

Pesquisa de anticorpos IgG e IgM para citomegalovírus em parturientes e recém-natos do município de Presidente Prudente e região, Estado de São Paulo

Ageane Monteiro Oliveira¹, Adriana Duarte Leite¹, Vanessa Elena de Almeida Silva¹, Sueli Cristina Schadeck Zago¹, Luiz Euribel Prestes Carneiro¹ e Ricardo Alberto Moliterno^{2*}

¹Laboratório de Análises Clínicas, Universidade do Oeste Paulista, Rua José Bonjeovani, 700, Cidade Universitária, 19050-680, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. ²Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência.

RESUMO. A infecção primária pelo citomegalovírus (CMV) é freqüentemente seguida por infecção persistente e/ou recorrente. Na grande maioria dos casos a infecção é subclínica, podendo ser aguda em certas condições. O objetivo deste trabalho foi determinar por ELISA a freqüência de anticorpos IgG e IgM para CMV, em 86 parturientes e seus recém-natos (RNs) provenientes do Hospital Universitário Dr. Domingos Cerávolo, Presidente Prudente, Estado de São Paulo. Os dados demonstraram que 83 parturientes (96,5%) apresentaram anticorpos IgG anti-CMV e 3(3,5%) não apresentaram anticorpos anti-CMV. Quanto aos RNs, 1(1,2%) não apresentou anticorpos anti-CMV, 83(96,5%) apresentaram anticorpos IgG e 2(2,3%) apresentaram anticorpos IgM, caracterizando infecção aguda. Verificamos, assim, uma alta freqüência de anticorpos IgG para CMV em gestantes e RNs, bem como uma relativa alta freqüência de RNs infectados congenitamente pelo CMV nessa população, o que pode ter um impacto importante no número de crianças com problemas neurológicos e outros decorrentes da infecção por esse vírus.

Palavras-chave: CMV, anticorpos, parturiente, recém-nato, Presidente Prudente.

ABSTRACT. Evaluation of IgG and IgM anti-cytomegalovirus antibodies in parturient women and their newborns in the municipality of Presidente Prudente and region, State of São Paulo. Primary infection by Cytomegalovirus (CMV) is usually followed by a persistent and/or recurrent infection. In most cases the infection is sub-clinical, but it can eventually be acute. This paper aims to evaluate by ELISA the frequency of IgG and IgM anti-CMV antibodies in 86 samples of parturient women and their newborns living in Presidente Prudente, SP, and vicinities. The samples were collected at Dr.Domingos Cerávolo University Hospital. Three parturient women (3.5%) were negative for anti-CMV antibodies, and 83(96.5%) were positive for IgG only. About the newborns, 83(96.5%) were positive for IgG only, 2(2.3%) were positive for both antibodies, and 1(1.2%) was negative for both antibodies. Results showed a high frequency of IgG anti-CMV antibodies in parturient women and their newborns. Moreover, we detected a relative high frequency of CMV congenitally infected newborns in this population, which might have an important impact on the amount of children with neurological and other diseases due to the virus infection.

Key words: CMV, antibodies, parturient, newborn, Presidente Prudente.

Introdução

O CMV é considerado um vírus emergente, o qual pertence ao gênero *Herpes*, da família Herpesviridae, que acomete cerca de 85% da população (Mercatelli *et al.*, 1998). A infecção por CMV ocorre praticamente em todas as regiões do mundo e a prevalência de anticorpos aumenta com a

idade, atingindo níveis máximos após 25 anos (Carvalho *et al.*, 1976). Existe uma nítida relação entre a prevalência de anticorpos numa determinada população adulta e seu nível socioeconômico, variando de 40% a 60% em populações de alto nível e 80% a 100% em populações de baixa renda (Balthesen *et al.*, 1993).

