

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

**DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL
EM LÍQUIDO AMNIÓTICO,
NO MOMENTO DO PARTO, DE
GESTANTES INFECTADAS PELO VÍRUS
DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA-1**

ANA CHRISTINA DE LACERDA LOBATO

**Belo Horizonte
2008**

ANA CHRISTINA DE LACERDA LOBATO

**DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL
EM LÍQUIDO AMNIÓTICO,
NO MOMENTO DO PARTO, DE
GESTANTES INFECTADAS PELO VÍRUS
DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA-1**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde da Mulher.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo de Melo.

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Regina Amélia Lopes Pessoa de Aguiar.

Faculdade de Medicina da UFMG

Belo Horizonte

2008

L796d Lobato, Ana Christina de Lacerda.
Determinação da carga viral em líquido amniótico, no momento do parto, de gestantes infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana-1 [manuscrito]./ Ana Christina de Lacerda Lobato. - - Belo Horizonte, 2008. 98f. : il.

Orientador: Victor Hugo de Melo.
Co-orientadora: Regina Amélia Lopes Pessoa de Aguiar.
Área de concentração: Saúde da Mulher.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. HIV. 2. Gestantes. 3. Líquido amniótico. 4. Carga viral. 5. Dissertações acadêmicas. I. Melo, Victor Hugo de. II. Aguiar, Regina Amélia Lopes Pessoa de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NLM : WC 503

Aos meus pais, pelo aprendizado e carinho.

Ao Marcelo, pela cumplicidade.

À vovó Cacilda, pelo amor eterno.

AGRADECIMENTOS

Diversas pessoas contribuíram para a realização desta dissertação. Agradeço e expresso meu reconhecimento a algumas delas:

Ao Prof. Dr. Victor Hugo de Melo, pela orientação neste trabalho, pelo imenso crédito, ensinamentos pessoais e profissionais.

À Profa. Dra. Regina Amélia Lopes Pessoa de Aguiar, pela orientação neste trabalho, pelo incansável incentivo, pela contribuição em minha formação obstétrica e pessoal, pela imensa disponibilidade, pela confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Henrique Vitor Leite, pelo incentivo, pelas oportunidades concedidas e, principalmente, pelo primoroso exemplo de liderança.

À Dra. Agdemir Waléria Aleixo, pela disponibilidade, atenção e grandes observações.

Ao Manoel Cordeiro de Castro, pela pronta disponibilidade nas coletas e transporte dos materiais e pelo eterno bom-humor.

Aos residentes e aos grandes amigos plantonistas da ginecologia e obstetrícia do HC-UFMG, pelo apoio e ajuda na coleta de dados.

Ao Dr. Jorge de Andrade Pinto, pela oportunidade, e à Dra. Fabiana Maria Kakehasi, pela ajuda na busca de resultados.

À Profa. Myrian Celani, pelos conselhos e incentivo, pelas conversas maravilhosas, pelo exemplo único de relação médico-paciente e por me ensinar que "...eu, passarinho".

Às Dras. Giovanna Dinelli Santa-Cecília, Isabela Melo Apocalypse e Madalena Martins, pelo apoio e amizade.

À Dra. Ines Katerina Damasceno Cavallo e Dr. Willian Schneider da Cruz Krettli, pelos bons momentos compartilhados, pelo apoio, pelo auxílio na elaboração deste trabalho e pela amizade.

Às Dras. Beatriz Amélia Monteiro de Andrade e Inessa Beraldo de Andrade Bonomi, pelas revisões e palpites, pelos grandes momentos divididos no Hospital das Clínicas (HC), pelo inquestionável apoio e amizade.

À Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Carvalho, pelos conselhos, carinho e grande torcida.

À minha família, especialmente aos meus pais, Maria Ângela e Ilídio, pelo exemplo de luta, pelo apoio e incentivo de sempre.

À Dra. Emília Maria Valentim Lobato de Vargas, Dr. Pedro Elias Vargas Rodriguez e Mary Túlia Vargas Lobato, pelo grande exemplo e carinho.

Ao Marcelo, pela força e paciência, pelo exemplo de perseverança e por todo o carinho, compreensão e cumplicidade nestes anos.

A Daniela, Renato, Isabela, Kilder e Adriana, por torcerem muito e estarem sempre ao meu lado.

Ao grupo de pesquisa materno-infantil do HC/UFMG, em especial Beatriz, Regina, Victor e Inês, pelas deliciosas reuniões científicas, com grande aprendizado pessoal e profissional, pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao Centro de Pós-graduação, pelo incentivo financeiro para a dosagem das amostras colhidas.

À Biomérieux, por acreditarem neste trabalho, especialmente ao Marcos Mancessini e à Tatiana, pela disponibilidade, pelo apoio e suporte científico.

A todas as pacientes, sem as quais este estudo não teria sido possível.

RESUMO

Objetivo: avaliar a possibilidade de detecção do HIV em amostras de líquido amniótico obtido no momento do parto, de gestantes infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e correlacionar os níveis de carga viral no líquido amniótico com os valores encontrados no sangue periférico materno e do recém-nascido. **Métodos:** foram recrutados 40 binômios. Todas as gestantes foram submetidas à cesariana eletiva. Realizou-se coleta de sangue periférico das puérperas e de seus recém-nascidos, com quantificação imediata da carga viral. A metodologia usada para quantificação da carga viral em sangue periférico foi *branched-chain* ácido desoxirribonucléico (bDNA). O líquido amniótico foi coletado durante a cirurgia e armazenado a -70°C . Todas as amostras foram dosadas em tempo único utilizando-se o *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification* (NASBA) *NucliSens easy MAG* (Biomérieux). Comparou-se a carga viral detectada em líquido amniótico com a encontrada em sangue periférico. **Resultados:** a mediana de idade das pacientes avaliadas foi de 28,5 anos e a mediana de consultas pré-natais a que compareceram foi de oito. Quanto à época de início de pré-natal, 13 pacientes (32,5%) iniciaram no primeiro trimestre e 17 (42,5%) no segundo trimestre de gestação. A carga viral sérica materna no momento do parto variou de <50 cópias/mL a 99.882 cópias/mL. Avaliando a dosagem de células CD4 no puerpério observou-se que cinco pacientes (13,9%) apresentaram contagem <200 cels/mm³, 16 (44,5%) entre 200 e 499 e 15 (41,6%) maior que 500 cels/mm³. Caracterizando os recém-nascidos quanto ao peso e à idade gestacional ao nascimento, oito (20%) tinham baixo peso (<2500 gramas) e três (7,5%) eram pré-termos (menos de 37 semanas). Apenas um recém-nascido apresentou carga viral positiva coletada pós-parto imediato, com negatificação da mesma após dois meses de vida. Os recém-nascidos (RNs) foram seguidos até o terceiro mês de vida, 38 eram sororrevertor e dois perderam o seguimento. Quanto à dosagem da carga viral no líquido amniótico, três amostras foram positivas; duas destas foram novamente reextraídas, amplificadas e quantificadas com detecção positiva em apenas uma delas. Todas as pacientes que apresentaram carga viral detectável no líquido amniótico possuíam carga viral indetectável pré-parto e após o parto, assim como seus recém-nascidos. **Conclusão:** foi possível detectar o vírus da imunodeficiência humana no líquido amniótico, mas não houve correlação dessa detecção com os valores da carga viral sérica materna e do recém-nascido.

Palavras-chave: HIV. Transmissão vertical. Líquido amniótico. Fatores de risco. Carga viral.

ABSTRACT

Objectives: evaluate possibility to HIV detection in amniotic fluid, collected at delivery, in HIV positive pregnant and to compare viral load in this fluid with the maternal and newborn child blood samples. **Methods:** we enrolled 40 HIV-1 positive women with healthy, singleton pregnancies and newborn child. All of them were submitted to elective cesarean section. The bDNA was used to determinated of maternal and child plasma viral load. Blood samples were collected after delivery. The amniotic fluid was obtained during surgery and was stored at -70° C. The NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) NucliSens easyMAG (*Biomérieux*) was used for quantification of amniotic fluid viral load. The viral load in maternal and child blood and amniotic samples were compared. **Results:** the median age of women was 28,5 years. The median of prenatal visits was 8 during pregnancy. 13 (32,5%) patient began pre-natal in first trimester and 17 (42,5%) began in second trimester. Maternal plasma viral load after delivery range <50 to 99.882 copies/ml. CD4 lymphocyte count, at the same time, was: 5 (13,9%) < 200 cels/mm³, 16 (44,5%) 200 to 499 cels/mm³ and 15 (41,6%) > 500 cels/mm³. Newborn infant characteristics were: eighth (20%) infants had weight less than 2500g and 3 (7,5%) were preterm (less than 37 weeks). One child had plasma viral load positive at delivery, but it became negative after 2 month. 38 children were HIV negative after 3 month. Three samples amniotic fluid viral load were positive. In the two samples viral load was repeated and one sample remained positive. All of mothers with amniotic fluid viral load positive had plasma viral load undetectable during pregnancy and after delivery. The mother of the child who had viral load positive after birth also had plasma viral load undetectable after delivery. **Conclusion:** HIV-1 RNA was detectable in amniotic fluid but we wouldn't identify co-relation with mother and child plasma viral load.

Keywords: HIV. Vertical transmission. Amniotic fluid. Risk factors. Virus load.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1a - Incisão uterina durante a cesariana.....	40
FIGURA 1b - Divulsão uterina, após incisão, para expor a membrana amniótica.....	40
FIGURA 2 - Coleta do líquido amniótico.....	41
FIGURA 3 - Imagem positiva da fluorescência emitida pelo <i>Easy</i> <i>Q</i> analisador.....	42
FIGURA 4 - Imagem negativa da fluorescência emitida pelo <i>Easy</i> <i>Q</i> analisador.....	42
FIGURA 5a - Extração das amostras.....	45
FIGURA 5b - Tubos de lise.....	45
FIGURA 6a - Amostras no miniMag.....	46
FIGURA 6b - Processo de lavagem das amostras.....	46
FIGURA 7a - Termomixer.....	47
FIGURA 7b - Eluídos.....	47
FIGURA 8 - <i>Nuclisens Easy Q</i> analisador.....	48

Gráficos

GRÁFICO 1 - Caracterização das pacientes quanto ao estado civil no momento do estudo.....	52
GRÁFICO 2 - Carga viral sérica materna no periparto.....	54

Quadro

QUADRO 1 - Características da performance do <i>Nuclisens Easy Q</i> .	43
------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Caracterização das pacientes quanto à idade cronológica (em anos), escolaridade (em anos) e paridade no momento da inclusão no estudo.....	50
TABELA 2 - Caracterização das pacientes quanto ao número de consultas pré-natais, época de início pré-natal e tempo de diagnóstico (em anos), no momento da inclusão no estudo.....	51
TABELA 3 - Caracterização das pacientes quanto ao uso de anti-retrovirais durante a gestação.....	52
TABELA 4 - Caracterização das pacientes quanto à indicação da cesariana como via de parto.....	53
TABELA 5 - Avaliação da carga viral (cópias/mL) e do valor da contagem de células CD4 (cels/mm ³) maternas no terceiro trimestre de gestação e após o parto.....	54
TABELA 6 - Caracterização das pacientes baseada no <i>Center for Disease Control and Prevention</i> (CDC), durante a gestação.....	55
TABELA 7 - Caracterização dos recém-nascidos quanto à idade gestacional (em semanas), peso (em gramas) e apgar de primeiro e quinto minutos de vida, na inclusão no estudo.....	56
TABELA 8 - Resultado das amostras de líquido amniótico positivas para HIV-1.....	59
TABELA 9 - Resultado comparativo das amostras de líquido amniótico positivas para HIV-1 com os valores da carga viral plasmática materno e neonatal.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome de imunodeficiência adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARV	Anti-retroviral
AZT	Zidovudina
bDNA	<i>Branched-chain</i> ácido desoxirribonucléico
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIUR	Crescimento intra-uterino restrito
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CV	Carga viral
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
gp 41	Glicoproteína 41
gp120	Glicoproteína 120
HAART	<i>Highly active antiretroviral therapy</i>
HC	Hospital das Clínicas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de confiança
IF	Imunofluorescência indireta
IgM	Imunoglobulina M
LA	Líquido amniótico
NASBA	<i>Nucleic acid sequenced based amplification</i>
NIP	Número de identificação pessoal
OR	<i>Odds ratio</i>
p24	Proteína 24

PACTG	<i>Pediatric Aids Clinical Trials Group</i>
PBMCS	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Rh	<i>Rhesus</i>
RIPA	<i>Radio immunoprecipitation assay</i>
RN	Recém-nascido
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotação por minuto
RR	Risco relativo
RT	Transcrição reversa
TARV	Terapia anti-retroviral
TV	Transmissão vertical
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI	Unidades internacionais
WB	<i>Western-blot</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 LITERATURA.....	18
2.1 Primórdios da infecção.....	19
2.2 O vírus da imunodeficiência humana.....	20
2.3 Métodos diagnósticos.....	22
2.3.1 Detecção do HIV em outros fluidos corporais.....	24
2.3.1.1 Líquido amniótico.....	25
2.4 Transmissão vertical.....	28
2.4.1 Fatores de risco.....	28
2.4.2 Medidas profiláticas.....	30
2.4.3 Transmissão intra-útero x transmissão intraparto.....	31
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivo específico.....	36
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	37
4.1 Critérios de seleção.....	38
4.2 Métodos.....	39
4.2.1 Líquido amniótico.....	39
4.2.1.1 Coleta.....	39
4.2.1.2 Dosagem da carga viral.....	41
4.2.1.3 NASBA (<i>Nucleic Acid Sequence-Based Amplification</i>) <i>Nuclisens Easy Q</i>	41
4.2.1.3.1 Extração das amostras.....	43
4.2.1.3.2 Lavagem do tampão.....	45

4.2.1.3.3 Eluição.....	46
4.2.1.3.4 Amplificação e detecção.....	47
4.2.2 Sangue periférico (coleta e quantificação da carga viral).....	48
5 RESULTADOS.....	49
5.1 Características maternas.....	50
5.2. Características dos recém-nascidos.....	56
5.3 Dosagem da carga viral no líquido amniótico.....	57
6 DISCUSSÃO.....	60
6.1 Características maternas e dos recém-nascidos.....	62
6.1.1 Características das pacientes e recém-nascidos que apresentaram carga viral detectável no líquido amniótico.....	66
6.2 Líquido amniótico, carga viral detectável x indetectável.....	68
7 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICES E ANEXO.....	83

1 Introdução

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), reconhecido em 1983, é o responsável pela maior epidemia mundial do último século. O programa das Nações Unidas para o HIV/AIDS¹ estimou, para o final de 2007, que 33,2 milhões de pessoas viveriam com o HIV em todo o mundo. As mulheres representam metade desse total, aproximadamente 15,4 milhões, e estão sob risco mais alto de infecção, especialmente em localidades em que a via de contaminação heterossexual é a predominante. Estima-se que 85% dessas mulheres estejam em idade reprodutiva, o que chama atenção especial para a prevenção da transmissão vertical do HIV.¹

A transmissão vertical é responsável por aproximadamente 99% dos casos de crianças infectadas pelo HIV. Em dezembro de 2007 estimou-se que 2,5 milhões de crianças abaixo de 15 anos estavam infectadas.¹

Minha formação em Obstetrícia e Ginecologia muito influenciou a decisão de fazer pós-graduação. No Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) tive contato com profissionais competentes e admiráveis. Muitos me incentivaram a trabalhar com esta área de pesquisa: pacientes portadoras do HIV. A busca por mais conhecimentos dos fatores de risco e medidas profiláticas visando a reduzir as taxas de transmissão do vírus estimulou-me a ingressar neste e em outros projetos. Iniciei-me, então, nesta estrada, trabalhando mais intensamente com pré-natal de alto risco no grupo de pacientes portadoras do HIV.

O grupo materno-infantil HIV/AIDS é referência na assistência às gestantes HIV positivas na Faculdade de Medicina e Hospital das Clínicas da UFMG e têm uma importante linha de pesquisa nesta área. Os esforços são contínuos na procura de mais conhecimentos sobre a infecção pelo HIV. É de reconhecida importância o diagnóstico em gestantes, com o

intuito de serem adotadas medidas profiláticas capazes de reduzir significativamente a taxa de transmissão vertical.

