

PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS IGG E IGM PARA CITOMEGALOVÍRUS EM GESTANTES

Ana Carla Nath Orsato¹

Jéssica Zolim Andreatto Mandelli¹

Alexandre Ehrhardt²

RESUMO

O Citomegalovirus possui altos índices de infecção viral durante a vida uterina, na infância e na fase adulta. Isso se deve pela sua fácil disseminação através de contato com secreções biológicas, como saliva, urina, leite materno e secreção vaginal. Esta pesquisa teve por objetivo determinar a prevalência de anticorpos IgG e IgM para Citomegalovirus em 25 gestantes na cidade de Marau-RS. Os resultados obtidos demonstraram que a totalidade das gestantes avaliadas apresentaram resultados positivos para os anticorpos IgG e resultados negativos para IgM. Estes resultados, mesmo sendo positivos para a memória imunológica e não para a infecção em curso, sugerem elevados índices de positividade frente ao contato com o Citomegalovirus.

Palavras-chave: Herpesviridae, infecção congênita, gravidez.

ABSTRACT

Cytomegalovirus has high rates of viral infection during uterine life, in childhood and in adulthood. This is due to its easy dissemination through contact with biological secretions such as saliva, urine, breast milk and vaginal secretion. This study aimed to determine the prevalence of IgG and IgM antibodies to Cytomegalovirus in 25 pregnant women in the city of Marau-RS. The data showed 100% of pregnant women had IgG antibodies and none had IgM antibodies. The results showed that all the pregnant women tested showed positive results for IgG antibodies and negative results for IgM. These findings, although positive for the immunological memory and not for the ongoing infection, suggest high levels of positivity to Cytomegalovirus contact.

Keywords: Herpesviridae, congenital infection, pregnancy.

INTRODUÇÃO

O Citomegalovirus (CMV) também conhecido como *Herpesvirus* tipo 5, pertence a família *Herpesviridae*, assim como o vírus da Varicela-zoster, vírus Epstein-Barr, Herpes simples tipo 1 e 2 e das herpesvírus humanas. Seu genoma é constituído de DNA, o qual encontra-se no interior de capsídeo proteico icosaédrico, rodeado por uma camada amorfa de proteínas e envolvido por uma bicamada lipídica, onde se encontram as glicoproteínas virais (CARMO, 2013).

¹ Biomédica graduada pela ULBRA/Carazinho

² Professor – Orientador do Curso de Biomedicina da ULBRA/Carazinho (bioquimicoalexandre@gmail.com)

Apesar de o CMV possuir replicação intracelular, a qual impede ação de anticorpos neutralizantes, o vírus pode ser inativado facilmente por fatores físico-químicos. A sua vida média é de 45 minutos a temperatura de 37°C (REIS, 2011).

O vírus pode ser encontrado em todas as regiões geográficas e grupos socioeconômicos, porém, apresenta maior prevalência nos países em desenvolvimento e comunidades socioeconômicas menos favorecidas. Além destas características, o CMV é a maior causa de infecção viral durante o nascimento em países industrializados (REIS, 2011).

Uma característica peculiar do vírus é a habilidade de permanecer latente no hospedeiro após a infecção primária. Dessa forma, qualquer deficiência envolvendo o sistema imunológico pode ser considerada um fator predisponente para que ocorra a reinfeção. É um vírus considerado com baixa infectividade, porém sua disseminação é alta devido ao período prolongado de excreção viral pelos indivíduos infectados. (FREITAS et al., 2006; NAVAS, 2011).

As vias de transmissão do vírus ocorrem por contato com secreções biológicas como, urina, saliva, sangue e secreções genitais. Outras fontes de transmissão horizontal se dão através de transfusão sanguínea e transplantes. Já a transmissão vertical pode ocorrer durante a gestação pela forma transplacentária, no nascimento com contato ao canal de parto e após pelo meio do leite materno. Logo após o contato com o vírus há o período de incubação que pode variar de 28 a 60 dias (COUTO et al., 2003).

