

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**ANTICORPOS NEUTRALIZANTES E DETECÇÃO
QUANTITATIVA DO CITOMEGALOVIRUS (CMV) EM MÃES
TRANSMISSORAS E NÃO TRANSMISSORAS DA INFECÇÃO
CONGÊNITA**

NEUSA REGINA PIRES BARBIERI

RIBEIRÃO PRETO

2006

NEUSA REGINA PIRES BARBIERI

**ANTICORPOS NEUTRALIZANTES E DETECÇÃO
QUANTITATIVA DO CITOMEGALOVIRUS (CMV) EM MÃES
TRANSMISSORAS E NÃO TRANSMISSORAS DA INFECÇÃO
CONGÊNITA**

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências Médicas Área de Concentração: Clínica
Médica Opção: Investigação Biomédica**

Orientadora: Prof^a Dr^a Aparecida Yulie Yamamoto

RIBEIRÃO PRETO

2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo

Barbieri, Neusa Regina Pires

Anticorpos neutralizantes e detecção quantitativa do citomegalovirus (CMV) em mães transmissoras e não transmissoras da infecção congênita.

Ribeirão Preto, 2006.

95 p.; il; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP-
Área de Concentração: Clínica Médica - Opção: Investigação Biomédica

Orientadora: Yamamoto, Aparecida Yulie.

1. Citomegalovirus 2. Infecção congênita por citomegalovirus 3. Anticorpos neutralizantes 4. Excreção CMV no leite materno 5. Carga viral

Dedicatória

Dedico ao meu marido Arnaldo, pelo carinho e compreensão, a meu filhinho Lucas que me fez renascer, aos meus pais (Ozay e Delfina) e irmãos (Neiva, Márcia e Marcelo) pelo carinho, apoio e colaboração ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Amo muito vocês, meu eterno muito obrigada.

Agradeço em especial a minha orientadora, Dr^a Aparecida Yule Yamamoto pelos os seus ensinamentos científicos e pela sua competência e exemplo de dedicação, que muito contribuíram para a minha formação profissional. Muito obrigada.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela minha vida, pela minha família e pelas oportunidades.

Agradeço ao meu marido, pelo amor, pelo apoio, pela compreensão, principalmente nos vários momentos da minha ausência. Amo você.

Agradeço ao meu filhinho por fazer eu resnascer para o amor e me perdoe pelas várias horas de ausência, mas em todo o momento você estava em mim. Te amo eternamente.

Agradeço aos meus pais e irmãos em especial, a Márcia, pela colaboração, apoio e por terem cuidado do meu filho na minha ausência. Amo vocês e muito obrigada.

Agradeço à FAPESP, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho processo nº 2/04166-6.

Agradeço a Profª e Drª Marisa Mussi-Pinhata, ao Prof. Dr. Luiz Tadeu que muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Cláudio Rossi, Prof. Dr. Victor Hugo Aquino, Prof. Dr. Benedito Fonseca que contribuíram para a melhoria da apresentação textual do trabalho, em especial ao Prof. Dr. Geraldo Duarte (pelo cuidado na correção e sugestões, felicidades).

Agradeço aos meus companheiros de laboratório que contribuíram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho muito obrigada, a Talita pela sua competência profissional e amizade (gosto muito de você), a Virgínia por vários auxílios neste trabalho (você é muito competente e especial), a Patrícia pela PCR em tempo real (parabéns, pela a sua competência), ao Juliano (pela alegria), Lucía (muito obrigada), Edgar, Rosângela, Cléo e Helena.

Ao centro de pesquisa em Virologia, por ter permitido o espaço físico para o desenvolvimento deste trabalho e pela boa convivência neste período, gosto muito de vocês, Soraia (grande amiga), Paula, Veridiana (pela sua alegria), Márcia e Ricardo (felicidades), Alessandra, Marquinho, Gelse, Aldo, Viviane (sempre disponível a ajudar), Paulo, Pavanelli (muito obrigada), Sueli (obrigada), Egnair, Ellen, Laura, Roberta, Victor Hugo (sempre disposto a ensinar), Thiago, Andréia e Regina.

Agradeço ao Prof. Dr. Roberto Martinez, docente responsável pelo Laboratório de Sorologia do HCFMRP-USP e a todos os funcionários, pela obtenção e apoio na obtenção de amostras.

Agradeço a farmacêutica responsável pelo Laboratório da Rede Municipal da Unidade Básica de Saúde do Castelo Branco de Ribeirão Preto, Caludia Vassimon e funcionários, pela obtenção de amostras.

Agradeço aos vários amigos (Alessandra, Denise, Mara, Sandra, Simone, Telam, Norberto, Rosane, Rosalice e outros), direção (Prof Novaes) e funcionários da E.E. Otoniel Mota que tudo que foi possível fizeram para me ajudar durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos vários amigos, direção (Joyce, obrigada) e funcionários da CEMEI Romualdo Eduardo de Souza pela ajuda e compreensão no final deste trabalho.

Agradeço a Dr. Luzia Aparecida pela sua paciência e palavras de reflexão a Cida por ter cuidado do meu filho na minha ausência.

Agradeço a todas as mães e seus bebês que participaram deste estudo, que sem a sua contribuição este não seria realizado.

RESUMO

Título: Anticorpos neutralizantes e detecção quantitativa do citomegalovirus (CMV) em mães transmissoras e não transmissoras da infecção congênita.

A imunidade humoral contra o CMV em gestantes previamente soropositivas pode desempenhar um papel importante no controle da reativação viral, prevenindo a ocorrência da infecção congênita. Não existem estudos sobre a resposta dos anticorpos neutralizantes específicos contra o CMV em gestantes brasileiras, numa população com elevada taxa de soroprevalência. Adicionalmente, mulheres com imunidade preconcepcional albergam o CMV em sítios de latência ainda não conhecidos, responsáveis pela transmissão da infecção ao feto. A replicação viral em sítios acessíveis, tais como o leite materno, presumivelmente reflete a ocorrência de reativação viral durante a gestação e pode ter correlação com a transmissão da infecção congênita. Foram objetivos deste estudo: 1- Comparar a resposta dos anticorpos neutralizantes contra o CMV em amostras séricas obtidas no início da gestação e no momento do parto em mães que tiveram filhos infectados congenitamente (transmissoras, T) e mães soropositivas de crianças não infectadas (não transmissoras, NT). 2- Investigar a influência de diferentes cepas do CMV na variação dos títulos dos anticorpos neutralizantes. 3- Avaliar a cinética da resposta dos anticorpos neutralizantes para o CMV durante a gestação em mães T e NT. 4- Comparar a carga viral do CMV no leite de mães que transmitiram e não transmitiram a infecção aos seus filhos. Foram incluídas mães de recém-nascidos (RN) infectados congenitamente pelo CMV (transmissoras -T) e identificados em um programa de triagem neonatal de 4439 (50 RN infectados; incidência =1,1%). Para cada caso-índice, foram incluídas duas mães soropositivas para o CMV de RN não infectados; foram avaliadas 47 mães transmissoras e 94 mães não transmissoras. Soros maternos foram obtidos nas primeiras semanas de gestação (mediana= 13 semanas) e no momento do parto. A atividade neutralizante dos anticorpos maternos contra a cepa AD169 e contra os isolados de RN infectados foi avaliada através de um teste de microneutralização pela redução do efeito citopático. As amostras de leite materno das mães T e NT foram obtidas imediatamente após o parto (mediana=3 dias) e submetidas a reação de amplificação gênica da polimerase qualitativa (PCR) para a detecção do DNA viral. As amostras positivas foram quantificadas pela PCR quantitativa em tempo real utilizando o corante fluorescente SYBR Green I com iniciadores que amplificam uma região do gene codificador da glicoproteína B (gB). Todas as 26 de 47 mães T e 47 das 91 NT que tinham amostras de soros disponíveis no início da gestação (mediana=13 semanas) apresentavam anticorpos específicos anti-CMV. Baixos títulos de anticorpos neutralizantes foram encontrados em mães T comparado às NT em amostras séricas do início da gestação (média geométrica = 87,5 (4-128) vs 142 (32-256); $p=0,02$). Um aumento significativo dos títulos da atividade neutralizantes dos anticorpos foi observado em mães T e NT, durante a gestação; ($p=0,019$). Os títulos dos anticorpos neutralizantes de amostras séricas obtidas no momento do parto não apresentaram diferenças significativas entre as mães T e NT ($P=0,16$). A resposta dos anticorpos neutralizantes maternos

contra a cepa AD169 e contra a cepa selvagem isoladas de seus respectivos filhos foi similar ($p=0,33$). O DNA viral do CMV foi detectado em 38/44 (86,4%) mães T e em 29/91 (31,8%) das NT pela PCR qualitativa ($p<0,001$). A carga viral do CMV no leite materno nas mães T foi maior que a obtida em mães NT, sendo a média geométrica de $2,37 \times 10^2$ (variação de $2,6 \times 10$ a $2,31 \times 10^3$) e $5,1 \times 10$ (variação de $1,2 \times 10$ a $3,43 \times 10^2$) cópias de DNA/ μl ($p= 0,004$), respectivamente. Os resultados deste estudo sugerem que baixos títulos de anticorpos neutralizantes maternos contra o CMV no início da gestação estão associados com a transmissão da infecção congênita. Apesar da heterogeneidade do CMV, os ensaios de neutralização usando a cepa laboratorial AD169 permite uma avaliação adequada da atividade neutralizante contra diferentes cepas do CMV. Cargas virais altas do CMV no leite materno constituem fatores de risco materno para transmissão do CMV ao feto e pode ser marcadores da replicação viral em sítios corporais maternos menos acessíveis, tais como células miométriais.

Palavras chaves: citomegalovirus; infecção congênita ; infecção CMV na gestação; anticorpos neutralizantes; virolactia; carga viral.

ABSTRACT

Title: Neutralizing antibody and quantitative detection of cytomegalovirus (CMV) in transmitters and non-transmitter mothers of congenitally infected infants

CMV specific humoral immunity in pregnant women may play an important role against viral reactivation and be effective in preventing congenital infection. There is not data on the response of neutralizing (NT) antibody to CMV in Brazilian pregnant women belong to highly seroimmune population. In addition, women with preconceptional immunity may harbor the CMV at unknown sites from which the fetus can be infected. High viral replication in an accessible site such as breast milk presumably reflects the occurrence of viral reactivation during gestation and correlates with viral transmission to the fetus. In the present study, the objectives were: 1- To compare neutralizing (NT) antibody to CMV in serum specimens obtained in the first weeks of pregnancy and at the delivery in mothers of congenitally infected infants (transmitters, T) and seropositive mothers of uninfected infants (non-transmitters, NT). 2- To investigate the influence of strain CMV variation on neutralizing antibody titers. 3- To evaluate the kinetics NT antibody response to CMV during gestation in T and NT mothers. 4- To compare CMV breast milk load in mother who did or did not transmit CMV infection to their fetus. Mothers of infants identified as congenitally infected by CMV in screening program for this infection in 4439 neonates (50 RN infected incidence= 1,1%) were included and referred to as transmitters (T). For each index-case, were included 2 seropositive mothers of non-infected infants; 47 transmitter mothers and 94 non-transmitter mothers were enrolled. Maternal sera were obtained in the first weeks of pregnancy (median= 13 weeks) and at the delivery. Maternal virus- neutralizing activity was assayed with the AD169 strain of CMV and against the CMV isolated by a previously described by cytopathic effect reduction microneutralization assay. Breast milk was obtained from T and NT mothers shortly after delivery (median=3 days) and processed by qualitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of viral DNA. Positive samples were quantified by a real-time quantitative PCR based on the Sybr Green I fluorescent dye. All 26 from 47 T and 47 from 91 NT mothers who had available sera samples in the first weeks of pregnancy (median=13 weeks) were seropositive for CMV. Low titers of neutralizing activity were found in T mothers than NT mothers in serum specimens obtained in the first weeks of gestation (geometric mean= 87.5(4 to 128) vs 142 (32 to 256); $p=0.02$). Significant rise in NT antibody titers during gestation was observed in T and NT mothers. The increase in NT antibody titers was more significant in T than NT mothers ($p= 0.019$). Titers of neutralizing activity in serum specimens obtained at the delivery did not differ in T mothers than NT mothers($p=0.16$). NT maternal antibody response against AD169 strain of CMV and the CMV isolated from their infected infants was similar ($p=0,33$). CMV DNA was detected in 38/44 (86.4%) T and in 29/91 (31,8%) NT mothers by the qualitative assay ($p<0.001$). The breast milk viral DNA load was higher in T than in NT mothers (geometric mean of DNA CMV levels = 2.37×10^2 (range from 2.6×10 to $2.31 \times$

10^3) and 5.1×10 (range from 1.2×10 to 3.43×10^2) copies/ μ l, respectively); ($p=0.004$). In conclusion, low titer of NT antibody to CMV in the first weeks of gestation is associated with transmission of congenital infection. Despite the strain heterogeneity of CMV, the neutralization assay using AD169 laboratorial strain permitted a reliable detection of NT antibodies against different CMV strains. Viral load in early breast milk correlates with transmission of CMV to the fetus and can be a marker for viral replication in maternal less accessible sites, such as myometric cells.

Key words: cytomegalovirus; congenital infection; maternal CMV infection; neutralizing antibody; viral load.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais do citomegalovírus e sua importância como causa de infecção congênita.....	1
1.2. Aspectos imunológicos e virológicos maternos e infecção congênita pelo CMV	7
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	15
3. OBJETIVOS	17
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	18
4.1. População de Estudo	18
4.1.1. Desenho de Estudo	18
4.2. MÉTODOS LABORATORIAIS.....	20
4.2.1. Coleta das amostras.....	20
4.2.2 Preparo das amostras	21
4.2.3. Pesquisa de anticorpos da classe IgG anti-CMV por teste Imunoenzimático-ELISA.....	21
4.2.4. Isolamento do CMV em cultura de fibroblastos humanos.	21
4.2.5. Titulação viral através da formação de <i>plaques</i> de lise	22
4.2.6. Técnica de microneutralização viral para citomegalovírus.....	25
4.2.7. Reação de Amplificação Gênica em cadeia pela Polimerase qualitativa: Nested-PCR	27

4.2.8. Reação de Amplificação Gênica pela Polimerase quantitativa em tempo real.....	29
4.3. Análise estatística.....	32
5. RESULTADOS	34
5.1. Características sócio-demográficas de 47 mães transmissoras e 94 não transmissoras.....	34
5.2. Definição do estado sorológico materno.....	34
5.3. Anticorpos neutralizantes contra o CMV (cepa AD169) de amostras séricas obtidas no início da gestação de mães transmissoras e não transmissoras.....	35
5.4. Anticorpos neutralizantes contra o CMV (cepa AD169) de amostras séricas obtidas no momento do parto em mães transmissoras e não transmissoras.....	36
5.5. Verificação do incremento dos títulos de anticorpos neutralizantes contra a cepa AD169 de amostras séricas de 26 mães transmissoras e 26 não transmissoras obtidas no início da gestação e no momento do parto.....	37
5.6. Determinação dos títulos dos anticorpos neutralizantes de amostras séricas de mães transmissoras no início da gestação e no momento do parto contra a cepa isolada de seus respectivos recém-nascidos	38
5.7. Quantificação do DNA do CMV no leite de mães transmissoras e não transmissoras da infecção congênita pelo CMV.....	40
6. DISCUSSÃO.....	44
7. CONCLUSÕES.....	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXOS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais do citomegalovírus e sua importância como causa de infecção congênita

O citomegalovírus (CMV) humano ou herpesvírus humano tipo 5 (HHV-5) é um vírus DNA pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae* e gênero *Citomegalovirus*, tendo como características comuns desta subfamília ser altamente hospedeiro-específico, o ciclo replicativo longo e a produção de inclusões nucleares e citoplasmáticas nas células infectadas (ROIZMAN; PELLET, 2001). Apresenta ampla distribuição em todo o mundo e interação complexa com o sistema imunológico do hospedeiro infectado, fato que vem fundamentando o grande número de estudos sobre este vírus na última década (GAYTAN et al., 2002; BARBI et al., 2006).

Segundo os dados da literatura, considera-se que o isolamento do CMV tenha ocorrido simultaneamente por três grupos de pesquisadores em diferentes laboratórios em 1956 (ROWE; HARTLEY; WATERMAN, 1956; SMITH, 1956; WELLER et al., 1957). Desde então, são constantes os avanços no estudo desse vírus destacando que, a propagação do CMV em cultura de células permitiu a produção de antígenos e o desenvolvimento de testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos contra este vírus. Este fato permitiu a realização de inquéritos epidemiológicos mostrando que a infecção por este vírus é muito comum (PASS, 1985; GRIFFITHS; BABOONIAN; RUTTER, 1991; AHLFORS; IVARSSON; HARRIS, 1999).

A partícula viral do CMV possui um diâmetro de aproximadamente 150-200 nm, com um envelope fosfolipídico, no qual estão presentes oito

glicoproteínas, sendo seis essenciais: gpUL55 (gB), gpUL73 (gN), gpUL74 (gO), gpUL75 (gH), gpUL100 (gM) e gpUL115 (gL) (CHEN et al., 1999; MOCARSKI; COUCERLLE, 2001). As glicoproteínas formam três complexos, denominados gCI, gCII e gCIII e estão envolvidas em vários eventos do ciclo replicativo do vírus, tais como a adsorção, entrada do vírus na célula permissível, propagação viral célula-célula e montagem do envelope (GRETCH et al., 1988; BRITT; MACH, 1996). O complexo gCI é constituído pela glicoproteína B (gB), sendo a mais abundante da superfície do envelope viral e altamente imunogênica (BRITT; VUGLER, 1990). A glicoproteína B apresenta um papel importante na replicação do CMV, principalmente na adsorção e entrada do vírus na célula infectada (COMPTON; NOWLIN; COOPER, 1993). A associação das glicoproteínas M e N resulta na formação do complexo gCII que está envolvido no processo de replicação viral, embora o seu papel no mecanismo de entrada do vírus na célula não esteja bem estabelecido (MOCARSKI; COURCELLE, 2001). As glicoproteínas H, L e O constituem o complexo gCIII e estão envolvidas na fusão do envelope viral na superfície da membrana celular (HUBER; COMPTON, 1999).

Entre o envelope e o capsídeo existe uma camada amorfa, denominada de tegumento, sendo esta estrutura composta por aproximadamente 25 proteínas, envolvidas no processo de maturação do vírus (BALDICKI et al., 1997). O capsídeo com conformação icosaédrica, é constituído por pelo menos cinco proteínas estruturais (pUL86, pUL46, pUL85, pUL46, pUL80) (CHEN et al., 1999). O genoma do CMV é constituído por DNA linear de fita dupla que

está organizado em duas regiões, denominadas segmento longo e segmento curto, separados por regiões repetidas com seqüências de pares de bases invertidas (NOVOTNY et al., 2001). A cepa laboratorial AD169, já totalmente sequenciada apresenta mais de 225 seqüências abertas, que codificam aproximadamente 200 proteínas (CHEE et al., 1990).

Na história natural da infecção causada pelo CMV em indivíduos susceptíveis, observa-se que o único reservatório para a transmissão do vírus é o próprio homem (WELLER, 1971). A infecção primária ocorre pelo contato direto com várias secreções e excreções contendo o vírus, tais como, as respiratórias, urinárias, salivares, sanguíneas, leite materno, secreção do colo uterino e esperma. Desta maneira, este vírus pode ser adquirido por meio de várias formas: contatos sexuais, contatos próximos, transmissão vertical, transplante de órgãos e por meio de transfusões sanguíneas (PASS, 1985; CHANDLER; HANDSFIELD; MCDUGALL, 1987; HO, 1990; NELSON; DEMMMLER, 1997; SWEET, 1999).

Após a infecção primária do indivíduo, a replicação inicial do CMV geralmente ocorre na mucosa epitelial e a viremia ocorre na fase sistêmica da infecção sendo o vírus propagado para diferentes tecidos do hospedeiro, seguindo-se a excreção viral através de vários fluidos corpóreos, durante meses e até anos (KLEMORA et al. 1970; PECKHAM et al., 1987). Esta infecção torna-se latente e em determinados períodos da vida ela pode recorrer, seja por reativação do vírus latente ou por reinfeção com novas cepas virais (HUANG et al., 1980; PASS; HUTTO, 1986).

