

Detecção de Citomegalovírus Humano e Herpesvírus Simples tipo 2 em amostras cervicais

Detection of Human Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus type 2 in cervical sample

Artigo Original

Palavras-chave

Infecções por citomegalovírus/diagnóstico
Herpesvírus humano 2
Reação em cadeia da polimerase em
tempo real
Técnicas de diagnóstico molecular
Amazonas
Brasil

Keywords

Cytomegalovirus infections/diagnosis
Herpesvirus 2, human
Real-time polymerase chain reaction
Molecular diagnosis
Amazonas
Brazil

Resumo

OBJETIVO: Testar a presença de DNA de Citomegalovírus Humano (HCMV) e Herpesvírus Simples tipo 2 (HSV-2) em amostras cervicais de mulheres atendidas em um serviço de atenção primária à saúde no município de Coari, Amazonas, Brasil. **MÉTODOS:** Participaram deste estudo 361 mulheres sexualmente ativas, variando entre 18 e 78 anos, atendidas em Unidades Básicas de Saúde para exame ginecológico de rotina. As amostras cervicais foram coletadas por meio de escova endocervical. A detecção dos vírus deu-se por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real. **RESULTADOS:** A média de idade das mulheres participantes foi de 36,4 anos (desvio-padrão (DP)=13,4). Foi encontrado DNA de HCMV em amostras cervicais de 30 mulheres (8,3%; IC95% 5,8–11,8) e de HSV-2 em 2 mulheres (0,6%; IC95% 0,1–2,2). Duas mulheres relataram ser portadoras do HIV, estando uma delas infectada com o HCMV. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre a infecção pelos patógenos estudados e as variáveis socioeconômicas, clínicas e comportamentais. **CONCLUSÕES:** A prevalência de infecção pelo HCMV encontrada na amostra estudada chama a atenção para a necessidade do rastreamento desse vírus na gestação e da vigilância nos pacientes imunocomprometidos. A baixa prevalência do HSV-2 deve-se provavelmente ao fato de a amostra cervical não ser adequada para este tipo de estudo por causa das características da biologia viral relacionadas à neurolatência.

Abstract

PURPOSE: To detect the presence of Human Cytomegalovirus (HCMV) and Herpes Simplex Virus type 2 (HSV-2) DNA in cervical samples from women assisted in a primary health care clinic in the city of Coari, Amazonas, Brazil. **METHODS:** Participated in this study 361 sexually active women between 18 and 78 years. They were been assisted in a Basic Health Care Clinic for routine gynecological exam. The cervical samples were collected using endocervical brush. The viruses were detected using real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. **RESULTS:** Mean age was 36.4 years (standard deviation (SD)=13.4). HCMV DNA was found in cervical samples from 30 women (8.3%; IC95% 5.8–11.8) and HSV 2 DNA in 2 women (0.6%; IC95% 0.1–2.2). Two women related being HIV positive, one of them infected with HCMV. There were no statistically significant associations between infections by the pathogens studied and socioeconomic, clinical or behavioral variables. **CONCLUSIONS:** The prevalence of the HCMV infection found in the sample points to the need for screening of the virus during pregnancy and surveillance in immunocompromised patients. The low prevalence of HSV-2 found is probably due to the fact that cervical sampling is not appropriate for this type of study because of the characteristics of viral biology related to neurovirulence.

Correspondência

Danielle Albuquerque Pires Rocha
Universidade Federal do Amazonas
Estrada Coari-Mamã, 305 – Espírito Santo
CEP 69460-000
Coari (AM), Brasil

Recebido

22/05/2012

Aceito com modificações

02/10/2012

Trabalho realizado no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM – Manaus (AM), Brasil.

¹Instituto de Saúde e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas – UFAM – Manaus (AM), Brasil.

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Amazonas – UFAM – Manaus (AM), Brasil.

Conflito de interesse: não há.