A infecção primária tende a ser assintomática na maioria dos pacientes, porém, nos casos em que a infecção apresenta-se sintomática, as manifestações clínicas são mal-estar, faringite, hipertermia, mialgias e linfadenopatias. (FREITAS et al., 2006; MARCONDES et al., 2003).

Pacientes imunocomprometidos, como portadores de HIV, portadores de neoplasias e receptores de transplantes, podem apresentar quadros de infecções severas relacionadas ao CMV, com o comprometimento da retina, fígado, pulmões, trato gastro intestinal e sistema nervoso (FREITAS et al., 2006; MARCONDES et al., 2003).

O CMV pode infectar várias células do corpo humano, porém as únicas que permitem sua replicação são os fibroblastos humanos. Sendo assim, os leucócitos infectados atravessam a barreira da placenta, entrando na circulação fetal pelos vasos do cordão umbilical, onde o vírus se replica e é excretado no líquido amniótico através da urina fetal. Esse líquido é deglutido pelo feto e o vírus pode replicar-se na orofaringe e entrar na circulação fetal atingindo outros órgãos (MIURA, 2005).

A chance de transmissão é semelhante em qualquer período da gestação, porém quando ocorre na fase inicial, até a 20ª semana, tem um prognóstico pior e maior número de malformações (MIURA, 2005).

A infecção congênita por CMV é a infecção intra-uterina mais comum no mundo, correspondendo a 0,2 a 2,2% em recém-nascidos (RNs). A infecção caracteriza-se nos RNs sintomáticos pelo envolvimento de múltiplos órgãos, principalmente o sistema nervoso

central e o sistema retículo endotelial. Apresentam várias manifestações clínicas como icterícia, petequias, hepatoesplenomegalia, microcefalias (com ou sem calcificações cerebrais), e prematuridade. Nos RNs assintomáticos que desenvolvem sequelas, estas podem ser déficits neurológicos, defeitos dentários e perda auditiva neurossensorial. Normalmente esses sintomas se manifestam nos primeiros dois anos de vida. (FREITAS et al., 2006; MEJIA, 2010). Realizar o diagnóstico de infecção ao nascimento, ou durante as duas primeiras semanas é fundamental para a confirmação da transmissão materna ou diagnóstico de infecção primária na gestação (MIURA, 2005, SALDAN et al., 2017).

Podem ser utilizados diferentes métodos para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo CMV, tais como exame histológico, antigenemia, cultura viral, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e testes sorológicos (MAGALHÃES, 2010). Considerando o exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar frente exposição de gestantes frente ao Citomegalovírus, através da determinação sorológica de anticorpos anti-IgG e anti-IgM.

MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada através de um estudo observacional transversal, do qual participaram gestantes que encontravam-se no primeiro trimestre de gestação, atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

A avaliação proposta foi realizada através de análises de amostras biológicas e de avaliação sócio-epidemiológica, sendo estes dados coletados nas Unidades de Estratégia Saúde da Família (ESFs), no município de Marau/RS, realizadas nos meses de Julho e Outubro de 2015.

A avaliação de perfil sócio-epidemiológica das participantes se deu através da aplicação, no dia da coleta, de um questionário elaborado pelos autores, abordando questões como idade da paciente, escolaridade, número de gestações e realização do exame de Citomegalovírus durante o pré-natal.

Após o preenchimento do questionário foram coletados 4mL de sangue, através de punção venosa, armazenadas em tubos com ativador de coágulo³, mantidos em temperatura de 2° a 8° até serem transportadas, conforme as normas de biossegurança, e mantidas congeladas (-20°) até o momento das análises.

As análises foram realizadas no Laboratório Escola da ULBRA Campus Carazinho, sendo as mesmas processadas e descartadas seguindo as normas e políticas do Laboratório. Foi utilizada a metodologia imunoenzimática em microplaca (ELISA)⁴. Os resultados qualitativos obtidos foram validados conforme especificações contidas na bula do kit reagente para a detecção de anticorpos IgG e IgM para Citomegalovírus. Os dados obtidos foram analisados por estatística descritiva utilizando o programa SigmaStat 32.