As células hematopoiéticas de linhagem mieloíde, tais como progenitores de macrófagos, granulócitos e células dendríticas são os principais sítios de latência do CMV (KONDO; KANESHIMA; MOCARSKI, 1994; SINGER; JAHN, 1996). A presença de transcritos associados à latência nessas células progenitoras infectadas naturalmente e experimentalmente, têm sido demonstrado; porém o papel desses transcritos, durante a latência do CMV, ainda não está bem estabelecido. Esses transcritos são codificados por duas regiões (UL122/UL123) dos genes precoce imediato (*ie1/ie2*) (KONDO; XU J; MOCARSKI, 1996; HAHN; JORES; MOCARSKI, 1998). A expressão desses transcritos associados à latência ocorre em um número reduzido de células progenitoras de granulócitos, principalmente CD33+ e o estágio de diferenciação dessas células tem um resultado significativo na expressão desses transcritos (SLOBEDMAN; MOCARSKI, 1999). Nos sítios de latência, o DNA viral é mantido como plasmídeo extracromossomal com baixa expressão gênica; estudo em pacientes com infecção previa ao CMV, duas a treze cópias do genoma viral por célula infectada tem sido detectadas pela reação de amplificação gênica (PCR) em células mononucleadas (SLOBEDMAN; MOCARSKI, 1999). A ação de citocinas proinflamatórias pode promover a alteração do estado de diferenciação e funcional da célula hospedeira e a redução da resposta imunológica do hospedeiro pode possibilitar a reativação viral (SODERBER-NAUCLER; NELSON, 1999).

Estudos epidemiológicos mostram que a infecção pelo CMV ocorre praticamente em todo o mundo, sem variação sazonal (PASS, 1985). Em geral, a

prevalência da infecção por CMV é alta em países subdesenvolvidos e entre os grupos de baixo nível socioeconômico (PASS et al., 1987). Em países desenvolvidos, aproximadamente 50% da população adulta terá evidências de infecção prévia com este vírus e em países em desenvolvimento, a soroprevalência poderá atingir 90 a 100% em adultos (PASS, 1985; ALMEIDA et al., 2001). No Brasil, na cidade de Caieiras, no estado de São Paulo, observou-se que a taxa de soropositividade para o CMV foi de 56% em crianças com um ano de idade, 64% entre cinco e nove anos, 75% entre adolescentes de 15 e 19 anos e acima de 90% em adultos com 40 anos de idade, demonstrando que a infecção por este vírus é altamente prevalente e ocorre precocemente ainda no primeiro ano de vida (ALMEIDA et al., 2001).

Em gestantes, a soroconversão para o CMV é dependente da taxa de prevalência da infecção primária na infância, da idade de início da vida sexual, bem como do número de parceiros sexuais e da presença de outras infecções sexualmente transmissíveis (CHANDLER et al., 1995). Além destes fatores, crianças jovens e com infecção subclínica pelo CMV são importantes fontes de infecção primária para gestantes (PASS, 1985; ALFORD et al., 1990). No Brasil, estudos mostram que a soroprevalência para o CMV é de 66,5% em gestantes de população de elevado nível socioeconômico e de 84,5% a 95% em populações de baixo nível socioeconômico (PANUTTI et al., 1985; DUARTE et al., 1994).

A transmissão vertical do CMV envolve três formas, sendo elas a transplacentária ou intra-útero, intra-parto e pós-natal precoce pelo aleitamento materno (STAGNO et al., 1973). As infecções que ocorrem no período intra-

parto ou pós-natal são geralmente assintomáticas, exceto em prematuros de muito baixo peso (HAMPRECHT et al., 2003). A transmissão transplacentária é a via mais importante porque resulta na infecção congênita, responsável pelas seqüelas neurológicas e surdez neurossensorial, sendo considerado importante problema de saúde pública (ROSS; BOPPANA, 2005). Quanto à deficiência auditiva, foi observado que o CMV é responsável por pelo menos um terço dos casos de perda auditiva em crianças jovens (HICKS et al., 1993). Mais recentemente, um estudo demonstrou que 10% dos diagnósticos de surdez neurossensorial realizados em crianças nos dois primeiros meses de vida eram atribuíveis à citomegalovirose congênita, sendo que esse percentual se elevou para 34,2% quando o diagnóstico de surdez se estendeu durante os primeiros anos de vida (BARBI et al., 2003).

A incidência da infecção congênita pelo CMV difere em diferentes populações, variando de 0,2% a 2,2% , de acordo com o nível sócio-econômico (STAGNO et al., 1977; LEINIKKI et al., 1978; STAGNO et al., 1982; STAGNO et al., 1983; ALFORD; IVARSSON; HARRIS, 1984). No Brasil, um estudo epidemiológico realizado no município de São Paulo, demonstrou que a incidência da infecção congênita foi de 0,98% em população de baixo nível socioeconômico e de 0,49% na de nível socioeconômico médio (PANNUTI et al., 1985). Em Ribeirão Preto, em uma população com taxa de soropositividade materna de 98%, a incidência desta infecção foi de 2,6% em recém nascidos de diferentes idades gestacionais e de 1,8% em recém-nascidos pretermos (YAMAMOTO et al., 2001).

1.2. A infecção materna pelo CMV e infecção congênita

A infecção congênita pelo CMV pode resultar da infecção materna primária, como da infecção recorrente, seja pela reativação do vírus endógeno ou pela reinfeção com novas cepas virais (STAGNO et al., 1977; SCHOPPEL; LAUBER; KRECH, 1978; AHLFORD; IVARSSON; HARRIS, 1999; BOPPANA et al., 2001). Em populações de alta soropositividade para o CMV, tal como a estudada em Ribeirão Preto, a infecção congênita pode ser resultado mais comumente de infecção recorrente e não primária. Ainda, considerando a elevada taxa de soroprevalência materna nesta população, a infecção congênita sintomática foi observada em 34%, sendo mais freqüente em recém-nascidos prematuros. Este achado sugere que a infecção congênita sintomática pode ser resultado também da infecção recorrente. (YAMAMOTO et al., 2001).

Estudos iniciais relatavam que apenas a infecção congênita decorrente da infecção materna primária tinha como conseqüência o aparecimento de seqüelas graves com repercussão importante no desenvolvimento neurológico (STAGNO et al., 1982; FOWLER et al., 1992). Entretanto, dados recentes sugerem que crianças infectadas congenitamente de mães com infecção prévia ao CMV também poderão desenvolver doença e sequelas graves (BOPPANA et al., 1999; AHLFORS; IVARSSON; HARRIS, 1999; GAYANT et al., 2002).

Os mecanismos da transmissão do CMV da mãe para o feto ainda não são completamente conhecidos. Na infecção materna primária, a transmissão intra-útero do CMV ocorre em 30 a 40% dos casos, sugerindo a existência de uma barreira inata com proteção parcial da transmissão vertical deste vírus (STAGNO; WHITEY, 1985; HEMMINGS et al., 1998). Uma possível seqüência

de eventos seria a disseminação do CMV por via hematogênica, carregado pelos leucócitos maternos (REVELLO et al., 1998; GERNA et al., 2000), alcançando o citotrofoblasto (responsável pela ancoragem da placenta ao útero) e, através de disseminação retrógrada, o vírus infectaria as células do líquido amniótico, que por sua vez seriam deglutidas pelo feto, iniciando a replicação na mucosa oral com conseqüente propagação sistêmica (FISHER et al., 2000).

Outro possível mecanismo ainda na infecção materna primária seria que o CMV pode ser carregado pelos leucócitos durante a viremia materna e infectaria as células endoteliais de capilares uterinos. Estas células, que estão em contato direto com o citotrofoblasto, infectariam o tecido basal das vilosidades coriônicas, incluindo fibroblastos e células endoteliais fetais (REVELLO; GERNA, 2002).

Na infecção materna recorrente, seja essa secundária à reativação da infecção latente ou à reinfecção, a transmissão viral ocorre na presença de imunidade pré-concepcional (STAGNO, 2001). Como resultado, a viremia materna é ausente ou indetectável nessa modalidade de infecção, exceto quando a mãe é portadora de imunodeficiência (REVELLO et al., 1998). Supõe-se que o CMV seria reativado em sítios pouco acessíveis a exames virológicos, tais como o endométrio e o miométrio com posterior propagação ao feto. Um mecanismo provável da replicação do CMV nestes sítios seria a imunossupressão local, que ocorre durante a gestação através da produção da IL-10 secretada pelo citotrofoblasto, uma citocina imunorregulatória capaz de suprimir a resposta proliferativa de linfócito T, bem como a produção de INF- γ

pelos linfócitos e a expressão de moléculas de MHC classe I (FISHER et al., 2000; ROTH et al., 1996). Esta imunossupressão local poderia facilitar a reativação do vírus latente contido nos macrófagos CD14+ dos tecidos uterinos, levando à disseminação retrógrada do CMV nas vilosidades e conseqüente propagação ao feto (SODERBER-NAUCLER et al., 2001).

Embora os fatores associados com a transmissão intra-útero do CMV em gestantes previamente soropositivas ainda não sejam claramente definidos, o grau da resposta imunológica materna bem como da replicação viral em diferentes sítios maternos e características inerentes ao vírus poderiam influenciar na ocorrência da infecção congênita (RAYNOR, 1993; REVELLO et al., 1998).

Supõe-se que a natureza dos mecanismos maternos protetores que limitam a transmissão intraútero possam incluir tanto a imunidade celular quanto a humoral. A redução ou ausência de respostas linfoproliferativas ao CMV e menores títulos de anticorpos neutralizantes têm sido identificados em gestantes que transmitiram o CMV quando comparadas àquelas que não transmitiram (BOPPANA; BRITT, 1995).

Vários estudos mostram que a atividade neutralizante dos anticorpos contra o CMV apresenta um papel fundamental no controle da infecção pelo CMV (YEAGER et al, 1981; SNYDMAN et al., 1987; BOPPANA et al., 1995; ALBEROLA et al., 1998, 2000). As primeiras evidências da importância destes anticorpos foram observadas através de transferência passiva a partir de doadores imunes ou de anticorpos monoclonais para receptores soronegativos

para o CMV, mostrando que a imunoprofilaxia reduzia o risco da infecção primária sintomática (YEAGER et al., 1981; SNYDMAN et al., 1987). Em modelo animal, um estudo demonstrou que a transferência de imunoglobulinas antes da indução da infecção pelo CMV em cobaias gestantes contribuía para a sobrevivência dos fetos. Entretanto, esta proteção era parcial, uma vez que embora os anticorpos contra CMV tenham melhorado a sobrevivência dos fetos, não impediram a transmissão vertical (BRATCHER et al., 1995).

Na infecção materna primária, a produção dos anticorpos neutralizantes específicos contra o CMV, ocorre aproximadamente entre 13 a 15 semanas após o início da infecção (EGGERS; METZGER; ENDERS, 1998). Portanto, a ausência ou baixos títulos de anticorpos neutralizantes, em amostras séricas de mulheres que apresentam imunoglobulinas IgG e IgM, podem ser um marcador de infecção primária recente (EGGERS; METZGER; ENDERS, 1998). Adicionalmente, a resposta dos anticorpos neutralizantes é mais intensa e prolongada em mães que transmitiram a infecção congênita comparado ao grupo de mães que não transmitiram a infecção aos seus filhos (ALFORD; HAYES; BRITT, 1988; BOPPANA; PASS; BRITT, 1993), sugerindo que o estímulo antigênico para produção destes anticorpos foi maior naquelas que transmitiram. Um estudo mostrou que a transmissão intrauterina do CMV não está associada ao déficit da quantidade de anticorpos contra o vírus, mas com a qualidade funcional destes anticorpos, ou seja, da atividade neutralizante antiviral (BOPPANA; BRITT, 1995). Entretanto, os títulos de anticorpos

neutralizantes protetores que impedem a transmissão intrauterina do CMV ainda não foram definidos (ADLER et al., 1995; SCHOPPEL et al., 1998).

Para a verificação *in vitro* da atividade neutralizante dos anticorpos específicos anti-CMV, a maioria dos estudos utiliza o ensaio de microneutralização em placa, observando-se seu efeito na redução do efeito citopático do vírus (BOPPANA et al., 1995; BOPPANA; BRITT, 1995; ALBEROLA et al., 1998; 2000). As principais glicoproteínas do CMV que induzem a produção dos anticorpos neutralizantes são as glicoproteínas do envelope viral (BRITT; MACH, 1996). Os anticorpos específicos gerados contra a glicoproteína B são induzidos frequentemente após a infecção natural (MARSHALL et al., 1992; ALBEROLLA et al., 2000).

Alguns estudos têm sugerido que a resposta dos anticorpos neutralizantes é cepa-específica, sendo esta característica importante em situações clínicas onde reinfecções com cepas exógenas do CMV ocorrem (GRUNDY et al., 1988; KLEIN et al, 1999). Estes estudos mostram que a capacidade neutralizante dos soros humanos contra cepas heterólogas do CMV é diferente da capacidade neutralizante contra cepas homólogas. Recentemente, (BOPPANA et al., 2001) mostraram que a reinfecção com diferentes cepas de CMV pode levar à infecção sintomática pelo CMV em fetos de mulheres com imunidade prévia contra este vírus e sugerem que a reinfecção materna seja, responsável pela ocorrência de infecção congênita sintomática pelo CMV.

Apesar da infecção pelo CMV ser geralmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, a avaliação dos anticorpos neutralizantes neste

grupo poderia contribuir para uma melhor compreensão da patogênese desta infecção. Estudo realizado em adolescentes que tiveram infecção primária pelo CMV demonstrou que durante o período de ausência de excreção viral foram observados altos níveis de anticorpos neutralizantes (ZANGHELLINI et al., 1999). Em 2000, ALBEROLLA et al. estudaram indivíduos imunocompetentes com infecção primária e observaram que aqueles que desenvolveram sintomas atribuíveis ao CMV apresentavam baixos títulos de anticorpos neutralizantes na fase aguda em comparação aos que eram assintomáticos ou com sintomas inespecíficos e leves.

Avaliando os dados disponíveis na literatura constata-se que os anticorpos neutralizantes limitam a disseminação do vírus e, conseqüentemente, a intensidade da replicação do CMV, resultando em um menor risco de doença e de transmissão do vírus (SCHOPPEL et al., 1997; ALBEROLA et al., 1998; ALBEROLA et al., 2000).

A exemplo do que ocorre em pacientes imunocomprometidos, a ausência ou baixos níveis de anticorpos neutralizantes em gestantes no momento do início da replicação viral, seja na infecção primária, reativação ou reinfecção, pode estar associada a risco maior de transmissão do CMV ao feto.

Da mesma maneira, o grau de replicação deste vírus em diferentes sítios maternos, durante a gestação, determinado pela quantificação viral em fluidos corporais maternos de fácil obtenção tais como saliva, urina, cervix uterino e sangue, pode refletir a replicação viral em sítios de difícil acesso para exames virológicos, tais como endométrio e o miométrio, que podem ser responsáveis

pela propagação do CMV ao feto em mulheres previamente imunes (NUMAZAKI, 1997). A detecção do CMV e a estimativa da carga viral nessas mães podem ser indicadores da ocorrência da transmissão da infecção congênita.

Entretanto, é conhecido que a detecção do CMV é observada em uma minoria de gestantes saudáveis e previamente soropositivas (PASS et al., 1982; SMITH et al., 1993). Em 1982, PASS et al., investigaram a excreção viral em urina, cervix uterino e saliva de mães de recém-nascidos portadores de infecção congênita por CMV, no período de um a três meses após o parto, demonstrando que até 65% daquelas com infecção primária gestacional excretavam o vírus em pelo menos um sítio avaliado, sendo a virúria mais frequente que a detecção na saliva ou no cervix uterino. No entanto, quando a infecção materna gestacional foi recorrente, a excreção viral foi menos frequente (17%). Além disso, quando essa ocorria, o vírus era encontrado somente na urina e no cervix uterino. Outros autores têm demonstrado que o CMV não foi detectado no sangue de nenhuma mãe com infecção recorrente (REVELLO et al., 1998; BITSCH et al., 1992).

Vários estudos mostraram que o leite é importante fonte excretora de CMV no período pós-parto. A detecção do DNA viral no colostro e no leite materno no período imediatamente após o parto é consequência da reativação viral. Entretanto, o sítio exato de replicação viral nas glândulas mamárias ainda não é conhecido (REYNOLDS et al., 1973; DWORSKY et al., 1983). Segundo NUMAZAKI, (1997) e HAMPRECHT et al. (2001), a detecção do DNA viral no

colostro e no leite materno no período imediatamente após o parto é consequência da reativação viral. Entretanto, o sitio exato de replicação viral nas glândulas mamárias ainda não é conhecido. Já está bem estabelecida a relação da virolactia com a infecção perinatal, aquela que ocorre no período pós-parto, e que até 96% das mães soropositivas excretam o CMV no leite, sendo esta a principal fonte de transmissão do vírus para o lactente após o parto (VOCKEN et al., 1998; HAMPRECHT et al., 2001; MÉIER et al., 2005). Embora a excreção do CMV no leite materno não esteja relacionada com a infecção intra-utero, o leite materno pode ser considerada a amostra com maiores probabilidades de se conseguir a detecção do CMV, possibilitando a determinação da carga viral neste fluido, e indiretamente mostrar evidências do grau de replicação do CMV em outros sítios maternos e a sua associação com a transmissão da infecção congênita.

2. JUSTIFICATIVAS E PRESSUPOSTOS DO ESTUDO

Apesar de estar bem estabelecido que a transmissão congênita do CMV pode ocorrer em mães previamente imunes e a despeito dos progressos nos métodos de diagnóstico da infecção congênita pelo CMV no período gestacional e ou no período pós-natal, ainda não é bem definido porque algumas mães soropositivas transmitem a infecção aos seus filhos e outras não. Esta explicação é importante para populações com alta taxa de soropositividade, em que a grande maioria dos casos de infecção congênita é muito provavelmente resultado de infecção materna recorrente, seja por reativação ou reinfeção. O conhecimento destas variáveis é crucial para a compreensão dos componentes da imunidade protetora e para o desenvolvimento de vacinas eficazes como estratégia de prevenção da infecção congênita.

Supõe-se que os fatores que influenciam a transmissão do CMV ao feto incluam baixos níveis de anticorpos neutralizantes maternos e altos níveis de replicação do CMV em diferentes sítios maternos.

A obtenção de uma amostra de sangue materno antes da gestação ou no início do primeiro trimestre permitiria o conhecimento do estado imunológico materno pré-concepcional. A comparação da atividade neutralizante contra o CMV em soros maternos colhidos antes da gestação ou no primeiro trimestre de gestação e no momento do parto permitiria avaliar a cinética destes anticorpos durante o período gestacional.

Pressupõe-se que a eventual diferença da atividade neutralizante do soro materno em amostras obtidas no primeiro trimestre da gravidez e no final

deste período, considerando as mães transmissoras e não transmissoras da infecção congênita, poderia fornecer evidências do papel da imunidade humoral na proteção contra a transmissão vertical desse vírus. Acredita-se que a amplitude das diferenças nas respostas dos anticorpos maternos contra o CMV tenha associação com a transmissão da infecção intra-uterina.

A determinação dos anticorpos neutralizantes de soros maternos contra as cepas do CMV isoladas de seus respectivos filhos com infecção congênita poderá indicar uma melhor correlação do papel protetor da imunidade materna do que a quantificação destes anticorpos contra a cepa laboratorial AD169.

A investigação de marcadores virológicos como a carga viral do CMV em alguns fluidos corporais maternos de fácil obtenção, a exemplo do leite, poderá refletir a ocorrência de replicação viral em sítios ocultos de difícil acesso.

3. OBJETIVOS

Baseado nestes pressupostos, foram objetivos deste estudo:

- 3.1. Comparar a atividade neutralizante dos anticorpos maternos contra a cepa AD169 do CMV de amostras séricas maternas obtidas no início da gestação e no momento do parto entre as mães que transmitiram e aquelas que não transmitiram a infecção aos seus filhos.
- 3.2. Comparar a atividade neutralizante dos anticorpos maternos contra as cepas do CMV isoladas de seus respectivos filhos em amostras séricas obtidas no início da gestação e no momento do parto entre as mães que transmitiram e aquelas que não transmitiram a infecção aos seus filhos.
- 3.3. Avaliar a cinética da resposta dos anticorpos neutralizantes durante a gestação contra a cepa AD169 e contra as cepas isoladas entre as mães que transmitiram e não transmitiram a infecção aos seus filhos.
- 3.4. Quantificar o DNA do CMV excretado no leite de mães transmissoras e daquelas não transmissoras e a sua associação com ocorrência de infecção congênita.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. População de Estudo

Participaram deste estudo 47 mães de 48 recém-nascidos (um gemelar) com infecção congênita pelo CMV, identificados em um programa de triagem neonatal de 4439 recém nascidos (50 recém-nascidos com infecção congênita; incidência de 1,1%) e 94 mães de 94 recém-nascidos não infectados, de duas maternidades públicas de Ribeirão Preto, incluindo o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e a Maternidade do Complexo Aeroporto de Ribeirão Preto (MATER), no período de março de 2003 a dezembro de 2004 (Fluxograma 1).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, processo número 4782/2002 (Anexo 1). Todas as mães participantes do estudo foram incluídas após a obtenção do termo de consentimento informado (Anexo 2).