Introdução

Os herpesvírus formam um grupo de vírus de genoma grande, sendo alguns deles patogênicos em seres humanos. Todos os herpesvírus estudados apresentam uma marcante característica comum: o estabelecimento de um período de latência após uma fase de replicação lítica ativa. Durante o ciclo infeccioso, a maioria dos genes virais é expressa resultando em uma grande disseminação viral. Em contraste, a expressão gênica viral é largamente reprimida durante a fase de latência, e partículas virais não são formadas. Dentre os herpesvírus patogênicos em humanos, o Citomegalovírus Humano (HCMV) e o Herpesvírus Simples tipo 2 (HSV-2) são dois importantes vírus transmissíveis por via sexual¹⁻⁴.

O herpes genital pode ser causado pelos HSV-1 e HSV-2, porém a infecção pelo HSV-2 é mais comum, mais grave e mais propensa às recorrências. A transmissão sexual do HSV-2 depende de contato íntimo entre um indivíduo susceptível e um indivíduo excretando vírus ativamente. O vírus deve entrar em contato com as superfícies mucosas para que a infecção seja iniciada. Após a infecção, o vírus replica-se na região genital, perigenital ou anal, colonizando o gânglio sacral. A seguir, os vírus migram pelos axônios até os gânglios sensitivos regionais (neurovirulência), onde permanecem em latência, em uma forma não infecciosa, em equilíbrio com a célula hospedeira, porém, com reativação periódica e liberação do vírus infeccioso^{3,5,6}.

Uma grave consequência da infecção por HSV-2 é a transmissão para o feto ou recém-nascido. A infecção fetal intrauterina ocorre como consequência de infecções transplacentárias ou infecção ascendente e acontece em cerca de 10% dos casos. A forma mais comum de infecção, todavia, é o contato do recém-nascido, durante o parto, com secreções maternas infectadas, ocorrendo em 75 a 80% dos casos^{5,7,8}.

O outro importante herpesvírus que pode ser transmitido por via sexual (embora não exclusivamente) é o Citomegalovírus Humano (HCMV). O HCMV é um clássico agente de infecção oportunista, que pode causar severa doença na ausência de uma efetiva resposta imune, de forma que sua importância tem sido cada vez mais apercebida em razão dos recentes tratamentos imunossupressores (por exemplo, na quimioterapia do câncer e no transplante de órgãos), bem como por causa da epidemia de AIDS no mundo. O HCMV estabelece uma infecção latente com episódios de reativação durante os quais é excretado na saliva, urina, secreção cervical, espermatozoides e leite

materno⁹⁻¹². A transmissão vertical do HCMV da mãe para o feto ou recém-nascido é comum e desempenha um papel importante na manutenção da infecção na população. Nesses casos, o HCMV pode ser transmitido de três formas: transplacentária, intraparto ou por meio do leite materno, e essa infecção pode ser causa de malformação congênita, atraso psicomotor e surdez^{3,10,13,14}.

O objetivo deste trabalho foi determinar a frequência do HCMV e do HSV-2 em espécime cervical por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real e relacionar esses dados de infecção com características sociodemográficas, história clínica e informações a respeito do comportamento sexual de uma população feminina atendida em uma unidade primária da Estratégia Saúde da Família (ESF).

Métodos

Este é um estudo de corte transversal, desenvolvido no município de Coari, estado do Amazonas, Brasil, com mulheres atendidas nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) do referido município, assistidas pela Estratégia de Saúde da Família. Os critérios de inclusão foram: mulheres sexualmente ativas, acima de 18 anos, que apresentassem queixas clínicas ou não, quer estivessem grávidas ou não. Os critérios de exclusão foram: mulheres hysterectomizadas e mulheres submetidas a tratamento recente (últimos três meses) para infecções genitais, quer por via sistêmica quer tópica.

Foram incluídas 361 mulheres nesta pesquisa. Para o cálculo amostral, considerou-se a prevalência de 42% de doenças sexualmente transmissíveis (DST) em geral no Brasil¹⁵, com margem de erro de 5% e confiança de 95%. As mulheres foram registradas sequencialmente nesta pesquisa de acordo com demanda espontânea. Todas as participantes do estudo foram esclarecidas quanto à importância dele e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

As mulheres foram entrevistadas, respondendo a um questionário-padrão contendo perguntas estruturadas e não estruturadas sobre as principais informações clínicas, socioeconômicas e comportamentais. Todas as mulheres foram submetidas a consulta e exame físico, incluindo exame pélvico, pelo(a) enfermeiro(a) responsável por esse procedimento na UBS.