³ Tubo de ativador de coágulo marca Vacuette®.

⁴ Kit teste ELISA da marca Bioclin®.

Foram considerados como critérios de inclusão: gestantes que encontravam-seno primeiro trimestre de gestação; maiores de 18 anos; gestantes que aceitarem participar livremente do presente estudo. Foram considerados como critérios de exclusão: gestantes no segundo e terceiro trimestre de gestação; idade inferior a 18 anos; bem como as que se recusarem a participar do presente estudo.

O estudo em questão teve o apoio e aprovação da Secretaria da Saúde do município de Marau e pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos da Universidade Luterana do Brasil, campus Canoas/RS, sob parecer de número 1.046.852. As gestantes participaram do estudo voluntariamente após terem assinado o “Termo de consentimento Livre e Esclarecido”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo informações da Secretaria de Saúde do Município de Marau, até o momento não haviam sido realizados estudos que avaliassem a prevalência sorológica para CMV em gestantes do município. Das 40 gestantes que se encontravam no primeiro trimestre de gestação atendidas nas Estratégias de Saúde Familiar de Marau, durante o período de julho e outubro, 25 gestantes (62,5%) aceitaram participar do estudo. Das 15 (37,5%) que não participaram, 10 (25%) não compareceram nos ESFs nos dias combinados e com 5 (12,5%) não foi possível realizar contato.

A faixa etária das gestantes no estudo variou de 18 a 39 anos, média de 27,12 (\pm 7,08) anos. Conforme Yamamoto (2010), a idade não implica na contaminação com o vírus do CMV, já que podemos adquiri-lo em qualquer faixa etária, principalmente na infância e adolescência. Ainda Carmo (2013), salienta que existem dois períodos de infecção primária. O primeiro durante a gestação ou a primeira infância e o outro durante a vida adulta pelo contato sexual. Por outro lado Artigao (2009) refere que a soroprevalência de infecção em mulheres em idade fértil entre 15 e 24 anos é de 60%, já em mulheres acima de 36 anos é de 95%.

O grau de escolaridade das participantes da pesquisa variou de 5 a 16 (11 ± 2) anos. No entanto, não foram encontrados estudos que relatam a implicância da infecção do CMV com o grau de escolaridade.

Das gestantes avaliadas, obteve-se variação no número de gestações, sendo que 15 (60%) gestantes estavam na primeira gestação. Destas, 92% nunca realizaram ou ouviram falar do exame de Citomegalovírus (Tabela 1). O número de gestações não esta diretamente correlacionado com a infecção ou reinfeção de CMV, que pode ser adquirido em qualquer faixa etária (YAMAMOTO, 2010).

Tabela 1 – Número de gestações verificado entre a população avaliada no estudo e a verificação percentual da realização do teste para CMV.

Características	Número	%
<i>Número de gestações</i>		
Uma gestação	15	60
Duas gestações	04	16
Três ou mais gestações	06	24
<i>Realização do teste anti-CMV</i>		
Sim	01	4
Não	23	92
Não sabem	01	4

Fonte: Dos autores.

Das 25 amostras analisadas, todas apresentaram o teste de anticorpos anti-CMV IgG positivo (100%) e nenhuma das gestantes apresentou positividade para o teste de anticorpos anti-CMV IgM negativo (Tabela 2). Segundo Palhares e Xavier (2011), estudos demonstram que no Brasil 65,5 a 92% das gestantes tem prevalência de anticorpos IgG para Citomegalovírus. Já de acordo com Couto (2003), na população adulta a prevalência de anticorpos para CMV pode variar de 40 a 100%.

Tabela 2 – Resultados da pesquisa de anticorpos anti-Citomegalovirus em gestantes de Marau-RS.