4.1.1. Desenho de Estudo

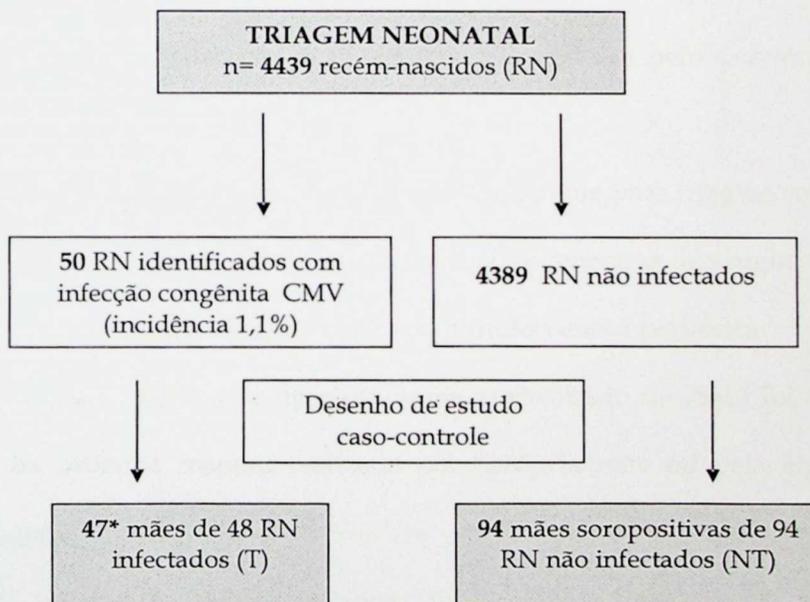
Em um desenho de estudo caso-controle, para cada caso índice, ou seja, para cada mãe de recém-nascido com infecção congênita confirmada por CMV (mãe transmissora), foram incluídas duas mães de recém-nascidos não infectados congenitamente pelo CMV (mães não transmissoras ou controles). Os seguintes critérios foram utilizados na inclusão de mães controles: serem mães de recém nascidos com a mesma idade gestacional que o caso índice e serem soropositivas para o CMV.

A infecção congênita pelo o CMV foi definida segundo os critérios divulgados por STAGNO et al., (1983) e DEMMLER, (1994). Os parâmetros

considerados foram a detecção do DNA viral pela reação de amplificação gênica em cadeia da polimerase (PCR) e pelo isolamento viral em cultura de células. Estas variáveis foram consideradas válidas quando concordarem entre si, na pesquisa do CMV em pelo menos duas amostras de saliva e/ou urina obtidas nas primeiras três semanas de vida.

De todas as mães participantes do estudo, programou-se a obtenção de amostras de soro coletadas no início da gestação e no momento do parto e a coleta de amostras de leite no período imediatamente após o parto.

Fluxograma 1:



* uma mãe T de gemelares

* excluídas duas mães T pela não disponibilidade de soros do pré e parto

4.2. MÉTODOS LABORATORIAIS

4.2.1. Coleta das amostras

Alíquotas de volumes variados (100-200 μ l) de soros do início da gestação foram obtidas de amostras remanescentes coletadas durante o pré-natal das mães. Estas amostras foram cedidas pelo Laboratório da Rede Municipal da Unidade Básica de Saúde do Castelo Branco de Ribeirão Preto, unidade responsável pela realização dos exames sorológicos do pré-natal de gestantes atendidas em diferentes Unidades Básicas de Saúde da região de Ribeirão Preto. Alíquotas de volumes variados (500 a 1000 μ l) de soro na ocasião do parto foram obtidas de amostras remanescentes coletadas para triagem sorológica de rotina no Centro Obstétrico do HCFMRP-USP, cedidas pelo Laboratório de Sorologia do HCFMRP-USP.

Na maternidade Mater, onde a coleta de sangue para triagem sorológica no momento do parto não é realizada de rotina, as amostras de sangue (volume máximo de 2mL) foram obtidas através de punção venosa periférica.

O colostro ou leite materno (volume aproximado de 2mL) foi coletado através de ordenha manual realizada pela própria mãe ou pela equipe de enfermagem.

A urina de recém-nascidos foi coletada em sacos coletores hipoalergênicos e estéreis. As amostras de saliva foram obtidas com a utilização de um swab estéril, colocado suavemente na face interna da bochecha do bebê, durante um minuto, para uma adequada umidificação do mesmo. Em seguida o *swab* foi transferido para um frasco contendo meio de transporte (Meio Earle, MEM, Cultilab) e mantidas a 4°C. As amostras de urina e saliva foram

inoculadas em cultura de fibroblastos humanos até o período máximo de 6 horas após a coleta.

Todas as amostras foram transportadas e armazenadas a 4°C até o processamento.

4.2.2. Preparo das amostras

As amostras de leite materno foram fracionadas após prévia centrifugação a 5000 rpm, durante 5 minutos. A camada superior de gordura foi retirada, obtendo-se o soro e células do leite (HAMPRECHT et al. 1998). Uma alíquota de 100 a 200 µL foi utilizada para a extração de DNA através de kit comercial (Qiagen, Alemanha), segundo as especificações do fabricante.

As amostras de urina e saliva foram tratadas com antibiótico (Amicacina 500µg/mL) e mantidas a 4°C, durante 1 hora, antes da inoculação em cultura de células. Após este período as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos e inoculadas em cultura de fibroblastos.

4.2.3. Pesquisa de anticorpos da classe IgG anti-CMV por teste imunoenzimático - ELISA .

A determinação qualitativa de anticorpos IgG específicos anti-CMV foi feita através de Ensaio Imunoenzimático (ELISA), pelo método indireto, utilizando Kit comercial (Eti-Cytok-G-Plus, DiaSorin, Italia), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.2.4. Isolamento do CMV em cultura de fibroblastos humanos

O isolamento das cepas do CMV, a partir de amostras de saliva e urina dos recém-nascidos que tiveram detecção do DNA do CMV pela PCR, foi realizado em culturas diplóides de fibroblastos humanos (HF), oriundas de

pulmão fetal e imortalizadas por telomerização (HFTelo). Estas células foram doadas pela Universidade do Alabama Birmingham, USA. As células foram cultivadas em meio mínimo essencial (MEM) com sais de Earle, contendo 1% de L-glutamina (Cultilab, Brasil); soro fetal bovino (Gibco, USA) a 10% no meio de crescimento e a 2% no meio de manutenção e 2% de uma solução de antibióticos contendo penicilina 100 U/mL e estreptomicina 0,01 mg/mL e solução de bicarbonato de sódio a 8,4 %, para ajustar o pH em 7,2. As colônias de células foram cultivadas em frascos estéreis de 25 cm² (Costar, EUA), a 37°C, em estufa de CO₂ 5%, até a formação de monocamadas confluentes. Foram inoculados em cada frasco 1000 µL da urina ou da saliva após a retirada do meio de cultura. As monocamadas celulares foram incubadas com os inóculos durante 1 hora e, posteriormente, acrescentado 5 mL do meio de cultura a 10% a cada frasco. As culturas celulares foram observadas diariamente em microscópio invertido (Zeiss, Alemanha) até o período máximo de 30 dias. A presença do CMV foi detectada pelo aparecimento do efeito citopático característico. Após o aparecimento de pelo menos 80% de efeito citopático pela monocamada, a suspensão de células infectadas e o sobrenadante foram estocados a - 80 °C até o seu uso no teste de neutralização.

4.2.5. Titulação viral através da formação de *plaques* de lise

As colônias de fibroblastos humanos foram cultivadas em microplacas estéreis de seis orifícios, contendo 10⁶ células/orifício, a 37°C, em estufa de CO₂ 5%, até a formação de monocamadas confluentes. Após a decantação do meio de cultura, foram inoculados aos orifícios da microplaca 200 µL de suspensão

viral (cepa AD169 ou isolado clínico), em diferentes diluições decimais (10^{-1} a 10^{-9}). As monocamadas celulares foram incubadas com os inóculos, por 1 hora, a 37°C , em estufa de CO_2 5% e posteriormente, acrescentado a cada orifício 3ml do meio agarose *overlay*. O meio agarose *overlay* foi constituído de partes iguais de 0,6% agarose (agarose *low melting point*, Gibco, USA) e meio mínimo essencial (MEM) com sais de Earle (Gibco, USA), concentrado duas vezes, contendo 1% de L-glutamina (Cultilab, Campinas, Brasil), 10% de soro fetal bovino (Gibco, USA) e 2% de uma solução de antibióticos contendo penicilina 100 U/mL e estreptomicina 0,01 mg/mL e solução de bicarbonato de sódio a 8,4%, para ajustar o pH em 7,2. As placas foram incubadas em estufa de CO_2 5% durante sete dias, quando foi acrescentado mais 3mL do meio *overlay* e incubadas por mais sete dias. Após este período, as monocamadas foram fixadas com formalina a 10%, durante 10 minutos e em seguida lavadas com água e coradas com azul de metileno 0,03% durante 2 minutos.

Os *plaques* foram contados por leitura visual em microscópio invertido (Zeiss, Alemanha) e o título viral foi calculado de acordo com a fórmula $X = N / \sum K \cdot d$, onde X= número de unidades formadoras de *plaques* por alíquota N= número total de *plaques* contadas em todas as diluições da suspensão viral e d= diluições correspondentes. O título viral foi expresso em unidades formadoras de *plaques de lise* (PFU)/por mL .

Tentou-se a titulação do CMV dos isolados clínicos de todas as amostras de urina e/ou saliva dos recém-nascidos que tiveram a detecção do DNA do CMV pela PCR. O efeito citopático característico do CMV foi observado em

todos os inóculos; entretanto, pelas limitações técnicas no cultivo do CMV, foi possível a titulação viral através da formação de *plaques* de lise em 30/50(60%) isolados; destes, em 14/30(47%) das cepas isoladas do CMV, foi possível a obtenção de títulos suficientes do vírus para uso nos ensaios de neutralização. Dentre as limitações, observou-se a lenta propagação do CMV na cultura, com aparecimento de alguns efeitos focais pela monocamada, sendo necessário a realização de um número limitado de passagens dos vírus (variação de 4 a 18), conforme mostra a Tabela 1. Como descrito na técnica de neutralização, foi necessário a utilização de 10^4 pfu/mL do vírus para obtenção de 100% de efeito citopático característico após 72 horas do inoculo nos orifícios controles que continham soros controles sem atividade neutralizante (negativos). Em 14 isolados, de passagens de 2 a 13, obteve-se títulos superiores a 10^4 pfu/mL e títulos inferiores a 10^4 pfu/mL foram observados em 16 dos 30 isolados; Tabela 1.

Tabela 1: Títulos em unidades formadoras de *plaques* das cepas virais isoladas a partir de amostras clínicas de 30 recém-nascidos com infecção congênita pelo CMV.

Cepas isoladas de recém-nascidos	Número de passagens	Título viral (PFU/mL)
0164AU-	P4	$3,2 \times 10^3$
0183AU	P6	$9,0 \times 10^3$
0533AU-	P5	$3,3 \times 10^4$
0798AU-	P4	$6,2 \times 10^4$
609AU-	P2	$3,7 \times 10^4$
981AU-	P6	$9,0 \times 10^3$
0956BU-	P4	$5,5 \times 10^3$

1016AU-	P18	$5,5 \times 10^3$
1175AU-	P 12	$2,2 \times 10^2$
1195BS-	P 8	$3,3 \times 10^4$
1254AU-	P10	$1,6 \times 10$
1468AU-	P5	$2,2 \times 10^4$
1727AU-	P5	$4,6 \times 10^5$
2244AU-	P12	$2,4 \times 10^4$
2226AU-	P5	$3,4 \times 10^4$
2292AU-	P7	$1,0 \times 10$
2367AU-	P6	$9,0 \times 10^3$
2467AU-	P4	$1,0 \times 10^3$
2519AU	P3	$8,0 \times 10^3$
2593AU-	P4	$8,0 \times 10^5$
2775AU	P4	$2,3 \times 10^3$
M0072AU-	P7	$9,4 \times 10$
M0074AU-	P10	$6,0 \times 10^4$
M0339AU-	P13	$2,2 \times 10^4$
M0680AU-	P4	$9,3 \times 10^3$
M781AU-	P4	$9,5 \times 10^3$
M0804AU-	P4	$3,3 \times 10^3$
M1106AU-	P7	$2,7 \times 10^4$
M1115AU-	P9	$5,4 \times 10^4$
M1271AU-	P6	$7,4 \times 10^4$

4.2.6. Técnica de microneutralização viral para citomegalovirus

Para a realização dos experimentos foi utilizada a técnica de microneutralização, segundo descrito por GONCZOL et al. (1986). Neste

ensaio, fibroblastos humanos (HFTelo) foram cultivados em frascos de cultura celular de 25 cm². Inicialmente, os soros foram incubados a 56°C e um volume de 30 µL de cada amostra foi adicionado em duplicata para um volume de 90 µL de meio de cultura (MEM, Gibco, USA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco, USA) em microplacas estéreis de 96 orifícios de fundo plano, próprias para cultura celular. Foram feitas diluições duplas e seriadas dos soros a partir de 1: 4 a 1: 512. Soros com atividade neutralizante em diluições maiores a 512, foram testados até a diluição 1: 4096. Controles positivos (soro conhecido com atividade neutralizante contra CMV previamente testado) e controles negativos (soro negativo sem atividade neutralizante contra CMV previamente testado) foram utilizados em todos os ensaios. Em seguida, 60 uL de suspensão viral contendo 800 PFU do vírus (CMV cepa AD169 ou da cepa isolada) e 5 uL de soro de cobaia foram adicionados em todos os orifícios, exceto no controle de células (contendo somente meio de cultura). Após 1 hora de incubação a 37°C em estufa de CO₂ 5%, 150 uL de suspensão de células (4 x 10⁴ células/orifício) foram adicionadas. Após 72 horas de incubação, foi feita a leitura visual da microplaca em microscópio invertido (Zeiss, Alemanha) e o título de atividade neutralizante foi definido como a mais alta diluição do soro que conseguiu inibir de 80 a 100% do efeito citopático característico do CMV (EC), ou seja, ausência completa ou até 20% de EC em monocamadas, quando comparada com 100% de EC nos orifícios contendo somente células e o vírus, como mostra a Figura 1. Todos os soros foram realizados em duplicata, sendo o

resultado definido quando as duplicatas de cada soro tiveram resultados concordantes.

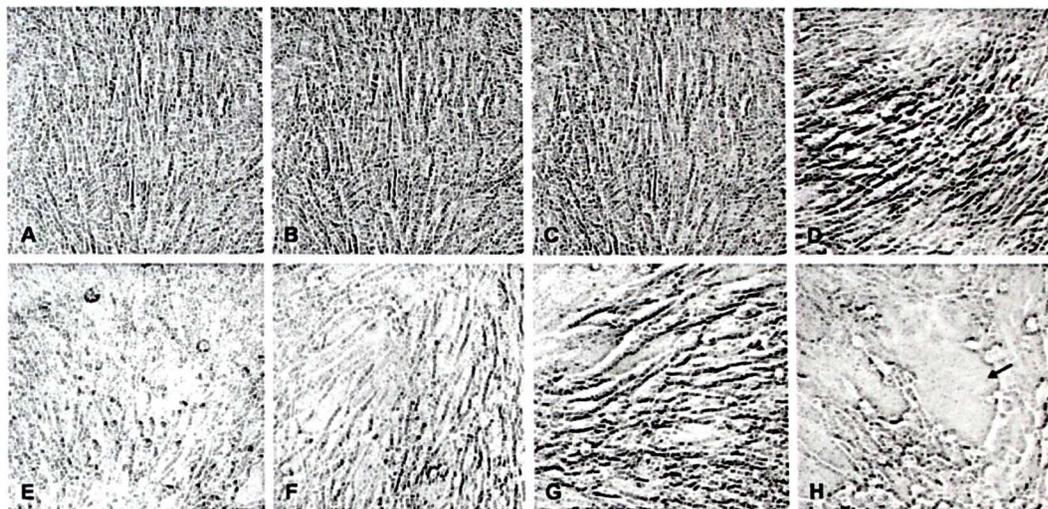


Figura 1: Teste de microneutralização viral para CMV. Ausência do efeito citopático com total neutralização do vírus nas diluições do soro (a) 1: 4, (b) 1: 8, (c) 1:16 (d) 1: 32. Presença de 10 a 20% efeito citopático pela monocamada nas diluições 1: 64 (e); 1: 128 (f). Presença de mais que 20% de efeito citopático na diluição 1: 256 (g) e 100% de efeito citopático na diluição 1: 512 (h).

Na avaliação do incremento dos títulos de anticorpos neutralizantes, considerou-se significativo quando ocorreu uma elevação nos títulos de pelo menos quatro vezes comparado ao título inicial de cada soro.

4.2.7. Reação de Amplificação Gênica em cadeia pela Polimerase qualitativa:

Nested-PCR

As amostras de leite das mães transmissoras e não transmissoras foram inicialmente analisadas pela PCR de duas etapas (YAMAMOTO et al., 2001). Na primeira etapa foram utilizados os iniciadores que amplificam uma região do gene codificador do antígeno precoce imediato (IE1), sendo os externos MIE-4 e MIE-5 (DEMMLER et al., 1998). A mistura da reação consistiu de uma solução

tampão 50mM de KCl e 20mM de Tris HCl, com pH 8,5; 1,5 mM de MgCl₂; 150µM de cada um dos trifosfatos de desoxinucleotídeos, 15 picomoles de cada um dos iniciadores; 1U de Taq DNA-polimerase (Invitrogen Life Technologies-EUA) e 5µL do DNA com volume final de 50 µL. A mistura da reação foi submetida a um ciclo de 94°C por 2 minutos, 55°C por 90 segundos e 72°C por 2 minutos, seguido por 34 ciclos de 94°C por 60 segundos, 55°C por 90 segundos e 72°C a 120 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Uma alíquota de 1µL do produto amplificado da primeira etapa foi submetida a uma segunda reação com os iniciadores internos IE-1 e IE-2 (NOGUEIRA et al., 2000). A mistura da reação foi submetida a 30 ciclos de 94°C por 60 segundos, 55°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos seguido, de extensão adicional de 72°C por 3 minutos.

Para a visualização das bandas correspondentes dos produtos amplificados, 10 µL do produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio 0,5µg/mL. A eletroforese foi efetuada a 150 V, por 45 minutos, em tampão TBE (Tris 0,089 M, Borato 0,089 M, EDTA 0,01M pH 7,5). Posteriormente, os géis foram visualizados à luz ultravioleta e fotografados em sistema *Polaroid*.

Tabela 2: Sequência de iniciadores utilizados na PCR qualitativa e quantitativa em tempo real para o CMV.

<i>Primer</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Tamanho do produto em pares de bases (pb)</i>
MIE-4	5' CAGCACCATCCTCCTCTCCTCTGG 3'	435
MIE-5	5' CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAGCC 3'	
IE-1	5' CCACCCGTGGTGCCAGCTCC 3'	159
IE-2	5' CCCGCTCCTCCTGAGCACCC 3'	
gB-1319	5' TGGAAGTGGAAACGTTTGGC 3'	256
gB-1604	5' GAAACGCGCGCAATCGG 3'	
gBn1	5'GCGCCGTTGATCCACACACC3'	95
gBn2	5'TACGCCAGCTGCAGTTCAC3'	

4.2.8. Reação de Amplificação Gênica pela Polimerase quantitativa em tempo real

As amostras de leite positivas pela técnica de PCR qualitativa foram submetidas a PCR quantitativa em tempo real baseada no uso do corante fluorescente SYBR Green I, utilizando o termociclador Rotor-gene versão 6.0, (Corbett, Austrália). Na reação da PCR utilizou-se 10 µL da mistura Sybr Green I (Abgene, Advanced Biotechnologies Ltda, USA), 0,5 µM dos iniciadores gB-1319 e gB-1604 (CHOU; DENNISON, 1991) e 2µL do DNA viral extraído da amostra de leite. A mistura de reação foi submetida a uma ativação inicial da Taq polimerase a 95°C por 15 minutos, seguida por 45 ciclos de desnaturação a 95°C a 20 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e desnaturação a 72°C por 30 segundos. Após o término da PCR, a temperatura foi diminuída para 65°C e em seguida gradualmente aumentada para 95°C (0,2°C/seg). A

fluorescência foi continuamente monitorizada durante o processo de análise da curva de *melting* ou de dissociação.