As amostras foram coletadas com o auxílio de espécimen vaginal, utilizando-se escova endocervical (*citobrush*). Foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL contendo

400 µL de tampão TRIS-EDTA (TRIS-HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0), colocadas imediatamente no gelo e depois armazenadas em freezer a -20°C no Instituto de Saúde e Biotecnologia da UFAM, em Coari, Amazonas; posteriormente, foram transportadas em gelo para o Laboratório de Diagnóstico Molecular da UFAM em Manaus, Amazonas, Brasil.

Depois de descongeladas à temperatura ambiente, as amostras foram submetidas ao processo de extração de DNA. Acrescentou-se 400 µL de tampão proteolítico TPK (TE [TRIS HCl 50 mM + EDTA 50 mM pH=8,0], Tween 20% e Proteinase K 10 mg/mL) e incubou-se por 60 minutos a 56°C e por 10 minutos a 95°C em banho seco. A seguir, o DNA foi extraído pelo método fenol/clorofórmio, precipitado com etanol absoluto e ressuspensão em 50 µL de água ultrapura (pH 7,6)¹⁶.

A detecção do HSV-2 foi realizada por meio da PCR em tempo real, com um ensaio do tipo TaqMan. Foi utilizado o *master mix* TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 da Applied Biosystems. Os iniciadores e sondas utilizados foram descritos por Corey et al. (2005)¹⁷. Nesse sistema, os iniciadores HSV-F e HSV-R amplificam ambos os HSV-1 e HSV-2 com igual eficiência, e para discriminação entre os tipos foi usada a sonda específica para o HSV-2 marcada com FAM. A reação teve um volume final de 20 µL, que continha os seguintes reagentes: 0,5 µL de HSV-F 10 pmol, 0,5 µL de HSV-R 10 pmol, 0,5 µL de sonda 10 pmol, 10 µL de *master mix* (2X), 4 µL DNA e 4,5 µL de água.

Para detecção do HCMV, foi utilizada também a PCR em tempo real. Para isso, foi utilizado um ensaio pronto do tipo presença/ausência da Applied Biosystems, o Taqman® Gene Expression Assay Pa03453400_s1. Nesse ensaio, os iniciadores e a sonda já vêm misturados nas seguintes concentrações: iniciadores a 900 nM e a sonda a 250 nM, e o fluoróforo presente na sonda é o FAM. Também foi utilizado o *master mix* TaqMan Environmental Master Mix 2.0, da Applied Biosystems. A reação teve um volume final de 20 µL, que continha 10 µL de *master mix* 2X, 1 µL do Assay Pa 03453400_s1 (20X), 4 µL de DNA e 5 µL de água.

As amostras foram distribuídas em placa apropriada para leitura óptica (MicroAmp Fast Optical 48-Well Reaction Plate) da Applied Biosystems. A placa foi levada ao aparelho de PCR em tempo real Step One™ Real Time PCR Systems, da Applied Biosystems. As condições de termociclagem foram: 5 minutos a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Ao final da reação, o resultado foi obtido

a partir do programa Step One™ Software v2.0. As amostras foram consideradas positivas se o *Cycle Threshold* (CT) foi até 37.

Os dados foram inicialmente tabulados e geraram bancos de dados que foram analisados pelo *software* Epi-Info 3.5.3 para Windows (programa desenvolvido e distribuído gratuitamente pelo *Center of Disease Control and Prevention* (CDC)). Na análise das variáveis quantitativas, quando os dados apresentavam distribuição normal, foi calculada a média e o desvio-padrão (DP), e na rejeição da hipótese de normalidade, o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Na análise das variáveis categóricas, foram calculadas as frequências absolutas simples e relativas e, em alguns casos, o Intervalo de Confiança ao nível de 95%. Na análise dos dados categóricos, foi calculado o teste do qui-quadrado de Pearson, e na impossibilidade da aplicação do teste de Pearson foi aplicado o teste exato de Fisher. O nível de significância fixado na aplicação dos testes foi de 5%.