	Anticorpos Anti-CMV IgG		Anticorpos Anti-CMV IgM	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Amostras				
Gestantes	100%	-	-	100%

Fonte: Dos autores

Resultados similares aos nossos foram relatados por Oliveira et al. (2002), em uma população de parturientes da cidade de Presidente Prudente-SP, na qual 96,5% das parturientes tiveram resultado positivo para anticorpos anti-CMV IgG. Outro estudo semelhante foi descrito por Moura et al. (2007), em uma população de gestantes da Região Oeste de Santa Maria-RS, em que 92,3% das gestantes apresentaram IgG positivo.

Em gestantes, a presença de anticorpos IgG antes da gravidez pode correlacionar-se com uma redução do risco de transmissão do vírus ao feto. Isso ocorre, pois o IgG é um anticorpo de defesa, ou seja, é o anticorpo que pode ser transferido através da placenta da mãe para o feto (DING, 2015). A IgG materna protege o feto até que o sistema imune do mesmo possa produzir seus próprios anticorpos.(FORTE, 2004; GAMEZ, 2014). Por outro lado, aproximadamente 2% das gestantes desenvolvem infecção primária em sua gestação, o que pode provocar quadro de contaminação vertical, sendo transmitida, acometendo o feto. Contaminações estimadas atingem um percentual de 30% a 50% dos casos, enquanto casos de reativação acontecem em 5% a 15% das ocorrências, podendo nestes casos ocorrer transmissão para o feto (REIS, 2011).

Conforme o Ministério da Saúde (1999), um resultado de IgM negativo, nem sempre descarta uma infecção aguda por CMV, pois pode estar no estágio inicial, onde o indivíduo não foi capaz de sintetizar os anticorpos IgM, ou ainda quando este se apresenta imunocomprometido.

Entretanto, um resultado negativo para IgG pode indicar que a imunidade não foi adquirida, porém não exclui quadro de infecção aguda, a menos que o IgM também seja negativo. Deve-se ressaltar que o IgG normalmente é negativo durante as primeiras três semanas após infecção, havendo um risco potencial para o feto (DING, 2015). Sabe-se que um resultado positivo para IgM indica infecção recente, ou seja, até oito meses antes do teste, ou também pode indicar infecção secundária, onde há a reativação do vírus latente (OLIVEIRA, 2002). Pesquisa realizada por Reis (2011), indica que os anticorpos permanecem presentes por períodos de até um ano e meio após a infecção primária com títulos baixos. O que pode dificultar a diferenciação entre infecção primária, reativação e reinfeção.

O título de IgM geralmente eleva-se entre um e três meses após o contato com o vírus. Entretanto a titulação pode permanecer em pacientes imunocomprometidos, pois níveis baixos podem ser detectados por mais de um ano. Resultados falso-positivos comumente podem surgir em indivíduos que apresentam outras infecções virais. Nos casos de anticorpos IgM positivo para CMV, deve ser realizado o teste de avididade para IgG com a finalidade de investigar se a infecção primária ocorreu durante ou antes da gravidez (SALDAN et al., 2017). Nos casos de avididade IgG baixo ou moderado, as gestantes são consideradas com uma elevada suspeita de infecção primária (OLIVEIRA, 2002; VILLE, 2015).

O risco para o feto é alto quando a gestante entra em contato com o vírus de CMV durante a gestação. Isso acarreta problemas no sistema retículo endotelial e o envolvimento de múltiplos órgãos. Podendo apresentar manifestações clínicas como icterícia, petéquias, hepatoesplenomegalia, microcefalias e prematuridade. É também considerada a principal causa de surdez congênita e dificuldade de aprendizado na infância. A infecção vertical é mais frequente no terceiro trimestre, porém é considerada mais grave no primeiro trimestre (BECERRA, 2012; FELDMAN, 2011; MIURA, 2005; VICENTIN, 2015). Mesmo com todos os riscos inerentes a infecção, o exame de Citomegalovírus ainda não está incluso nos exames de pré-natal preconizados pelo Ministério da Saúde.

Em outras populações de acordo com Reis (2011), de 30% a 90% de adultos imunocompetentes tem a presença de anticorpos IgG anti-CMV soropositivos. Já em crianças 25% a 80% adquirem o vírus através do contato com outras em creches e escolas e podem disseminar o vírus para os outros membros da família no prazo médio de seis meses (DING, 2015).

