhidos 5ml de sangue materno em tubo estéril seco. Após a separação dos soros, os mesmos foram armazenados a 20 graus centígrados negativos até sua utilização.

As determinações de anticorpos IgM e IgG anti-CMV por ELISA foram realizadas utilizando-se Kits comerciais *ETI-CYTOK-M reverse* (Sorin Biomédica, Itália). A quantidade de 100 microlitros de amostras de soro diluídas a 1:101, foram adicionadas a orifícios de placas de ELISA, sensibilizados com anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-IgM humana. Após incubação por 1 hora a 37 graus centígrados, as placas foram lavadas 4 vezes com solução salina tamponada com fosfatos (SST), contendo *Tween 20 (TW)*. A seguir,

concentrações apropriadas de antígeno de CMV e conjugado (anticorpo monoclonal de camundongo IgG anti-CMV marcado com peroxidase) foram misturados, e 100 microlitros dessa solução foram adicionados aos orifícios e as placas foram deixadas em repouso por 1 hora a 37 graus centígrados. As placas foram lavadas com SST-TW, como já descrito, e 100 microlitros do sistema substrato (tetrametilbenzidina-peróxido de hidrogênio) foram adicionados aos orifícios. Trinta minutos após a adição do sistema substrato, as reações foram bloqueadas adicionando-se aos orifícios 200 microlitros de ácido sulfúrico 1N. As absorbâncias das reações foram lidas a 450, 630 nm, utilizando-se uma leitora de *ELISA* (*ETI-SYSTEM READER, SORIN BIOMÉDICA, Itália*). Os cálculos foram realizados automaticamente através de um programa de computação específico (*ETY=SYSTEM SOFTWARE*). Todas as reações foram realizadas em duplicata e as médias das densidades ópticas (DO) foram consideradas. Em cada ensaio, soros controles foram incluídos para o cálculo de “*cut-off*”. As amostras cujas absorbâncias foram maiores que o valor do “*cut-off*” foram consideradas reagentes.

ANEXO 3

“Consentimento informado”

Eu, _____, aceito colaborar com um trabalho que está sendo realizado na Divisão de Obstetrícia do CAISM para escolher qual o melhor exame a ser utilizado para fazer o diagnóstico, no pré-natal, de uma doença que pode trazer problemas ao feto. Para isso, sei que colherão uma amostra de meu sangue para a realização de exames. Estou ciente de que já existe indicação da análise sangüínea fetal e que, a coleta do sangue materno não vai prejudicar a minha saúde. Fui informada de que o diagnóstico pré-natal de infecção pelo CMV pode proporcionar um seguimento mais adequado do feto bem como, uma avaliação mais correta do acometimento e prognósticos fetais. A escolha do melhor método diagnóstico proporcionará um seguimento antenatal mais adequado de fetos com esta doença que pode trazer sérios problemas. Está claro para mim que poderei desistir de participar do trabalho a qualquer hora, e que isto não vai prejudicar o meu tratamento.

Campinas, ____ de _____ de 199____ .

Assinaturas: 1. Paciente: _____

2. Médico: _____