As medidas adotadas durante o pré-natal e intraparto já são bem definidas. O estudo proposto busca o melhor conhecimento da transmissão intra-útero, avaliando a presença do HIV e sua quantificação no líquido amniótico, comparando os valores encontrados com a carga viral detectada no sangue periférico materno e do recém-nascido após o parto.

A detecção do HIV no líquido amniótico e sua quantificação comparada com a carga viral sérica materna e do recém-nascido periparto poderia estabelecer correlação com a transmissão vertical intra-útero e dar início à identificação de fatores de risco e formas de profilaxia mais eficazes.

2 Literatura

2.1 Primórdios da infecção

Desde os relatos dos primeiros casos da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) no início da década de 1980 até o isolamento e identificação do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) como agente causador da síndrome, em 1983-1984, os pesquisadores vêm buscando o rápido conhecimento da fisiopatogenia da AIDS, do complexo ciclo replicativo do HIV-1 e métodos laboratoriais capazes de auxiliar no diagnóstico da afecção.²

Existem dois retrovírus capazes de levar à AIDS: o HIV-1 e o HIV-2. Este último tem sido descrito em diferentes regiões do mundo, mas sempre em indivíduos que tiveram algum contato com o continente africano ou sua população.³ Em 1985, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou os primeiros testes para detecção do HIV.⁴

Nos primórdios da infecção, início dos anos 80, a doença era encontrada em homens homossexuais e usuários de drogas injetáveis, o grupo de risco também incluía haitianos, hemotransfundidos, prisioneiros e africanos.⁴ No decorrer dos anos a infecção passou a ser observada em mulheres que tinham contato com parceiros infectados e crianças. A disseminação da doença se deu de forma rápida e a busca pelo conhecimento das formas de infecção, profilaxia e tratamento tornou-se mandatória.

A predominância heterossexual da transmissão do HIV transforma as mulheres em um grande grupo de risco para adquirir a infecção. Parcela significativa delas encontra-se em idade reprodutiva, portanto, a concomitância de uma gestação com a infecção materna pelo HIV não pode ser considerada evento raro.⁵

Estimou-se, no final de 2007, que 15,4 milhões de mulheres em todo o mundo eram portadoras do HIV. Por outro lado, 420 mil crianças abaixo de 15 anos foram infectadas naquele ano, sendo que em mais de 90% delas a infecção ocorreu durante a gravidez ou no período do aleitamento materno. Além disso, havia na América Latina 1,6 milhões de pessoas vivendo com o vírus, dos quais 36% (612 mil) eram mulheres.¹

Sem dúvidas, as pesquisas dos últimos anos possibilitaram melhor entendimento e conhecimento dos fatores que aumentam a transmissão perinatal do HIV-1,⁶ fato que possibilitou, dentro do possível, equacionar os recursos para combate a esta forma de transmissão do vírus. No Brasil, o estímulo à pesquisa ativa da infecção com o exame sorológico aconselhado para todas as gestantes e a implementação progressiva de medidas pré-natais, obstétricas e pós-natais apropriadas fizeram com que os percentuais de transmissão vertical (TV) desse vírus se reduzissem, paulatinamente, de 34,8% no início da década de 90 para 1,2% nos dois últimos anos.⁷

2.2 O vírus da imunodeficiência humana

O vírus da imunodeficiência humana, conhecido como HIV (sigla originada do inglês: *human immunodeficiency virus*), pertence à classe dos retrovírus, na subfamília dos lentivírus. Ao entrar no organismo humano, pode ficar silencioso e incubado por muitos anos. O HIV age no interior das células do sistema imunológico, atingindo preferencialmente células que expressam molécula CD4 em sua superfície, tais como os linfócitos T CD4+, usando-os para se replicar.⁷

Uma partícula infecciosa do HIV consiste de dois filamentos idênticos de RNA, acondicionados dentro de um centro de proteínas virais e cercado

por um envoltório de bicamada lipídica derivada da membrana celular do hospedeiro, mas incluindo proteínas da membrana codificadas viralmente.⁸

Na primeira fase da infecção ocorre a ligação de alta afinidade da glicoproteína viral gp120 às moléculas CD4 presentes na superfície de uma célula T ou de um fagócito mononuclear. Após a ligação, as partículas do HIV penetram na célula por fusão direta da membrana, sendo o processo facilitado pelas moléculas da glicoproteína viral gp41. Esse processo é dependente de co-receptores expressos na membrana das células-alvo, sendo os mais bem definidos as quimiocinas que incluem a CCR5 e a CXCR4. Estas moléculas estão expressas nas células T, nos monócitos teciduais e em outros tipos de células.⁸

Na infecção pelo HIV e na progressão da imunossupressão, além das células T CD4+, dois outros tipos de células exercem importante papel: os macrófagos e as células dendríticas foliculares. Os macrófagos expressam CD4 e receptores de quimiocinas como o CCR5, podendo se tornar reservatório para o vírus. As células dendríticas foliculares dos centros germinativos do baço e linfonodos também aprisionam grande quantidade do HIV.⁸

Cepas do HIV podem ser divididas de acordo com o tropismo preferencial para infectar células da linhagem macrófágica ou células da linhagem linfocítica. O que determina esse tropismo preferencial são os co-receptores de membranas. Cepas linfocítico-trópicas utilizam o co-receptor CXCR4, ao passo que as macrófágico-trópicas utilizam o receptor CCR5.⁹ A infecção pelo HIV é crônica. O vírus se replica constantemente, sem ser eliminado. No sangue ele pode estar associado às células sob forma de provírus integrado ao genoma celular, mas aparece também sob a forma livre (virion infeccioso), produto da replicação ativa do vírus.

2.3 Métodos diagnósticos

Os testes laboratoriais caminham lado a lado com o rápido conhecimento da fisiopatogenia da AIDS e do complexo ciclo replicativo do HIV-1.¹⁰

Finalmente, em 1985, os testes dos doadores de sangue passaram a ser disponíveis, rotineiramente, a partir do primeiro *kit* de ensaio imunoenzimático *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), que estabeleceu HIV-1 ELISA como a primeira ferramenta de triagem diagnóstica.¹¹ A sua implantação ocorreu, primeiramente, nos bancos de sangue e, posteriormente, como método diagnóstico para os indivíduos com risco de infecção pelo HIV-1.

O método laboratorial mais direto para detectar HIV-1 em pacientes é a cultura do vírus por meio do cocultivo de células mononucleares do sangue periférico, plasma ou células ganglionares, com estimulação de *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) de doadores não infectados.¹² Esse método tem alto custo, pressupõe uma equipe de técnicos treinados e condições laboratoriais de isolamento e segurança e é uma técnica demorada, obtendo-se resultados após 15 a 30 dias, ou mais, de cultivo. Por isso, sua indicação, atualmente, vem se restringindo à área de pesquisa clínica.¹⁰

As técnicas mais freqüentemente utilizadas para pesquisa de anticorpos anti-HIV são: teste imunoenzimático (ELISA), fluorimetria, quimioluminescência, radioimunoprecipitação (*radio immunoprecipitation assay* - RIPA), aglutinação de partículas de látex, imunofluorescência indireta (If) e *western-blot* (WB). O ELISA e o WB têm, atualmente, alta sensibilidade (99%). Em termos de diagnóstico sorológico de infecção pelo HIV, o Ministério da Saúde do Brasil preconiza que seja realizado o ELISA em duplicata, como método de triagem, e outro método como teste

confirmatório de positividade, que pode ser a aglutinação de partículas de látex ou a If, na dependência das condições do laboratório.¹⁰

Existem alguns testes usados para a ampliação do genoma do HIV:

- Detecção do DNA do HIV-1 integrado ao genoma leucocitário (PCR-DNA quantitativo)

Usa-se a reação em cadeia de polimerase - *polymerase chain reaction* (PCR), em especial para o diagnóstico de infecção pelo HIV-1, em crianças nascidas de mães soropositivo, sendo altamente específico e sensível em lactentes de um a dois meses de idade e para o esclarecimento diagnóstico de indivíduos com perfis indeterminados ao WB.¹³

- Detecção do ácido ribonucléico (RNA) do HIV-1 no plasma (PCR-RNA qualitativo)

Emprega-se PCR após transcrição reversa (RT-PCR). É indicada para o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 em crianças nascidas de mães soropositivo e diagnóstico de infecção pelo HIV-1 em adultos expostos recentemente (até dois ou três meses), portanto, antes de soroconversão.¹³

- Detecção do RNA do HIV-1 no plasma (quantitativo) ou determinação da carga viral (CV)

A carga viral corresponde à quantidade de vírus replicativo ou latente presente em um indivíduo infectado. A utilização da técnica de PCR permitiu mostrar que o HIV se replica de maneira variável em todos os estágios da doença, o que contradiz a concepção inicial de latência virológica após a primoinfecção.¹⁴

A determinação da carga viral tornou-se ferramenta indispensável para o melhor acompanhamento clínico das pacientes portadoras do HIV. Várias tecnologias têm sido utilizadas para esta quantificação.¹⁵

As técnicas mais freqüentemente empregadas para determinação da carga viral são: PCR quantitativo por competição, bDNA, *nucleic acid sequenced based amplification* (NASBA). A quantificação do RNA viral plasmático pode ser realizada, atualmente, por meio de *kits* comerciais, que utilizam amplificação gênica, tais como a PCR ou NASBA e hibridização molecular, como a técnica do DNA ramificado. Cada um destes *kits* permite obter medição extremamente confiável da carga viral plasmática, mas necessita de pessoal qualificado e equipamento específico.¹⁰

2.3.1 Detecção do HIV em outros fluidos corporais

Como já é sabido, o vírus está presente em outros compartimentos corpóreos, além do sérico, de pessoas contaminadas. Em fluidos como o esperma, resíduo vaginal e leite materno, a taxa de transmissão é significativa.¹⁶ Está também em outros líquidos (saliva, lágrimas, urina e suor), mas a quantidade é tão pequena que não apresenta riscos de transmissão.¹⁷

O HIV já foi identificado a partir de cultura de PCR-DNA em material oriundo de abortamentos: na placenta, na oitava semana de gestação; e no feto, na 10^a semana.¹⁸

O líquido amniótico é alvo de grandes estudos na área da transmissão vertical do HIV.^{19,20} A grande maioria das pesquisas desenvolvidas avalia a presença e a concentração de anti-retrovirais no líquido de gestantes submetidas ao uso desses medicamentos durante a gravidez. A existência

do HIV no líquido amniótico ainda é incerta. Estudos recentes têm sido desenvolvidos para sua detecção nesse compartimento, objetivando melhor conhecimento da transmissão intra-útero.²⁰

2.3.1.1 Líquido amniótico

O ser humano está envolvido, desde a sua formação, pelo líquido amniótico (LA). A sua origem e o seu volume variam conforme a idade gestacional e dependem de uma série de trocas envolvendo o feto, a placenta, as membranas e o organismo materno. Apesar dessas alterações serem nítidas, até o presente pouco se sabe sobre os mecanismos fisiológicos que regulam a sua composição e o seu volume nos diferentes trimestres gestacionais.²¹

A deglutição é a principal via pela qual o fluido deixa a cavidade amniótica, sendo a micção fetal a maior fonte de LA, desde o início da segunda metade da gestação.²¹

A pele fetal desempenha importante papel na formação do LA nas primeiras semanas da gestação, mas, a partir da queratinização que ocorre aproximadamente com 25 semanas, sua participação na produção e composição do líquido vai sendo substituída. A placenta é também um local importante de troca de fluidos desde o final do primeiro trimestre, permanecendo durante toda a segunda metade da gestação. Há inclusive entrada preferencial pela placenta de produtos deciduais, como prostaglandinas e a prolactina, que passam direto para o LA sem circular pelo sangue materno.²²

Os principais componentes presentes nesse líquido estão em suspensão e em dissolução. Entre os elementos em suspensão encontram-se células

esfoliadas do âmnio, principalmente do feto, assim como lanugem e gotículas de gordura. Como elementos de dissolução são encontradas substâncias orgânicas e inorgânicas. Os eletrólitos representam as substâncias inorgânicas, sendo alguns relacionados com a idade gestacional. Entre os compostos orgânicos estão as proteínas, os aminoácidos, a alfa-fetoproteína, as substâncias nitrogenadas não-protéicas, os lipídios, os carboidratos, as vitaminas, as enzimas, a bilirrubina, os hormônios e as prostaglandinas.²¹

O líquido amniótico apresenta-se rico em células descamadas que delimitam a cavidade amniótica e também células provenientes do feto. A base morfológica da citologia amniótica está estritamente relacionada ao feto, decorrendo a necessidade de ser conhecido o desenvolvimento intra-uterino da pele, das mucosas respiratórias e digestivas, das coberturas geniturinárias e dos demais elementos que tenham contato com esse líquido. Torna-se necessária a investigação da fisiologia de cada epitélio, de seus ritmos de crescimento e maturação.²³

Encontram-se no líquido amniótico células do epitélio escamoso estratificado e sem cornificação, presentes na boca, no esôfago e no ânus do feto e células dos epitélios glandulares no restante do tubo digestivo e glândulas anexas. Nas vias urinárias há, fundamentalmente, epitélio transicional também no líquido amniótico.²³

Alguns estudos têm sido realizados em busca da detecção do HIV no líquido amniótico com a finalidade de mais conhecimento dos fatores de transmissão intra-útero. Mundy *et al.* (1987)¹⁹ detectaram a presença do HIV no líquido amniótico e em células colhidas por amniocentese em uma paciente isoimunizada pelo fator *Rhesus* (Rh) e contaminada com o vírus. A paciente era usuária de droga injetável, motivo pelo qual foi testada a infecção pelo HIV. Iniciou o pré-natal no terceiro trimestre da gestação e

não fez uso de anti-retroviral nesse período. Foi submetida a duas amniocentese devido à isoimunização Rh, para avaliação do acometimento fetal. Na segunda amniocentese foram colhidos 60 mL de líquido amniótico, parte utilizada para avaliar a presença do HIV. A técnica adotada para detecção foi a cultura viral por PCR. O líquido amniótico foi colocado em contato com células mononucleares do sangue periférico, colhidas de indivíduos não infectados. Após cinco semanas foi identificada contaminação dessas células mononucleares, confirmando-se a presença de vírus livre em líquido amniótico, com capacidade de infecção. A grande questão era que Mundy *et al.*¹⁹ não poderiam excluir a contaminação desse líquido por sangue materno durante a amniocentese.²⁰

Maiques *et al.* (2003)²⁴ publicaram estudo realizado na Espanha entre 1984 e 2000 procurando rastrear o HIV no líquido amniótico a partir de amniocentese. Foram avaliados 356 binômios (mãe e recém-nascido). A metodologia utilizada para detecção do vírus no líquido foi NASBA. Foram formados três grupos distintos de pacientes, todos comparados com o grupo-controle, posteriormente, para a avaliação da transmissão vertical. O primeiro grupo abrangia 11 pacientes submetidas à amniocentese entre 16 e 18 semanas de gestação, realizada antes de 1987; o segundo grupo envolvia 18 pacientes e a amniocentese foi realizada entre 37 e 38 semanas de gestação, com inclusão de pacientes entre 1987 e 1999; o terceiro grupo tinha 38 pacientes, o líquido amniótico foi coletado durante a cesarianas realizadas após 1999. Não foi verificado o HIV em nenhuma amostra analisada e a diferença de transmissão vertical entre as pacientes submetidas à amniocentese e as não submetidas não foi estatisticamente significativa (risco relativo - RR 95%, intervalo de confiança - IC = 1,85 - 0,69-4,98).

A contaminação do líquido amniótico pelo HIV foi investigada em 26 pacientes entre 29 e 41 semanas de gestação, por meio da detecção da

presença do antígeno proteína 24 (p24). As amostras de líquido amniótico foram obtidas por amniocentese.²⁵ Não se encontrou o antígeno p24 em nenhuma amostra, somente o anticorpo p24.