O risco de infecção por esse agente começa já na vida intra-uterina e no período perinatal, podendo

ocorrer, também, na infância ou na idade adulta como infecção adquirida. A infecção congênita pelo CMV é uma das mais frequentes em todo o mundo. Sua incidência varia de 0,24% a 2,2%, sendo transmitida não apenas na primeira infecção, mas também nas infecções recidivantes (Santos *et al.*, 2000). Na grande maioria dos casos a infecção é subclínica. No entanto, sob certas condições específicas, como em pacientes com deficiência imunológica ou em crianças com infecções congênitas, pode manifestar-se com seqüela neurológica grave e, muitas vezes, conduzir à morte (Yamamoto *et al.*, 1998). A forma mais grave é denominada “doença da inclusão citomegálica”, caracterizada por icterícia, hepatoesplenomegalia, microcefalia e calcificações cerebrais. O vírus pode ser encontrado na saliva, urina e em outros fluidos corpóreos como no sêmen e na secreções vaginais (Canto *et al.*, 2000; Ferreira e Ávila, 1996).

O diagnóstico clínico da infecção é extremamente difícil de ser firmado e depende, em última análise, da confirmação laboratorial. A infecção pré-natal e a doença no RN (recém-nascido) podem ser detectadas pela pesquisa de anticorpos IgG e IgM (Pannuti *et al.*, 1983). A cultura de células obtidas do líquido amniótico e a detecção do vírus por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) são métodos mais precisos, porém inviáveis de serem aplicados na rotina da maioria dos laboratórios de análises clínicas, por exigirem equipamentos, reagentes e instalações físicas especiais (Fowler *et al.*, 1993; Weirich, 1998). Em nossa região não se realiza a pesquisa de anticorpos para CMV em gestantes e doadores de sangue, e não se conhece o perfil de infecção da população.

Assim, o objetivo deste trabalho é evidenciar a frequência de anticorpos IgG e IgM para CMV em gestantes e seus RNs pelo método de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), acompanhando a evolução da doença pela titulação dos anticorpos específicos até o terceiro mês de vida. Os resultados obtidos em Presidente Prudente também foram comparados com outros estudos populacionais.

Material e métodos

Foram estudadas amostras de sangue coletadas de 86 parturientes e seus respectivos RNs, entre maio e outubro de 2000, provenientes do Hospital Universitário “Dr. Domingos Cerávolo”, município de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. A idade das parturientes variou de 15 a 40 anos.

As amostras de sangue periférico das parturientes e sangue do cordão umbilical dos RNs foram

coletadas na hora do parto. Essas amostras foram centrifugadas e o soro obtido foi estocado a -4°C até seu processamento. Para realização das dosagens dos anticorpos IgG e IgM para CMV foi utilizado kit comercial da DiaSorin, pelo qual se emprega um teste imunométrico baseado na técnica de ELISA.

Para IgG específica anti-CMV foi utilizada a determinação quantitativa. Aos poços de microplacas, recobertos com CMV inativado, adicionaram-se as amostras diluídas 1:101 em tampão PBS (*Phosphate Buffer Saline*) e incubou-se por 1 hora a 37°C . Após lavagem dos poços-controle e testes com solução tampão PBS, adicionou-se o conjugado enzimático IgG monoclonal de camundongo anti-IgG humana, conjugada com peroxidase de rábano (HRP), seguido de incubação a 37°C por 1 hora. A presença de IgG específica anti-CMV permite que o conjugado se ligue à fase sólida, sendo a atividade enzimática proporcional à concentração de IgG anti-CMV presente nas amostras. Essa atividade foi medida pela adição de uma solução incolor de tetrametilbenzidina, peróxido de hidrogênio e sulfóxido de dimetila. A ação de HRP sobre essa solução produziu uma coloração que, após 30 minutos à temperatura ambiente, foi interrompida pela adição de solução de ácido sulfúrico 0,4N. A coloração produzida foi medida por um fotômetro com o filtro de 450/630 nm.