Resultados

Todas as amostras foram positivas na PCR para detecção do DNA genômico humano. Foi encontrado DNA de HCMV em 30 mulheres (8,3%; IC95% 5,8–11,8) e DNA de HSV-2 em 2 mulheres (0,6%; IC95% 0,1–2,2).

No nosso estudo, encontramos mulheres jovens infectadas pelo HCMV. A média das idades das mulheres infectadas foi bem abaixo da média das mulheres não infectadas (32,3±14,0 e 36,8±13,3 anos, respectivamente), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (p=0,078). Uma das mulheres infectadas relatou ser portadora do HIV. O grupo de mulheres solteiras/divorciadas/viúvas apresentou maior prevalência (9,8%) em relação às casadas/união estável (7,9%), e o grupo de mulheres que relatou ter tido mais de 10 parceiros sexuais ao longo da vida apresentou também maior prevalência (10,7%) em relação aos grupos que relataram 1 a 5 parceiros (8,5%) e entre 6 e 10 (6,1%). Foi encontrada prevalência maior entre as mulheres que afirmaram uso não frequente do preservativo com parceiros fixos (12,9%) em relação às que não usavam (8,3%), mas, em relação aos parceiros eventuais, foi maior a prevalência entre mulheres que relataram uso inconsistente do preservativo (14,3%) em relação às que disseram usar “sempre” (8,0%). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos nas quatro situações citadas. Associações significativas entre a infecção pelo HCMV e outras variáveis estudadas também não foram encontradas (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição segundo a frequência da história clínica em relação ao resultado do Citomegalovírus Humano nas mulheres amostradas no município de Coari (AM)

Variáveis (n=361)	Citomegalovirus humano				Total	Valor p
	Positivo		Negativo			
	f _i	%	f _i	%		
Escolaridade						0,3*
Fundamental incompleto	11	6,9	148	93,1	159	
Fundamental completo	19	9,4	183	90,6	202	
Idade						0,07**
Média±DP	32,3±14,0		36,8±13,3			
Amplitude	18-70		18-78			
Estado civil						0,5*
Solteira/Divorciada/Viúva	8	9,8	74	90,2	82	
Casada/União estável	22	7,9	257	92,1	279	
Número de parceiros na vida						*****
1 a 5	24	8,5	260	91,5	284	
6 a 10	3	6,1	46	93,9	49	
Acima de 10	3	10,7	25	89,3	28	
Número de filhos						0,1*****
Mediana	2,0		3,0			
Amplitude	0-14		0-16			
Uso de preservativo com parceiro fixo (n=328)						0,2*
Nem sempre	22	8,3	243	91,7	265	
Sempre	8	12,9	54	87,1	62	
Uso de preservativo com parceiro eventual (n=33)						0,5***
Nem sempre	1	14,3	6	85,7	7	
Sempre	2	8,0	23	92,0	25	
Tem /Já teve DST						0,1***
Sim	—	—	20	100,0	20	
Não	30	8,8	311	91,2	341	
Parceiro com história de DST nos últimos 12 meses						0,4***
Sim	2	10,5	17	89,5	19	
Não	28	8,2	314	91,8	342	
Motivo da consulta						0,09*
Consulta de rotina	20	10,7	167	89,3	187	
Queixas clínicas	10	5,8	162	94,2	172	

f_i: frequência absoluta simples; DP: desvio-padrão; *Teste do χ^2 de Pearson; **Teste t de Student; ***Teste exato de Fisher; *****Teste não paramétrico de Mann-Whitney; *****Não é possível aplicar a estatística de teste em razão das restrições do χ^2 .

Discussão

A associação entre o HSV-2, um patógeno que causa formação de úlceras, e a infecção pelo HIV tem aumentado o interesse sobre a epidemiologia do HSV-2. Já o crescente interesse pelo HCMV está relacionado principalmente à sua característica oportunística em pessoas imunodeprimidas, como pacientes com HIV, e as submetidas a tratamentos imunossuppressores, como os transplantados, situação cada vez mais frequente^{12,18}.