Usando metodologia NASBA, Mohlala *et al.* (2005)²⁰ publicaram estudo para avaliação da carga viral no líquido amniótico. As pacientes eram recrutadas durante o pré-natal entre 30 e 36 semanas de gestação. Mulheres com complicações obstétricas ou em uso de outras medicações além dos anti-retrovirais eram excluídas. A cesariana procedia-se como de rotina até a exposição das membranas, sem sua rotura, para a coleta de líquido amniótico. As amostras grosseiramente contaminadas com sangue ou mecônio eram descartadas, implicando a exclusão da paciente do estudo. O leito placentário era biopsiado após a cesariana, para avaliação de anormalidades como hemorragias, trombozes ou infartos. No caso de anormalidades placentárias, as pacientes eram excluídas. Foi dosada carga viral no líquido amniótico de 26 gestantes infectadas pelo HIV. As amostras foram processadas dentro de quatro horas após a coleta e estocadas a -70° C. As amostras colhidas não foram centrifugadas antes da extração do RNA, podendo haver contaminação celular no líquido analisado. Nenhuma amostra apresentou resultado positivo.

2.4 Transmissão vertical

2.4.1 Fatores de risco

A patogênese da transmissão vertical do HIV está relacionada a múltiplos fatores, entre eles:

- fatores virais: carga viral, genótipo e fenótipo viral;

- fatores maternos: estados clínico e imunológico, presença de doenças sexualmente transmissíveis (DST) e outras co-infecções,²⁶ estado nutricional e o tempo de uso de anti-retrovirais na gestação;²⁷
- fatores comportamentais: uso de drogas ilícitas e prática sexual desprotegida;
- fatores obstétricos: duração da ruptura de membranas amnióticas, via de parto e hemorragia intraparto;
- fatores inerentes ao recém-nascido: maturidade e baixo peso ao nascer;
- fatores relacionados ao aleitamento materno.²⁸

A transmissão só é possível se existir penetração do líquido contaminado no organismo sadio. Devem-se cumprir obrigatoriamente duas condições:

- a) o vírus tem que estar em quantidade suficientemente importante no líquido contaminante;
- b) o vírus tem que encontrar uma porta de entrada para penetrar no organismo. As portas de entrada podem ser lesões das mucosas (genital, anal, bucal) ou lesões de pele.²⁷

A maior parte dos casos de transmissão vertical do HIV ocorre durante o trabalho de parto e no parto propriamente dito. Um percentual de 35% ocorre intra-útero, principalmente nas últimas semanas de gestação,²⁹ havendo ainda o risco adicional de transmissão pós-parto por meio do aleitamento materno.³⁰ O aleitamento materno representa risco adicional que se renova a cada exposição da criança ao peito e a taxa de transmissão vertical situa-se entre 7 e 22%.³¹

Os fatores de risco mais significativos para a avaliação da possível transmissão vertical são: carga viral materna, gravidade da doença materna, tempo de rotura de membranas anteparto e a via de parto.³² A

carga viral nas secreções cérvico-vaginais e no leite materno tem-se mostrado um importante determinante de risco de transmissão intraparto e pela amamentação.³³ Com o melhor conhecimento dos vários fatores de risco, algumas medidas profiláticas foram adotadas objetivando-se a redução das taxas de transmissão vertical.

2.4.2 Medidas profiláticas

Em 1994 foram publicados os resultados do primeiro ensaio clínico randomizado que avaliou a eficácia do uso profilático da zidovudina (AZT) – durante a gravidez, o parto e para o recém-nascido – com o objetivo de reduzir a transmissão vertical do HIV-PACTG 076 - *Pediatric Aids Clinical Trials Group*.³⁴ Os resultados do protocolo 076 evidenciaram redução de 67,5% na transmissão vertical com o uso da zidovudina (AZT) durante a gestação, no trabalho de parto, no parto e pelos recém-nascidos que foram alimentados exclusivamente com fórmulas infantis.²⁸

Está amplamente comprovado que o uso combinado dos anti-retrovirais é capaz de reduzir significativamente a carga viral plasmática para níveis indetectáveis.^{35,36} Dados epidemiológicos e de ensaios clínicos sugerem que mulheres que receberam terapia anti-retroviral (TARV) combinada e potente apresentam taxas muito baixas de transmissão vertical.³⁷

A via de parto de acordo com a carga viral materna e a substituição do aleitamento materno por fórmula láctea são consideradas determinantes na redução da transmissão materno-fetal.³⁸ Outros fatores como o não abuso de substâncias ilícitas, o tratamento de infecções durante a gestação e o bom estado nutricional materno também são de grande importância.

Estudo realizado no Hospital das Clínicas da UFMG demonstrou significativa redução da taxa de transmissão vertical com a adoção de medidas profiláticas eficazes.⁵

2.4.3 Transmissão intra-útero x transmissão intraparto

Um dos possíveis fatores que envolvem a transmissão vertical periparto incluem a microtransfusão transplacentária do sangue materno dentro da circulação fetal durante as contrações, parto e dequitação da placenta antes da clampagem do cordão umbilical³⁹. Outro fator é a infecção ascendente pela vagina após a rotura das membranas, com infecção do líquido amniótico e absorção do vírus pelo trato gastrintestinal ainda imaturo do feto. Microtraumas da pele fetal durante o parto, com exposição sanguínea e secreções cérvico-vaginais infectadas, também são formas possíveis de se adquirir o vírus nesse período.⁴⁰

Atribuiu-se diferenciado valor a algumas variáveis constitucionais do feto e/ou do recém-nascido como fatores de risco para a infecção vertical do HIV-1. Entre eles estão a integridade da pele, a resposta imune celular e a presença constitucional de genes que irão expressar os receptores secundários do HIV-1.⁴¹ Parece que a resposta imunológica deficiente do recém-nascido (RN) representada por reduzida atividade celular citotóxica também tem papel significativo sobre o aumento das taxas de TV desse vírus.⁴²

Ao lado do CD4 atuam co-receptores de beta quimiocinas responsáveis pela ligação e infecção do HIV. Os macrófagos placentários (células de Hofbauer) expressam receptores (CCR5) e a expressão destes encontram-se aumentadas nos estados de ativação imunológica, podendo facilitar a transmissão do HIV.¹⁸ O padrão genético de certas células fetais as define

como mais ou menos suscetíveis à infecção por esse vírus, a exemplo da mutação homozigótica no gene que expressa o CCR5, receptor secundário do HIV-1.⁴⁰ A presença dessa mutação no feto tem sido aventada como proteção contra a TV desse vírus.⁴³

Outra hipótese sugere que partículas virais livres poderiam aderir-se às células M presentes na superfície do lúmen intestinal do concepto, ocorrendo endocitose e transporte para o espaço intra-epitelial, que contém linfócitos e macrófagos susceptíveis à infecção pelo HIV.¹⁸

Os fatores de risco relevantes para a transmissão intraparto e por meio do leite materno são bastante conhecidos, entretanto, a infecção fetal no curso da gestação tem sido menos estudada, com uma lacuna no que se refere a fatores de risco para a transmissão intra-útero. Teoricamente, a transmissão intra-uterina do HIV é possível ao longo de toda a gestação. A presença do HIV no líquido amniótico ou em células encontradas dentro do líquido, antes da rotura de membranas, poderia ser responsável por grande parte da transmissão vertical intra-útero.²⁰

As culturas virais e a amplificação gênica do HIV-1 são recursos tecnológicos que permitem estimar o período em que a TV ocorreu. Baseado nesses exames, considera-se que 29% a 34% das TV ocorrem por via transplacentária, das quais 59% a 76% no período periparto e 9,3% a 29% pós-natais,⁴⁴ associadas geralmente ao aleitamento materno.⁴⁵ Estudo realizado no Zaire, com população em aleitamento materno, indicou taxa de transmissão intra-uterina de 23%, intraparto de 65% e pelo aleitamento materno de 12%.¹⁸

Uma das dificuldades em distinguir os fatores de risco durante os diferentes tempos da gestação é determinada pela questão de quando a criança adquiriu o vírus. Magder *et al.* (2005)⁴⁶ relatam que a transmissão

intra-útero está amplamente associada a fatores maternos como alta carga viral, uso de drogas ilícitas, uso de anti-retrovirais durante a gestação e tempo de rotura de membranas.

O PACTG, em 1992, estabeleceu critérios para diagnosticar o período em que ocorreu a transmissão vertical, com base na avaliação laboratorial do sangue do RN:⁴⁷

- infecção intra-útero: quando a PCR-DNA ou cultura viral for positiva em amostra de sangue periférico colhida nas primeiras 48 horas após o nascimento;
- infecção periparto: se os testes diagnósticos anteriores forem negativos em amostras de sangue obtidas na primeira semana de vida e positiva entre o sétimo e o 90º dia de vida, se ausente o aleitamento materno.

Estudo publicado em 2005⁴⁶ relata que, em crianças infectadas intra-útero, as provas virais são positivas ao nascer ou positivam-se até o sétimo dia pós-nascimento. Caso haja positivação entre o oitavo e o 28º dia, considera-se que a TV tenha ocorrido no período periparto. Após 28 dias, sugere-se contaminação pós-natal, geralmente por aleitamento materno. Na prática clínica utiliza-se a PCR do sangue do recém-nascido para esse diagnóstico.¹³ A transmissão foi significativamente associada ao uso de droga ilícita da mãe durante a gestação, carga viral antenatal, tratamento anti-retroviral (ARV) e baixo peso ao nascer.

Com o desenvolvimento de métodos de detecção de proteínas (antígeno p24) e ácidos nucleicos, foi possível comprovar a infecção do HIV em tecidos fetais e na placenta. A transmissão intra-uterina pode ocorrer por acesso do vírus livre ou por células infectadas pelo HIV presentes na circulação materna para a placenta. Estudos *in vitro* indicam que o vírus

associado às células infecta mais eficientemente células do sincício trofoblasto.¹⁸

Ainda não se sabe se o HIV está presente no líquido amniótico antes da ruptura das membranas e se sua dosagem é semelhante à dosagem sérica materna. Estudo realizado na África do Sul apresentou resultado negativo em todas as amostras.²⁰ Outros estudos que investigaram a detecção do HIV no líquido amniótico utilizaram a amniocentese para coleta, apenas um deles detectou a presença do vírus em 1987.^{19,24}

Os fatores de risco para a infecção periparto são bem conhecidos e as medidas profiláticas adotadas apresentam forte impacto na redução da transmissão vertical tornando a infecção intra-útero alvo de pesquisas recentes. Estudo realizado nos Estados Unidos da América (EUA) observou aumento significativo da transmissão vertical intra-útero e redução da taxa de transmissão intraparto nos últimos anos.⁴⁶ Este estudo, objetiva um maior conhecimento do compartimento intra-uterino buscando a presença do HIV no líquido amniótico. Na hipótese da detecção do vírus será realizada comparação dos valores no líquido amniótico com a carga viral plasmática materna e neonatal numa tentativa de identificar fatores de risco para esta forma de transmissão.

3 Objetivo

3.1 Objetivo geral

Avaliar a possibilidade de detecção do HIV em líquido amniótico.

3.2 Objetivo específico

Associar os níveis de carga viral do líquido amniótico com os valores encontrados no sangue periférico materno e do recém-nascido.

4 Pacientes e Métodos

O estudo foi realizado na Universidade Federal de Minas Gerais envolvendo o Hospital das Clínicas e a Faculdade de Medicina.

Foram recrutados 40 binômios (materno–infantil) durante a admissão no referido Hospital, que preenchiam todos os critérios de inclusão e exclusão.

Todas as gestantes apresentavam sorologia confirmatória positiva para o HIV e submeteram-se à cesariana eletiva no Hospital das Clínicas da UFMG. Todas receberam AZT venoso periparto por pelo menos três horas antes da cirurgia.

As gestantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A), sendo informadas quanto ao objetivo, à segurança e aos tipos de exames propostos para a realização do estudo. A paciente e o RN receberam um número de identificação de paciente (NIP).

O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) – Processo ETIC no 249/06 (ANEXO A), Colegiado de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia e Câmara do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da UFMG, tendo sido respeitados os princípios para pesquisa em seres humanos.

4.1 Critérios de seleção

Os critérios de inclusão foram:

- gestantes infectadas pelo HIV;
- membranas íntegras;
- indicação para cesariana eletiva;

- líquido amniótico límpido no momento da coleta, observado à macroscopia.
- ter assinado o TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido)

4.2 Métodos

O estudo avaliou o resultado quantitativo da carga viral no momento do parto, em líquido amniótico, e o comparou com os valores encontrados no sangue periférico materno-infantil, periparto de gestantes infectadas pelo HIV e seus recém-nascidos.

4.2.1 Líquido amniótico

4.2.1.1 Coleta

A coleta do líquido amniótico foi feita durante a cesariana, que foi procedida como de rotina até a abertura da cavidade uterina na região segmentar.

A membrana amniótica foi exposta, sem ser rompida, seguida de aspiração de no mínimo 2 mL de líquido amniótico utilizando-se agulha de calibre 18 gauge acoplada a uma seringa de 20 mL.



FIGURA 1a - Incisão uterina durante a cesariana.

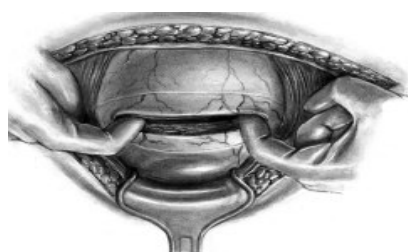


FIGURA 1b - Divulsão uterina, após incisão, para expor a membrana amniótica.

Após a coleta, a cesariana prosseguiu como de rotina. As amostras de líquido amniótico contaminadas com mecônio espesso ou sangue foram descartadas. O líquido amniótico foi armazenado a -70° C até a obtenção de 40 amostras para dosagem da carga viral simultânea, devido ao período de validade do teste a ser utilizado.

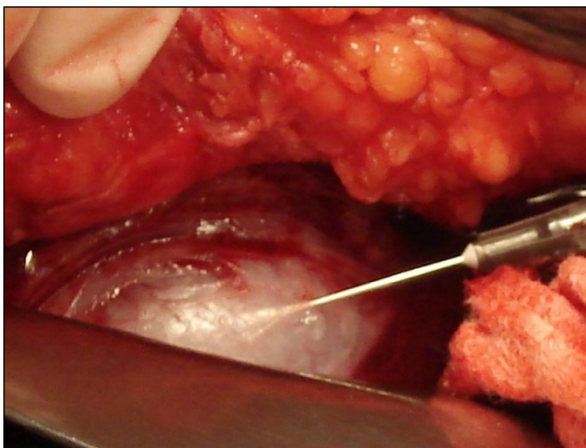


FIGURA 2 - Coleta do líquido amniótico.

4.2.1.2 Dosagem da carga viral

As amostras do líquido amniótico obtidas durante a cirurgia para a análise da carga viral foram imediatamente estocadas a -20° C e posteriormente transferidas para armazenamento a -70° C.

O NASBA e *NucliSens easy MAG* (*Biomérieux*) foram usados para isolar, amplificar e quantificar a carga viral no líquido amniótico. A sensibilidade do teste é de aproximadamente 50–3.000.000 UI/mL. A técnica utilizada está descrita detalhadamente a seguir.

4.2.1.3 NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) e *Nuclisens Easy Q*

O teste de amplificação de ácido nucléico tornou-se muito importante nas rotinas laboratoriais e, em conjunto com o *Nuclisens Easy Q*, os ensaios qualitativos de amplificação de RNA detectam, em tempo real, o vírus utilizando moléculas beacons (capazes de se ligarem à seqüência se RNA liberando fluorescência para sua detecção).

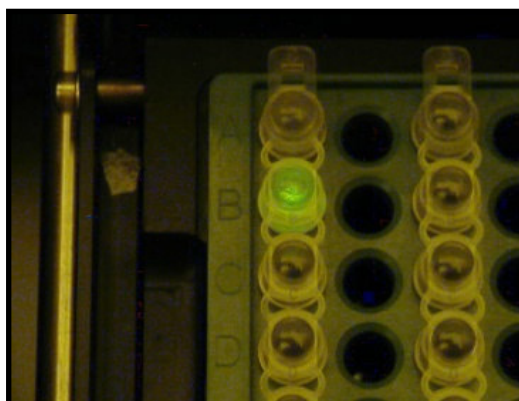


FIGURA 3 - Imagem positiva da fluorescência emitida pelo *Easy Q* analisador.



FIGURA 4 - Imagem negativa da fluorescência emitida pelo *Easy Q* analisador.