Para a determinação qualitativa de IgM específica anti-CMV, foi usado um teste imunométrico de captura de anticorpos, baseado na técnica de ELISA. Aos poços recobertos com IgG (monoclonal de camundongo) anti-IgM humana, adicionaram-se as amostras diluídas 1:101 com solução de tampão PBS e incubou-se por 1 hora a 37°C . Após lavagem com tampão PBS, adicionou-se o antígeno de CMV, juntamente com o conjugado enzimático (IgG monoclonal de camundongo) anti-CMV conjugada com HRP e incubou-se por 1 hora a 37°C . A presença de IgM específica anti-CMV permite que o conjugado se ligue à fase sólida através da presença do antígeno de CMV. A atividade enzimática é, portanto, proporcional à concentração de IgM anti-CMV presente nas amostras, sendo essa atividade medida pela adição de tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio, contendo sulfóxido de dimetila. A ação da enzima produziu uma coloração que, após 30 minutos à temperatura ambiente, foi interrompida pela adição de uma solução de ácido sulfúrico 0,4N. A coloração produzida foi medida por um fotômetro com o filtro de 450/630 nm.

Nos casos positivos para IgM, foram dosadas amostras de sangue das mães e seus respectivos RNs três meses após o nascimento.

Resultados

Das parturientes estudadas, 33% tinham idade entre 21-25 anos e apenas 1% entre 36-40 anos (Figura 1). A maioria eram primíparas (38%), enquanto que 6,3% possuíam 5 ou mais filhos (Figura 2).

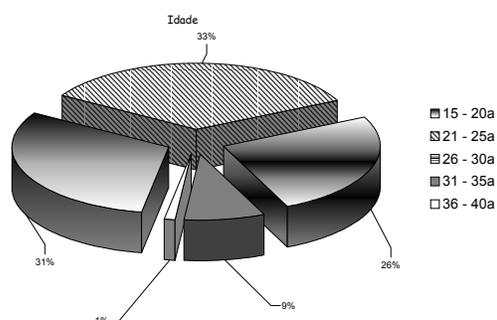


Figura 1. Distribuição da faixa etária de 86 parturientes pesquisadas para anticorpos anti-CMV, atendidas no Hospital Universitário Dr. Domingos Cerávolo, de maio a outubro de 2000, Presidente Prudente, Estado de São Paulo, Brasil . (a=anos)

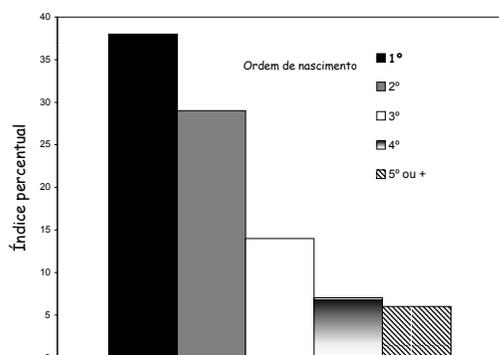


Figura 2. Distribuição do percentual de 86 parturientes, pela ordem de nascimento do filho analisado, pesquisadas para anticorpos anti-CMV, atendidas no Hospital Universitário Dr. Domingos Cerávolo, de maio a outubro de 2000, Presidente Prudente, Estado de São Paulo, Brasil

Na Tabela 1 verifica-se que de 86 parturientes estudadas, 83 (96,5%) apresentaram anticorpos IgG anti-CMV. Apenas 3 (3,5%) foram negativas tanto para IgG quanto para IgM. Em relação aos RNs, também 83 de 86 (96,5%) indivíduos testados apresentaram anticorpos IgG anti-CMV. No entanto, 2 (2,3%) apresentaram, concomitantemente, anticorpos IgM, os quais negativaram 3 meses após o nascimento. Não foram

observados sintomas clínicos de infecção por CMV nessas crianças. Apenas um recém-nascido não apresentou anticorpos anti-CMV.