Para a quantificação gênica do CMV, foi construída uma curva padrão a partir dos valores do CT de cada amostra, ou seja, o número de ciclos de PCR requeridos para gerar fluorescência suficiente para alcançar o nível onde a taxa de amplificação é a maior durante a fase exponencial. Estes valores foram obtidos com as diluições decimais seriadas (10^{-3} a 10^{-9}), correspondendo a respectivamente $1,7 \times 10$ a $1,7 \times 10^7$ cópias/ μl do DNA de plasmídios contendo o inserto de parte do gene codificador da glicoproteína B do CMV, previamente quantificados (MARIN et al., 2001). O mínimo de $1,7 \times 10$ cópias/ μl do DNA plasmídial foi detectado neste ensaio quantitativo, como mostram as Figuras 2 e 3.

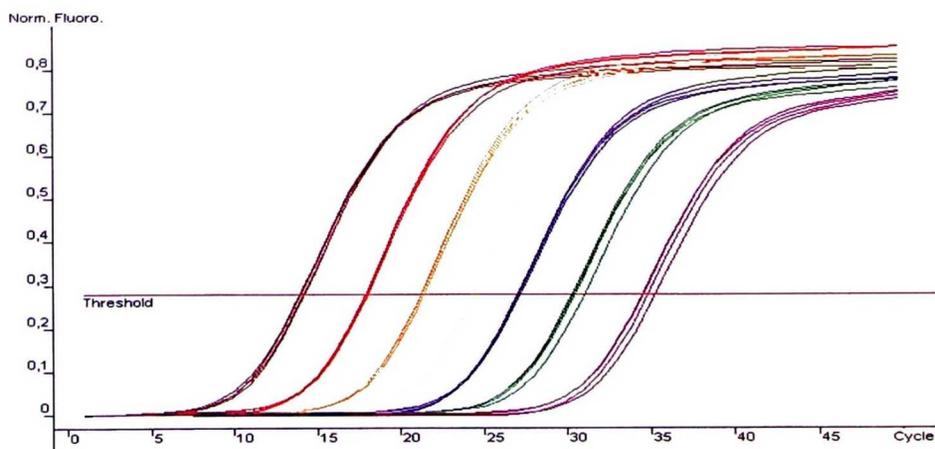


Figura 2: Curvas de monitoramento de fluorescência da amplificação em tempo real *versus* valores do CT (número de ciclos de PCR requeridos para cada amostra para atingir o limiar onde a taxa de amplificação é a maior durante a fase exponencial. Quadruplicatas das diluições de plasmídios (10^{-3} a 10^{-9}).

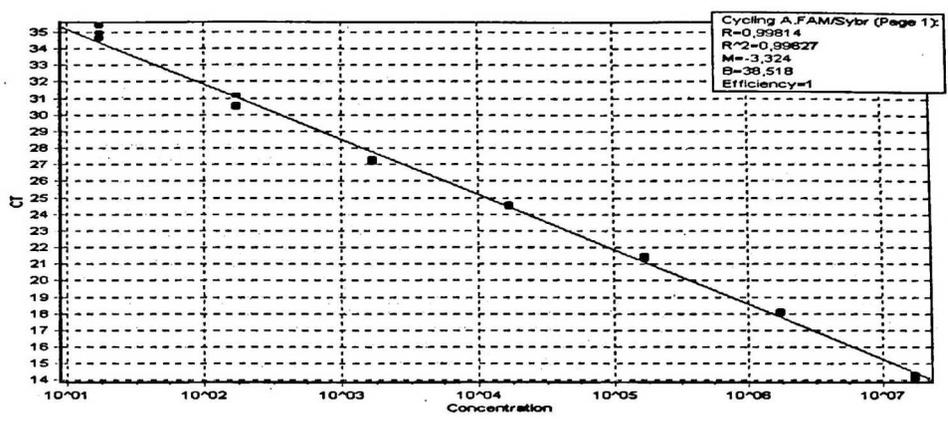


Figura 3: Curva padrão obtida a partir de diluições decimais seriadas do lote de plasmídeos clonados com inserto de parte do gene codificador da glicoproteína B do CMV ($1,7 \times 10^1$ a $1,7 \times 10^7$ cópias/ μ l).

O pico de *melting* ou de dissociação de 88,5°C foi obtida com todas as diluições dos plasmídios, como mostra a Figura 4. A especificidade dos produtos amplificados a partir de DNA extraído da fração do leite materno foi realizada pela análise do pico de *melting*. A amostra foi considerada positiva quando o pico de *melting* foi obtido na temperatura de 87,8 a 88,5°C (Figura 5) e a presença de uma banda correspondente em gel de agarose foi observada em todas as amostras positivas.

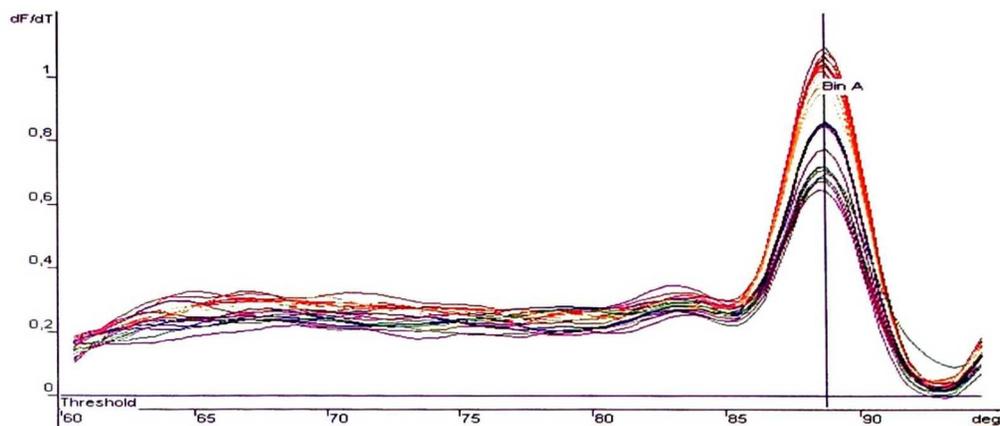


Figura 4: Determinação do pico de *melting* ou de dissociação de 88,5°C com as diluições decimais seriadas (10^{-3} a 10^{-9}) dos plasmídios com inserto de parte do gene codificador da glicoproteína B do CMV.

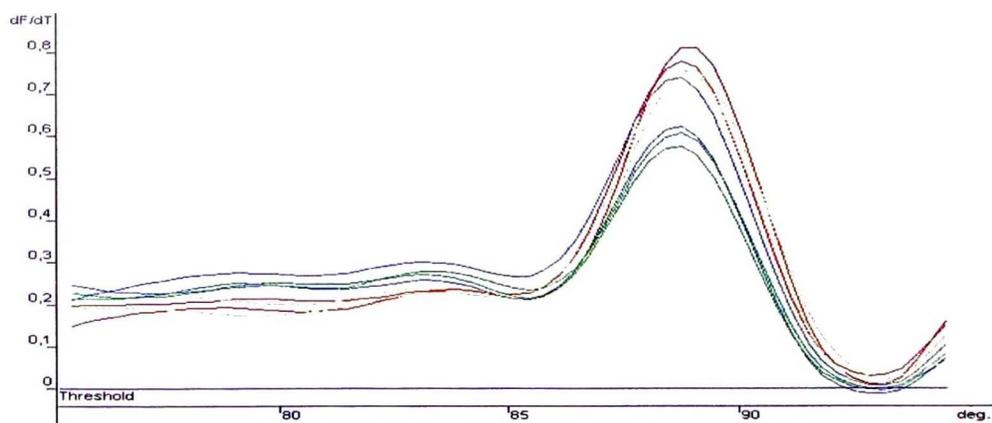


Figura 5: Análise do pico de *melting* para determinação da especificidade dos produtos amplificados a partir de DNA extraído da fração do leite materno de 4 amostras, em duplicata. A amostra foi considerada positiva quando o pico de *melting* foi obtido na temperatura de 87,5 a 88,5°C.

4.3. Análise Estatística

Elaborou-se um banco de dados no programa Epi Info (Centers for Disease Control and Prevention, 2004), que também foi utilizado para análise estatística. A comparação das diferenças entre as médias geométricas dos anticorpos neutralizantes e dos logaritmos das cargas virais obtidas no leite

foi feita pelo teste t de Student e teste de Mann-Whitney, quando indicado.

Assumiu-se o nível de significância $\alpha= 5\%$ em todos os testes.

5. RESULTADOS

5.1. Características sócio-demográficas de 47 mães transmissoras e 94 não transmissoras.

Dentre as mães transmissoras, a mediana da idade foi de 20 anos (variação de 14 a 41) e dentre as não transmissoras foi de 22 anos (variação de 15-39). Em relação à mediana da escolaridade (anos de escola), dentre as transmissoras e não transmissoras foi de oito anos, com variação de 1 a 13 anos e 0 a 15 anos, respectivamente. Quanto à paridade, dentre as transmissoras 21 (45%) eram primíparas e 26 (55%) eram multíparas. Entre as mães não transmissoras 44 (48%) eram primíparas e 47 (52%) eram multíparas. Realizaram o pré-natal, 26 (54%) das mães transmissoras e 42 (46%) das não transmissoras. Os aspectos sócio-demográficos maternos estão apresentados nos Anexos 3 e 4.

5.2. Definição do estado sorológico materno

Foram obtidas amostras de soro do pré-natal de 26 das 47 mães transmissoras (55%) e 47 das 94 não transmissoras (50%), coletadas no início da atual gestação (mediana de 13 semanas). Todas as 26 mães transmissoras e as 47 mães não transmissoras apresentavam anticorpos da classe IgG específicos contra CMV, sugerindo a ocorrência de uma provável infecção recorrente materna (STAGNO et al., 1982; FOWLER et al., 1992).

Foram obtidas amostras de soro do parto de 47 mães transmissoras das 49 e de todas as 94 não transmissoras. Todas as 47 mães transmissoras e 94 não

transmissoras apresentavam anticorpos específicos contra o CMV no momento do parto.

Os dados sorológicos da pesquisa de anticorpos IgG anti-CMV maternos pelo teste imunoenzimático ELISA estão apresentados nos Anexos 5 e 6.

5.3. Anticorpos neutralizantes contra a cepa AD169 do CMV de amostras séricas obtidas no início da gestação de mães transmissoras e não transmissoras da infecção congênita.

A verificação da atividade neutralizante de anticorpos de amostras séricas maternas obtidas no início da gestação (mediana de 13 semanas) contra a cepa AD169, foi verificada em todas as 26 mães transmissoras que tinham amostras de soro disponíveis no início da gestação.

Dentre as 47 mães não transmissoras que tinham amostras disponíveis no início da gestação, a verificação da atividade neutralizante foi verificada em 27 destas mães; em outras 20, os soros foram testados mas por limitações técnicas (destruição da monocamada de células ou por contaminação bacteriana ou por fungos), a leitura do teste não foi conclusiva. A quantidade de soros destas mães foi insuficiente para repetir o teste de neutralização, em duplicata.

A média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes das mães transmissoras foi de 87,15 (mediana = 128), variação de 4 a 128 e em mães não transmissoras foi de 141,80 (mediana= 128), variação de 32 a 256. Uma proporção maior de mães com títulos maiores que 128 foi observado entre as transmissoras da infecção congênita comparado às não transmissoras, sendo a diferença das médias geométricas estatisticamente significativa ($p=0,02$), como

mostra a Figura 1. Títulos de anticorpos neutralizantes maiores a 128 foram observados em 5 (19%) de mães transmissoras e em 12 (44%) de mães não transmissoras. Os resultados da determinação da atividade neutralizante de cada soro das mães T e NT estão apresentados nos Anexos 7 e 8.

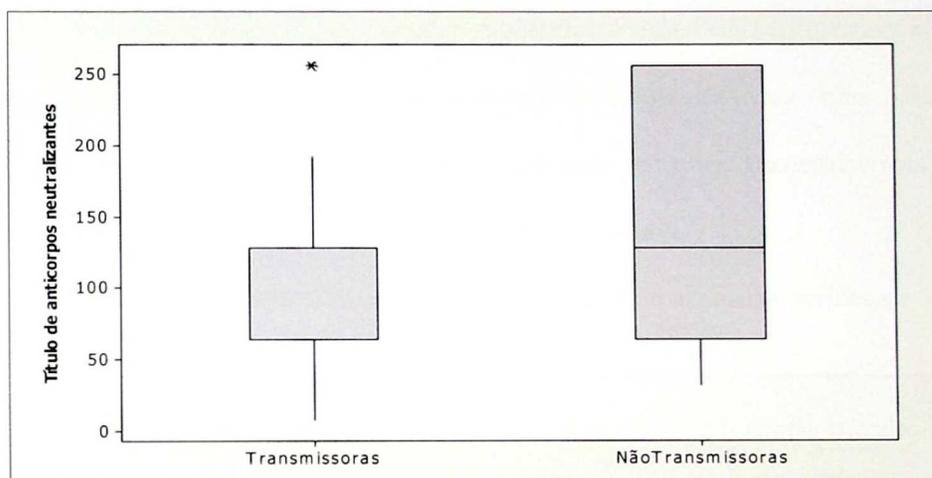


Figura 6: Comparação dos títulos de anticorpos neutralizantes contra a cepa AD169 do CMV em mães transmissoras e não transmissoras no início da gestação.

5.4. Anticorpos neutralizantes contra o CMV (cepa AD169) de amostras séricas obtidas no parto em mães transmissoras e não transmissoras da infecção congênita.

A determinação da atividade neutralizante dos anticorpos maternos de soros obtidos no momento do parto contra a cepa AD169 foi realizada em 47 mães transmissoras e em 91 mães não transmissoras (dentre as 94 mães não transmissoras uma teve resultado negativo, apesar da presença de anticorpos IgG anti-CMV por ELISA e duas mães não tinham amostras de soros suficientes para a realização do teste de neutralização). Nenhuma mãe transmissora e três

mães não transmissoras apresentavam títulos de anticorpos iguais a 1024; oito (17%) das transmissoras e 12(13%) das não transmissoras tiveram títulos iguais a 512 e 30 (64%) das transmissoras e 67 (73%) das não transmissoras apresentavam títulos iguais a 256. Embora títulos maiores ou iguais a 256 tenham sido observados em proporções maiores de mães não transmissoras, a média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes não diferiu significativamente entre as mães transmissoras e não transmissoras no momento do parto ($p=0,16$), conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Atividade neutralizante contra a cepa AD169 de amostras séricas de mães transmissoras e não transmissoras obtidas no momento do parto.

	Media geométrica \pm dp	Mediana (variação)
Mães Transmissoras n= 47	193,44 \pm 146,13	256 (32-512)
Mães Não Transmissoras n= 91	244,56 \pm 183,08	256(16-1024)
Valor de p	$p= 0,16$	

5.5.Verificação do incremento dos títulos de anticorpos neutralizantes contra a cepa AD169 de amostras séricas de 26 mães transmissoras e 26 não transmissoras obtidas no início da gestação e no momento do parto.

Observou-se um incremento significativo nos títulos de anticorpos neutralizantes de amostras séricas obtidas no início da gestação e no momento do parto tanto no grupo de 26 mães transmissoras e 26 não transmissoras (a quantidade de soro obtida no momento do parto de uma mãe não transmissora

não era suficiente para realização do teste de neutralização), como mostra a Tabela 4.

Tabela 4: Comparação dos títulos dos anticorpos neutralizantes contra a cepa AD169 dos soros de mães transmissoras e não transmissoras durante a gestação (no início da gestação e no momento do parto).

	Pré- parto	Parto	<i>p</i>
Mães Transmissoras (n= 26)	87 ± 76	263 ± 133	<0,01
Mães não transmissoras (n= 26)	135± 93	218 ± 123	0,016

Entretanto, o incremento destes títulos foi significativamente maior no grupo das mães que transmitiram a infecção aos seus filhos, ou seja, a diferença entre as médias dos títulos dos anticorpos neutralizantes obtidas no início da gestação e no momento do parto no grupo das mães transmissoras foi de 176 *vs* 83 em não transmissoras ($p= 0,019$).

5.6. Determinação dos títulos dos anticorpos neutralizantes de amostras séricas de mães transmissoras no início da gestação e no momento do parto contra a cepa isolada de seus respectivos recém-nascidos.

A determinação dos títulos de anticorpos neutralizantes em mães transmissoras contra as cepas do CMV isoladas de seus respectivos filhos foi realizada em 14 pares mãe-filhos no momento do parto. Destas mães, apenas sete tinham amostras obtidas no início da gestação. A não verificação da atividade neutralizante contra as cepas isoladas de seus filhos em outros casos foi decorrente da não obtenção de quantidades suficientes de vírus nos isolados, como descrito em Métodos laboratoriais.

No início da gestação, a média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes contra as cepas de seus respectivos filhos nos sete pares mães-filhos foi de 72 (32 a 256), não diferindo da média obtida contra a cepa laboratorial AD169 que foi de 90,5 (64 a 128); ($p=0,66$).

No momento do parto, a média geométrica dos títulos de anticorpos neutralizantes contra as cepas de seus respectivos filhos nos 14 pares mães-filhos foi de 161, 3 (32 a 512) e contra a cepa AD169 foi de 228 (32 a 512) ($p=0,35$).

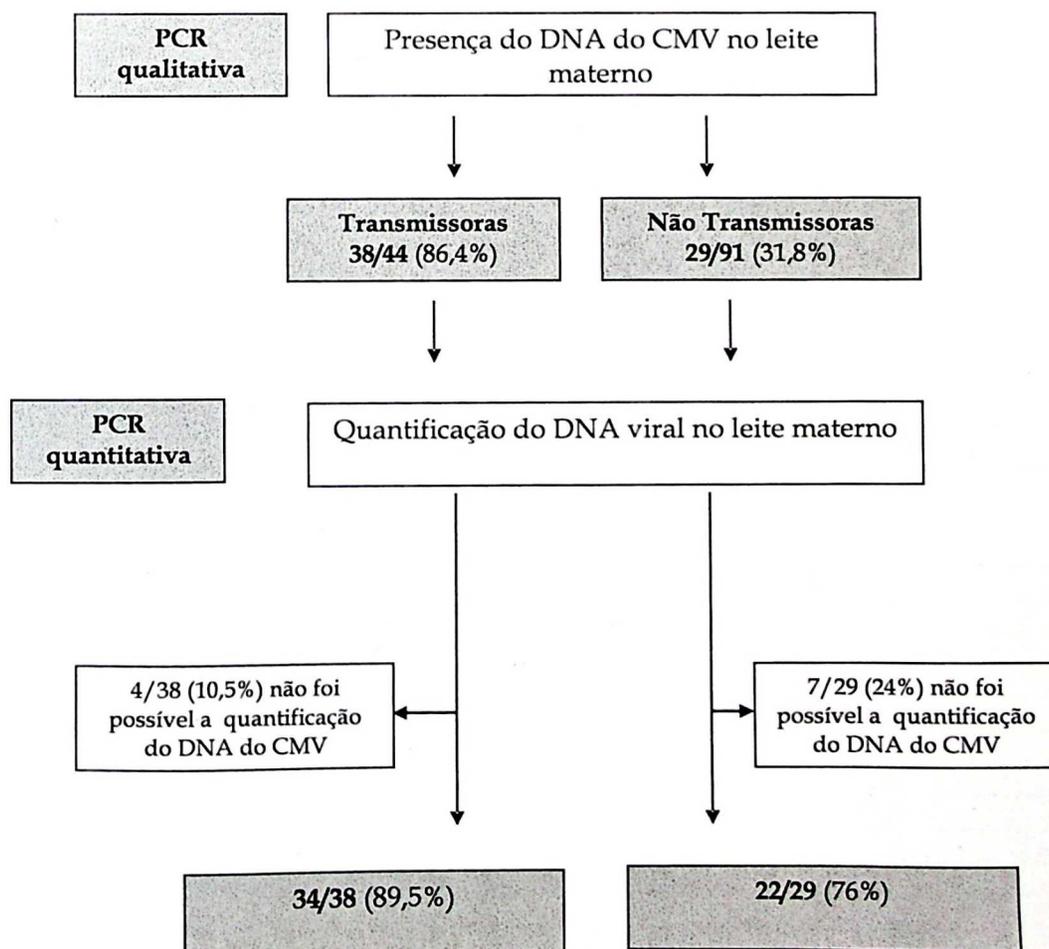
Tabela 5: Títulos da atividade neutralizante dos anticorpos, contra as cepas AD169 e isolados clínicos de seus respectivos filhos, em amostras séricas de mães transmissoras, no início da gestação e no momento do parto.