Considera-se que mais de 70% das infecções por HSV-2 não sejam conhecidas. Portanto, estudos epidemiológicos são importantes para o entendimento do padrão de distribuição da infecção dentro das populações^{18,19}. O método diagnóstico mais usado nos estudos epidemiológicos é a sorologia. Estudos mais antigos usavam a combinação do ELISA (para detectar anticorpo anti-HSV) e Western blot (para discriminar entre HSV-1 e HSV-2)^{5,20,21}, enquanto só mais recentemente os testes de ELISA discriminaram entre anticorpos anti-HSV-1 e anti-HSV-2^{18,19,22}. Nos estudos

brasileiros, as soroprevalências para o HSV-2 tanto por ELISA quanto pela combinação de ELISA com Western blot em mulheres (gestantes, HIV-positivas, estudantes universitárias, etc.) variam entre 7,3 e 50,7%^{5,18-22}.

Em nosso estudo, encontramos DNA do HSV-2 em apenas duas mulheres utilizando raspado cervical como amostra. A detecção viral nesse tipo de amostra para fim de estudo epidemiológico é limitada, uma vez que o HSV-2 apresenta latência no gânglio sacral (neurolatência) e não está presente nos tecidos epiteliais e conjuntivos a não ser nas fases de reativações^{5,6}. Outras utilidades podem ser citadas para a detecção do vírus em amostra cervical, por exemplo, avaliar se uma parturiente previamente diagnosticada como portadora da infecção está em fase de reativação assintomática. Nesse caso, seria indicado um parto cesariano para evitar a ocorrência de herpes neonatal decorrente de contaminação no canal do parto. Outra importante utilidade desse teste é a avaliação da presença de DNA viral em úlceras genitais a fim de determinar a etiologia diante de outras doenças formadoras de úlceras^{5,23,24}.

Provavelmente, as duas mulheres positivas para HSV-2 neste estudo desconheciam ser portadoras do vírus, pois nenhuma delas relatou história prévia dessa infecção, sugerindo-se que estavam em fase de reativação assintomática. Outros estudos como os de Corey et al.¹⁷ e Dinc et al.²³, comparando a sorologia com a detecção do HSV-2 por técnica molecular em amostras cervicais e/ou úlceras, são necessários para que se possa ter mais segurança em relação à aplicabilidade desse ensaio.

O HCMV é transmitido pelo contato direto com fluidos corporais de pessoas excretando o vírus. Uma diferença marcante em relação ao HSV-2 é que, após a aquisição inicial, o HCMV é excretado em altos títulos na urina, saliva, lágrima, sêmen e secreções cervicais por meses ou anos, ao passo que o HSV-2 é excretado apenas localmente e em um curto intervalo de tempo, tanto durante a infecção inicial quanto nas reativações^{3,10}. Essa característica da biologia viral faz do tipo de amostra analisada nesta pesquisa, amostra cervical colhida com *citobrush*, portanto contendo tanto fluido quanto células cervicais, uma amostra mais adequada para detecção do HCMV em relação à detecção do HSV-2.

Foram encontradas 30 mulheres com a presença do HCMV na secreção cervical. A detecção desse vírus em fluidos corporais teria uma indicação muito importante relacionada ao diagnóstico de infecção congênita ou perinatal em urina de recém-nascidos, proporcionando a intervenção com recursos terapêuticos que podem minimizar a gravidade dos casos e, no caso das infecções congênitas, possibilitando diminuir a intensidade das sequelas²⁵. A detecção na secreção cervical diagnosticaria a mulher excretando ativamente o vírus, porém não discriminaria entre infecção primária e reativação, o que

poderia ser feito em um acompanhamento de soroconversão durante a gestação²⁶. No entanto, o rastreamento dessa infecção durante a gravidez é discutido há vários anos, sem consenso estabelecido¹³.