Tabela 1. Distribuição dos resultados da pesquisa de anticorpos anti-CMV entre 86 parturientes e seus RNs, atendidas no Hospital Universitário Dr. Domingos Cerávolo, de maio a outubro de 2000, Presidente Prudente, Estado de São Paulo, Brasil

Amostra	Ao nascimento		Três meses após nascimento				
	IgG	IgM	IgG		IgM		
Parturientes	83	3	0	86	-	-	-
RN	83	3	2	84	2	0	0

Reagente (R), Não-Reagente (NR). A determinação de anticorpos foi realizada em soro coletado por ocasião do parto nas mães e nos RNs. Naqueles positivos para IgM foi realizada uma nova determinação após 3 meses

Também não foi observada correlação entre o título de anticorpos IgG anti-CMV e a idade das parturientes (dados não mostrados).

Discussão

A resposta imunitária contra o CMV envolve síntese de anticorpos da classe IgM algumas semanas após a infecção, seguida de síntese de anticorpos da classe IgG. Os níveis de IgM anti-CMV geralmente aumentam por algumas semanas e depois diminuem lentamente no decorrer de quatro a seis meses. Ocasionalmente, a IgM pode permanecer na circulação por anos (Ministério da Saúde, 1999).

Dada a alta sensibilidade dos imunoenaios atuais, os níveis de IgM podem demorar a negativar-se, o que explicaria o dado antigo de até 40% dos pacientes, previamente expostos, poderem cursar com IgM ainda positiva por até alguns anos (Pannuti *et al.*, 1987).

Um resultado negativo para IgG indica que a imunidade não foi adquirida, mas não exclui uma infecção aguda, a menos que o teste de IgM também seja negativo. Deve ser ressaltado que o teste de IgG geralmente é negativo durante as primeiras duas ou três semanas após infecção, havendo um risco potencial para o feto. A imunidade da gestante, portanto, deve ser testada em intervalos regulares durante toda a gravidez, para excluir uma infecção aguda por CMV (Ferreira e Ávila, 1996).

Resultado positivo para IgM é indicativo de infecção recente (até oito meses antes do teste) ou infecção secundária (reativação do vírus latente ou reinfeção). Isso está bem claro no estudo feito por Ianhes (1984) em pacientes submetidos a transplante renal. A maioria dos pacientes que apresentaram anticorpos IgM anti-CMV, no pós-transplante, já tinham anticorpos IgG para o CMV antes do transplante, configurando, portanto, uma reativação

da infecção. Um resultado negativo para IgM, porém, nem sempre descarta uma infecção aguda por CMV, pois a infecção pode estar no seu estágio inicial, quando o paciente ainda não foi capaz de sintetizar IgM específica anti-CMV, ou, ainda, quando o paciente se apresenta imunocomprometido (Ministério da Saúde, 1999).

Segundo Carvalho *et al.*, (1976), após os 16 anos de idade há elevação progressiva da taxa de positividade de anticorpos anti-CMV, indicando que a infecção primária pode dar-se mesmo em adultos, o que não é comum na maioria das viroses. Sessenta e quatro por cento das pacientes por nós estudadas eram jovens com idade variando entre 15 e 25 anos. Dados semelhantes foram obtidos por Santos e cols. (2000) que, ao analisarem a infecção em gestantes e RNs pela técnica de PCR, encontraram idades médias de 26 anos. Weirich (1998), pesquisando tanto anticorpos quanto o antígeno em gestantes e RNs, verificou a maior incidência em gestantes com idade média de 22 anos.

O fato de as crianças apresentarem anticorpos IgG para o CMV é explicado pela passagem passiva desses anticorpos pela placenta. A alta prevalência de anticorpos IgG anti-CMV neste estudo pode ser devido ao baixo nível socioeconômico da população estudada.

É consenso de inúmeros autores que a prevalência de anticorpos anti-CMV é mais elevada em populações e países menos desenvolvidos. A habitação comum e a má higiene pessoal facilitam a disseminação precoce do vírus (Santos *et al.*, 2000; Pass, 1985). Isso está de acordo com os dados obtidos em nosso trabalho, cuja população é proveniente de região de baixo poder aquisitivo.