N° no projeto	Período Gestacional			
	Pré-parto		Parto	
	Isolado Clínico	AD 169	Isolado Clínico	AD 169
609	256	128	256	256
M 74	32	64	256	512
M 339	32	128	64	256
M 1106	32	32	32	32
M 1115	128	128	512	512
M 1271	128	128	256	256
533			128	256
798			128	256
1195			128	128
1468			128	32
1727			64	64
2226			256	128
2244			256	512
2593			256	256

5.7. Quantificação do DNA do CMV no leite de mães transmissoras e não transmissoras da infecção congênita pelo CMV.

A presença do DNA do CMV pela PCR qualitativa foi detectado em 38 /44 (86,4%) mães transmissoras (3 mães não tinham amostras de leite) e em 29/91 (31,8%) mães não transmissoras ($p<0,001$). A quantificação da carga viral não pode ser determinada em 4/38 (10,5%) amostras de mães transmissoras e em 7/29 (24%) de mães não transmissoras. O fluxograma 2 mostra um esquema dos resultados obtidos na detecção qualitativa e quantitativa do DNA do CMV de leite materno de mães transmissoras e não transmissoras.

Fluxograma 2.



A carga viral do CMV no leite foi significativamente maior em mães transmissoras comparado às mães não transmissoras que tiveram o DNA do CMV quantificado no leite, sendo a média geométrica do número de cópias de DNA/ μl de leite = $2,37 \times 10^2$ (variação de $2,6 \times 10$ a $2,31 \times 10^3$) e $5,1 \times 10$ (variação de $1,2 \times 10$ a $3,43 \times 10^2$) cópias/ μl de leite, respectivamente; $p=0,004$), como mostrado nas Tabelas 6 e 7 e na Figura 7.

Tabela 6. Detecção e quantificação do DNA do CMV na fração do soro do leite de mães transmissoras: determinação do pico de *melting* e número de cópias de DNA/ μl de leite.

Mães	Cópias de DNA/ μl	Pico de <i>melting</i>
59	56,6	87,8
164	80,2	87,8
183	215,1	87,5
187	84,5	88
511	604	88,2
513	375,2	87,5
533	93,5	88,5
609	35	88
853	45,3	87,8
1016	61,5	88,2
1063	470,7	88
1150	732,8	88
1175	133,4	87,7
1254	2307,2	88
1468	90,5	87,8
M72	64,6	88
M74	351,9	87,5
M206	2576,4	88,2
1749	932,4	87,8
M339	258,6	88,3
M457	438,5	88
M781	97,9	87,8
M804	274,7	88
2244	609,9	88
2292	70,4	88
M981	60,4	87,5
2367	927,2	87,8
M1106	1124	87,8
M1115	615,1	87,5
2519	161,6	88

M1271	476,4	88
2593	26,2	88,2
M1467	688,6	87,8
2761	636,3	88

Tabela 7. Detecção e quantificação do DNA do CMV na fração do soro do leite de mães não transmissoras: determinação do pico de *melting* e número de cópias de DNA/ μ l de leite.

Mães	Cópias de DNA/ μ l	Pico de <i>melting</i>
188	12,9	88
174	56,7	87,5
502	44	88,2
516	22,9	88,3
506	46	88,7
512	83,8	88
808	48,1	88
1023	343,5	88
1249	83,4	87,7
M100	17,7	88
M113	13,4	87,5
M102	78,3	87,8
M843	73,3	88
1717	86	87,8
M484	133,1	88,5
M686	11,6	88,5
M806	31,3	87,5
2228	32,7	87,5
2300	213,3	87,5
M985	18,1	87,8
2513	45,5	88
M1573	87,8	87,8

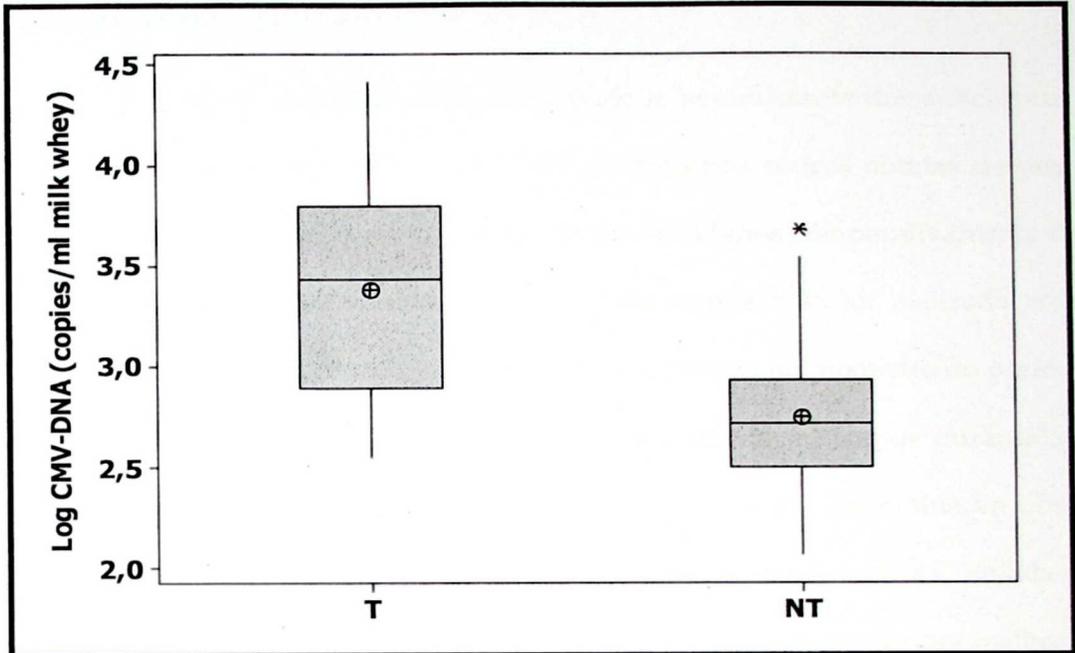


Figura 7: Quantificação do DNA do CMV no leite materno obtida nas primeiras duas semanas pós-parto (mediana=3 dias) de mães transmissoras e não transmissoras da infecção congênita ($p=0,001$).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se a atividade neutralizante dos anticorpos específicos contra a cepa AD169 do CMV de amostras séricas obtidas de um grupo de mães que transmitiram a infecção aos seus filhos comparativamente a um grupo de mães que não transmitiram. Esta comparação foi realizada em dois períodos, sendo uma no início da gestação e o outro no momento do parto, estudando-se a cinética da resposta da atividade destes anticorpos durante a gestação em cada grupo. Baseado no pressuposto de que a determinação dos anticorpos neutralizantes de soros maternos contra as cepas do CMV isoladas de seus respectivos filhos com infecção congênita poderá mostrar uma melhor correlação do papel protetor da imunidade materna do que a quantificação destes anticorpos contra a cepa laboratorial AD169, avaliou-se também a resposta dos anticorpos neutralizantes contra as cepas isoladas de seus respectivos filhos em mães transmissoras. Adicionalmente, verificou-se a detecção do DNA do CMV no grupo de mães transmissoras e não transmissoras no leite, considerado o melhor sítio de excreção viral após o parto, buscando-se uma associação com a transmissão da infecção congênita, uma vez que a carga viral do CMV em alguns fluidos corporais maternos de fácil obtenção, tais como o leite pode refletir a ocorrência de replicação viral em outros sítios ocultos de difícil acesso, mas que contribuem para a propagação do CMV ao feto.

O achado mais importante deste estudo foi a associação dos níveis de anticorpos neutralizantes com a transmissão da infecção congênita. Observou-

se que mães transmissoras apresentavam níveis menores de anticorpos neutralizantes no início da gestação comparado às mães que não transmitiram o CMV ao feto durante a gestação, ou seja, altos títulos de anticorpos neutralizantes, mais comumente observados dentre as não transmissoras limitam a ocorrência de infecção congênita. Embora os títulos protetores de anticorpos neutralizantes não sejam conhecidos (ADLER et al., 1995), este achado implica que a atividade neutralizante tem papel protetor na ocorrência da transmissão do CMV ao feto durante a gestação como demonstrado em estudo prévio por BOPANA; BRITT, 1995, sendo este conhecimento crucial no estudo de desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes na prevenção desta infecção.

Existem algumas hipóteses para o achado de níveis menores de atividade neutralizante em algumas mulheres imunocompetentes e predominantemente jovens como as mães participantes deste estudo. Uma delas seria uma demora na aquisição da maturação destes anticorpos como consequência de uma alteração na resposta dos linfócitos T. Para a maturação dos anticorpos, ocorre uma mutação somática nos genes responsáveis pela expressão da região variável das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas, seguido por uma seleção de linfócitos B produtores de anticorpos de alta afinidade (FRENCH; LASKOV; SCHAFF, 1989). Portanto, os processos de hipermutação somática e produção de anticorpos de alta afinidade são dependentes da resposta linfócitos dos T (SIEKEVITZ et al., 1987). Desta maneira, a persistência ou repetidas estimulações de antígenos protéicos dependentes de célula T aumentam o

número de mutações dos genes das imunoglobulinas, gerando anticorpos com alta afinidade (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). Uma alteração no processo de maturação da afinidade dos anticorpos, como algumas hipermutações dos genes das imunoglobulinas podem resultar em um declínio ou perda de ligação ao antígeno ou mesmo anormalidades no mecanismo imunológico celular, possivelmente uma alteração na resposta das células T auxiliadora que são essenciais para a maturação da resposta de anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Uma consequência desta maturação dos anticorpos resulta em maior capacidade de neutralização viral que pode ser demonstrada *in vitro* pela determinação dos índices de avidéz de anticorpos e *in vivo* pela maior proteção contra a infecção e a disseminação do CMV (BLANK; LESLIE; CLEM, 1972). A correlação entre a avidéz de anticorpos e atividade neutralizante viral foi evidenciada em gestantes com infecção primária pelo CMV; as mães transmissoras da infecção congênita pelo CMV apresentavam anticorpos de baixa avidéz e menores títulos de anticorpos neutralizantes, quando comparadas àquelas que não transmitiram a infecção (BOPPANA; BRITT, 1995). Estes pesquisadores sugerem que a transmissão intrauterina do CMV não está relacionada ao déficit de anticorpos, mas sim à afinidade dos anticorpos e à capacidade de neutralização. Em outro estudo utilizando espécimes de biópsias de placentas humanas observou-se associação da relação entre infecção ativa do CMV e baixos títulos de anticorpos neutralizantes (PEREIRA et al., 2003).

Uma segunda explicação relacionada à demora na aquisição da maturação dos anticorpos contra o CMV, pode ser atribuída aos mecanismos de evasão imunológica do vírus, em particular à não apresentação de antígenos na superfície das células infectadas, pois o CMV infecta preferencialmente tecidos que expressam um menor número de moléculas de MHC da classe I e expressão de proteínas virais. Como consequência, não ocorreria a lise pelas células CD8+ e a produção de anticorpos policlonais (HENGEL; BRUNE; KOSZINOWSKI, 1998). Em 2004, STEINNINGER et al. realizaram da maturação de anticorpos e ocorrência de viremia em pacientes imunocompetentes e transplantados renais que tiveram infecção primária pelo CMV. Nesta comparação observaram que a aquisição da maturação dos anticorpos contra o CMV em pacientes imunocompetentes ocorreu em média três a cinco meses após a infecção primária e nos pacientes transplantados ocorreu em um período superior a 48 meses. Os autores atribuem esta demora na maturação dos anticorpos contra o CMV aos mecanismos de evasão imunológica deste vírus uma vez que o tempo de aquisição desta maturação foi superior ao observado com o vírus da rubéola e Epstein-Barr vírus (EBV), que ocorre geralmente em um a três meses após a infecção primária (HEDMAN; ROUSSEAU, 1989).

Uma terceira hipótese para explicar os menores níveis de atividade neutralizante em mães transmissoras refere-se à época de aquisição da infecção primária. Em geral, as mães participantes deste estudo eram predominantemente jovens, tanto no grupo das transmissoras como das não transmissoras. No entanto, é possível que a primo-infecção pelo CMV tenha

ocorrido mais recentemente nas transmissoras. A idade materna já foi relatada em estudos prévios como fator de risco de infecção congênita pela maior probabilidade de ocorrência de infecção recente em mães mais jovens (STAGNO, 1977; MONTGOMERY et al., 1980). A evidência de que o risco de ocorrência de infecção congênita é maior quando a infecção primária materna ocorre próximo da concepção foi sugerido recentemente por FOWLER; STAGNO; PASS, 2004. Neste estudo, mães que tiveram uma nova gestação no período menor de dois anos após a primo-infecção pelo CMV apresentaram maiores chances de transmitirem a infecção aos seus filhos comparado àquelas mães que tiveram uma nova gestação em um período superior a este período.

O segundo momento da avaliação dos níveis de anticorpos neutralizantes maternos neste estudo ocorreu no período imediatamente após o parto. Ao contrário do observado no início da gestação, a média geométrica destes anticorpos não diferiu entre as mães transmissoras e não transmissoras. Observou-se um aumento, em pelo menos quatro vezes dos títulos dos anticorpos maternos do início da gestação, em comparação aos títulos obtidos no momento do parto nos dois grupos, sugerindo a ocorrência de infecção ativa pelo CMV nos dois grupos. Considerando que todas as mães transmissoras e não transmissoras que tinham amostras de soro disponíveis no início da gestação eram soropositivas na ocasião, a replicação do CMV provavelmente ocorreu em sítios de latência por reativação viral. Este provável evento é reforçado pela observação de que esta elevação, na maioria das mães, não excedeu mais que duas vezes o título obtido no início da gestação. A

estimulação antigênica para produção dos anticorpos neutralizantes geralmente é maior na infecção primária pela replicação viral no sangue que está presente nos primeiros meses (REVELLO et al., 1998). Segundo, BOPPANA; BRITT, (1995), os títulos de anticorpos neutralizantes em mães que tiveram infecção primária durante a gestação, geralmente são maiores ou iguais a 400, quando avaliadas no momento do parto. Considerando que um provável mecanismo da transmissão intra-útero na infecção recorrente materna seria a replicação viral localizada em sítios próximos ao miométrio sem a ocorrência de viremia (FISHER et al., 2000), na reativação viral a elevação dos anticorpos neutralizantes seria menor .

Entretanto, o incremento, ou seja, a elevação dos níveis destes anticorpos durante a gestação foi significativamente maior em mães que transmitiram a infecção aos seus filhos. A replicação do CMV provavelmente foi mais intensa nas mães que tiveram filhos infectados uma vez que apresentavam menores níveis de anticorpos neutralizantes no início da gestação, conferindo pouca proteção contra a transmissão do CMV ao feto. Ao contrário, nas não transmissoras que apresentavam níveis mais elevados, a replicação viral provavelmente foi menos intensa. O grau de replicação viral também pode ser responsável pelo achado de níveis similares dos anticorpos neutralizantes no momento do parto nos dois grupos. Considerando que as mães não transmissoras tinham níveis mais elevados de anticorpos neutralizantes no início da gestação e tiveram menor estímulo antigênico, pode-se supor que conseqüentemente a elevação destes anticorpos seria menor

comparado às não transmissoras. Reforçando estes achados, TANAKA et al., (1991), que estudaram a cinética dos anticorpos neutralizantes em gestantes soropositivas ao CMV durante a gestação, verificaram que aquelas que apresentavam baixos títulos no primeiro trimestre, tiveram aumento significativo no final do terceiro trimestre. Por outro lado, em gestantes com altos títulos de anticorpos neutralizantes no início da gestação, este aumento não ocorreu de maneira significativa. Os autores sugerem que a cinética da resposta dos anticorpos neutralizantes observada nestas gestantes foi em decorrência da reativação do vírus endógeno e que os anticorpos neutralizantes devem contribuir na prevenção da transmissão intrauterina.

Da mesma maneira que o estudo de SCHOPPEL et al., 1998, que demonstraram o papel dos anticorpos neutralizantes no controle da disseminação do CMV e conseqüente proteção no desenvolvimento de doença em pacientes transplantados de medula óssea, é provável que exista uma associação entre os títulos de anticorpos neutralizantes em gestantes e transmissão da infecção congênita.

Recentemente, tem sido questionada a contribuição da reinfecção com novas cepas virais em mães com imunidade prévia na transmissão intrauterina do CMV. Embora as dificuldades técnicas relacionadas ao cultivo do CMV a partir de isolados clínicos tenham limitado a obtenção de títulos virais suficientes para os ensaios de microneutralização, no presente estudo, observou-se que a resposta dos anticorpos neutralizantes de amostras séricas de mães transmissoras contra a cepa isolada de seus filhos e contra a cepa

laboratorial AD169 foi similar no início da gestação e no momento do parto. Estes achados foram concordantes com os obtidos por WEBER et al., (1993) verificando que os níveis de anticorpos neutralizantes contra a cepa AD169 em um grupo de transplantados renais que tiveram infecção primária foram similares aos encontrados contra as suas respectivas cepas isoladas. A heterogeneidade das diferentes cepas do CMV poderia ser a maior razão para uma falha na detecção dos anticorpos neutralizantes usando cepas laboratoriais de referência, uma vez que desde 1960, em estudo realizado por WELLER et al., 1957, demonstrou-se que a maior atividade neutralizante ocorre contra a cepa do CMV responsável pela infecção. Desta maneira, os resultados deste estudo mostram que a despeito da existência de diferentes cepas do CMV, os testes de neutralização usando a cepa AD169, permitem uma avaliação quantitativa e real de anticorpos neutralizantes contra o CMV.

Outros estudos mostraram que a capacidade neutralizante dos soros humanos contra cepas heterólogas (novas cepas) do CMV é diferente da capacidade neutralizante contra cepas homólogas (reativação de infecção latente) (GRUNDY et al., 1988; KLEIN et al., 1999). Um estudo em gestantes com imunidade prévia mostrou que aquelas mães que tiveram reinfecção com uma nova cepa do CMV, a atividade neutralizante contra a cepa AD169 não apresentou diferença significativa no início da gestação e no momento do parto. Entretanto, quando a atividade neutralizante foi analisada contra a cepa isolada de seus respectivos filhos observou-se uma elevação significativa (BOPPANA et al., 2001). Portanto, os achados deste estudo mostram que existe uma associação

entre a resposta humoral materna e ocorrência ou não de infecção congênita a exemplo de diversas linhas de evidências experimentais que têm sugerido que os anticorpos com atividade neutralizante contribuem na prevenção da disseminação viral (BOPPANA; PASS; BIRTT, 1993; JONGIC et al., 1994; BOPPANA; BRITT, 1995). Entretanto, ainda não é muito claro se a atividade neutralizante contra uma determinada cepa do CMV confere proteção contra reinfecções com novas cepas.

Além da resposta imunológica materna, caracterizada pela resposta dos anticorpos neutralizantes contra o CMV, um outro fator avaliado neste estudo que pode estar associada a um maior risco de transmissão da infecção congênita, foi estimar grau de replicação viral nestas mães através da quantificação do DNA do CMV no leite imediatamente após o parto, ou seja, no colostro. Este fluido corporal foi escolhido pela alta probabilidade de detecção do CMV no período pós-parto (VOCKEN et al., 1998; HAMPRECHT et al., 2001), embora os estudos de transmissão do CMV na infecção perinatal tenham mostrado que o CMV é raramente encontrado no colostro (NUMAZAKI, 1997; YASUDA et al., 2003). A exemplo do que ocorre na infecção congênita, o rim não é o órgão alvo de doença congênita no recém-nascido infectado, mas a quantidade de vírus excretado na urina reflete a infecção sistêmica; desta maneira, a virúria pode ser considerada um marcador de replicação viral em órgãos alvos tais como o cérebro e ouvido interno, que são menos acessíveis clinicamente para testes virológicos (GRIFFITHS et al., 1982).