O *NucliSens Easy Q* utiliza a tecnologia Boom®⁴⁸ com sílica magnética para o isolamento do RNA alvo da amostra nos equipamentos *NucliSens miniMag* (semi-automático) ou *NucliSens easy MAG* (automatizado). Posteriormente, são realizadas amplificação e detecção em tempo real na plataforma *NucliSens Easy Q* Analisador, pela metodologia NASBA. O sistema usado apresenta um calibrador interno para melhor apuração dos resultados. O *NucliSens Easy Q* traz as seguintes características demonstradas no QUADRO 1:

QUADRO 1

Características da performance do *Nuclisens Easy Q*

Características de performance	
Valores de carga viral de HIV-1	Unidades internacionais / mL
Sensibilidade	50 – 3.000.000 UI/mL
Especificidade	99,7% (IC 98,5 – 100%)
Reatividade do subtipo do HIV-1	HIV-1 grupo M subtipos A a J
Amostra	1 mL de plasma humano

O NASBA é amplamente usado para a detecção de RNA viral no plasma humano. É um método que permite a amplificação isotérmica de filamentos simples de RNA do HIV-1 utilizando-se três enzimas: a transcriptase reversa do vírus da mieloblastose aviária, uma RNase H e a RNA polimerase do fago T7. A técnica possibilita a obtenção de 10^6 a 10^9 cópias em menos de uma hora. Sua metodologia baseia-se na lise e em propriedades enzimáticas inativadoras do agente guanidina juntamente com a capacidade de ligação dos ácidos nucléicos com a sílica na presença desse agente.

Entre as técnicas de amplificação de ácidos nucléicos de HIV, a mais empregada em fluidos biológicos é a NASBA. Optou-se, então, pela sua utilização na detecção da carga viral no líquido amniótico.

4.2.1.3.1 Extração das amostras

As amostras foram retiradas do *freezer* a -70°C e descongeladas à temperatura ambiente. Depois foram centrifugadas por três minutos a 1.200 rotações por minuto (rpm).

As amostras foram separadas em tubos de 1,5 mL, sendo desprezado o sobrenadante. Iniciou-se, então, o processo de extração do RNA viral.

No primeiro passo, descristalizaram-se os tampões de lise e de lavagem centrifugando-os por 10 segundos a 3.000 rpm. Após a centrifugação, acrescentou-se 1 mL de amostra já centrifugada ao tampão de lise e vortexeando levemente. Aguardaram-se 10 minutos para incubação à temperatura ambiente.

A seguir, foram adicionados 20 µl da solução de controle interno, previamente suspenso com o tampão de eluição, e 50 µl da sílica, ambos vortexeados. Aguardaram-se 10 minutos à temperatura ambiente para nova incubação.

Após esse processo de lise e adesão viral à sílica, procedeu-se à lavagem do tampão, uma vez que a guanidina, substância utilizada para a lise, é tóxica e impede a adequada detecção viral pelo *Nuclisens Easy Q* analisador.

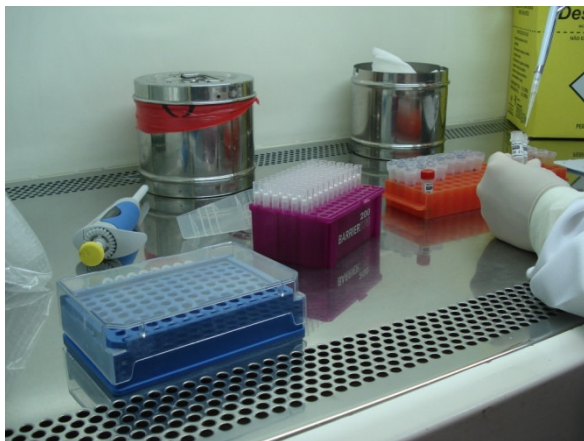


FIGURA 5a - Extração das amostras.

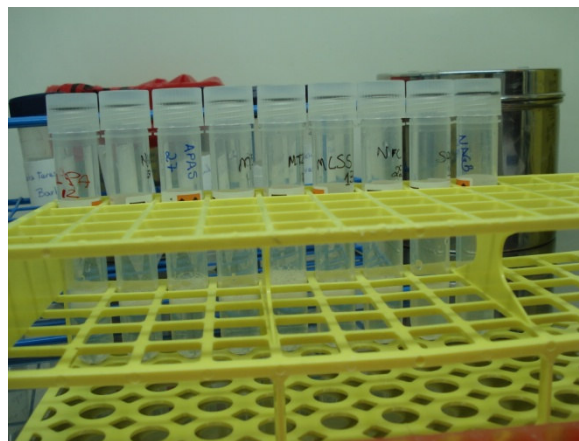


FIGURA 5b - Tubos de lise.

4.2.1.3.2 Lavagem do tampão

Centrifugou-se o tubo de tampão de lise por dois minutos a 3.000 rpm, removendo o sobrenadante a seguir. Neste processo, o material aderido à sílica foi transferido para tubo de 1,5 mL do miniMag e realizada lavagem em três tempos com três diferentes soluções, sendo as duas primeiras por 30 segundos e a terceira por 15 segundos com o magneto on (sílica e RNA viral aderidos por magnetismo à parede do tubo).

A cada tampão adicionado desprezava-se o anterior previamente, deixando apenas o material e a sílica aderidos.

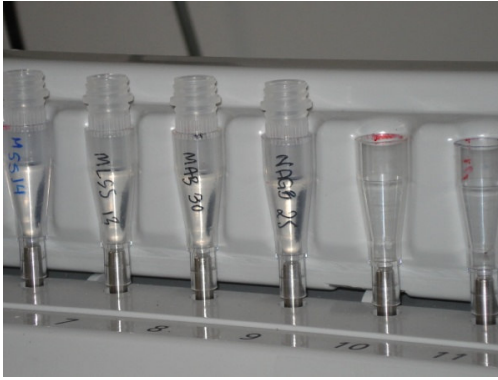


FIGURA 6a - Amostras no miniMag.

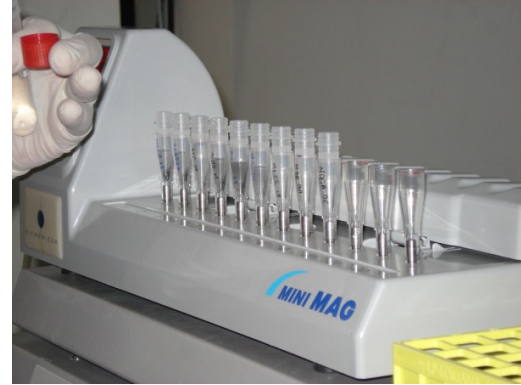


FIGURA 6b - Processo de lavagem das amostras.

4.2.1.3.3 Eluição

Após a lavagem da guanidina e a extração dos tampões adicionaram-se 25 μ l do tampão de eluição e colocou-se a nova solução no termomixer a 60°C (velocidade 1.400 rpm), aguardando-se cinco minutos para incubação. Realizou-se a transferência para o *rak* magnético para a separação do eluído formado da sílica restante. O eluído foi transferido para um tubo estéril.



FIGURA 7a - Termomixer

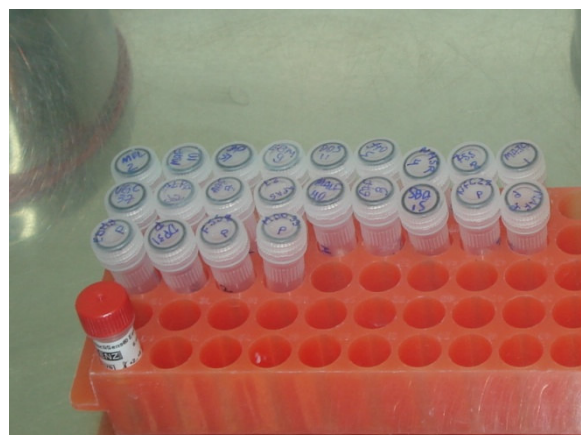


FIGURA 7b – Eluídos.

4.2.1.3.4 Amplificação e detecção

Do eluído formado, extraíram-se 5 μ l que foram colocados em uma forma estéril própria para a amplificação, realizando-se, então, a diluição da enzima e do *primer*.

Ao eluído adicionaram-se 10 μ l do *primer*, em cada tubo, colocados no *Nuclisens Easy Q* incubador, cuja reação ocorre em um período de quatro minutos, sendo dois minutos a 65° C e dois a 41° C. Adicionaram-se, a seguir, 5 μ l da enzima já diluída em cada tubo e centrifugou-se por dois segundos no *mini-strip centrifuge* duas vezes. As amostras preparadas foram transferidas para o *Nuclisens Easy Q* analisador para detecção do RNA viral, que ocorre em cerca de uma hora. Optou-se pela realização de cinco corridas para detecção com no mínimo nove amostras em cada para melhor aproveitamento da quantidade *primer* e enzima disponíveis.



FIGURA 8 - *Nuclisens Easy Q* analisador.

4.2.2 Sangue periférico (coleta e quantificação da carga viral)

Foram obtidas amostras de sangue periférico materno durante o pré-natal, aproximadamente com 34 semanas, e sangue periférico materno e do recém-nascido periparto, para quantificação da carga viral sérica, conforme o protocolo padrão de acompanhamento desses casos.

Foi colhido sangue da mãe e do recém-nascido, aproximadamente 16 mL e 9 mL, respectivamente. O sangue foi centrifugado imediatamente para dosagem da carga viral. A metodologia utilizada para essa detecção foi bDNA da Simens.

5 Resultados

Foram acompanhadas prospectivamente 40 gestantes infectadas pelo HIV e seus recém-nascidos.

Todos os dados foram armazenados em formulário próprio (APÊNDICE B). Cada parto foi considerado um caso. Neste estudo, analisaram-se os dados referentes ao valor da carga viral nos compartimentos: sérico (materno e neonatal) e em líquido amniótico, comparando-se os valores encontrados.

5.1 Características maternas

Na TAB. 1 as pacientes foram caracterizadas quanto à idade cronológica (em anos), escolaridade (em anos) e paridade incluindo o parto no momento de inclusão no estudo. Na TAB. 2 elas foram caracterizadas quanto ao número de consultas pré-natais, época de início do pré-natal e tempo de diagnóstico (em anos) no momento de inclusão no estudo.

TABELA 1

Caracterização das pacientes quanto à idade cronológica (em anos), escolaridade (em anos) e paridade no momento da inclusão no estudo

Características	N	Mín-Máx	Mediana	Intervalo interquartil
Idade (anos)	40	16 – 45	28,5	25,5 – 31,0
Escolaridade (anos)	30*	0 – 13	4,0	4,0 – 8,0
Paridade	40	1 – 7	3,0	2,5 - 5,0

N= número; Mín= mínimo; Max= máximo.

* Uma paciente tinha escolaridade desconhecida.

TABELA 2

Caracterização das pacientes quanto ao número de consultas pré-natais, época de início pré-natal e tempo de diagnóstico (em anos), no momento da inclusão no estudo

Características	N	Mín-Máx	Mediana	Intervalo interquartil
Consultas	39*	1 – 15	8,0	5 - 11
Início pré-natal (semana)	39*	8 – 40	17,0	10 - 24
Diagnóstico (anos)	40	0 – 12	3,0	0,5- 5,0

N= número; Mín= mínimo; Max= máximo.

*Não se conheciam o número de consultas nem a época de início do pré-natal de 1 paciente.

Quanto à época de início de pré-natal, 13 pacientes (32,5%) iniciaram no primeiro trimestre, 17 (42,5%) no segundo trimestre e nove (22,5%) tardiamente, no terceiro trimestre. Não se conhecia a época de início do pré-natal de uma paciente.

As pacientes foram caracterizadas, também, quanto ao estado civil e uso de anti-retrovirais durante o pré-natal, conforme demonstrado no GRÁF. 1 e na TAB. 3.

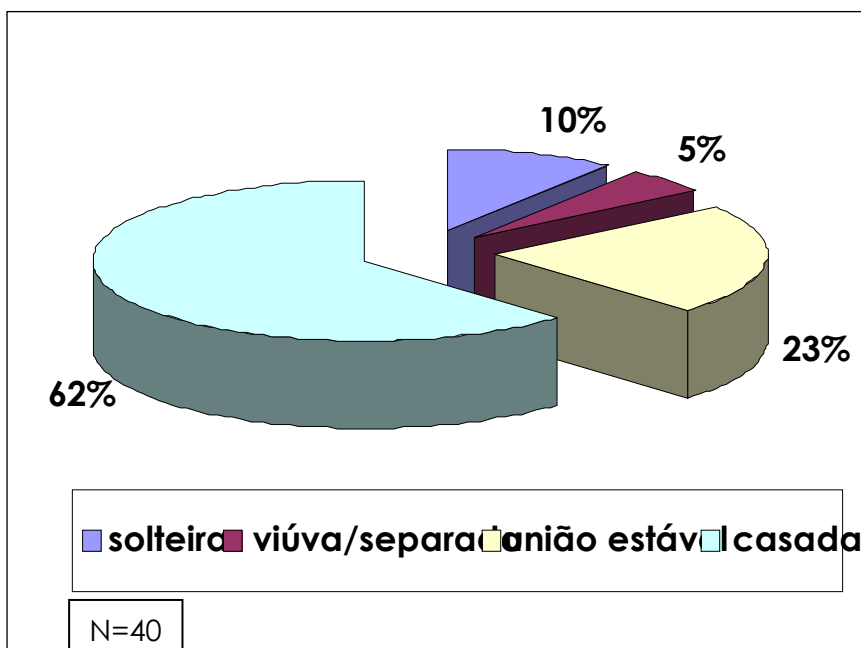


GRÁFICO 1 - Caracterização das pacientes quanto ao estado civil no momento do estudo.

TABELA 3

Caracterização das pacientes quanto ao uso de anti-retrovirais durante a gestação

Terapia anti-retroviral	Frequência	Percentual (%)
Nenhuma	3	7,5
Tríplice	33	82,5
Quádrupla	4	10,0

Avaliando a época de descobrimento do vírus entre as pacientes do estudo, 27 (67,5%) obtiveram o diagnóstico de infecção pelo HIV em período gestacional, tendo 10 recebido o diagnóstico durante o presente estudo e 13 (32,5%) fora do período gestacional.

A indicação de cesariana como via de parto para as gestantes avaliadas é demonstrada na TAB. 4.

TABELA 4
Caracterização das pacientes quanto à indicação
da cesariana como via de parto

Indicação da cesariana	Frequência	Percentual (%)
Carga viral >1000*	8	20,0
Iteratividade	24	60,0
Outras	8	20,0

*Quatro pacientes possuíam carga viral maior que 1.000 cópias/mL e cesariana prévia.

Em relação às outras indicações para cesariana, quatro pacientes apresentavam oligodrâmnio e gestação a termo, duas tinham a carga viral desconhecida no terceiro trimestre da gestação, uma desenvolveu aumento dos níveis pressóricos próximo do termo com crescimento intra-uterino restrito (CIUR) e em uma o feto estava em posição córmica.

Todas as gestantes receberam zidovudina endovenosa periparto por período mínimo de três horas antes da realização da cesariana.

Na TAB. 5 as pacientes foram caracterizadas quanto à carga viral (cópias/mL) e ao valor da contagem de células CD4 (cels/mm³) durante a gestação (aproximadamente com 34 semanas) e logo após o parto. No GRÁF. 2 observa-se a variação da carga viral materna colhida até periparto (até 30 dias).