Os resultados deste estudo indicam que a infecção pelo CMV é freqüente entre as gestantes de Presidente Prudente, pois 96,5% das parturientes examinadas foram contaminadas em alguma época por esse vírus. Resultado semelhante foi relatado por Carvalho *et al.*, (1976) em uma população da cidade de São Paulo.

Os resultados podem também ser comparados com estudos populacionais semelhantes, sendo que, em alguns deles, aplicaram-se técnicas com maior sensibilidade e maior especificidade como PCR, FC (Fixação do complemento) e cultura de células (Fortuna *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 2000). Isso nos permite concluir que a técnica imunoenzimática ELISA apresenta plena concordância nos resultados, possibilitando, assim, que reagentes comerciais, em termos práticos, possam competir com outras técnicas no diagnóstico rotineiro da infecção pelo CMV.

Acredita-se que o estudo contribuirá para que se tenha uma visão mais ampla do risco da infecção pelo CMV em gestantes e seus recém-nascidos, na população de baixa renda do município de Presidente Prudente e região, bem como dará subsídios para uma ação mais efetiva dos órgãos de saúde pública no acompanhamento de crianças infectadas intra-uterinamente pelo CMV, no sentido de evitar seqüelas mais graves da doença.

Referências

- BALTHESSEN, M. *et al.* Lungs as a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *J. Virol.*, Washington DC, v.67, n.9, p.5360-5366, 1993.
- CANTO, C.L.M. *et al.* Cytomegalovirus infection in children with Down syndrome in a day-care center in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v. 42, n.4, p.179-183, 2000.
- CARVALHO, R.P. *et al.* Estudo soro- epidemiológico da infecção pelo citomegalovírus em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.18, n.1, p.1-5, 1976.
- FERREIRA W.A, ÁVILA S.L.M. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- FOWLER K.B. *et al.* Maternal age and congenital cytomegalovirus infection: Screening of two diverse newborn populations, 1980-1990. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.168, n.3, p. 552-556, 1993.
- FORTUNA, E.S. *et al.* Prevalência da infecção pelo citomegalovírus e pelo vírus da imunodeficiência humana numa população de presidiários em São Paulo. *Rev. Laes e Haes*, São Paulo, v. 14, p. 36-37, 1993.
- IANHES, L.E. Infecção por citomegalovírus pós transplante renal. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*, São Paulo, v.39, n.2, p.47-53, 1984.
- MERCATELLI, C. *et al.* Citomegalovírus. *Rev. Laes e Haes*, São Paulo, v. 17, p.62-64, 1998.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de controle de doenças sexualmente transmissíveis. Brasília, v.3, p.12-13, 1999.
- PANNUTI, C.S. *et al.* Síndrome "mononucleose simile" na infância. Incidência da infecção por citomegalovírus diagnosticada através de detecção imunoenzimática de anticorpos IgM. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.25, n.6, p.300-304, 1983.
- PANNUTI, C.S. e cols. Detecção de anticorpos IgM nas infecções primárias e secundárias pelo citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante renal. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.29, n.5, p.317-322, 1987.
- PASS, R.F. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.152, n.2, p.243-246, 1985.
- SANTOS, D.V.V. *et al.* Congenital cytomegalovirus infection in a neonatal intensive care unit in Brazil evaluated by PCR and association with perinatal aspects.

Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, São Paulo, v.42, n.3, p.129-132, 2000.

WEIRICH, J. Infecção congênita pelo citomegalovírus: estudo realizado na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v.31, n.3, p.325-326, 1998.

YAMAMOTO, A.Y e cols. Diagnóstico de infecção congênita e perinatal por citomegalovírus utilizando a reação em cadeia da polimerase. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v.31, n.1, p.19-26, 1998.

Received on March 26, 2002.

Accepted on May 20, 2002.