Já está bem estabelecida a relação da virolactia com a infecção perinatal em diferentes estudos (VOCKEN et al., 1998; HAMPRECHT et al., 2001; MÉIER et al., 2005), confirmando-se que a maioria das mães soropositivas excretam o CMV no leite e que essa é a principal fonte de transmissão do vírus para o lactente após o parto. No entanto, de maneira geral, poucas mulheres soropositivas excretam o CMV no leite na primeira semana após o parto (YASUDA et al., 2003). Geralmente, o período de maior frequência de detecção da DNAlactia situa-se entre duas e seis semanas pós-natais (YASUDA et al., 2003; VOCKEN et al., 1988; HAMPRECHT et al., 2001, HAMPRECHT et al., 2003) quando a quantificação dessa fração atinge o pico máximo de 10^4 a 10^6 cópias/mL (YASUDA et al., 2003). Diferentemente, em nosso estudo, a alta frequência e o alto grau de replicação precoce, antes de duas semanas pós-natais, do CMV no leite, revelado por níveis de DNA viral tão elevados quanto 10^4 cópias/mL, em mães que transmitiram a infecção ao feto quando comparados àquelas que não transmitiram essa infecção, é achado inédito. Importante ressaltar que a detecção de DNA viral no soro lácteo tão precoce quanto aquela identificada neste estudo foi encontrada por HAMPRECHT et al., 2001. Estes autores mostram que a detecção precoce de DNAlactia bem como cargas virais altas do CMV no leite materno constituem fatores de risco materno para transmissão materna da infecção pós-natal do CMV de mulheres soropositivas ao CMV para recém-nascidos pré-termo enquanto as mulheres que não transmitiram a infecção pós-natal mostraram reativação viral tardia e carga de DNA viral baixa no leite. Os achados do presente estudo permitem

supor que a detecção precoce de DNA viral no leite materno seja, além de um indicador de replicação viral na glândula mamária, também indicador dessa replicação em outros sítios corporais envolvidos na transmissão intra-uterina, considerando células miometriais e macrófagos.

Existem evidências da importância da imunidade humoral contra o CMV, particularmente na transmissão materno-fetal (BOPPANA; BRITT, 1995) e em pacientes submetidos a transplante renal (SNYDMAN, 2001), bem como da relação inversa dos níveis de anticorpos neutralizantes com o grau de replicação sistêmica do CMV (ALBEROLA et al., 1998). O estudo da atividade neutralizante dos anticorpos específicos contra este vírus em indivíduos imunocompetentes como as gestantes com imunidade pré-existente e da determinação e quantificação da excreção ativa do CMV nessas mulheres, pode contribuir na compreensão das conseqüências da infecção pelo CMV durante a gestação, seja por reativação ou reinfecção com novas cepas, numa população com elevada taxa de soroprevalência.

7. CONCLUSÕES

7.1. Existe associação entre baixos títulos de anticorpos maternos neutralizantes contra o CMV no início da gestação e a transmissão da infecção congênita. Menores títulos de anticorpos neutralizantes foram encontrados em mães que transmitiram o CMV quando comparadas àquelas que não transmitiram.

7.2. Apesar da heterogeneidade do CMV, a atividade neutralizante contra a cepa AD169 permite uma avaliação real da resposta destes anticorpos às diferentes cepas do CMV. A resposta dos anticorpos neutralizantes maternos contra a cepa isolada de seus respectivos filhos não diferiu da resposta desses anticorpos contra a cepa AD169.

7.3. A elevação dos títulos dos anticorpos neutralizantes contra o CMV durante a gestação em gestantes soropositivas sugere a ocorrência da reativação viral em mães transmissoras e não transmissoras da infecção congênita. O incremento maior nos títulos dos anticorpos neutralizantes em mães transmissoras sugere a ocorrência de replicação do CMV mais intensa comparado às não transmissoras.

7.4. A detecção precoce e cargas elevadas do CMV no leite materno podem constituir fatores de risco para a transmissão intra-útero deste vírus e podem indicar o grau de replicação em outros sítios corporais envolvidos na transmissão da infecção congênita, como células miometriais e macrófagos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS A.; LICHTMAN A.; POBER J. B cell activation and antibody production
In: Cellular and Molecular Immunology 4th edition , W.B. Saunders
Company, 2000: chapter 09, p.182-231.
- ADLER S. P; STARR S. E; PLOTKIN S. A; HEMPFLING S. H; BUIS J.;
MANNING M. L.; BEST A. Immunity induced by primary human
cytomegalovirus infection protects against secondary infection among
women of childbearing age. J Infect Dis, v. 171, p. 26-32, 1995.
- AHLFORS K.; IVARSSON S. A.; HARRIS S. Report a long-tem study of
maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of
prospective studies available in the literature. Scand J. Infect Dis, v.31, nº
5, p.443-457, 1999.
- ALBEROLA J; DOMINGUEZ V.; CARDENOSO L; LOPEZ-ALDEQUER J.;
BLANES M.; ESTELLES F. Antibody response to human
cytomegalovirus (HCMV) glicoprotein B (gB) in AIDS patients with
HCMV end-organ disease. J Med Virol, v. 55, p. 272-280, 1998.
- ALBEROLA J; TAMARAT A.; IGUAL R.; NAVARRO D. Early neutralizing
and glicoprotein B (gB) specific antibody responses to human
cytomegalovirus (HCMV) in immunocompetent individuals with
distinct clinical presentations of primary HCMV infection. Journal
Clinical Virology, v.16, p.113-122, 2000.

- ALFORD C. A.; STAGNO S.; PASS R. F.; BRITT W. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis*, v. 12, p.745-752, 1990.
- ALFORD C. A.; HAYES K; BRITT W, Primary Cytomegalovirus infection in pregnancy: comparison of antibody responses to virus-encoded proteins between women with and without intrauterine infection. *J Infect Dis*, v.188, p.917-924, 1988.
- ALFORD K.; IVARSSON S.; HARRIS L. Congenital cytomegalovirus infection and disease in Sweden and the relative importance of primary and secondary maternal infections. Preliminary findings from a prospective study. *Scand. J. Infect. Dis.*, v. 16, p.129-131, 1984.
- ALMEIDA L. N. B.; AZEVEDO R. S.; AMAKU M.; MASSAD E. Cytomegalovirus seroepidemiology in a urban community of São Paulo, Brazil *Rev Saúde Pública*, v. 35, nº2, p.124-129, 2001.
- BALDICK C.; MARCHINI A.; PATERSSON C.; SHENK T. Human cytomegalovirus tegument protein pp71 (gpUL82) enhances the infectivity of viral DNA and accelerates the infectious cycle. *J Virol*, v.71, p.4400-4408, 1997.
- BARBI M; BINDA S.; CAROPPO S.; AMBROSETTI S.; CORBETTA U.; SERGIO S. A wider role for congenital cytomegalovirus in sensorineural hearing loss. *Pediatric Infect Dis.*, v.22, nº1, p.39-42, 2003.
- BARBI M.; BINDA S.; CAROPPO S.; CALVARIO A GERMINARIO C.; BOZZI A.; TANZI L.; VERONESI L.; MURA I.; PIANA A.; SOLINAS G.; PUGNI L.; BEVILAQUA G.; MOSCA F. Multicity Italian study of congenital

- cytomegalovirus infections. *Pediatric Infect Dis J*, v. 72, n°2, p.156-159, 2006.
- BITSCH A, KIRKNER H, DUPKE R, BEIN G. Failure to detect human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of healthy blood donors by the polymerase chain reaction. *Transfusion*, v.32, p. 612-617, 1992.
- BLANK S.; GERRIE A.; LESLIE; CLEM W. Antibody affinity in valence in viral neutralization. *J Immunol*, v. 8, n°3, March, 1972.
- BOPPANA S. B.; BRITT W. J. Antiviral antibody responses and intrauterine transmission after primary maternal cytomegalovirus infection. *J Infect Dis*, v.171, p.1115-1121, 1995.
- BOPPANA S. B.; FOWLER K. B.; BRITT W. J.; STAGNO S.; PASS R. F. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* v.104, p.55-60, 1999.
- BOPPANA S. B.; PASS R.; BRITT W. Virus-specific antibody responses in mothers and their newborn infants with asymptomatic congenital infections. *J Infect Dis.*, v.167, p.167-172, 1993.
- BOPPANA S. B.; POLIS M. A., KRAMER A. A.; BRITT W. J; KOENING S. Virus-specific antibody responses to human cytomegalovirus (HCMV) in human immunodeficiency virus type I -infected persons with HCMV retinitis. *J Infect Dis.*, v.171, p.182-185, 1995.

- BOPPANA S. B.; RIVERA L. B.; FOWLER K. B.; MACH M.; BRITT W.
Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with
preconceptional immunity. *N Engl J Med*, v. 344, p. 1366-1371, 2001.
- BOPPANA S. B.; FOWLER K. B.; PASS R. F.; RIVERA L. B.; BRADFORD R. D.;
LAKEMAN F. D.; BRITT W. J. Congenital cytomegalovirus infection:
association between virus burden in infancy and hearing loss. *J
Pediatric*, v.146, n°6, p. 817-823, 2005.
- BRATCHER D. F.; BOURNE N.; BRAVO F. J.; SHLEISS M. R.; SLAOUI M.;
MYERS M. G.; BERNSTEIN D. I.. Effect of passive antibody on
congenital cytomegalovirus infection in guinea-pigs. *J Infect Dis.*, v.172,
p.944-950, 1995.
- BRITT W. J.; VUGLER L. G. Antiviral antibody responses in mothers and their
newborn infants with clinical and subclinical congenital cytomegalovirus
infection *J Infect Dis*, v.161, p.214-219, 1990.
- BRITT W. J.; MACH M. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology*,
v.39, p.401-412, 1996.
- CHANDLER S. H.; HANDSFIELD H. H.; MCDOUGALL J. K. Isolation of
multiple strain of cytomegalovirus from women attending a clinic for
sexually transmitted diseases. *J Infect Dis*, v.155, n°4, p. 655-660, Apr, 1987.
- CHANDLER S. H.; HOLMES K.; WENTWORTH B; GUTMANL.; WIESNER P.;
ALEXANDER E.; HANDSFIELD H. The epidemiology of
cytomegalovirus infection in women attending a sexually transmitted
disease clinic. *J Infect Dis*, v.152, n° 3; p.597-605, 1995.

- CHEE MS., BANKIER A. T.; BECK S.; BOHNI R.; BROWN C. M.; CERNY B. R. HORSNELL T.; HTCHISON III C. A.; KOUZARIDES T.; MARTIGNETTI J. A.; PREDDIE E.; SATCHWELL S. C.; TOMLINSON P.; WESTON K. M.; BARREL B. G. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Topics in Microbiol an Immunology* v. 154, p. 125-170, 1990.
- CHEN D. H.; JIANG H.; LEE M.; LIU F.; ZHOU Z. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology*, v.260, p.10-16, 1999.
- CHOU S.; DENNISON K. Analysis of inter strain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *J Infect Dis*, v.163, p.1229-1234, 1991.
- COMPTON T.; NOWLIN D. M.; COOPER N. R. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology*, v.193, p.834-841, 1993.
- DEMMLER G. J. Congenital cytomegalovirus infection. *Semin Pediatr Neurol.*, v.1, n°1, p.36-42, 1994.
- DEMMLER G. J.; BUFFONE G. J.; SCHIMBOR C. M.; MAY R. A. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis*, v.158, n°6, p.117-1184, Dec, 1998.

- DUARTE G, KAWASAKI E, FIGUEIREDO LTM, YAMAMOTO AY, CARLUCCI RH. Estudo soroepidemiologico sobre citomegalovirus em parturientes. *Rev Bras Ginecol Obstet* v.16,p. 153-158,1994.
- DWORSKY M; YOW M.; STAGNO S.; PASS R. F.; ALFORD C. Citomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics*, v.72, n° 3, p.295-299, Sep, 1983.
- EGGERS M.; METZER C.; ENDERS G. Differentiation between acute primary and recurrent human cytomegalovirus infection in pregnancy, using a microneutralization assay. *J Med Virol*, v.56, p. 351-358, 1998.
- FISHER S; GENBACEV O; MAIDJI E; PEREIRA L Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in uterus: implications for transmission and pathogenesis. *J Virol*, v. 74, n° 15, p. 6808-6820, Aug, 2000.
- FOWLER K. B; STAGNO S; PASS R; BRITT W.; BOLL T; ALFORD C. A. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med*, v. 326, p.663-667, 1992.
- FOWLER K.; STAGNO S.; PASS R. Interval between births and risk of congenital cytomegalovirus infection. *Clinical Infectious Disease*, v. 38, p.1035-1037, 2004.
- FRENCH D.; LASKOV R.; SCHARFF M. The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity. *Science*, v.24, p.1152-115, 1989.
- GAYTANT M. A.; STEEGERS E.; SEMMEKROT B. A.; HANS M.; MERKUS; JOCHEM; GALAMA J. M. Congenital cytomegalovirus infection: Review

of the Epidemiology and outcome. Obstetrical and Gynecological Survey, v. 57, n°4, p.245-256, 2002.

GERNA G.; PERCIVALLE F.; BALDANTI S; SOZZANI S.; LANZARINI P.; GENINI E.; LILLERI D.; REVELLO M.G. Human cytomegalovirus replicates abortively in polymorphonuclear leukocytes after transfer from infected endothelial cell via transient microfusion events. J Virol, v.74, p.5629-5638, 2000.

GONCZOL F.; FURLINI G.; IANACONE J.; PLOTKIN S. A rapid microneutralization assay for cytomegalovirus. Journal Virology Methods, v.14, n° 7, p. 37-41, 1986.

GRETCH D. R.; KARI B.; RASMUSSEN L.; GEHRZ R. C.; STINSKI M. F. Identification and characterization of three distinct families of glycoprotein complexes in the envelopes of human cytomegalovirus. J Virol, v. 62, n° 3, p. 875-881, Mar, 1988.

GRIFFITHS P. D; BABOONIAN C. RUTTER D. Congenital and maternal cytomegalovirus infections in a London population. Br J Obstet Gynaecol, v. 98, p.135-140, 1991.

GRIFFITHS P.D; STAGNO S.; PASS R.F; SMITH R. J.; ALFORD C. A. Infection with cytomegalovirus pregnancy specific IgM antibodies as a marker of recent primary infection. J Infect Dis, v. 145, n° 5, p. 647-653, 1982.

GRUNDY J. E.; LUI S. F.; SUPER M.; BERRY N. J.; SWENY P.; FERNANDO O.N.; MOORHEAD J. ; GRIFFITHS P.D. Symptomatic cytomegalovirus

infection in seropositive kidney recipients: reinfection with donor virus rather than reactivation of recipient virus. *Lancet*, v. 2, p.132-135, 1988.

HAHN G; JORES R.; MOCARSKI E. S. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, v. 95, p. 3937-3942, 1998.

HAMPRECHT K.; VOCHER M.; BAUMEISTER A.; BONIEK M.; SPEER C.; JAHN G. Detection of cytomegaloviral DNA in human milk cells and cell free milk whey by nested PCR. *J Virol Methods*, v.70, n°2, p.167-176, Feb, 1998.

HAMPRECHT K; MASCHMANN J.; VOCHER M.; DIETZ K; SPEER C.P.; JAHN G. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from women to preterm infant by breastfeeding. *The Lancet*, v. 357, p. 513-518, Feb, 2001.

HAMPRECHT K; WITZEL S.; MASCHMANN K.; DIETZ K.; BAUMEISTER ; MIKELER E.; GOELZ R.; A.; SPEER C. P.; JAHN G. Rapid detection and quantification of cell free cytomegalovirus by a high-speed centrifugation-based microculture assay: comparison to longitudinally analyzed viral DNA load and pp67 late transcript during lactation. *Journal Clinical Virology*, v. 28, p. 303-316, 2003.

HEDMAN K.; ROUSSEAU S. Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. *J Med Virol*, v.27, p.288-292, 1989.

- HEMMINGS D. G.; KILANI R.; NYKIFORUK C.; PREIKSAITIS J.; GUILBERT L. J. Permissive cytomegalovirus infection of primary villous term and first trimester trophoblasts. *J Virol*, v.72, n° 6, p. 4970-4979, Jun, 1998.
- HENGEL H.; BRUNE W.; KOSZINOWSKI U. Immune evasion by cytomegalovirus.-survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol*, v. 6, n° 5, p. 190-197, 1998.
- HICKS T.; FOWLER K.; RICHARDSON M.; DAHLE A.; ADAMS L; PASS R. Congenital infection and neonatal auditory screen. *J Pediatric* ,v.123, n° 5, p.779-882, 1993.
- HO M. Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis*. V.12, p. 701-710, 1990.
- HUANG C.; RICKS R.; GARVIE M.; PASS R. F. Molecular epidemiology of cytomegalovirus infection in women and their infants. *N Engl J Med*, v. 303, n° 17, p. 958-962, Oct, 1980.
- HUBER M. T.; COMPTON T. Intracellular formation and processing of the heterotrimeric gH-gL-gO (gCIII) glycoprotein envelope complex of human. *J Virol.*, v.73, n°5, p. 3886-3892, 1999.
- JONJIC S., PAVIC I.; POLIC B. CRNKOVIC I.; LUCIN P.; KOSZINOWSKI U. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med*, v.179,p. 1713-1717, 1994.

- KLEIN M; SCHOPPEL N; AMBROSSIADIS N.; MACH M. Strain-specific neutralization of human cytomegalovirus isolates by human sera. *J Virology*, v. 73, p.878-886, 1999.
- KLEMOLA; VON ESSEN R; HENLE G; HENLE W. Infectious mononucleosis-like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus antibodies. *J Infect Dis*, v.121, p.608-614, 1970.
- KONDO K; KANESHIMA H; MOCARSKI E. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 91, p.11879-1188, 1994.
- KONDO K; XU J; MOCARSKI E. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p.11137-11142, 1996.
- LEINIKKI P.; GRANSTROM M.; SANTAVUORI P.; PETTAY O. Epidemiology of cytomegalovirus infections during pregnancy and infancy. *Scand J Infect Dis* v.10, p. 165-171, 1978.
- MARIN L. J; CUNHA A.; AQUINO V. H; FIGUEIREDO L. T. M. The use of qualitative and quantitative polymerase chain reactions for diagnosis of cytomegalovirus infections in bone marrow and kidney transplant recipients. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.37, n^o2, p.158-164, 2004.
- MARSHALL G. S.; RABALAIS G. P.; STOUT G. G.; WALDEYER S. I.. Antibodies to recombinant-derived glycoprotein B after natural human

- cytomegalovirus infection correlate with neutralizing activity. *J Infect Dis*, v.165, p.381-384, 1992.
- MÉIER J.; LIENICKE U.; TSCHIRCH E.; KRUGER D.; WAUER R.; PROSCH S.
Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants. *J Clin Microbiol*, v. 43, n°3, p.1318-1324, Oct., 2005.
- MOCARSKI E. S.; COURCELLE C. T. Cytomegalovirus and their replication. In: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 4th edition. Lippincot Willians Wilkins. Philadelphia, 2001: chapter 76, p.2629-2673.
- MONTGOMERY J. R.; MASON E. O.; WILLIAN A. P.; DESMOND M. M.; SOUTH M. A. Prospective study of congenital cytomegalovirus infection. *South Med J*, v.73, n° 5, p.590-595, 1980.
- NELSON T.; DEMMMLER G.J. Cytomegalovirus infection in the pregnant mother, fetus and newborn infant . *Infectious in Perinatology*, v. 24, n° 1, 151-160, Mar, 1997.
- NOGUEIRA E.; ARRUDA V. R.; BIZZACCHI J. M.; COSTA F. F.; OZELO M.; ROSSI C. L.; COSTA S. C. B. Possible association between cytomegalovirus infection and gastrointestinal bleeding in hemophiliac patients. *Acta Haematol*, v. 103, p. 73-77, 2000.
- NOVOTY J. RIGOUTSOS L.; COLEMAN D.; SHENK T. *In silico* structural and functional analysis of the cytomegalovirus (HHV-5) genome. *J. Mol. Biology*, v.310, p1150-1166, 2001.