TABELA 5

Avaliação da carga viral (cópias/mL) e do valor da contagem de células CD4 (cels/mm³) maternas no terceiro trimestre de gestação e após o parto

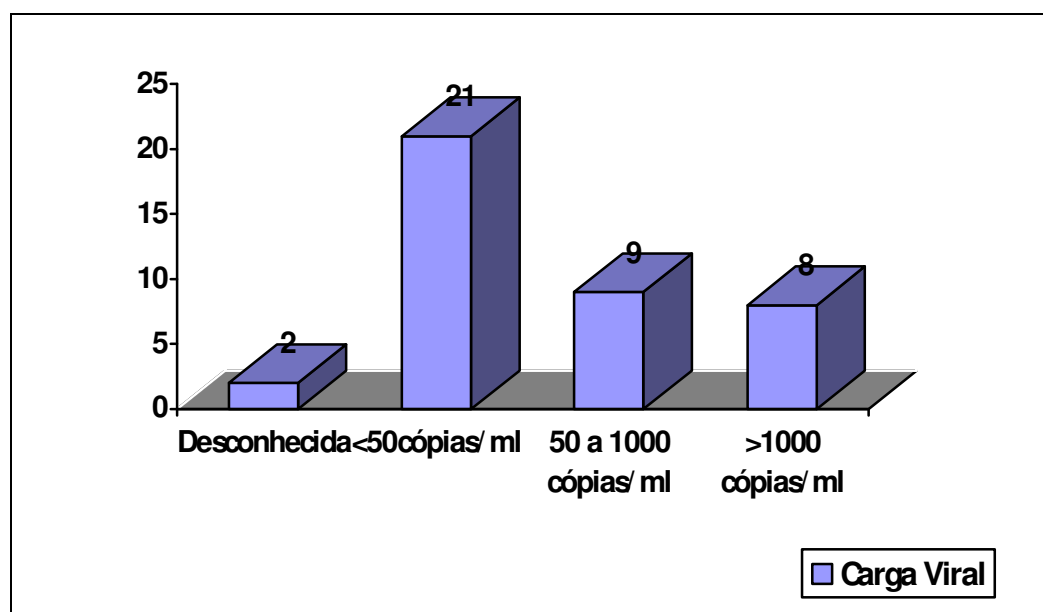
Características	N	Mín-Máx	Mediana	Intervalo interquartil
Carga viral (pré-natal)	27*	<50 - 115000	<50	-
Carga viral (pós-parto)	38**	<50 - 99882	<50	-
CD4 (pré-natal)	27*	32-1084	518	291-674
CD4 (pós-parto)	36***	49-783	443,5	330-625

N= número; Mín= mínimo; Máx= máximo.

* cinco pacientes com pré-natal de início tardio, quatro freqüentaram o pré-natal irregularmente, uma realizou o pré-natal em serviço privado, duas faltaram à coleta programada para esse período e uma teve o parto com 32 semanas por aumento dos níveis pressóricos.

** duas pacientes não colheram a carga viral após o parto.

*** quatro pacientes sem informação da contagem de células CD4.



N=40

GRÁFICO 2 - Carga viral sérica materna no periparto.

A dosagem de células CD4 materna foi avaliada e pôde-se verificar que durante a gestação seis (16,7%) pacientes apresentaram valores <200 cels/mm³, 11 (30,6%) entre 200 e 499 cels/mm³ e 19 (52,8%) maior que 500 cels/mm³; quatro não tinham o valor conhecido na época. Na dosagem após o parto, cinco (13,9%) apresentaram contagem de células CD4 <200 cels/mm³, 16 (44,5%) dosagem entre 200 e 499 e 15 (41,6%) maior que 500 cels/mm³; quatro não tinham o valor conhecido naquele momento.

A TAB. 6 mostra a classificação das gestantes baseada nos critérios do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), que avalia as características clínicas após a infecção pelo HIV e seu perfil sorológico baseando-se nos valores da contagem de células CD4.

TABELA 6
Caracterização das pacientes baseada no
Centers for Disease Control and Prevention (CDC), durante a gestação

CDC	N	Freqüência (%)
A1	10	25
A2	8	20
A3	6	15
B1	1	2,5
B2	2	5,0
C2	1	2,5
C3	4	10,0

N=número.

- Oito pacientes não possuíam sua classificação definida pelo CDC.

Apenas duas pacientes mudaram sua classificação após o parto imediato de A1 para A2, devido à queda na contagem de células CD4.

5.2 Características dos recém-nascidos

Caracterizando o peso e a idade gestacional ao nascimento, oito recém-nascidos (20%) apresentaram baixo peso (< 2500 gramas) e três (7,5%) eram pré-termo (menos de 37 semanas completas).

Na TAB. 7 os recém-nascidos foram caracterizados quanto à idade gestacional no parto (em semanas), peso (em gramas) e apgar de primeiro e quinto minutos de vida, na inclusão no estudo.

TABELA 7

Caracterização dos recém-nascidos quanto à idade gestacional (em semanas), peso (em gramas) e apgar de primeiro e quinto minutos de vida, na inclusão no estudo

Características	N	Mín-Máx	Mediana	Intervalo interquartil
Idade gestacional (semana)	40	32 – 40	38,0	38 - 38
Peso (em gramas)	40	1345 – 3590	3047	2722-3250
Apgar 1º minuto	40	4 – 9	8,0	8 – 9
Apgar 5º minuto	40	9 – 10	9,0	9 - 9

N= número; Mín= mínimo; Máx= máximo.

* NA= não se aplica.

Obteve-se resultado da carga viral de 37 recém-nascidos, 36 colhidas até o sétimo de vida e uma no 30º dia. Três recém-nascidos tinham a carga viral desconhecida nesse período. Um total de 36 RNs apresentou

resultado indetectável. Apenas um exibiu carga viral positiva dosada no primeiro dia de vida, tornando-se negativa após o segundo mês de vida.

Os RNs foram acompanhados por período mínimo de três meses após o parto, 38 considerados sororrevertor e dois sem *status* definido nem carga viral conhecida após o parto, por perda de seguimento.

5.3 Dosagem da carga viral no líquido amniótico

Foram armazenadas 40 amostras a -70 graus C (*freezer*: Thermo Forma). O controle de temperatura foi rigorosamente feito utilizando-se dois termômetros (um acoplado ao próprio *freezer* e outro calibrado por empresa certificada pelo Inmetro). A temperatura foi registrada diariamente e a manutenção preventiva foi feita semestralmente. Para o processamento das amostras, todas foram descongeladas e centrifugadas no mesmo dia, com o intuito de realizar a extração, a amplificação e a detecção da carga viral.

Na dosagem da carga viral no líquido amniótico, no *Nuclisens Easy Q*, foram realizadas cinco corridas, sendo quatro delas com nove amostras e uma com 18 amostras já preparadas. Optou-se pela realização das corridas com esse número de amostras para melhor aproveitamento do *primer* e da enzima usados no *kit* da Biomérieux. Definiu-se que toda amostra positiva seria dosada novamente, desde que a quantidade de material colhido o permitisse.

Na primeira corrida dosaram-se nove amostras, sendo duas invalidadas, número 12 e 27, por pouca ou nenhuma amplificação ocorrida (APÊNDICE B). Em todas as outras sete a carga viral foi indetectável.

Na segunda corrida, foram dosadas nove amostras, com apenas uma invalidada por não ocorrer amplificação. Essa amostra foi a mesma de número 27 da primeira corrida, novamente testada por ter sido identificada alguma falha no processo de extração, optando-se por sua reextração. Nas oito amostras nas quais foram possíveis a extração e a amplificação, a carga viral foi indetectável.

Na terceira corrida, todas as nove amostras foram validadas e duas apresentaram resultado positivo: a de número 20 com resultado de 90 UI/mL e a de número 23 com resultado de 58 UI/mL.

Na quarta corrida foram dosadas 18 amostras, sendo que as amostras de número 2 e 3 foram invalidadas por não ter ocorrido amplificação. Uma amostra apresentou positividade, número 4, detectando-se 100 UI/mL.

Na quinta corrida, todos os resultados foram validados. Reextraíram-se e dosaram-se novamente as amostras de líquido amniótico invalidadas anteriormente, números 2 e 3. Estas apresentaram resultados indetectáveis na nova dosagem. As amostras positivas, números 20 e 23, foram novamente extraídas e dosadas. A de número 4 não foi testada novamente por não haver quantidade de material suficiente para nova extração. Nos resultados encontrados, a amostra número 20, antes com resultado de 90 UI/mL, apresentou, em sua nova extração, resultado não detectável. A amostra 23, antes com resultado de 58 UI/mL, em sua nova extração manteve a positividade, detectando-se 29 UI/mL.

Conforme já citado, em duas das três amostras positivas na primeira dosagem o processo de extração, amplificação e detecção foi repetido. Uma amostra não foi testada novamente por quantidade insuficiente de material colhido para a realização de nova extração.

A TAB. 8 demonstra os resultados encontrados na detecção da carga viral no líquido amniótico das amostras positivas. As outras 37 tiveram quantidade de vírus indetectável para a sensibilidade do teste.

TABELA 8

Resultado das amostras de líquido amniótico positivas para HIV-1

Amostras	Carga viral 1ª dosagem	Carga viral 2ª dosagem
20	90 UI/mL	Indetectável
23	58 UI/mL	29 UI/mL
4	100 UI/mL	Não testada

O resultado comparativo dos valores encontrados na dosagem da carga no líquido amniótico com os valores da carga viral sérica materna e neonatal obtidos após o parto está representado na TAB. 9.

TABELA 9

Resultado comparativo das amostras de líquido amniótico positivas para HIV-1 com os valores da carga viral plasmática materno e neonatal

Amostras	Carga viral líquido amniótico	Carga viral neonatal	Carga viral Materna
20	90 UI/ml	Indetectável	Indetectável
23	58 UI/ml	Indetectável	Indetectável
4	100 UI/ml	Indetectável	Indetectável

6 Discussão

Desde a descoberta do HIV o perfil dos pacientes infectados variou muito. No início da infecção, os casos descritos eram de homossexuais. Nos dias atuais, com a predominância heterossexual da transmissão, a mulher tornou-se um grande grupo alvo, especialmente aquelas em idade reprodutiva.⁵ O diagnóstico da infecção pelo HIV em gestantes é de suma importância, com o intuito de adotarem-se medidas profiláticas capazes de reduzir significativamente a taxa de transmissão vertical.

Em termos de diagnóstico no Brasil, o Ministério da Saúde preconiza a realização do ELISA em duplicata, como método de triagem, e o *Western Blot* ou a IF como testes confirmatórios.^{10,28} É responsabilidade da equipe de saúde solicitar, o mais cedo possível, a sorologia anti-HIV na gravidez.

Diversos estudos têm se voltado para a melhor identificação das formas de transmissão do HIV.^{20,22,49} O vírus é sabidamente encontrado no plasma, leite materno, sêmen e secreção vaginal em quantidades suficientes para causar a infecção.¹⁶ Outros compartimentos vêm sendo analisados, como a saliva, a urina e, atualmente, o líquido amniótico.¹⁷ Este aprimoramento nas formas de detecção e concentração viral busca mais conhecimento sobre a doença, objetivando a identificação dos fatores de risco e de medidas profiláticas a serem adotadas.

Os fatores de risco durante a gestação e o parto e as medidas profiláticas adotadas durante o pré-natal e intraparto, tais como o uso de anti-retrovirais, a substituição do aleitamento materno por fórmula láctea e a escolha da via de parto dependendo da carga viral plasmática materna, já são bem conhecidos²⁰, mas os fatores de risco de infecção intra-útero ainda são incertos.

O presente estudo buscou conhecer melhor a transmissão intra-útero investigando a presença do HIV e sua quantificação no líquido amniótico,

comparando com os valores encontrados no sangue periférico materno e do recém-nascido. Pesquisas recentes mostram elevação das taxas de transmissão observadas nesse período do ciclo gravídico-puerperal, revelando taxas de até 23% de transmissão.¹⁸

Alguns fatores exercem papel significativo na transmissão intra-útero como, por exemplo, a resposta imunológica deficiente do recém-nascido.⁴²

A transmissão intra-uterina pode ocorrer por acesso do vírus livre ou por células infectadas pelo HIV presentes na circulação materna, para a placenta.¹⁸ A detecção do vírus no líquido amniótico antes da ruptura das membranas e sua quantificação poderiam estabelecer uma correlação com a transmissão vertical intra-útero e dar início à identificação de fatores de risco e formas de profilaxia mais eficazes.

6.1 Características maternas e dos recém-nascidos

Avaliando as gestantes acompanhadas no estudo, pôde-se identificar a importância do rastreamento pré-natal para a infecção pelo HIV e a ação de várias medidas profiláticas adotadas, com o intuito de reduzir a taxa de transmissão vertical.

Mais da metade das pacientes (67,5%) teve confirmação diagnóstica da infecção pelo HIV durante a gestação, o que reforça a recomendação internacional, adotada pelo governo brasileiro, de rastrear o vírus em toda gestante. Série brasileira de gestantes infectadas pelo HIV demonstrou taxa semelhante (66%) de diagnóstico da infecção durante a gravidez.⁵⁰ Melo *et al.* (2005)⁵ publicaram estudo realizado no Hospital das Clínicas entre 1994 e 2004 avaliando gestantes HIV positivo acompanhadas no

serviço, verificando taxa mais baixa de confirmação diagnóstica da infecção durante a gestação (45,4%).

A mediana da idade (28 anos) e o tempo de estudo (quatro anos) das gestantes incluídas no presente estudo não diferem da literatura.^{51,52} Quanto ao estado civil, 62% das pacientes relataram ser casadas, semelhantemente a série de casos publicada anteriormente⁵, mas em discordância com outra, na qual 82,8% das mulheres infectadas pelo HIV eram solteiras.⁵³

A mediana de início das consultas de pré-natal foi de 17 semanas, sendo que, no presente estudo, apenas 32,5% das gestantes iniciaram o seguimento pré-natal ainda no primeiro trimestre da gestação. O número médio de consultas entre essas pacientes foi oito. É bem definido que o início precoce da assistência pré-natal favorece o resultado perinatal, principalmente no que se refere à introdução das medicações anti-retrovirais.

Duas pacientes fizeram apenas uma consulta de pré-natal, ambas sabidamente infectadas antes do início da gravidez de inclusão no estudo. Nenhuma das duas fez uso de qualquer terapia anti-retroviral durante a gestação, mas receberam AZT endovenoso periparto. Uma delas apresentava carga viral maior que 1.000 cópias/mL no momento do parto. Esse achado não é o habitual no perfil das gestantes acompanhadas no nosso serviço no Hospital das Clínicas da UFMG, cuja investigação entre 1994 e 2004⁵ relatou grande diferença, com mediana da idade de início do pré-natal de 19 semanas e uso de ARV durante a gestação de 97,8%. Os RNs dessas duas gestantes foram acompanhados até o sexto mês de vida, apresentando resultado negativo para o ELISA; e as amostras de líquido amniótico dessas pacientes não revelaram carga viral detectável, apesar dos fatores de risco claramente identificados.

O uso de ARV durante a gestação vem sendo recomendado desde meados da década de 90 a partir de estudo pioneiro que demonstrou a eficácia da monoterapia com zidovudina na redução da transmissão vertical do HIV.³⁴ Atualmente, o esquema mais preconizado é a associação de três ou mais tipos de ARV para potencializar ao máximo os seus efeitos e reduzir a carga viral em níveis indetectáveis durante a gravidez. Nas gestantes acompanhadas nesta pesquisa, 92,5% fizeram uso de *Highly active antiretroviral therapy* (HAART). Três não usaram ARV, duas por início tardio do pré-natal e uma por diagnóstico tardio da infecção durante a gestação. Nenhuma dessas três apresentou carga viral detectável no líquido amniótico.

A administração do AZT venoso durante o parto é outro fator importante para a proteção do feto.^{34,35} No presente trabalho, 100% das pacientes receberam AZT intravenoso no periparto. Sem dúvida, um fator que influenciou esse resultado foi o fato de que todos os casos incluídos tinham previamente a indicação de cesariana eletiva com conseqüente internação programada. As indicações para a realização da cesariana foram a carga viral maior que 1.000cópias/mL próximo da data da interrupção da gestação (oito casos - 20%), carga viral desconhecida no final da gestação (dois casos - 5%), cesariana prévia (24 casos - 60%), oligodramnia com gestação a termo sem causa justificável (quatro casos - 10%), CIUR com elevação dos níveis pressóricos maternos (um caso - 2,5%) e feto em apresentação anômala em gestação a termo (um caso - 2,5%).

Baixa proporção das gestantes apresentou contagem de linfócitos T CD4+ abaixo de 200 células/mm³ (16,7%) durante o pré-natal e após o parto (13,9%), indicando ausência de comprometimento imunológico grave na maioria delas. Proporção semelhante foi encontrada em estudo anterior realizado no Hospital das Clínicas (14,3%).⁵ Contudo, para outros autores,

a proporção de mulheres com contagem de linfócitos T CD4+ abaixo desse valor foi mais elevada, tendo sido 29,4% na série de Monfenson *et al.* (1999)⁵⁴ e 22% na série de Tuomala *et al.* (2002).⁵² Nesta pesquisa, 75% das pacientes apresentaram carga viral próxima do parto com níveis abaixo de 1.000 cópias/mL. Entre as 40 gestantes, 21 (52,5%) apresentavam níveis indetectáveis da carga viral nessa época.