No estudo de Moura (2007), é apresentada uma nítida relação entre a prevalência de anticorpos IgM e IgG para CMV, vinculadas as condições de moradia, higiene pessoal, hábitos de cada população e forma de transmissão. Sendo assim, a maior incidência é em populações de baixo poder aquisitivo, por apresentar condições mais propícias para sua disseminação através de secreções.

O método diagnóstico escolhido para a detecção do CMV deve ser realizado com o propósito do estudo, visto a grande variabilidade de cada método, o custo na realização e o grau de dificuldade. Os métodos mais utilizados são: diagnóstico sorológico, antigenemia, cultura viral e reação em cadeia por polimerase (PCR). (LAWLOR, 2010; LOUTFY et al, 2017). A técnica utilizada no presente estudo foi a imunoenzimática ELISA, a qual segundo Marcondes et al. (2003), possibilita a detecção dos dois anticorpos, IgG e IgM com especificidade e sensibilidade. Por ter uma fácil execução e disponibilidade comercial é o método mais utilizado na rotina de diagnóstico das infecções por CMV (CARMO, 2013; PANNUTI, 2003).

De acordo com Couto (2003), no período de gestação, podem também ocorrer algumas alterações laboratoriais, tais como linfopenia ou linfocitose com presença de linfócitos atípicos, trombocitopenia e aumento das aminotransferases, além da produção de anticorpos específicos que podem sugerir infecção pelo CMV.

O diagnóstico fetal pode ser realizado através de sangue ou líquido amniótico pela cordocentese ou amniocentese. Porém esses exames apresentam risco, pois a cordocentese pode levar a parto prematuro, sangramento e perda fetal e durante a amniocentese pode ocorrer sangramento e perda de líquido amniótico. (MIURA, 2005).

Durante o período gestacional, não há nenhum tratamento que possa ser administrado, limitando-se ao uso de Ganciclovir, em casos de doença materna complicada por imunodepressão, não sendo recomendada a administração de antivirais ou imunomoduladores em gestantes saudáveis (FREITAS, 2006). Conforme Swamy (2015), o desenvolvimento de uma vacina para a prevenção primária do CMV esta sendo o foco de diversos estudos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstraram que a totalidade das gestantes avaliadas apresentaram resultados positivos para os anticorpos IgG e resultados negativos para IgM. Estes resultados, mesmo sendo positivos para a memória imunológica e não para a infecção em curso, sugerem elevados índices de positividade frente ao contato com o citomegalovírus. Destaca-se ainda a importância a inclusão do exame durante o pré-natal, pois, embora todos os riscos que esta doença possa acarretar aos RNs, ainda não esta incluso nos exames preconizados pelo Ministério da Saúde.

REFERÊNCIAS

- ARTIGAO, F. B. Citomegalovirus Congenito: es necessário un cribado serologico durante El embarazo? **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 29, n. 6, p. 363-369, 2008.
- BECERRA, C. E. F.; TOVAR, G. M. R. Infeccion Congenita por Citomegalovirus: Presentacion de Tres Casos y Revision de La Literatura, **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecologia**, v.63, n.2, p.168, 2012.

CARMO, A. M. **Avaliação da Infecção Pelo Citomegalovírus em Pacientes com Doença Inflamatória Intestinal**. Dissertação (Mestrado em Ciências em Gastroenterologia), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2013.

COUTO, J. C. F. et al. Citomegalovírus e gestação, um antigo problema sem novas soluções. **Feminina**, n.6, v. 31, p. 509-516, 2003.

DING, Z. et al. A Multifactorial Analysis of the Pregnancy Outcomes in Cytomegalovirus-Infected Women, **Gynecol Obstet Invest**, n, 80, p. 106–112, 2015.

FELDMAN, B. et al. Progestational, Periconceptual, And Gestational Primary Maternal Cytomegalovirus Infection: Prenatal Diagnosis in 508 Pregnancies, **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v.4, 2011.