- NUMAZAKI K. Human cytomegalovirus infection of breast milk. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 18, p.91-98, 1997.
- PANNUTI C. S.; VILAS-BOAS L. S.; ANGELO M.; CARVALHO R. P.; SECRE C. M. Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in two socio-economically distinct populations of a developing country. *Rev Inst Med Trop São Paulo* v. 27, p.105-107,1985.
- PASS R. F. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J Infect Dis*, v. 152, p.243-248, 1985.
- PASS R. F.; LITTLE E.; STAGNO S.; BRIT W.; ALFORD C. Young children as a probable source of maternal and congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med*, v. 316, p.1366-70, 1987.
- PASS R. F.; STAGNO S.; DWORSKY M. SMITH R.; ALFORD C. Excretion of cytomegalovirus in mothers: observations after delivery of congenital infeted and normal infants. *J Infect Dis*, v. 146, nº 1, p. 1-6, 1982.
- PASS R. F.; HUTTO C. Group day care of cytomegalovirus infection of mothers and children. *Rev. Infect Dis*, v.8, nº 4, p.599-605, Jul-Aug, 1986.
- PECKHAM C. S.; JOHNSON C.; ADES A.; PEARL K; CHIN K. Early acquisition of cytomegalovirus infection. *Arch. Dis Child*, v.67, nº8, p. 780-785, Aug, 1987.
- PEREIRA L, MAIDJI E.; MCDONAGH S.; GENBAVEC O.; FISHER S. Human cytomegalovirus transmission from the uterus to the placenta correlates with the presence of pathogenic bacteria and maternal immunity. *J Virol*, v. 77, p. 13301-13314, 2003.

- RAYNOR B. D. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Semin Perinatology*, v.17, n°6, p.394-402, 1993.
- REVELLO M. G.; ZAVATTONI A.; SARASINI E A.; PECIVALLE E.; SIMOCINI L.; GERNA G. Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection: prognostic implications for pregnancy. *J Infect Dis* , v. 177,p. 1170-1175, 1998.
- REVELLO M. G; GERNA G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus and newborn infant. *Clinical Microbiology Reviews*, v.15, p. 680-715, 2002.
- REYNOLDS D. W.; STAGNO S.; HOSTY T.; TILLER M.; ALFORD C.; Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N Engl J Med*, v. 289, p.1-5, 1973.
- ROIZMAN B.; PELLETT P. The family Herpesviridae In: Knipe DM, Howlwey PM. *Fields Virology*, 4th edition, Lippincot Willians Wikins. Philadelphia, 2001: chapter 71, p.2629-2673.
- ROSS S.A.; BOPPANA S. Congenital cytomegalovirus infection; outcome and diagnosis. *Pediatric Infect Dis*, v.16, n°1, 2005.
- ROTH I.; CORRY D. B.; LOCKSLEY R. M.; ABRAMS J. S.; LITTON M. J.; FISHER S. J. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med*, v. 184, p. 539-548, Aug, 1996.

- ROWE W. P.; HARTLEY J. W.; WATERMAN S. Cytopathogenic agent resembling salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.92, p.418-424, 1956.
- SCHOPPEL K.; KROPFF B.; SCHMIT C, VORNHAGEN R.; MACH M. The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein-specific antibodies. *J Infect Dis*, v.175, p.533-544, 1997.
- SCHOPPEL K.; LAUBER E.; KRECH U. Congenital cytomegalovirus infection in newborn infants of mothers infected before pregnancy. *Arch. Dis. Child.* , V. 53, P. 536-539, 1978.
- SCHOPPEL K.; SCHMIDT C.; EINSELE H.; HEBART H.; MACH M. Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogenic bone marrow transplant recipients. *J. Infect Dis*, v.178, p. 1233-1243, 1998.
- SIEKVIETZ M.; KOCK C.; RAJEWSKY K.; DILDROP R. Analysis of somatic mutation and class switching naïve and memory B cells generating adoptive primary and secondary responses. *Cell*, v.48, p. 757-770, 1987.
- SINZGER C.; JAHN G. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology*, v.9, p.302-319, 1996.
- SLOBEDMAN B.; MOCARSKI E. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J Virol* , v.73, p.4806-4812, 1999.

- SMITH K. L.; KUSKI L. J.; COBAIN T.; DUNSTAN R. A .Detection of cytomegalovirus in blood donors by the polymerase chain reaction. *Transfusion*, v.33, p.497-502, 1993.
- SMITH M. G. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.92, p. 424-430, 1956
- SNYDMAN D; WERNER B.; HEINZE-LAOEY BERARDI V.; TILNEY N.; KIRKMAN R.; MILFORD E.; CHO S.; BUSH H.; LEVEY A. Use of cytomegalovirus immunoglobulin to prevent cytomegalovirus disease in renal- transplant recipients . *N Engl J Med*, v. 54, p. 1366-1371, 1987.
- SODERBERG-NAUCLER C.; NELSON J.Y. Human cytomegalovirus latency and reactivation -a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirology* , v. 42 , n° 4-5, p.314-321, 1999.
- SODERBERG-NAUCLER C.; STREBLOW K.; FISH J.; ALLAN-YORKE, SMITH P.; NELSON J.A. Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14+ monocytes is differentiation dependent. *J. Virol*, v.75, p. 7543-7554, 2001.
- STAGNO S, REYNOLDS DW; LAKEMAN A, CHARAMELLA L.; ALFORD C. Congenital cytomegalovirus infection: Consecutive occurrence due to viruses with similar antigenic compositions. *Pediatrics*, v.52, p. 788-794, 1973.

- STAGNO S. Cytomegalovirus. In: Remington JS Klein JO. Infection diseases of the fetus and newborn infant, Saunders Co. Philadelphia, 2001: chapter 7, p. 389-424
- STAGNO S.; DWORSKY M.; TORRES J.; MESA T.; HIRSH T. Prevalence and importance of congenital cytomegalovirus infection in three different populations. *J Pediatr*, v.101, p. 897-900, 1982.
- STAGNO S; PASS R; DWORSKY M.; ALFORD C. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Semin Perinatol*, v.7, p. 31-42, 1983.
- STAGNO, S REYNOLDS, D.; HUANG E.; THAMES S.; SMITH R. ;ALFORD Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in an immune population. *N. Engl J Med*, v. 296, p. 1254-1258, 1977.
- STAGNO, S.; WHITEY R. Herpesvirus infection of pregnancy. Part I. cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *N. Engl J Med*, v 313, n° 20, p1270-1274, Nov 14, 1985.
- STEINNINGER C.; KUNDI M.; KLETZMAYR J.; ARBELE W.; KRAUPP-POPOW T. Antibody maturation and viremia after primary cytomegalovirus infection, in immunocompetent patients and kidney-transplant patients. *J Infect Dis*, v.190, p.1908-1912, 2004.
- SWEET C. The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microbiology Reviews*, v.23, p.457-482, 1999.
- TANAKA A; MORIUCHI H; HIROTA K; NUMAZAKI Y. Neutralizing antibody response to cytomegalovirus in seropositive pregnant women. *J Med Virol*, v.34, p.85-88, 1991.

- VOCHEM M.; HAMPRECHT K.; JAHN G.; SPEER C. Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. *Pediatric Infect Dis J*, v.17, p.53-58, 1998.
- WEBER B.; KLINGHARDT U.; LUX A.; BRAUN W.; RABENAU DOERR H. Detection of neutralizing antibodies against human cytomegalovirus : Influence of strain variation. *J Med Virol*, v.40, p.28-34, 1993.
- WELLER T. H. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. *N Engl J Med*, v.285, p. 203-214, 1971.
- WELLER T. H., MACAULEY J. C., CRAIG J. M., WIRTH P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 94, p. 4-12, 1957.
- YAMAMOTO A. Y.; MUSSI-PINHATA M. M; PINTO P. C.; FIGUEIREDO L. T. M. Congenital cytomegalovirus infection in preterm and full-term newborn infants from a population with a high seroprevalence rate . *Pediatric Infect Dis J*, v. 20, p.188-192, 2001.
- YASUDA A.; KIMURA H.; HAYAKAWA M.; OHSHIRO M.; KATO YUICHI K.; MATSUURA O.; SUZUKI C.; MORISHIMA T. Evaluation of cytomegalovirus infections transmitted via breast milk in preterm infants with a real-time polymerase chain reaction assay.. *Pediatric*, v.111, p. 1333-1336, 2003.

YEAGER A; GRUMET F.; HALFLEIGH E.; ARVIN A.M.; BRADLEY J.S.;

PROBER C. G. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infection in newborn infants . J Pediatrics , v. 98, p. 281-287, 1981.

ZANGHELLINI F.; BOPPANA S. B.; EMERY V. C.; GRIFFITHS P.; PASS R.

Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. J Infect Dis, v.180, p.702-707, 1999.

Versão 2.0, 20 de março de 2003

Anexo 1 - Cópia da Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



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

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 502-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 29 de julho de 2002

Ofício nº 1979/2002
CEP/SPC

Prezada Senhora:

O trabalho intitulado "INFECÇÃO CONGÊNITA POR CITOMEGALOVÍRUS EM POPULAÇÃO DE ELEVADA SOROPOSITIVIDADE: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS VIRAIS E AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DA REINFECÇÃO MATERNA", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 135ª Reunião Ordinária realizada em 22/07/2002, e enquadrado na categoria: APROVADO, de acordo com o Processo HCRP nº 4782/2002.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF. DR. SÉRGIO-PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
DRª APARECIDA YULIE YAMAMOTO
Depto. de Puericultura e Pediatria
Em mãos

Versão 2.0, 20 de março de 2003

Anexo 2. Cópia do termo de Consentimento Aplicado

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SAO PAULO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE - FONE: 602- 1000
FAX: 633-1144 - CEP: 14048-900-RIBEIRÃO PRETO - SP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO

NOME DA PESQUISA:

Infecção congênita por citomegalovírus em população de elevada soropositividade :
caracterização molecular das cepas virais e avaliação da ocorrência de reinfeção materna.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL : APARECIDA YULIE YAMAMOTO

CRM Nº: 49769

PROMOTOR DA PESQUISA: Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP

Patrocinador que apóia financeiramente a pesquisa: FAPESP (Auxílio Pesquisa)

Gostaria de convidar a Sra e o seu filho para participem de um estudo de pesquisa.

Esta pesquisa é sobre uma infecção causada por um vírus chamado Citomegalovirus. Esta infecção é muito comum. Quando uma mulher pega este vírus durante a gravidez, a infecção pode passar para o bebê ainda dentro da barriga da mãe. Se o medico ficar sabendo logo que o bebê tem esta infecção, pode começar um tratamento e estes problemas não ficarem muito graves e também acompanhar a criança desde pequeno e fazer todos os exames para saber se a criança vai ter problemas.

Essa pesquisa quer saber quantas crianças nascem com essa infecção e o por que algumas crianças nascem com essa infecção e outras não. Além disso, existem muitos tipos destes vírus chamado citomegalovirus e a pesquisa também quer descobrir quais tipos deste vírus que causam mais esta infecção e também como a mãe pode reagir contra este vírus para não passar esta infecção para o bebe.

Se a senhora concordar em participar, do seu filho, será preciso colher um pouco de urina e um pouco de saliva logo ao nascimento, para fazermos exame que vai mostrar se ele está com a infecção por este vírus ou não. Será colocado um saquinho de plástico para colher um pouco de urina de seu filho e a saliva será coletada com um tubinho de plástico, sem machucar a boca do bebê. Se a quantidade de saliva for pouca, será pingada uma gotinha para aumentar a saliva naquele momento da coleta. Serão feitos exames na urina e na saliva. Ele vai receber todos os cuidados necessários no berçário.

Se seu filho estiver com esta infecção ou se ele não estiver com infecção, poderá ser necessário repetir o exame e nesse caso a Sra será avisada e convidada para uma consulta. Também solicitaremos que a Sra responda a um questionário e nos doe um pouco de sua urina e de seu leite para fazermos exames para a pesquisa e ver como está a defesa do seu corpo contra este vírus. Será fornecido auxílio-transporte para comparecer a essa consulta. Se o seu filho não tiver infecção e vocês forem convidados a vir ao hospital, será necessário vir ao hospital uma única vez.

Também, para fazer exames que mostrarão se você teve a infecção por este vírus antes ou durante a sua gravidez, será aproveitado um pouco do sangue que você colheu durante a gravidez nos postos de saúde ou nesse hospital (se você tiver feito pré-natal) e o que

sobrou do sangue que você colheu no dia que internou nesse hospital para dar a luz e que estavam guardados no Laboratório.

Se o seu filho estiver com esta infecção e se você concordar, ele será acompanhado nesse hospital e serão feitos exames para saber se ele tem alguma consequência da infecção e para planejarmos o tratamento. Nesse caso, nas duas primeiras consultas de retorno, solicitaremos que você colha um pouco de sua urina e de seu leite, se estiver amamentando.

A coleta destes exames não irá atrapalhar ou atrasar os cuidados que seu filho precisa ou mesmo a sua alta do Hospital, que serão feitos normalmente.

A participação nesse estudo não lhe trará nenhum gasto. Não haverá nenhuma despesa para você, além daquela de transporte para o retorno, que normalmente você teria que ter para trazer o seu filho para o acompanhamento.

O único desconforto esperado é o saquinho de plástico que ficará colado na pele da criança somente o tempo necessário para ele urinar e o tubinho de plástico que será colocado no canto da boca para colher um pouco de saliva. Não é esperado que o seu filho corra risco algum ao participar desta pesquisa.

Para você os únicos desconfortos será o de coleta de um pouco de urina e um pouco de seu leite, o que não causa nenhuma complicação.

O seu filho pode se beneficiar ao participar deste estudo, pois, se soubermos que ele tem infecção pelo citomegalovírus, podemos planejar o seu tratamento e acompanhamento. Não haverá nenhuma despesa para você com relação ao tratamento da criança. Este será realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

O resultado dessa pesquisa pode ajudar outras crianças nascidas com esta infecção. Mesmo que o seu filho não esteja infectado, a sua participação nesse estudo pode nos ajudar a compreender o por quê algumas crianças adquirem esse vírus e outras não e, assim, no futuro, poderemos tentar ajudar a prevenir a infecção em grande número de crianças, por meio do desenvolvimento de vacinas contra este vírus. Seu nome e o nome de seu filho nunca serão identificados.

Como foi descrito acima, não há riscos importantes em participar deste estudo, tanto para você como para o seu filho. Caso você ou seu filho sofram algum tipo de lesão como resultado deste estudo, o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo dará a ele o tratamento necessário e imediato. Este estudo não modificará o tratamento de rotina que o seu médico fornecerá a você e seu filho, nas questões relacionadas à sua saúde e a de seu filho.

A sua participação é voluntária, o tratamento e todos os cuidados de seu filho estarão garantidos em qualquer tempo, mesmo que você não concorde em participar. Você pode desistir de participar dessa pesquisa em qualquer momento.

Não há nenhum programa de compensação monetária por meio desta Instituição, mas você e seu filho não estarão renunciando a nenhum direito legal ao assinar este formulário de consentimento.

ASSINATURAS

Se tiver lido o consentimento livre e esclarecido (ou se ele tiver sido explicado para você) e tiver entendido a informação, e concorda voluntariamente em permitir que seu filho recém-nascido participe deste estudo, por favor assine abaixo:

Nome do voluntário

(datilografado ou em letra de fôrma)

Nome da testemunha

Data

Datilografado ou em letra de forma

Eu expliquei o motivo deste estudo à voluntária. Estou certo de que ela entendeu o propósito, os procedimentos, riscos e benefícios deste estudo.

Nome do pesquisador : Aparecida Yulie Yamamoto

Assinatura _____

Data:

Telefone de contato: 602-2674

Anexo 3: Dados sócio-demográficos das 47 mães transmissoras da infecção congênita

	Nome	Registro	Idade (anos)	Estado civil	Grau Instrução (anos)	Profissão	Paridade
1	LEM	0645727K	16	casada	5	Dona de casa	primípara
2	CAVC	0649437K	17	não casada	7	Dona de casa	primípara
3	TMSM	0519284J	26	casada	8	Doméstica	múltipara
4	AAJ	0136663J	20	casada	11	Dona de casa	primípara
5	IAFL	0654507B	31	casada	8	Dona de casa	múltipara
6	JDO	0559480D	22	casada	5	Dona de casa	múltipara
7	TDV	0201746A	15	não casada	6	Doméstica	primípara
8	AMTS	0664096A	31	casada	13	Prof. Educaç	múltipara
9	CAP	0666874K	22	casada	11	Dona de Casa	múltipara
10	NBS	0673112B	40	casada	3	Dona de casa	múltipara
11	GAO	0139030I	19	casada	11	Dona de casa	primípara
12	RFS	0677400H	28	casada	3	Dona de casa	múltipara
13	DCL	0200514C	15	não casada	7	Estudante	primípara
14	DJO	0653821F	23	Casada	2	Dona de casa	múltipara
15	AA M	0421998E	40	não casada	3	Faxin. Escolar	múltipara
16	ADM	0637048F	42	Não casada	4	Dona de casa	Múltipara
17	FSF	0192148D	16	não casada	8	Desocupada	primípara
18	JADS	0134239F	19	casada	10	Dona de casa	múltipara
19	GV	16239	25	casada	4	Dona de casa	múltipara
20	TCVV	16243	17	casada	11	Dona de casa	primípara
21	LMS	0063083J	25	casada	2	Dona de casa	múltipara

	Nome	Registro	Idade (anos)	Estado civil	Grau Instrução (anos)	Profissão	Paridade
22	GRG	16394	20	casada	4	Dona de Casa	múltipara
23	AA	0678595K	32	casada	8	Dona de casa	múltipara
24	JMT	16577	18	casada	11	Prof. Liberal	primípara
25	MISE	16742	14	não casada	6	Estudante	primípara
26	OOS	0074043K	41	não casada	4	Catadora de papel	múltipara
27	AAS	17047	18	casada	4	Dona de casa	primípara
28	BOMA	17167	19	Casada	5	Dona de casa	múltipara
29	JRS	17190	21	Casada	8	Doméstica	múltipara
30	GGM	17221	19	Casada	11	Dona de casa	primípara
31	LL	0137040E	26	Casada	11	Auxiliar de Produção	múltipara
32	RAS	0465719C	26	Casada	2	Dona de casa	múltipara
33	RCH	0153972J	39	Casada	11	Dona de casa	múltipara
34	SCS	0311259B	26	Casada	4	Dona de casa	múltipara
35	ENS		17	Casada	5	Dona de casa	primípara
36	LRRF	17508	28	Casada	11	Doméstica	múltipara
37	LKL	0707544A	18	Não casada	8	Dona de casa	primípara
38	ARNRM	17614	16	Casada	8	Desocupada	primípara
39	JMC	17613	16	Casada	5	Dona de casa	múltipara
40	NBB	0205057E	16	Casada	9	Estudante	primípara
41	CPO	0711678H	18	Não casada	9	Estudante	primípara
42	CPS	2275	22	não casada	4	Dona de Casa	múltipara
43	PCP	0150122F	19	não casada	11	Comerciaría	primípara
44	JT	18114	16	casada	9	Dona de casa	primípara

	Nome	Registro	Idade (anos)	Estado civil	Grau Instrução (anos)	Profissão	Paridade
45	GBA	18251	18	casada	10	Dona de casa	primípara
46	ZANS	0113311K	37	casada	1	Dona de casa	múltipara
47	AS	0718681J	17	casada	11	Estudante	primípara

Anexo 4: Dados sócio-demográficos das 94 mães não transmissoras da infecção congênita

	Nome	Registro	Idade(anos)	Estado civil	Grau Instrução (anos)	Profissão	Paridade
1	AA GS	0638851F	23	casada	11	Prof. Indústria	múltipara
2	RA J	0174081E	30	casada	5	Camareira	múltipara
3	J M S	0636129A	19	casada	10	Func. Admin	primípara
4	J A G S	0506522F	16	casada	10	Estudante	primípara
5	DRF	0387339I	24	casada	7	Dona de casa	múltipara
6	L B F	0622394C	19	casada	11	Comerciária	primípara
7	F A A	0168655E	17	casada	8	Dona de casa	primípara
8	ERS	0101130H	20	casada	5	Dona de casa	múltipara
9	A C F V	0436790A	31	casada	11	Comerciária	múltipara
10	I C M C	0374133K	36	casada	15	Comerciária	múltipara
11	J L A G	0442736E	32	casada	11	Dona de casa	primípara
12	C F P A T	0559324K	22	casada	12	Comerciária	múltipara
13	E C A	0234264F	22	casada	9	Dona de casa	primípara
14	C E L S	0667032H	25	casada	2	Dona de casa	múltipara
15	A A O S	0644362C	21	não casada	8	Prof. Saúde	múltipara
16	V P S	0252076G	23	casada	11	Dona de casa	múltipara
17	S M R	0506222G	17	casada	11	Dona de casa	primípara
18	R L B	0066021D	22	não casada	5	Dona de casa	múltipara
19	M B A R	0242923F	45	casada	3	Doméstica	múltipara
20	E C A I	0651148I	26	casada	6	Dona de casa	múltipara
21	E S	0677669F	26	não casada	5	Doméstica	múltipara
22	M E M S	0678142A	21	não casada	8	Dona de casa	primípara