Estudo multicêntrico (*Pediatric AIDS Clinical Trials Group 185 Team*) publicado em 2000, cujas mães estavam em uso de zidovudina profilática – ou outros ARVs –, demonstrou que 497 recém-nascidos tiveram taxas de prematuridade (17%), baixo peso ao nascer (13%) e CIUR (6%) muito semelhantes às de crianças de mulheres não-infectadas que também haviam recebido cuidados pré-natais adequados. Nos resultados neonatais observados nesta pesquisa, obtiveram-se taxa de prematuridade muito mais baixa (7,5%) e taxa mais alta quando se avaliou o baixo peso ao nascimento (20%). Encontrou-se apenas um caso de CIUR. Isto pode ter ocorrido devido aos critérios de inclusão, que restringiam ao grupo apenas pacientes com indicação de cesariana eletiva, não analisando a população acompanhada no serviço como um todo.

A mediana da idade gestacional encontrada no momento do parto foi de 38 semanas. Este resultado foi influenciado pela característica do grupo analisado, que devia ter indicação de cesariana eletiva para que a coleta do líquido amniótico pudesse ocorrer. A cesariana eletiva é indicada normalmente com 38 semanas de gestação.

Todos os RNs com idade gestacional menor que 37 semanas completas ao nascimento apresentaram carga viral indetectável colhida até o terceiro dia após o parto e em líquido amniótico. Sabe-se que o tipo de parto está associado ao risco de transmissão. Metanálise publicada em 1999 envolvendo 8.533 pares de mães e filhos encontrou decréscimo de 50%

do risco de transmissão entre as mulheres submetidas à cesariana eletiva (*Odds ratio* - OR= 0,45; IC a 95%: 0,33 - 0,56). Quando a cesariana eletiva foi associada ao uso de ARV materno e neonatal, a taxa de transmissão foi reduzida para 2%.⁵⁵

Nesta avaliação, os resultados perinatais encontrados reforçam o conhecimento atual de como a adoção de condutas adequadas durante a gestação, parto e puerpério é determinante na redução da transmissão vertical do HIV. O seguimento dessas pacientes em pré-natal especializado realizado por equipe treinada foi fundamental para o resultado neonatal encontrado.

Dos recém-nascidos avaliados, 38 foram considerados sororrevertor e dois não tinham *status* definido nem carga viral conhecida após o parto, por perda de seguimento.

6.1.1 Características das pacientes e recém-nascidos que apresentaram carga viral detectável no líquido amniótico

Avaliando as características das pacientes que apresentaram positividade na detecção da carga viral no líquido amniótico e seus recém-nascidos, verificaram-se os seguintes dados: duas pacientes (casos 4 e 20) receberam o diagnóstico da infecção pelo HIV dois anos antes da gestação de inclusão no estudo, uma durante a gravidez anterior (caso 20) e outra fora do período gestacional, após diagnóstico da doença do filho anterior (caso 4). A terceira paciente (caso 23) descobriu a infecção pelo HIV durante a gestação da presente pesquisa, com idade gestacional de nove semanas.

Todas as três negavam uso de drogas ilícitas previamente e durante a gestação, duas (caso 20 e 23) eram tabagistas. Todas iniciaram o pré-natal no nosso serviço no segundo trimestre, duas com 13 semanas e uma com 21 semanas, semelhantemente à mediana das demais do grupo avaliado.

Todas fizeram uso de ARV com esquema tríplice e compareceram a mais de 10 consultas pré-natais cada, número mais alto que a mediana do grupo avaliado, que foi de oito consultas. Em relação à classificação do CDC, a gestante 4 foi categorizada como classe C2 e apresentava contagem de células CD4 > 200 cels/mm³ durante a gestação e parto. A gestante 20 foi categorizada na classe A1 e gestante 23 na classe A2, ambas com contagem de células CD4 > 500 cels/mm³, indicando ausência de comprometimento imunológico grave no momento do estudo.

Avaliando a carga viral dessas pacientes, a mesma era indetectável com aproximadamente 34 semanas e também no período periparto. Oito pacientes do estudo (20%) apresentavam carga viral > 1.000 cópias/mL no momento do parto mas, não detectável no líquido amniótico. Nenhuma das três manifestou infecção concomitante ou co-morbidade associada durante o período gestacional. Todas fizeram uso do AZT endovenoso por pelo menos três horas antes da extração do RN e clampagem do cordão.

Observando as características dos recém-nascidos após o parto, todos os três eram a termo (idade gestacional entre 38-39 semanas). O apgar de primeiro minuto variou entre oito e nove e no quinto minuto entre nove e 10. O peso ao nascimento (em gramas) foi de 3.035 (paciente 4), 2.200 (paciente 20) e 3.220 (paciente 23). Nenhum dos três recém-nascidos teve complicações neonatais. Os RNs foram acompanhados até o sexto mês de vida, com carga viral indetectável e ELISA negativo durante esse acompanhamento.

6.2 Líquido amniótico, carga viral detectável x indetectável

Avaliando esses dados, não foi possível identificar fator de risco já conhecido que justificasse a presença do vírus no líquido amniótico. Em contrapartida, puderam-se verificar algumas pacientes com claros fatores de risco, como o não uso de ARV durante a gestação, a elevada carga viral durante a gestação e periparto, prematuridade fetal e baixo peso ao nascimento. Nenhuma das pacientes apresentou carga viral detectável no líquido amniótico.

Esta significativa divergência nos resultados encontrados levanta a questão da real validade desse teste em líquido amniótico e se os resultados encontrados não seriam falso-positivos. Em pacientes infectados pelo HIV, a metodologia mais utilizada para detecção da carga viral em outros compartimentos além do sérico é a NASBA (aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA para a utilização em líquido amniótico), apesar de apresentar menos sensibilidade na detecção do vírus quando comparada com outras metodologias como o RT-PCR e o bDNA.¹⁵ Na literatura consultada encontrou-se apenas duas publicações que utilizaram metodologia semelhante à empregada neste trabalho. Nos resultados apresentados por Mohala *et al.* (2005)²⁰ não houve detecção do HIV no líquido amniótico.

Como já relatado anteriormente, a transmissão intra-uterina pode ocorrer por acesso do vírus livre ou por células infectadas. O HIV apresenta tropismo preferencial por células que expressam em sua superfície moléculas CD4, comumente encontradas em macrófagos e linfócitos. O processo de infecção é facilitado pela presença de co-receptores (CkR5 e CXC-CKP4) presentes nessas células. Alguns autores descrevem na composição do líquido amniótico a existência de estruturas celulares, cuja grande maioria são células descamadas do âmnio e do feto. Encontram-se

células do epitélio escamoso estratificado, epitélio glandular e transicional. Não há relato de infecção viral pelo HIV nesses tipos celulares.²³

Se considerar-se a hipótese de que o resultado positivo aqui encontrado nas três amostras de líquido amniótico representaria verdadeiramente a presença do vírus nesse compartimento, é possível inferir que o vírus encontrado no líquido amniótico provavelmente se refere à sua forma livre, uma vez que não há relato de células infectáveis nesse fluido. Além disso, poder-se-ia também concluir que a constatação do vírus no líquido amniótico não representa infecção fetal, já que nenhum dos recém-nascidos oriundos de gestantes com carga viral positiva no líquido amniótico estava infectado.

Questiona-se, então, de que forma o vírus poderia ter alcançado a cavidade amniótica? Seria o vírus presente na circulação materna capaz de atravessar as membranas placentárias alcançando diretamente a cavidade amniótica? Se sim, ele alcançaria a cavidade amniótica na sua forma livre ou associado a algum componente celular materno? Essa contaminação poderia ter ocorrido a partir de alguma alteração nas membranas placentárias, como áreas de infarto ou necrose, que poderiam facilitar o transporte viral?

Outra hipótese que não pode ser descartada é a possibilidade de a contaminação ter ocorrido durante a coleta do material. A divulsão da parede uterina foi cuidadosamente realizada e, após exposição das membranas, a mesma foi limpa com compressa antes da realização da coleta do material. Análise com a mesma metodologia, incluindo citologia nas amostras de líquido amniótico com o objetivo de identificar hemácias maternas ou fetais, poderia responder esta questão.²⁰

Mohlala *et al.* (2005)²⁰ avaliaram a existência do HIV em líquido amniótico. A população estudada era muito semelhante à deste estudo, quando comparados a idade, média de 28 anos em ambos os trabalhos e o perfil imunológico das gestantes. Esses autores avaliaram 23 pacientes submetidas à cesariana eletiva, mas não detectaram o HIV nas amostras colhidas no líquido amniótico ou no sangue de cordão. As amostras não foram centrifugadas antes da extração viral, ao contrário do que foi feito no presente estudo. Optou-se pela realização prévia da centrifugação com o intuito de eliminar sobrenadantes comumente encontrados, como o vérnix. A centrifugação foi utilizada em avaliação que objetivava quantificação de ARV no líquido amniótico, como citado por Jaspán (2004).⁵⁶ O material gorduroso presente no líquido amniótico pode inibir a amplificação viral e falsear a quantificação do vírus nesse compartimento.

A coleta do líquido amniótico foi muito semelhante em ambos os estudos, apesar da descrição pouco detalhada de Mohlala *et al.*²⁰ Para a realização desta pesquisa, foi feita ampla investigação na busca de técnica mais adequada para a coleta do líquido. Outras avaliações^{56,57} feitas para detecção e quantificação de ARV nesse fluido relataram técnica de obtenção de amostras de líquido amniótico semelhante à de Mohlala *et al.* O método não é fácil e exige habilidade para que não ocorra ruptura das membranas durante a histerotomia. Treinamento prévio foi realizado pela autora durante cesariana eletiva de pacientes não infectadas pelo HIV. Faz-se necessária a mobilização do pólo cefálico antes da histerotomia e, após a exposição das membranas, realiza-se delicada limpeza, que objetiva evitar a contaminação com sangue materno.

Volume mínimo de 2 mL foi exigido para inclusão no estudo, levando-se em consideração a quantidade necessária de material para a realização do NASBA (1 mL). Utilizou-se como princípio que caso alguma amostra apresentasse contaminação macroscópica de sangue ou mecônio seria

desprezada. Nenhuma das amostras mostrou na avaliação visual contaminação com sangue ou mecônio. Foi obtido volume de 2 mL somente em uma das amostras positivas (caso 4), com a centrifugação prévia à extração e ao descarte do sobrenadante. A quantidade obtida foi suficiente apenas para uma extração e amplificação. Em estudos futuros talvez seja válido aumentar o volume mínimo para validar a amostra. Todo teste positivo idealmente deve ser repetido pelo menos uma vez para ratificar o resultado e tirar possíveis dúvidas sobre falso-positivo.

Outro ponto a ser questionado é se houve algum outro fator de risco associado a essas gestações, ainda não conhecido, que justifique a detecção viral no compartimento analisado.

O binômio gestante-feto é susceptível a diversas infecções. O feto pode ser contaminado na vida intra-uterina por via transplacentária ou por infecção ascendente, existindo, também, o risco de contaminação fetal no momento do parto devido ao contato direto com o sangue e secreções maternas. Nas outras infecções congênicas, o exame laboratorial assume papel fundamental. Uma vez confirmada a infecção materna, é necessário continuar a propedêutica para a pesquisa de infecção fetal.⁵⁸

Atualmente, para a grande parcela das infecções congênicas de importância clínica, como toxoplasmose, rubéola, infecção pelo citomegalovírus e pelo parvovírus, o diagnóstico da contaminação fetal é realizado por meio da análise do líquido amniótico, utilizando-se a técnica da PCR.⁵⁸

Já é bem conhecida a detecção de agentes infecciosos e anticorpos maternos contra esses agentes no líquido amniótico, como *toxoplasma gondii*, o vírus da rubéola e o citomegalovírus. No caso deste último, acredita-se que o vírus seja transmitido quando os leucócitos infectados

atravessam a placenta. Ao atingirem o feto, o vírus se aloja predominantemente no epitélio tubular renal e, com a diurese fetal, há eliminação para o líquido amniótico.⁵⁸ Já na pesquisa da rubéola, a detecção de imunoglobulina M (IgM) específica pode indicar a doença fetal.⁵⁹

Best (1996)⁵⁹ já relatava que a detecção da infecção intra-útero não implica a doença no feto. Pode-se, então, aventar a hipótese de que é possível detectar o HIV no líquido amniótico, mas sua presença não confirma, necessariamente, que o feto se encontra acometido.

Na presente pesquisa, detectou-se o vírus da imunodeficiência humana em três dos 40 líquidos amnióticos avaliados utilizando a metodologia NASBA, conforme descrito na literatura para detecção do vírus em outros compartimentos além do plasma. Provavelmente esse vírus encontrava-se na forma livre, uma vez que foram usados centrifugação previamente à extração e tubos de lise para a realização da mesma. Não se encontrou correlação entre a detecção viral no líquido amniótico e a dosagem do HIV no plasma materno ou neonatal. Não foi observada também associação entre a detecção viral nesse compartimento e doença fetal, conforme descrito por Best (1996).⁵⁹ Todas as pacientes com detecção positiva em líquido amniótico apresentavam resultado negativo na sorologia dos RNs.

Apesar do resultado sugerir que o HIV pode ser encontrado no líquido amniótico, não ficou bem esclarecido o mecanismo pelo qual esse vírus atingiu o líquido amniótico e se sua detecção representa realmente sua existência nesse compartimento. Dessa maneira, para avaliar se os casos encontrados são falso-positivos, seria necessário maior número de pacientes e de material colhido. Toda amostra positiva deveria ser testada mais de uma vez para afastar-se essa possibilidade. A avaliação de lesões nas placentas dessas gestantes e a pesquisa de hemácias maternas no

líquido amniótico tornam-se fundamentais para descartar-se a possibilidade de contaminação do material durante a gestação por acometimento placentário ou durante a coleta das amostras.

Grandes esforços têm sido feitos para se diminuir a incidência da transmissão vertical do HIV e para mais conhecimento das formas de transmissão do vírus. É fundamental o diagnóstico precoce durante a gestação com a finalidade de adotarem-se medidas profiláticas adequadas. Dessa maneira, deixa-se registrada a expectativa de que os esforços não sejam em vão e que a cada ano ocorra queda no número de crianças infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana.

7 Conclusão

Neste estudo foi possível identificar a presença do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) em três amostras de líquido amniótico obtido durante a cesariana de gestantes infectadas pelo mesmo. Não foi observada associação entre a quantificação da carga viral no líquido amniótico com a carga viral plasmática materna determinada no terceiro trimestre de gestação e após o parto, nem entre a quantificação da carga viral no líquido amniótico com a carga viral plasmática do recém-nascido.

Referências

1. UNAIDS/WHO. **AIDS epidemic update**: December 2007.[on line] accessed on www.unaids.org.
2. GOTTLIEB, M.S. *et al.* Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **The New England Journal of Medicine**, v.305: p.1425-1431, 1981.
3. HENDRY, R.M. *et al.* Lack of evidence for HIV-2 infection among at-risk individual in Brazil. **J AIDS**, v.4: p.623-627, 1991.
4. SEPKOWITS, K.A. AIDS- the first 20 years. **The New England Journal of Medicine**, v.344 (23), jun. 7, p:1764-1771, 2001.
5. MELO, V.H. *et al.* Resultados maternos e perinatais de dez anos de assistência obstétrica a portadoras do vírus da imunodeficiência humana. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.27, n.11: p.683-690, 2005.
6. FAWZI, W. *et al.* Predictors of intrauterine. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.27, n.11: p.698-705, 2005.
7. D'IPPOLITO, M. *et al.* Missed opportunities for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Latin America and the Caribbean: the NICHD International Site Development Initiative (NISDI) Perinatal Study. *In: 3rd IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment*, 2005 Jul 24-27; Rio de Janeiro, Brazil. Geneva: IAS; p. TuPe5.1P03, 2005.
8. ABBAS, A.K. *et al.* **Imunologia celular e molecular**. São Paulo: 3 ed. Revinter, p:460-469, 2000.
9. PINTO, J.A. **Marcadores prognósticos e diagnósticos precoce em uma coorte de crianças infectadas verticalmente pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1**. 1999 Dissertação (Doutorado em Pediatria).Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
10. MACHADO, A.A.; COSTA, J.C. Métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). *In: Simpósio: VIROLOGIA MÉDICA II Medicina*, Ribeirão Preto, v.32: p.138-146, abr/jun. 1999.
11. LEVINSON, S.S.; DENYS, G.A. Strengths and weaknesses in methods for identifying the causative agent(s) of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Crit Rev Clin Lab Sci**, v.26: p.277-302, 1988.