Das cinco mulheres que estavam grávidas em nosso estudo, uma delas apresentou-se positiva para a infecção pelo HCMV. Entre as mulheres grávidas, a infecção por esse vírus é frequentemente uma séria ameaça ao feto. Perda auditiva e severo dano neurológico são as principais manifestações da infecção congênita, e menos frequentemente ocorre morte fetal ou neonatal. Essa mulher pode estar em infecção primária ou em reativação da infecção e tanto uma como outra situação são quase sempre assintomáticas e favorecem a disseminação viral horizontal e vertical^{10,27}. Uma vez que essa paciente está excretando o vírus ativamente, transmissão congênita ou perinatal pode ocorrer.

As infecções assintomáticas são predominantes na população, e em nossa amostra não foi diferente. Todas as 30 mulheres infectadas pelo HCMV desconheciam a sua infecção, pois nenhuma delas relatou história prévia. A despeito da alta prevalência mundial, as infecções pelo HCMV são geralmente assintomáticas na população, exceto em recém-nascidos de mães infectadas e em pacientes imunodeprimidos, como citado, nos quais o HCMV afeta muitos órgãos¹². Eliminar ou reduzir a morbidade associada com a infecção pelo HCMV durante a gravidez seria o foco do rastreamento sorológico durante essa fase.

Neste estudo, duas mulheres disseram-se conhecedoras da sua condição de soropositividade para o HIV, e uma delas apresentou infecção pelo HCMV. A infecção pelo HCMV é muito preocupante em pessoas com quadros de imunodeficiência, pois este é um vírus oportunista, que causa severos quadros de pneumonite, lesões gastrointestinais, hepatite, retinite, pancreatite, miocardite e, às vezes, encefalite, além de maior propensão a outras infecções oportunistas fúngicas e bacterianas^{11,12}. Nesses pacientes, somente a detecção com PCR não necessariamente correlaciona-se com doença ativa, porque os vírus que se encontram em estado latente também podem ser amplificados. A PCR em tempo real, portanto, também tem sido utilizada para detecção e quantificação de carga viral. Um ensaio quantitativo de infecção pelo HCMV é uma ferramenta importante, pois a análise da carga viral no sangue é um importante fator preditivo de infecção e aparecimento de doenças em pacientes HIV-positivos^{28,29}.

Assim, este estudo chama a atenção para a prevalência encontrada de HCMV em amostra cervical de mulheres em exame ginecológico de rotina. Tal prevalência serve de alerta para o não relaxamento da solicitação da sorologia para esse vírus durante a gestação e para a verificação mais detalhada da condição de portador em pacientes imunodeprimidos.