	Nome	Registro	Idade(anos)	Estado civil	Grau Instrução (anos)	Profissão	Paridade
24	IFS	0513958F	22	casada	11	Atendente	multípara
25	SHAC	0481453F	30	casada	5	Dona de Casa	multípara
26	GAF	0353179J	22	casada	5	Dona de casa	multípara
27	SOA	0679845I	17	não casada	6	Dona de casa	primípara
28	ACO	0182762H	17	casada	7	Dona de casa	primípara
29	VSBB	0675368G	27	casada	15	Prof. Educ.	multípara
30	EPT	0682243I	21	casada	9	Dona de Casa	multípara
31	RMC	0430812E	29	não casada	9	Estudante	multípara
32	JSA	0365738E	18	não casada	11	Desocupada	primípara
33	LSP	16278	16	casada	5	Desocupada	primípara
34	FCVM	16284	20	casada	7	Dona de casa	multípara
35	GT	4140	27	casada	6	Dona de casa	multípara
36	RFS	16231	22	casada	11	Prof. Educ.	primípara
37	J A S	16279	15	casada	5	Dona de casa	primípara
38	MS	17273	17	não casada	5	Descascadora de Milho	primípara
39	DPS	0070285I	23	casada	11	Dona de casa	primípara
40	CFC	0691801I	24	casada	8	Dona de casa	multípara
41	SSC	16351	20	casada	11	Func. Admin	primípara
42	AASS	0690859B	36	casada	4	Dona de casa	multípara
43	VSP	0543153C	28	casada	8	Dona de casa	multípara
44	ATB	1285	21	casada	7	Doméstica	multípara
45	AML	16564	29	casada	11	Func. Admin	multípara
46	MEAV C	16775	17	casada	10	Dona de casa	primípara
47	AAS	16777	21	casada	11	Dona de casa	primípara

	Nome	Registro	Idade(anos)	Estado civil	Grau Instrução (anos)	Profissão	Paridade
49	LFPS	0694312J	17	casada	8	Dona de casa	primípara
50	LS S	17055	19	casada	8	Dona de casa	primípara
51	AFO	17059	39	não casada	11	Comerciária	múltipara
52	SC C	17173	18	casada	7	Dona de casa	múltipara
53	VSD	17171	23	casada	11	Doméstica	primípara
54	MRS F	17227	15	não casada	8	Estudante	primípara
55	LCE	17215	25	não casada	6	Dona de casa	primípara
56	LDAM	17220	15	não casada	6	Estudante	primípara
57	TS	0702968K	18	casada	2	Doméstica	primípara
58	VLS M	0703407A	34	casada	6	Dona de casa	múltipara
59	VTC	0713999A	22	não casada	11	Prof. Educ.	primípara
60	VCA S	0622465G	21	casada	8	Dona de Casa	múltipara
61	MTR	0493348C	21	casada	11	Dona de casa	primípara
62	F L A	0148722C	19	casada	11	Comerciária	primípara
63	MSSG	10883	26	casada	11	Dona de casa	múltipara
64	JVM	17435	23	casada	11	Func. Admin	primípara
65	J A R	17521	18	casada	8	Dona de casa	primípara
66	A A S	0106677J	21	casada	5	Dona de Casa	múltipara
67	ABMA	0703253I	24	casada	11	Comerciária	primípara
68	ELS J	0086542I	22	casada	11	Dona de Casa	primípara
69	MLDC	0623810F	21	casada	7	Dona de Casa	múltipara
70	R J	17625	25	não casada	0	Doméstica	múltipara
71	CMG	17626	19	casada	7	Comerciária	primípara
72	KC B P	17621	26	casada	8	Dona de casa	múltipara
73	FPS	17620	22	casada	8	Dona de casa	múltipara

	Nome	Registro	Idade (anos)	Estado civil	Grau Instrução (anos)	Profissão	Paridade
75	LJMB	0179480I	38	casada	6	Dona de casa	múltipara
76	AMP	0711591B	19	não casada	8	Func. Admin	primípara
77	AMC	0711720E	23	casada	11	Dona de casa	múltipara
78	TVS	17824	18	casada	5	Dona de casa	primípara
79	SJF	17827	15	não casada	4	Estudante	primípara
80	MCS	0431749J	30	não casada	11	Dona de casa	múltipara
81	RBSAM	0252160A	20	casada	9	Dona de casa	primípara
82	GARL	18116	20	casada	10	Dona de casa	primípara
83	P A A R	18107	28	casada	8	Dona de casa	múltipara
84	RPNM	18262	29	casada	7	Dona de casa	múltipara
85	RCM	18265	29	casada	7	Auxiliar de Produção	múltipara
86	ELNR	0718129G	26	casada	8	Func. Admin	primípara
87	SCA	0718304J	37	casada	5	Doméstica	múltipara
88	FRS	0178217C	18	casada	5	Dona de casa	múltipara
89	AGES	0173034K	18	casada	10	Estudante	primípara
90	PM S	0708757D	19	não casada	10	Dona de Casa	primípara
91	SHF	16338	26	não casada	8	Dona de Casa	primípara
92	ITS	0538534F	18	casada	5	Dona de Casa	múltipara
93	JRS	0631860F	19	casada	8	Dona de Casa	primípara
94	AMO	0626576A	19	casada	4	Doméstica	primípara

Anexo 5: Dados sorológicos (ELISA) das mães transmissoras

Número	IgG soros do Pré -parto			IgG soros do Parto		
	Trimestre	Cut-off da reação	Absorbância da amostra	Elisa	Cut-off da reação	Absorbância da amostra
59	2	0,355	1,245	Reagente	0,355	1,229
187	não obtido			Reagente	0,355	0,810
292	2	0,355	2,313	Reagente	0,355	2,252
511	não obtido			Reagente	0,355	2,168
513	não obtido			Reagente	0,355	0,806
533	1	0,355	1,317	Reagente	0,355	1,187
609	1	0,355	2,006	Reagente	0,355	1,722
853	não obtido			Reagente	0,355	1,615
956	2	0,355	1,420	Reagente	0,355	1,512
1016	não obtido			Reagente	0,355	1,822
1063	2	0,429	0,567	Reagente	0,429	1,678
1150	não obtido			Reagente	0,429	1,276
1175	não obtido			Reagente	0,429	2,197
1195	não obtido			Reagente	0,429	1,230
1254	não obtido			Reagente	0,429	2,276
1380	não obtido			Reagente	0,429	2,149
1468				Reagente	0,216	0,770
1587	2	0,216	0,234	Reagente	0,216	1,363
M72	3	0,216	0,617	Reagente	0,216	0,617
M74	1	0,216	0,426	Reagente	0,216	0,544
1727	não obtido			Reagente	0,216	0,931
M206	1	0,226	0,226	Reagente	0,120	0,415

Número	Trimestre	IgG soros do Pré -parto			IgG soros do Parto		
		Cut-off da reação	Absorbância da amostra	Elisa	Cut-off da reação	Absorbância da amostra	Elisa
1749	2	0,131	0,690	Reagente	0,216	1,092	Reagente
M339	3	0,131	0,455	Reagente	0,216	1,637	Reagente
M457	2	0,388	0,627	Reagente	0,388	1,306	Reagente
1951	1	0,216	1,396	Reagente	0,216	1,582	Reagente
M680	2	0,131	0,530	Reagente	0,226	0,885	Reagente
M781	não obtido			Reagente	0,120	0,510	Reagente
M798	2	0,464	1,769	Reagente	0,139	0,665	Reagente
M804	1	0,464	1,336	Reagente	0,139	0,641	Reagente
2205	não obtido			Reagente	0,139	0,379	Reagente
2226	não obtido			Reagente	0,139	0,650	Reagente
2244	não obtido			Reagente	0,139	0,599	Reagente
2292	2	0,131	0,713	Reagente	0,139	0,441	Reagente
M981	não obtido			Reagente	0,139	0,291	Reagente
M1039	1	0,211	0,551	Reagente	0,464	1,597	Reagente
2367	1	0,211	0,573	Reagente	0,464	1,213	Reagente
M1106	1	0,211	0,800	Reagente	0,464	1,666	Reagente
M1115	2	0,211	0,793	Reagente	0,464	2,237	Reagente
2467	2	0,211	1,035	Reagente	0,388	2,467	Reagente
2519	1	0,211	0,526	Reagente	0,130	0,354	Reagente
M1271	3	0,211	0,959	Reagente	0,130	0,640	Reagente
2593	não obtido			Reagente	0,211	1,097	Reagente
M1467	1	0,211	0,694	Reagente	0,211	0,975	Reagente
M1562	não obtido			Reagente	0,211	0,732	Reagente
2761	não obtido			Reagente	0,211	0,912	Reagente
2775	não obtido			Reagente	0,211	0,747	Reagente

Anexo 6: Dados sorológicos (ELISA) das mães não transmissoras

número	IgG soro do Pré-parto			IgG soro do parto		
	Trimestre	Cut-off da reação	Absorbância da amostra	ELISA	Cut-off da reação	Absorbância da amostra
62	não obtido			Reagente	0,355	1,216
77	1	0,355	1,655	Reagente	0,355	1,494
174	não obtido			Reagente	0,355	2,017
185	1	0,355	1,767	Reagente	0,355	1,858
318	não obtido			Reagente	0,355	1,085
321	1	0,355	1,169	Reagente	0,355	1,950
502	1	0,355	2,043	Reagente	0,355	2,160
516	1	0,355	1,057	Reagente	0,355	0,748
506	não obtido			Reagente	0,355	1,765
512	1	0,355	1,347	Reagente	0,355	1,174
614	1	0,355	0,477	Reagente	0,355	0,486
805	não obtido			Reagente	0,355	1,894
808	1	0,355	1,838	Reagente	0,355	1,808
974	não obtido			Reagente	0,355	0,929
963	não obtido			Reagente	0,355	1,677
1023	não obtido			Reagente	0,355	1,631
1022	2	0,355	1,567	Reagente	0,355	1,510
1073	não obtido			Reagente	0,355	0,792
1078	não obtido			Reagente	0,355	2,344
1162	não obtido			Reagente	0,429	2,471

número	IgG soro do Pré-parto			IgG soro do parto		
	Trimestre	Cut-off da reação	Absorbância da amostra	ELISA	Cut-off da reação	Absorbância da amostra
1192	não obtido			Reagente	0,429	1,525
1193	1	0,429	1,768	Reagente	0,429	1,611
1205	não obtido			Reagente	0,429	1,761
1261	3	0,429	0,947	Reagente	0,429	0,961
1249	1	0,429	0,961	Reagente	0,429	0,921
1470	não obtido			Reagente	0,120	0,272
1472	não obtido			Reagente	0,120	0,216
1367	não obtido			Reagente	0,429	0,540
1565	não obtido			Reagente	0,216	2,230
1605	1	0,216	0,744	Reagente	0,216	1,088
M100	não obtido			Reagente	0,226	0,282
M113	2	0,216	3,219	Reagente	0,216	3,018
M840	não obtido			Reagente	0,139	0,891
M65	2	0,216	0,743	Reagente	0,216	0,770
M102	2	0,388	0,742	Reagente	0,388	0,925
M843	2	0,211	0,547	Reagente	0,139	0,336
1721	não obtido			Reagente	0,216	2,241
1717	não obtido			Reagente	0,120	0,291
M169	não obtido			Reagente	0,216	1,156
1755	não obtido			Reagente	0,216	2,404
1158	não obtido			Reagente	0,120	0,388
1760	não obtido			Reagente	0,216	0,726
M329	2	0,131	0,455	Reagente	0,216	0,247
M345	1	0,131	0,543	Reagente	0,216	0,345

Número	IgG soro do Pré-parto			IgG soro do parto		
	Trimestre	Cut-off da reação	Absorbância da amostra	ELISA	Cut-off da reação	Absorbância da amostra
M484	2	0,216	0,367	Reagente	0,216	0,340
M485	2	0,216	1,687	Reagente	0,216	1,258
1949	não obtido			Reagente	0,216	0,900
1950	2	0,216	0,507	Reagente	0,216	0,337
M682	não obtido			Reagente	0,226	0,852
M686	não obtido			Reagente	0,226	1,555
M775	2	0,464	2,256	Reagente	0,120	0,671
M777	1	0,464	1,336	Reagente	0,120	0,342
M806	1	0,464	1,657	Reagente	0,139	0,514
M807	2	0,464	0,948	Reagente	0,139	0,320
M1041	2	0,464	1,064	Reagente	0,139	0,382
2200	1	0,464	0,964	Reagente	0,139	0,466
2207	não obtido			Reagente	0,139	0,338
2717	2	0,131	0,546	Reagente	0,211	0,597
1372	3	0,429	0,559	Reagente	0,429	0,538
2298	1	0,464	1,769	Reagente	0,139	0,753
2300	1	0,464	1,883	Reagente	0,139	0,636
M982	1	0,464	2,416	Reagente	0,139	0,802
M985	2	0,464	1,679	Reagente	0,139	0,741
M1049	1	0,211	0,808	Reagente	0,464	1,860
2237	não obtido			Reagente	0,139	0,558
2364	1	0,211	0,836	Reagente	0,464	1,778
1190	não obtido			Reagente	0,429	1,046
2373	2	0,211	0,582	Reagente	0,464	1,314

número	IgG soro do Pré-parto			IgG soro do parto		
	Trimestre obtido	Cut-off da reação	Absorbância da amostra	ELISA	Cut-off da reação	Absorbância da amostra
2249	não obtido			Reagente	0,464	2,468
M1117	não obtido			Reagente	0,464	1,539
M1118	1	0,211	0,574	Reagente	0,464	0,985
M1120	3	0,211	0,936	Reagente	0,464	2,253
M1121	1	0,211	0,557	Reagente	0,464	1,494
2471	2	0,211	0,615	Reagente	0,388	1,208
2472	não obtido			Reagente	0,388	1,687
2513	não obtido			Reagente	0,130	0,296
2520	1	0,211	0,435	Reagente	0,130	0,453
M1280	1	0,211	0,625	Reagente	0,130	0,402
M1283	2	0,211	0,504	Reagente	0,130	0,290
2594	não obtido			Reagente	0,211	1,340
2603	não obtido			Reagente	0,211	0,725
M1456	não obtido			Reagente	0,211	0,873
M1459	não obtido			Reagente	0,211	0,736
M1569	não obtido			Reagente	0,211	1,004
M1573	2	0,131	0,734	Reagente	0,211	1,024
2737	2	0,131	0,835	Reagente	0,211	1,048
2770	não obtido			Reagente	0,211	1,074
2778	não obtido			Reagente	0,211	0,540
2228	não obtido			Reagente	0,139	0,423
2456	2	0,211	0,639	Reagente	0,464	1,971
M161	não obtido			Reagente	0,120	0,722
M1456	não obtido			Reagente	0,211	0,873
191				Reagente	0,355	0,955
171				Reagente	0,355	1,882

Anexo 7: Títulos da atividade neutralizante dos anticorpos, contra a cepa AD169, em amostras séricas de mães transmissoras e não transmissoras, no período do pré-parto.

Transmissora	Títulos	Não Transmissora	Títulos
0059M	192	0188M	64
0292M	256	2300M	256
0533M	256	2364M	64
0609M	128	2471M	128
0956M	256	2737M	256
1063M	32	M0065M	64
1587M	32	M0329M	128
1749M	128	M0484M	256
1951M	128	M0775M	256
2292M	64	M0806M	128
2367M	128	M0982M	256
2467M	256	M1120M	128
2519M	128	M1280M	256
M0072M	128	0077M	256
M0074M	64	0321M	256
M0206M	128	0516M	128
M0339M	128	0614M	64
M0457M	8	M0102M	32
M0680M	16	M0345M	256
M0798M	64	M0485M	64
M0804M	64	M0807M	32
M1039M	64	M0985M	256
M1106M	128	M1049M	256
M1115M	128	M1118M	256
M1271M	128	M1121M	32
M1467M	16	M1283M	128
		M1573M	256

Anexo 8: Títulos da atividade neutralizante dos anticorpos, contra a cepa AD169, em amostras séricas de mães transmissoras e não transmissoras, no momento do parto.

Transmissoras	Títulos	Não Transmissoras	Títulos	Não Transmissoras	Títulos
0059M	256	0062M	128	0321M	512
0187M	256	0188M	128	0516M	128
0292M	512	0174M	256	0506M	128
0511M	256	0318M	128	0614M	128
0513M	256	0502M	128	0808M	512
0533M	256	0512M	64	0963M	256
0609M	256	0805M	512	1023M	256
0853M	32	0974M	128	1078M	256
0956M	256	1022M	1024	1162M	256
1016M	128	1073M	128	1192M	256
1063M	256	1190M	256	1205M	256
1150M	64	1193M	256	1261M	256
1175M	256	1249M	1024	1372M	128
1195M	128	1367M	256	1472M	512
1254M	128	1470M	256	1565M	256
1380M	64	1605M	1024	1721M	256
1468M	32	1717M	256	1760M	512
1587M	128	1755M	256	1950M	256
1727M	64	1949M	256	2207M	256
1749M	256	2200M	512	2237M	16
1951M	512	2228M	512	2249M	256
2205M	64	2456M	256	2298M	256
2226M	128	2300M	256	2373M	128
2244M	512	2364M	256	2472M	128
2292M	512	2471M	128	2520M	256
2367M	256	2513M	256	2603M	512
2467M	256	2594M	256	2717M	256
2519M	128	2737M	512	2778M	256
2593M	256	2770M	256	M0113M	512
2761M	256	M0100M	512	M0102M	256
2775M	512	M0065M	256	M0169M	512
M0072M	256	M0161M	256	M0345M	256
M0074M	512	M0329M	256	M0485M	128
M0206M	256	M0484M	256	M0686M	256
M0339M	256	M0682M	256	M0777M	256
M0457M	256	M0775M	256	M0807M	128
M0680M	256	M0806M	256	M0843M	128
M0781M	128	M0840M	256	M0985M	256
M0798M	256	M0982M	256	M1049M	256
M0804M	128	M1041M	128	M1118M	256
M0981M	32	M1117M	256	M1121M	512

Transmissoras	Títulos	Não Transmissoras	Títulos	Não Transmissoras	Títulos
M1039M	64	M1120M	128	M1283M	512
M1106M	512	M1280M	256	M1456M	256
M1115M	512	M1459M	256	M1573M	256
M1271M	256	M1569M	256	0185M	128
M1467M	256	0077M	128		
M1562M	256				

Anexo 9: Títulos dos anticorpos, contra a cepa AD169, em amostras séricas de mães transmissoras, no início da gestação e após o parto.

Transmissora	Pre-parto	Parto
0059M	192	256
0292M	256	512
0533M	256	256
0609M	128	256
0956M	256	256
1063M	32	256
1587M	32	128
1749M	128	256
1951M	128	512
2292M	64	512
2367M	128	256
2467M	256	256
2519M	128	128
M0072M	128	256
M0074M	64	512
M0206M	128	256
M0339M	128	256
M0457M	8	256
M0680M	16	256
M0798M	64	256
M0804M	64	128
M1039M	64	64
M1106M	128	512
M1115M	128	512
M1271M	128	256
M1467M	16	256

Anexo 10: Títulos da atividade neutralizante dos anticorpos, contra a cepa AD169 , em amostras séricas de mães não transmissoras, no início da gestação e após o parto.

Não Transmissora	Pre-parto	Parto
0188M	64	128
2300M	256	256
2364M	64	256
2471M	128	128
2737M	256	512
M0065M	64	256
M0329M	128	256
M0484M	256	256
M0775M	256	256
M0806M	128	256
M0982M	256	256
M1280M	256	256
0077M	256	128
0321M	256	512
0516M	128	128
0614M	64	128
M0102M	32	256
M0345M	256	256
M0485M	64	128
M0807M	32	128
M0985M	256	256
M1049M	256	256
M1118M	256	256
M1121M	32	512
M1283M	128	512
M1573M	256	256