FORTE, W. N. **Imunologia Básica e Aplicada**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FREITAS, F. et al. **Rotinas em Obstetrícia**. 5 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2006.

GAMEZ, S. S.; RUIZ, M. P.; MARI, J. M. N. Infeccion por Citomegalovirus Humano. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.32, sup.n.1, 2014.

LAWLOR, G.; MOSS, A. C. Cytomegalovirus In Inflammatory Bowel Disease, Pathogen or Innocent Bystander?, **Inflamm Bowel Dis**. v.16, n.9, 2010.

LOUTFY et al. Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections and their clinical relevance in Egyptian leukemic pediatric patients, **Virology Journal**. v. 14, n. 46, 2017

MAGALHÃES, I. C. **Infecção Aguda Por Citomegalovírus em Imunocompetentes**. Universidade do Porto, 2010. Disponível em: <<https://repositorioaberto.up.pt/bitstream/10216/52810/2/Tese%20Mestrado%20Isabel%20Magalhaes.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2015.

MARCONDES, E. et al. **Pediatria Básica, Pediatria Clínica Geral**. Tomo II. 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2003.

MEJÍA, Y. et al. Citomegalovirus congênito. Informe de caso. **Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas**, vol. 15, n. 1, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. Brasília, v.3, p. 12-13, 1999.

MIURA, C. S. **Prevalência de Infecção Congênita por Citomegalovírus em Recém-nascidos da Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**. Dissertação (Mestrado em Pediatria) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MOURA, J. U. et al. **Prevalência Sorológica de Anticorpos Anti-CMV em Gestantes da Região Oeste de Santa Maria, RS**. Trabalho de Iniciação Científica UNIFRA, Santa Maria, 2007.

- NAVAS, R. C.; GARCÍA, J. C. Infecção congênita por citomegalovírus: La gran desconocida. **Medicina de Familia Semergen**, Elsevier España, v.37, n.10, 2011.
- OLIVEIRA, A. M. et al. Pesquisa de AnticorposIgG e IgM Para Citomegalovirus em Parturientes e Recém-natos do Município de Presidente Prudente e Região, Estado de São Paulo. Universidade do Oeste Paulista. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 3, p. 737-741, 2002.
- PALHARES, D. B.; XAVIER, P. C. N. **Citomegalovirose Neonatal**. Pediatria/FAMED/UFSM, Santa Maria: UFSM, 2011.
- PANNUTI, C. S. Citomegalovirose Infecção por Citomegalovirus. Pediatria, São Paulo, 2003.
- REIS, M. A. M. F. **Prevalência de Infecção por Citomegalovírus Numa População Obstétrica**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade de Aveiro, Portugal, 2011.
- SALDAN, A. et al. Testing for Cytomegalovirus in Pregnancy, **J. Clin. Microbiol**, v. 55, n. 3, p. 693-702. 2017
- SWAMY, G. K. Cytomegalovirus, Parvovirus B19, Varicella Zoster, and Toxoplasmosis in Pregnancy. The American College of Obstetricians and Gynecologists. **Wolters Kluwer Health**, n. 151, 2015.
- VILLE, M. L. Prediction of Fetal Infection in Cases With Cytomegalovirus Immunoglobulin M in the First Trimester of Pregnancy: A Retrospective Cohort. **Clin Infect Dis**, v. 56, n.10, p.1428-35, 2013.
- VISENTIN, S. et al. Early Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy: Maternal Hyperimmunoglobulin Therapy Improves Outcomes Among Infants at 1 Year of Age. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 497–503, 2012.
- YAMAMOTO, A. Y. et al. Infecção Congênita e Perinatal por Citomegalovirus, Aspectos Clínicos, Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento. **Simpósio Virologia Médica**, cap. v, v.32, jan./mar. Ribeirão Preto, 1999.
- YAMAMOTO, A. Y. et al. Human Cytomegalovirus Reinfection is Associated With Intrauterine Transmission in a Highly Cytomegalovirus-Immune Maternal Population. **American of Obstetrics and Gynecology**, v. 202, n. 10, 2010.