Referências

1. Subak-Sharpe JH, Dargan DJ. HSV molecular biology: general aspects of herpes simplex virus molecular biology. *Virus Genes*. 1998;16(3):239-51.
2. Paulus C, Nitzsche A, Nevels M. Chromatinisation of herpesvirus genomes. *Rev Med Virol*. 2010;20(1):34-50.
3. Ráck ML. Herpesvirus. In: Trabulsi LR, Altherthum, F, editores. *Microbiologia*. 5a ed. São Paulo: Atheneu; 2008. p. 633-44.
4. Maitra N, Gupta M. Seroprevalence and correlates of herpes simplex virus type-2 infection in a general gynecology clinic. *Arch Gynecol Obstet*. 2007;275(1):19-23.
5. Paschoini MC, Duarte G, Cunha SP, Fonseca BAL. Seroprevalence evaluation of herpes simplex virus 1 and 2 among pregnant women. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2001;23(1):15-20.
6. Conti C, Malacrino C, Mastromarino P. Inhibition of herpes simplex virus type 2 by vaginal lactobacilli. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60(Suppl 6):19-26.
7. Hon KL, Leung TF, Cheung HM, Chan PK. Neonatal herpes: what lessons to learn. *Hong Kong Med J*. 2012;18(1):60-2.
8. Kim ID, Chan HS, Hwang KJ. Herpes simplex virus 2 infection rate and necessity of screening during pregnancy: a clinical and seroepidemiologic study. *Yonsei Med J*. 2012;53(2):401-7.
9. Spano LC, Ferreira MSR, Almeida MS, Nascimento JP, Leite JPG. HCMV gB genotypes in cervical secretion and placenta tissues in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Braz J Microbiol*. 2007;38(3):424-9.
10. Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol*. 2008;197(2):65-73.
11. Bayram A, Özrur A, Erkilic S. Prevalence of human cytomegalovirus co-infection in patients with chronic viral hepatitis B and C: a comparison of clinical and histological aspects. *J Clin Virol*. 2009;43(3):212-7.
12. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest*. 2011;121(5):1673-80.
13. Vide Tavares M, Domingues AP, Tavares M, Malheiro E, Tavares F, Moura P. Citomegalovírus: existe lugar para o rastreio durante a gravidez? *Acta Med Port*. 2011;24(Suppl 4):1003-8.
14. Alkhawaja S, Ismaeel AY, Botta GA, Senok AC. The prevalence of congenital and perinatal cytomegalovirus infections among newborns of seropositive mothers. *J Infect Dev Ctries*. 2012;6(5):410-5.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
17. Corey L, Huang ML, Selke S, Wald A. Differentiation of herpes simplex virus types 1 and 2 in clinical samples by a real-time taqman PCR assay. *J Med Virol*. 2005;76(3):350-5.
18. Cowan FM, French RS, Mayaud P, Gopal R, Robinson NJ, Artimos de Oliveira S, et al. Seroepidemiological study of herpes simplex virus types 1 and 2 in Brazil, Estonia, India, Morocco, and Sri Lanka. *Sex Transm Infect*. 2003;79(4):286-90.
19. Clemens SAC, Farhat CK. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2010;44(4):726-34.
20. Weinberg A, Canto CLM, Pannuti CS, Kwang WN, Garcia SAL, Zugaib M. Herpes simplex virus type 2 infection in pregnancy: asymptomatic viral excretion at delivery and seroepidemiologic survey of two socioeconomically distinct populations in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1993;35(3):285-90.
21. Carvalho M, Carvalho S, Pannuti CS, Sumita LM, Souza VA. Prevalence of herpes simplex type 2 antibodies and a clinical history of herpes in three different populations in Campinas city, Brazil. *Int J Infect Dis*. 1999;3(2):94-8.
22. Santos FC, Oliveira SA, Setúbal S, Camacho LA, Faillace T, Leite JP, et al. Seroepidemiological study of herpes simplex virus type 2 in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the city of Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(3):315-9.
23. Dinc B, Bozdayi G, Biri A, Kalkançi A, Dogan B, Borkurt N, et al. Molecular detection of cytomegalovirus, herpes simplex virus 2, human papillomavirus 16-18 in Turkish pregnant. *Braz J Infect Dis*. 2010;14(6):569-74.
24. Cleary KL, Paré E, Stamilio D, Macones GA. Type-specific screening for asymptomatic herpes infection in pregnancy: a decision analysis. *BJOG*. 2005;112(6):731-6.
25. Yamamoto AY, Aquino VH, Figueiredo IT, Mussi-Pinhata MM. Diagnóstico de infecção congênita e perinatal por citomegalovírus utilizando a reação em cadeia da polimerase. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31(1):19-26.
26. Nigro G, Anceschi MM, Cosmi EV; Congenital Cytomegalic Disease Collaborating Group. Clinical manifestations and abnormal laboratory findings in pregnant women with primary cytomegalovirus infection. *BJOG*. 2003;110(6):572-7.
27. Gerna G, Baldani F, Revello MG. Pathogenesis of human cytomegalovirus infection and cellular targets. *Hum Immunol*. 2004;65(5):381-6.
28. Terra APS, Silva-Vergara ML, Gomes RA, Pereira CLL, Simpson AJG, Caballero OL. Monitoramento de pacientes com AIDS para o desenvolvimento de doença por citomegalovírus (CMV) usando-se PCR multiplex. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33(6):583-9.
29. Cunha AA, Marin LJ, Aquino VH, Figueiredo IT. Diagnosis of cytomegalovirus infections by qualitative and quantitative PCR in HIV infected patients. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2002;44(3):127-32.