12. KELLER, G.H.; MANAK, M.M. Detection of HIV-1 nucleic acid in clinical samples using target DNA amplification and nonisotopic probes. *In*: KHAN, N.C.; MILNICK, J.L. eds. **Human immunodeficiency virus: innovative techniques**. Karger, Basel, p.28-60 (Monographs in Virology, 18), 1999.
13. GRANATO, C.F.H. Uso clínico dos marcadores laboratoriais ligados à infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida do tipo 1 (HIV-1). **J SBI**, v.4: p.4, 1996.
14. BELEC, L. Carga viral circulante no decorrer da infecção pelo HIV-1; métodos de avaliação, aplicações clínicas e terapêuticas. *In*: **Anais, Seminário de Cooperação Brasil-França. Os ensaios clínicos dentro do quadro da infecção pelo HIV/AIDS**, Salvador, BA, 23 a 25 de outubro de 1996. Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde Coordenação Nacional de DST e AIDS, p.83-108, 1998.
15. PAN, P. *et al.* Clinical comparison of branched DNA and reverse transcriptase-PCR and nucleic acid sequence-based amplification assay for the quantitation of circulating recombinant form_{BC} HIV-1 RNA in plasma **AIDS**, Dec, v. 21 Suppl 8: p.27-32, 2007.
16. VERGARA, T.R.C., BARROSOS, P.F. Transmissão sexual do HIV: Tendências em HIV. **AIDS**, v.1, n.4: p.17-24, 2006.
17. PILCHER, C.D. *et al.* HIV nos fluidos corporais durante a infecção primária pelo HIV: implicações para a patogênese, tratamento e saúde pública. **AIDS**, v.4, 15, n.7: p.837-45, 2001.
18. SÁ, C.A.M.; RUBINI, N.; ROCCO, R. Aids e gravidez, *In*: REZENDE, J. *et al.* **Obstetrícia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10^a ed., p.625-6, 2005.
19. MUNDY, D.C. *et al.* Human immunodeficiency virus isolated from amniotic fluid. **Lancet**, v.2: p.459-60, 1987.
20. MOHLALA, B.K.F. *et al.* Investigation of HIV in amniotic fluid from HIV-infected pregnant women at full term. **The Journal of Infectious Diseases**, v.192: p.488-91. 2005.
21. REZENDE, J.; MONTENEGRO, C.A.B.; COTTA-PEREIRA, G. Trocas materno-ovulares, *In*: REZENDE, J. *et al.* **Obstetrícia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10^a. ed., p.96, 2005.

22. CAMPANA, S.G.; CHÁVEZ, J.H.; HAAS, P. Diagnóstico laboratorial do líquido amniótico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.39, n.3, 2003.
23. FREIRE, N.S. Propedêutica da gravidez: citologia e citopatologia no ciclo gravídico-puerperal. *In*: REZENDE, J. *et al.* **Obstetrícia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10^a. ed., p.214, 2005.
24. MAIQUES, V. *et al.* HIV detection in amniotic fluid samples Amniocentesis can be performed in HIV pregnant women? **European Journal of Obstetric & Gynecology and Reproductive Biology**, v.108: p.137-141, 2003.
25. VISCARELLO, R.R. Prospects for prenatal diagnosis of congenital infection with HIV. *In*: MELICA, F. Editor. **AIDS and reproduction**. Basel: Karger: p.92-101, 1992.
26. JOHN, G.C. *et al.* Genital shedding of human immunodeficiency virus type-1 DNA during pregnancy: association with immunosuppression, abnormal cervical and vaginal discharge and severe vitamin A deficiency. **J Infect Dis**, v.175, n.1: p.57-62, 1997.
27. LEWIS, P. *et al.* Cell-free human immunodeficiency virus type 1 in breast milk. **J Infect Dis**, v.177, n.1: p.34-39, 1998.
28. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Recomendações para profilaxia da transmissão vertical do HIV e terapia anti-retroviral em gestantes**. Brasília Ed MS n0 46 160p, 2007. www.aids.gov.br
29. BERTOLLI, J. *et al.* Estimating the time of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus in a breastfeeding cohort in Kinshasa, Zaire. **J Infect Dis**, v.174: p.722-726, 1996.
30. DUNN, D.T. *et al.* Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission through breastfeeding. **Lancet**, v.340: p.585-588, 1992.
31. BOBAT, R. *et al.* Breastfeeding by HIV-1 infected women and outcome in their infants: a cohort study from Durban, South Africa. **AIDS**, v.11, n.13: p.1627-1633, 1997.
32. MINKOFF, H. (G.E.) HIV and pregnancy. **Clin Obst Gynecol**, v.137: p.44-2, 2001.

33. CHUACHOOWONG, R. *et al.* Short-course antenatal zidovudine reduces both cervicovaginal human immunodeficiency virus type 1 RNA levels and risk of perinatal transmission. **J Infect Dis**, v. 181, n.1: p.99-106, 2000.
34. CONNOR, E.M. *et al.* Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. **N Engl J Med.**, v.331, n.18: p.1173-80, 1994.
35. WATTS, H.D. Management of human immunodeficiency virus infection on pregnancy. **N Engl J Med**, v.346, n.24: p.1879-91, 2002.
36. MINKOFF, H. Human Immunodeficiency Virus Infection in Pregnancy. **Obstet Gynecol**, v.101: p.797-810, 2003.
37. THEA, D.M. *et al.* The effect of maternal viral load on the risk of perinatal transmission of HIV-1. **J Infect Dis**, v.175: p.707-711, 1997.
38. GARCIA, P.M. *et al.* Maternal levels of plasma immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. **N Engl J Med**, v.341: p.394-402, 1999.
39. LIN, H.H. *et al.* Least microtransfusion from mother to fetus in elective cesarean delivery. **Obstet Gynecol**, v.87: p.244-8, 1996.
40. DUARTE, G.; QUINTANA, S.M.; BEITUNE, P. Fatores que influenciam a transmissão vertical do vírus da imunodeficiência humana tipo 1. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.27, n.11: p.698-705, 2005.
41. OMETTO, L. *et al.* Viral phenotype and host-cell susceptibility to HIV-1 infection as risk factors for mother-to-child HIV-1 transmission. **AIDS**, v.9, n.5: p.427-3448, 1995.
42. ROWLAND-JONES, S.L. *et al.* HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. **Lancet**, v.341 (8849): p.860-1, 1993.
43. MISRAHI, M. *et al.* CCR5 chemokine receptor variant in HIV-1 mother-to-child transmission and disease progression in children. French Pediatric HIV Infection Study Group. **JAMA**, v.279, n.4: p.277-80, 1998.
44. MOFENSON, L.M. Mother-child HIV-1 transmission. Timing and determinants. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v.24, n.4: p.759-84, 1997.

45. TESS, B.H. *et al.* Breastfeeding, genetic, obstetric and other risk factors associated with mother-to-child transmission of HIV-1 in São Paulo State, Brazil. São Paulo Collaborative Study for Vertical Transmission of HIV-1. **AIDS**, v.12, n.5: p.513-20, 1998.
46. MAGDER, L.S. *et al.* Risk factors for in utero and intrapartum transmission of HIV. **J Acquire Immune Defic Syndr**, v.38, n.1: p.87-95, 2005.
47. EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY. Risk factors for mother-to-child transmission of HIV-1. **Lancet**, v.339:p.1007-1012, 1992.
48. BOOM, R. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.3: p.495-503, Mar. 1990.
49. SHEPARD, R.N. *et al.* Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in different biological compartments. **Journal of Clinical Microbiology**, v.4: p.1414-1418, 2000.
50. JOAO, E.C. *et al.* Vertical transmission of HIV in Rio de Janeiro, Brazil. **AIDS**, v.17: p.1853-56, 2003.
51. NOGUEIRA, S.A. *et al.* Successful prevention of HIV transmission from mother to infant in Brazil using a multidisciplinary team approach. **Braz J Inf Dis**, v.5, n.2: p.78-86, 2001.
52. TUOMALA, R.E. *et al.* Anti-retroviral therapy during pregnancy and the risk of an adverse outcome. **N Engl J Med**, v.346: p.1863-70, 2002.
53. ELLIS, J. *et al.* Human immunodeficiency virus infection is a risk factor for adverse perinatal outcome. **AJOG**, v.186, n.5: p.903-6, 2002.
54. MONFENSON, L.M. *et al.* Risk factors for perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with zidovudine. **New Engl J Med**, v.341, n.6: p.385-93, 1999.
55. THE INTERNATIONAL PERINATAL HIV GROUP. The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1: a meta-analysis of 15 prospective cohort studies. **N Engl J Med**; v.340: p.977-87, 1999.
56. JASPAN, H.B. *et al.* Amniotic fluid has higher relative levels of lentivirus-specific antibodies than plasma and can contain neutralizing antibodies, **Journal of Clinical Virology**, v.31: p.190-197, 2004.

57. CHPPUY, H. *et al.* Maternal-Fetal transfer and amniotic fluid accumulation of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors un human immunodeficiency virus-infected pregnant women. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.11: p.4332-4336, 2004.
58. COUTO, J.C.F.; LEITE, M.J.; SOARES, E.B. Infecções perinatais *In*: CORRÊA, M.D. *et al.* **Noções Práticas de Obstetrícia**. Belo Horizonte: Coopmed, 13^a ed., p.719-744, 2004.
59. BEST, J.M. Laboratory diagnosis of intrauterine and perinatal virus infections. **Clinical and Diagnostic Virology**, v.5: p.121-129, 1996.

Apêndices e Anexo

Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido

Título do Projeto:

DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL EM LÍQUIDO AMNIÓTICO, NO MOMENTO DA CESARIANA, DE GESTANTES INFECTADAS PELO HIV

INTRODUÇÃO

Você está sendo convidada a participar deste estudo porque está infectada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e, portanto, seu bebê tem risco de adquirir o HIV. Este é um formulário de consentimento que lhe dará informações sobre o estudo. Se você decidir participar, e também permitir a participação de seu bebê, você deverá assinar este formulário de consentimento. Você receberá uma cópia do termo de consentimento e a outra ficará com o pesquisador.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

O propósito deste estudo é obter informações sobre mulheres grávidas infectadas pelo HIV, e seus bebês, que estiverem recebendo atendimento médico no Centro de Treinamento e Referências em Doenças Infecciosas e Parasitárias Orestes Diniz (CTR-DIP) e no Hospital das Clínicas da UFMG. Você e seu filho irão receber remédios já aprovados para uso em pessoas infectadas pelo HIV. Nenhum desses medicamentos está sendo testado pela primeira vez neste estudo. Os dados obtidos nesta pesquisa serão utilizados para uma dissertação de mestrado e serão arquivados com a pesquisadora, professora Regina Amélia. No caso de ser utilizado em outra pesquisa, você será procurada para autorizar assinando novo termo de consentimento livre e esclarecido.

O QUE EU (E MEU FILHO) PRECISAREMOS FAZER NAS VISITAS DO ESTUDO?

Na maternidade serão obtidas informações sobre você e seu filho. Este estudo será realizado nas mulheres submetidas à cesariana, quando será colhido líquido amniótico antes da retirada do bebê (aproximadamente 20 mL). Deverá também ser colhida amostra do seu sangue e do seu bebê, para a realização de exames de laboratório relacionados com a infecção pelo HIV. Serão retirados de você aproximadamente 14 mL (três colheres de chá) de sangue e de seu bebê aproximadamente 9 mL (duas colheres de chá). Os exames realizados em você e no seu bebê serão semelhantes aos de qualquer paciente portadora do HIV, conforme o protocolo do Hospital das Clínicas. Você e seu bebê receberão um Número de Identificação de Paciente (NIP). As informações recolhidas não irão conter seu nome ou do seu bebê, de modo que suas identidades não serão reveladas.

O QUE SERÁ FEITO COM AS AMOSTRAS DE SANGUE E LÍQUIDO ARMAZENADAS?

As pesquisas com as amostras de sangue e líquido armazenadas podem incluir estudos para entender como o HIV causa doença, qual o melhor tratamento, qual a melhor forma de prevenção do HIV e de suas complicações. Podem incluir também testes de resistência do vírus aos medicamentos. Os resultados serão anotados em seu prontuário para que seus médicos possam consultá-los.

QUANTAS MULHERES E SEUS BEBÊS PARTICIPARÃO DESTE ESTUDO?

O estudo irá incluir 30 a 50 pares de mães e bebês.

EU OU MEU BEBÊ PODEREMOS SER RETIRADOS DO ESTUDO?

Vocês serão retirados do estudo se no líquido colhido houver contaminação com outro material, como sangue, por exemplo, ou apresentar volume menor que o necessário.

QUAIS SÃO OS RISCOS DESTE ESTUDO?

Não há altos riscos para você ou seu bebê por participar do estudo. A coleta de sangue pode provocar desconforto, sangramento ou hematomas onde a agulha penetrar no corpo, da mesma forma que qualquer exame de sangue realizado durante o pré-natal. A coleta de líquido não provoca riscos para você ou para seu bebê na hora da cesariana.

QUAIS OS BENEFÍCIOS DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?

Os resultados deste estudo ajudarão os médicos a entender melhor o que deve ser feito para reduzir a transmissão do HIV para os bebês durante a gravidez e o parto. Ajudarão também a avaliar os riscos e os benefícios dos medicamentos administrados durante a gravidez, contra o HIV.

O QUE PODE OCORRER SE EU NÃO CONCORDAR EM PARTICIPAR?

Se você decidir não participar, mesmo assim continuará a receber todo o tratamento necessário durante a gravidez, parto e pós-parto. Seu bebê também será tratado e acompanhado durante o tempo que for necessário para verificar se ele foi ou não contaminado pelo HIV. Ou seja, você pode se recusar a participar do estudo ou mesmo se retirar a qualquer momento sem que isto atrapalhe o seu tratamento ou de seu filho no Hospital das Clínicas da UFMG.

CONFIDENCIALIDADE

Serão feitos esforços no sentido de manter o sigilo do seu prontuário médico e o de seu filho. Além disso, todos os registros serão mantidos em fichário trancado. Entretanto, esses registros poderão ser vistos por

indivíduos que trabalham neste estudo e os resultados poderão ser publicados em revistas científicas. Você e seu bebê não serão pessoalmente identificados em qualquer publicação resultante da informação recolhida neste estudo.

HÁ ALGUM CUSTO PARA MIM?

Não há qualquer custo para você relacionado com as visitas clínicas, exames ou testes de laboratório durante o estudo.

EU (OU MEU BEBÊ) RECEBEREI ALGUM PAGAMENTO?

Você e seu bebê não receberão pagamento por estarem participando deste estudo.

O QUE ACONTECERÁ SE EU (OU MEU BEBÊ) SOFRER ALGUMA LESÃO?

Se você ou seu bebê sofrerem algum tipo de lesão em consequência deste estudo, o Hospital das Clínicas da UFMG dispensará a você(s) todo o tratamento e cuidados necessários para a sua imediata recuperação, sem qualquer custo para você(s).

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS (E OS DE MEU BEBÊ) COMO SUJEITOS DA PESQUISA?

A participação neste estudo é completamente voluntária. A qualquer momento você poderá optar por não participar ou sair do estudo ou por não permitir que seu filho tome parte, sem qualquer prejuízo quanto ao tratamento de vocês dois.

NOVAS DESCOBERTAS OU RESULTADOS DO ESTUDO

Qualquer descoberta de importância que resultar do estudo lhe será transmitida por um membro da equipe. No final, quando os resultados estiverem prontos, eles serão comunicados a você.

O QUE DEVO FAZER SE TIVER PROBLEMAS OU PERGUNTAS?

No caso de perguntas sobre este estudo ou lesão relacionada com a pesquisa, fazer contato com a professora Dra. Regina Amélia Lopes Pessoa de Aguiar ou com a Dra. Ana Christina de Lacerda Lobato nos telefones 3248-9424 ou 3248-9421. Você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG: Av. Prof. Antônio Carlos 6627- Unidade Administrativa II - 2º andar Campus Pampulha - fone 031 34994592

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu li este formulário de consentimento (ou alguém o explicou para mim), todas as minhas perguntas foram respondidas e concordo em tomar parte neste estudo. Estou ciente de que eu (ou meu filho) podemos sair a qualquer momento, sem perder o direito de receber cuidados médicos.

Nome da gestante (legível)

Assinatura da gestante

Data: _____

Eu concordo em que as amostras do meu sangue e do sangue do meu filho sejam armazenadas para futuros estudos de pesquisa.

Sim Não (Circular um)

Responsável pelo estudo

Assinatura do responsável pelo estudo

Data _____

Nome da testemunha

Assinatura da testemunha

Data _____

Apêndice B - Dados dos binômios analisados no epi-info versão 3.4.1

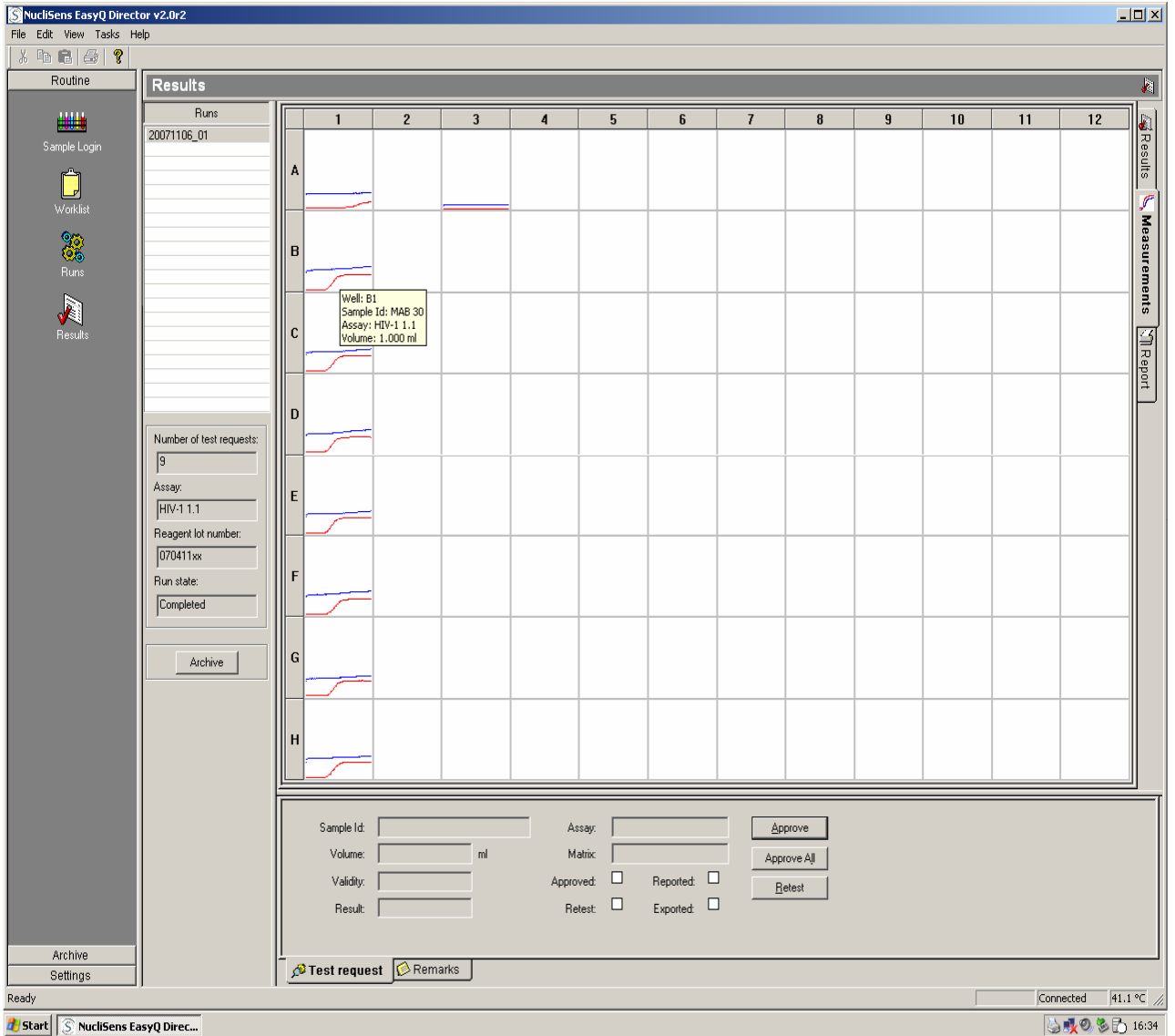
N	idade	G	P N	PC	A	Temp diag	Gest Atual	Gest Ant	Foi gest	Escol	E civil	tera pia	cdc	cdc
1	26	3		2		4	No	Yes	No	6	casada	tripla	c	3
2	28	3		2			Yes	No	No	4	separad	tripla	a	1
3	30	3		2		4	No	No	Yes	8	casada	tripla	a	3
4	25	3		2		2	No	No	Yes	8	casada	tripla	c	3
5	31	4	2		1	3	No	No	Yes	4	estavel	tripla	b	3
6	27	2	1			4	No	No	Yes	10	estavel	tripla	a	3
7	29	5	2	1	1	8	No	Yes	No	11	estavel	tripla	b	2
8	16	2			1		Yes	No	No	7	solteira	tripla	a	2
9	24	4		3		4	No	Yes	No		estavel	nenh	?	?
10	33	3	1	1		10	No	No	Yes	7	estavel	quad	c	3
11	22	4	3			3	No	Yes	No	4	estavel	tripla	a	2
12	28	2		1		2	No	No	Yes	8	casada	tripla	a	2
13	31	4	2	1			Yes	No	No	4	casada	tripla	a	1
14	28	3	1	1		2	No	Yes	No	8	casada	tripla	a	1
15	30	5	2	1	1		Yes	No	No	4	estavel	tripla	c	3
16	34	2		1		5	No	Yes	No	5	estavel	tripla	a	1
17	37	7	6			3	No	Yes	No	4	estavel	tripla	?	?
18	38	4		3		6	No	No	Yes	4	casada	tripla	a	3
19	31	5		3	1	5	No	No	Yes	8	casada	tripla	b	3
20	30	5	2	2		2	No	Yes	No	2	estavel	tripla	a	1
21	24	5	3	1		2	No	Yes	No	2	solteira	tripla	c	2
22	32	4	1	1	1	5	No	No	Yes	4	estavel	tripla	a	3
23	25	1					Yes	No	No	13	estavel	tripla	a	2
24	26	5		2	2	4	No	No	Yes	7	estavel	tripla	b	3
25	31	2		1		1	No	Yes	No	4	solteira	tripla	a	2
26	33	7	4	1	1		Yes	No	No	?	estavel	tripla	a	2
27	18	2	1				Yes	No	No	7	estavel	quad	a	1
28	29	6	2	1	1		Yes	No	No	4	estavel	tripla	a	2
29	27	3		1	1	2	No	Yes	No	2	estavel	tripla	a	2
30	31	4	2	1		10	No	Yes	No	4	estavel	tripla	b	2
31	28	3	1	1			Yes	No	No	2	estavel	nenh	a	1
32	35	3			2		Yes	No	No	7	estavel	tripla	a	2
33	45	3	1	1		4	No	Yes	No	4	estavel	tripla	a	3
34	27	5		3	1	2	No	Yes	No	9	estavel	tripla	a	1

35	27	3	2			10	No	No	Yes	4	casada	tripla	a	2
36	23	4		2	1	3	No	Yes	No	4	solteira	quad	b	1
37	31	2		1		5	No	No	Yes	4	viúva	nenh	a	2
38	22	2		1		7	No	Yes	No	7	estavel	tripla	a	1
39	37	2		1		12	No	No	Yes	8	estavel	quad	a	1
40	24	5	1	1	2	2	No	Yes	No	9	estavel	tripla	a	3

N	Parto	IG	Peso	Apgar1	Apgar5	AZT-ATQ	AZTman	cons	InícioPN	IndicaçãoPC
1	1 PCE	38	2970	8	9	Yes	Yes	14	10	iterativa
2	1 PCE	38	3545	9	10	Yes	Yes	?		iterativa
3	1 PCE	39	3440	8	9	Yes	Yes	8	11	iterativa
4	1 PCE	38	3035	9	10	Yes	Yes	14	13	iterativa
5	1 PCE	40	3125	8	9	Yes	Yes	11	10	outras
6	2PCTP	38	3060	9	9	Yes	Yes	10	17	outras
7	1 PCE	38	3465	4	9	Yes	Yes	10	19	iterativa
8	1 PCE	38	2735	8	9	Yes	Yes	12	9	cv>1000
9	1 PCE	40	3380	8	9	Yes	Yes	1	40	iterativa
10	1 PCE	38	3200	8	9	Yes	Yes	5	24	iterativa
11	1 PCE	38	3250	8	9	Yes	Yes	3	33	outras
12	1 PCE	38	3205	8	9	Yes	Yes	15	10	iterativa
13	1 PCE	38	3360	8	9	Yes	Yes	10	20	iterativa
14	1 PCE	38	3060	8	9	Yes	Yes	4	14	iterativa
15	1 PCE	37	2135	9	10	Yes	Yes	7	32	cv+iterativa
16	1 PCE	39	2595	9	9	Yes	Yes	12	18	iterativa
17	1 PCE	37	2920	6	9	Yes	Yes	4	22	cv>1000
18	1 PCE	38	3200	9	9	Yes	Yes	6	11	iterativa
19	1 PCE	38	2960	8	9	Yes	Yes	8	9	iterativa
20	1 PCE	38	2200	8	9	Yes	Yes	10	21	cv>1000
21	1 PCE	38	2435	9	10	Yes	Yes	5	15	outras
22	1 PCE	36	2955	5	9	Yes	Yes	7	19	outras
23	1 PCE	39	3220	8	9	Yes	Yes	13	13	outras
24	1 PCE	38	3175	9	10	Yes	Yes	13	8	cv+iterativa
25	1 PCE	39	3255	8	9	Yes	Yes	9	13	iterativa
26	1 PCE	36	2730	8	9	Yes	Yes	6	23	iterativa
27	1 PCE	38	2740	8	9	Yes	Yes	4	21	cv>1000
28	1 PCE	39	3390	8	9	Yes	Yes	3	37	iterativa
29	1 PCE	38	3250	9	10	Yes	Yes	11	11	iterativa
30	1 PCE	38	2460	8	9	Yes	Yes	15	9	iterativa
31	1 PCE	38	2450	8	9	Yes	Yes	8	13	cv+iterativa
32	1 PCE	32	1345	8	9	Yes	Yes	6	17	CIUR
33	1 PCE	37	2450	8	9	Yes	Yes	5	29	cv+iterativa
34	1 PCE	38	3590	8	9	Yes	Yes	11	9	iterativa
35	1 PCE	38	2715	9	10	Yes	Yes	3	29	outras
36	1 PCE	39	2940	8	9	Yes	Yes	6	32	iterativa
37	1 PCE	40	2790	8	9	Yes	Yes	1	40	iterativa
38	1 PCE	38	3255	7	9	Yes	Yes	7	28	iterativa
39	1 PCE	38	2195	9	10	Yes	Yes	6	9	iterativa
40	1 PCE	38	3250	8	9	Yes	Yes	14	9	iterativa

N	Cvpre valor	Cvparto valor	CD4pre valor	CD4parto valor	CvTempo pre- parto	Cvtempo posparto	CVRN Valor	TempoRN parto-cv	LA CV
1	1	1	725	719	34	3	1	3	1
2	1	0	542	0	28	75			1
3	1	1	138	184	35	2	1	2	1
4	1	1	258	248	33	2	1	2	100
5	1	1	863	441	34	1	1	1	1
6	1	1	368	410	33	3	1	3	1
7	884	1	425	319	35	1	1	1	1
8	6633	6981	325	341	33	1	210	1	1
9	481	660	638	479	30	2	1	2	1
10	13938	13179	106	58	34	1	1	1	1
11									1
12	1	1	604	598	34	5	1	5	1
13	1	1	726	346	35	1	1	1	1
14	1	1	603	512	28	3	1	3	1
15	3653	60	97	89	30	2	1	2	1
16	1	1	637	647	36	2	1	2	1
17	115000	96	790	722	30	2	1	2	1
18	1	1	777	783	34	2	1	2	1
19	1	1	608	626	33	2	1	2	1
20	1	1	752	752	35	9	1	3	1
21	19731	6153	222	286	15	1	1	1	1
22	15931	99882	67	74	10	2	1	2	1
23	1	1	672	672	34	15	1	1	29
24	8752	4976	198	231	30	2	1	2	1
25	104	104	428	428	35	25			1
26	1	1	519	600	34	3	1	3	1
27	8435	8435	676	676	33	31	1	3	1
28	1	1	438	438	37	14	1	2	1
29	51	51	342	342	34	26	1	30	1
30	63	63	391	344	34	1	1	1	1
31		2884		567			1		1
32	1	1	333	381	27	3	1	1	1
33	16849	639	32	49	34	1	1	1	1
34	1	1	1084	494	34	1	1		1
35	51	51	550	550	36	10	1	2	1
36	85	1	788	676	33	1	1	2	1
37		12811		446		2	1	2	1
38	112	68	518	624	31	3	1	3	1
39	1	1			34	8	1	8	1
40	74	1	246		34	2	1	1	1

Apêndice C - Resultados detectados no Nuclisens Easy Q Analisador



NucliSens EasyQ Director v2.0r2

File Edit View Tasks Help

Routine

- Sample Login
- Worklist
- Runs
- Results

Results

Runs

- 20071106_02
- 20071106_01

Number of test requests: 9

Assay: HIV-1 1.1

Reagent lot number: 070411xx

Run state: Completed

Archive

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Well: B10 Empty

Sample Id: [] Assay: [] Approve

Volume: [] ml Matrix: [] Approve All

Validity: [] Approved: Reported: Retest

Result: [] Retest: Exported:

Test request Remarks

Ready Connected 41.0 °C

Start NucliSens EasyQ Direc... 20:04

NucliSens EasyQ Director v2.0r2

File Edit View Tasks Help

Routine

- Sample Login
- Worklist
- Runs
- Results

Results

Runs

- 20071106_03
- 20071106_02
- 20071106_01

Number of test requests: 9

Assay: HIV-1 1.1

Reagent lot number: 070411xx

Run state: Completed

Archive

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B							Well: B7 Empty					
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Sample Id: [] Assay: [] [Approve]

Volume: [] ml Matrix: [] [Approve All]

Validity: [] Approved: Reported: [Retest]

Result: [] Retest: Exported:

Test request Remarks

Ready Connected 41.0 °C

Start NucliSens Easy Direc... 22:01

NucliSens EasyQ Director v2.0r2

File Edit View Tasks Help

Routine

- Sample Login
- Worklist
- Runs
- Results

Results

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Runs

- 20071107_01
- 20071106_03
- 20071106_02
- 20071106_01

Number of test requests: 18

Assay: HIV-1 1.1

Reagent lot number: 070411xx

Run state: Completed

Archive

Sample Id: MAF10P Assay: HIV-1 1.1 Approve

Volume: 1.000 ml Matrix: Plasma Approve All

Validity: Valid Approved: Reported: Retest

Result: 15000 IU/ml Retest: Exported:

Test request Remarks

Ready Connected 41.0 °C

Start NucliSens EasyQ Direc... 11:26

NucliSens EasyQ Director v2.0r2

File Edit View Tasks Help

Routine

- Sample Login
- Worklist
- Runs
- Results

Results

Runs

- 20071107_02
- 20071107_01
- 20071106_03
- 20071106_02
- 20071106_01

Number of test requests: 9

Assay: HIV-1 1.1

Reagent lot number: 070411xx

Run state: Completed

Archive

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Sample Id: Assay:

Volume: ml Matrix:

Validity: Approved: Reported:


Result: Retest: Exported:

Test request Remarks

Ready Connected 41.0 °C

Start NucliSens EasyQ Direc... 15:23

Anexo A – Parecer ético

	Universidade Federal de Minas Gerais <i>Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP</i>
-----------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------


Parecer nº. ETIC 249/06

Interessada: Profa. Regina Amélia Lopes Pessoa de Aguiar
Departamento de Ginecologia e obstetrícia
Faculdade de Medicina-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 27 de setembro de 2006, o projeto de pesquisa intitulado **"Determinação da carga viral em líquido amniótico, no momento do parto, de gestantes infectadas pelo vírus HIV"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG