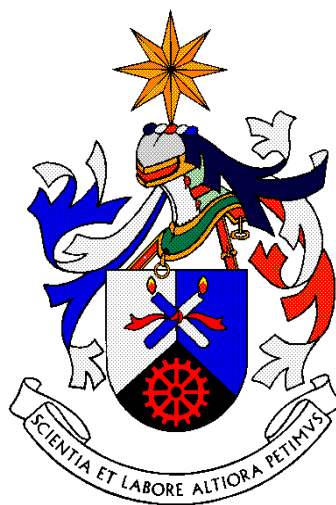


UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR



Diagnóstico da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano a partir de urinas colhidas em papel de filtro

Elaborado por

Alexandra Filipa Candeias Carrilho

Orientado por

Prof. Doutora Fernanda Domingues

e

Doutora Sofia Almeida

Covilhã, 4 de Setembro de 2009

Dissertação de Mestrado submetida ao Departamento de Química para obtenção do grau
de Mestre em Bioquímica

AGRADECIMENTOS

A realização do presente trabalho não seria possível sem o apoio incondicional de muitas pessoas. Deste modo, presto os meus mais sinceros agradecimentos:

À minha orientadora, a Prof. Doutora Fernanda Domingues, por todo o apoio e total disponibilidade que sempre demonstrou.

À minha co-orientadora, a Doutora Sofia Almeida, um especial agradecimento por todo o tempo disponibilizado para o esclarecimento de dúvidas, por todo o apoio e paciência, e pela amizade que sempre demonstrou.

Aos membros do Laboratório de Patologia Clínica do Centro Hospitalar da Cova da Beira agradeço também todo o apoio prestado e total disponibilidade.

A todas as pessoas que sempre estiveram do meu lado, pais e amigos, dando todo o incentivo possível e impossível para não desistir.

RESUMO

O Citomegalovirus Humano (HCMV) é a causa mais frequente de infecção congénita infectando 1% (0,2% - 3%) de todos os recém-nascidos. Apesar de 90% das crianças infectadas congenitamente pelo HCMV não possuírem sinais clínicos ou sintomas à nascença, o diagnóstico desta infecção é importante uma vez que 5 a 15% das crianças com infecção congénita assintomática irá desenvolver sequelas neurológicas mais tarde, e 10% nascem com sintomas graves que no entanto não são exclusivos de uma infecção por HCMV, devendo a sua etiologia ser esclarecida. O método de referência para o diagnóstico de infecção congénita pelo HCMV nos recém-nascidos é a cultura celular. No entanto, este método apresenta algumas limitações, que podem reduzir significativamente a sensibilidade da técnica.

Assim, este trabalho teve como objectivo estudar a possibilidade de aplicar um método de nested PCR ao diagnóstico de infecção congénita por HCMV, utilizando amostras de urina colhidas em papel de filtro, para tal 273 amostras foram obtidas a partir de recém-nascidos entre a 1ª e a 3ª semana de vida. O diagnóstico de infecção congénita por HCMV foi demonstrado pela cultura celular. Das 273 amostras de urina colhidas em sacos, dezoito (7%) foram positivas para o HCMV e 255 foram negativas. As 18 urinas positivas e 100 negativas foram aplicadas em papel de filtro e testadas por nested PCR, tendo-se verificado uma correlação total entre o método de referência e o método em estudo. Assim, a pesquisa do DNA do HCMV em urina colocada em papel de filtro revelou uma sensibilidade e especificidade de 100% em comparação com a cultura celular. Como se verificou uma correlação total dos resultados, testou-se um total de 155 urinas, colhidas em papel filtro colocado directamente nas fraldas de recém-nascidos. De todas as urinas testadas não foi possível confirmar a detecção de nenhum positivo uma vez que não se obteve nenhum, no entanto não se detectou nenhum falso positivo.

Os resultados sugerem que o método é um teste confiável para o diagnóstico de infecção congénita por citomegalovírus, quando utilizado em amostras de urina colhidas nas três primeiras semanas de vida. Assim, este procedimento poderá constituir uma alternativa prática, rápida e económica ao método de cultura celular, podendo as amostras serem facilmente transportadas e guardadas à temperatura ambiente.

ABSTRACT

The human cytomegalovirus (HCMV) is the most frequent cause of congenital infection, and infect 1% (0.2% - 3%) of all newborns. Although 90% of the HCMV congenitally infected children have no clinical signs or symptoms at birth, the diagnosis of this infection is important because 5 to 15% of children with asymptomatic congenital infection will develop neurological sequelae later, and 10% born with severe symptoms that, however are not exclusive of a HCMV infection, its etiology should be clarified. The reference method for the diagnosis of congenital HCMV infection in newborns is the cell culture. However, this method has some limitations, which can significantly reduce the sensitivity of the technique.

So, this work aimed to study the possibility of applying a nested PCR method for the diagnosis of congenital infection by HCMV, using samples of urine collected on filter paper. For this, were obtained 273 samples of urine from newborns between 1^a to 3^a weeks of life.

A diagnosis of congenital HCMV infection was established by cell culture. Of the 273 urine samples collected into bags, eighteen (7%) were positive for HCMV and 255 were negative. The 18 positive and 100 negative urine were applied on filter paper and tested by nested PCR method and it was found a total correlation between the reference method and the method of study. Thus, the search of HCMV DNA in urine placed on filter paper revealed a sensitivity and specificity of 100% compared with cell culture. As there was a total correlation of results, it was tested a total of 155 urine, collected on filter paper placed directly on the diapers of newborns. Of all urine tested was not possible to confirm the detection of positive since it is not got none, however not detect any false positive.

The results suggest that method is a reliable assay for diagnosing congenital cytomegalovirus infection when used in urines samples collected in the first three weeks of life. Thus, this procedure will be able to constitute a practical, inexpensive and easy alternative to the cell culture method for congenital infection diagnosis, principally if the samples need long transport, and make possible the samples transport and storage at room temperature.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE GERAL	iv
Índice de Figuras	vi
Índice de Gráficos.....	vii
Índice de Tabelas	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Descrição do citomegalovírus	2
1.1.1 – Estrutura e genoma do vírus	2
1.1.2 – Ciclo replicativo do vírus	3
1.2. Infecção pelo Citomegalovírus Humano	5
1.2.1 Infecção Congénita	8
1.3. Tratamento e prevenção de infecção pelo HCMV	10
1.4. Diagnóstico de infecção pelo HCMV.....	12
1.4.1. Diagnóstico de infecção por HCMV durante a gravidez.....	13
1.4.2. Diagnóstico de infecção congénita no feto.....	15
1.4.3. Diagnóstico de infecção congénita no recém-nascido.....	19
2. OBJECTIVOS	21
3. MÉTODOS.....	22
3.1. Amostras estudadas	22
3.1.1 Colheita das amostras	22
3.2. Métodos	22
3.2.1. Cultura celular em “shell vial”	22
3.2.2. Quantificação das urinas positivas	23
3.2.3. Sensibilidade analítica da técnica	24
3.2.4. Extracção do DNA viral do papel de filtro.....	25
3.2.5. Amplificação do DNA viral	25
3.2.6. Electroforese em gel de agarose	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28

4.1. Divisão das amostras de urina em positivas e negativas	28
4.1.1. Quantificação da carga viral das urinas positivas.....	29
4.2. Sensibilidade da Técnica	32
4.3. Comparação do método de nested PCR aplicado em urinas colhidas em papel de filtro com o método de referência.....	33
5. CONCLUSÃO.....	40
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	41
7. BIBLIOGRAFIA	42

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura do Citomegalovirus	2
Figura 2. Representação do ciclo de replicação do Citomegalovírus Humano.....	4
Figura 3. Mapa representativo da prevalência de infecção por CMV no mundo.....	5
Figura 4. Patologia retinal causada pelo cytomegalovirus num indivíduo com HIV, mostrando necrose retinal com hemorragia.....	7
Figura 5. Características da infecção por HCMV após infecção materna.....	9
Figura 6. Fluxograma representativo do diagnóstico de infecção por HCMV em mulheres grávidas	14
Figura 7. Detecção de infecção pelo HCMV através da identificação de efeitos citopatogénicos numa monocamada de fibroblastos humanos.....	16
Figura 8. Técnica de “shell-vial”. Células endoteliais infectadas com HCMV 96h após infecção.....	17
Figura 9. Fluxograma representativo do diagnóstico pré-natal de infecção congénita por HCMV	18

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Número de urinas positivas e negativas detectadas pelo método de referência, método de cultura celular	28
Gráfico 2. Percentagem de urinas positivas e negativas obtidas pelo método de referência	29

Índice de Tabelas

Tabela 1. Testes laboratoriais usados para o diagnóstico de infecção pelo citomegalovirus humano (HCMV) (Adaptado de Hassan e Connell, 2007).....	12
Tabela 2. Registo das cargas virais das respectivas urinas positivas pelo método de referência	30
Tabela 3. Registo das cargas virais das urinas e suas respectivas diluições.....	32
Tabela 4. Comparação dos resultados obtidos pelo método de referência e pelo método de nested PCR em urinas aplicadas em papel de filtro.....	33
Tabela 5. Registo de resultados obtidos pelo método de referência e pelo método de nested PCR em urinas aplicadas em papel de filtro.....	35
Tabela 6. Registo dos resultados obtidos pelo método de referência e pelo método de nested PCR aplicado a urinas colhidas em papel de filtro.....	36
Tabela 7. Registo dos resultados obtidos pelo método de referência e pela técnica de nested PCR em urinas aplicadas/colhidas em papel de filtro, e respectiva sensibilidade e especificidade da técnica de PCR.....	37

1. INTRODUÇÃO

O Citomegalovírus humano (HCMV), também designado por herpesvirus humano 5 (HHV-5) é um membro da família *Herpesviridae* e subfamília Betaherpesvirina (Ma et al., 2006; Revello e Gerna, 2004), é o maior vírus desta família, sendo morfológicamente indistinguível dos outros herpesvirus humanos (Ji et al., 2006). O HCMV estabelece um estreito relacionamento com o hospedeiro, resultando em infecção primária, latência e secreção intermitente após reactivação (Revello e Gerna, 2004).

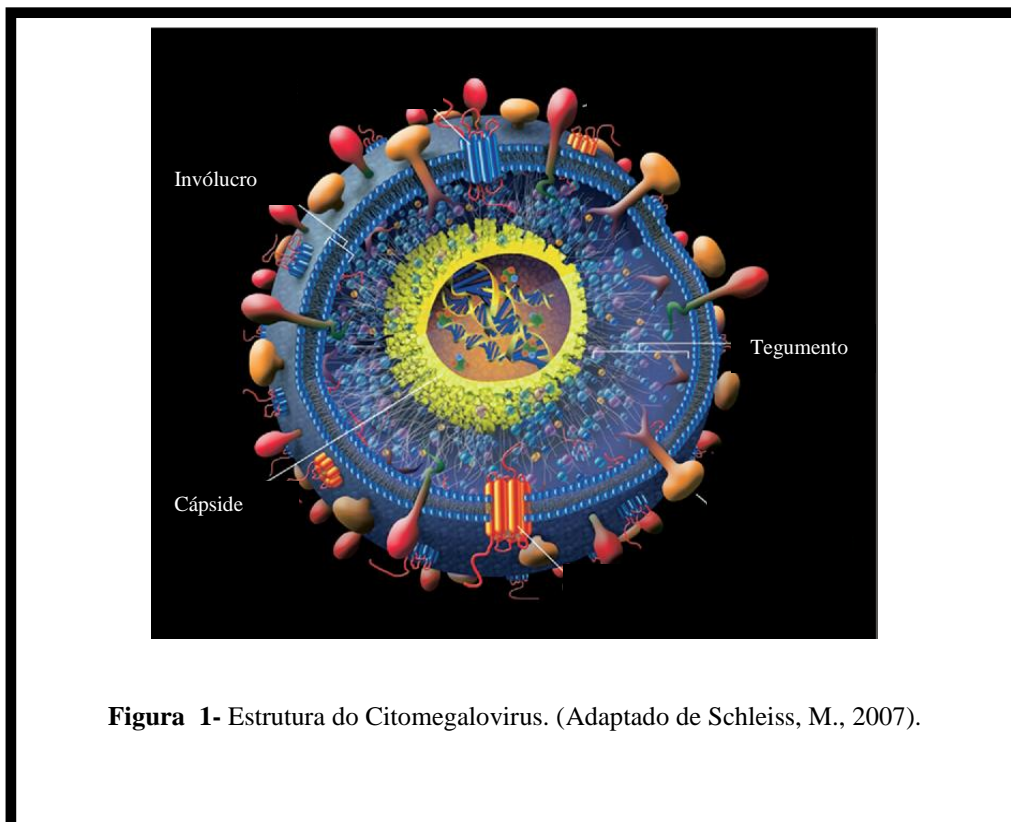
O HCMV foi isolado pela primeira vez em 1956 por três grupos de investigadores (Weller, 1970). Desde então, tem sido reconhecido como a causa mais comum de infecção congénita nos humanos ocorrendo em 0.2-2.2% de todos os nascimentos (Demmler et al., 1991; Gaytant et al., 2001; Paixão et al., 2005). A maioria dos recém-nascidos infectados (80-90%) não apresenta nenhum sinal clínico ou sintoma à nascença, mas 5-15% dessas crianças assintomáticas desenvolverá sequelas durante a infância, sendo a mais comum a perda auditiva sensorial (Boppana et al., 1997; Dahle et al., 2000; Pass e Boppano, 1991). Adicionalmente, o citomegalovírus humano também tem sido reconhecido como uma importante causa de morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos, tais como indivíduos com o síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e indivíduos transplantados (Jacobson et al., 1988; Winston et al., 1990).

O diagnóstico de infecção congénita por HCMV nos recém-nascidos é, então, importante devido à frequência da infecção, e uma vez que 5-15% das crianças assintomáticas desenvolvem sequelas mais tarde. Assim e à semelhança do que é feito com as amostras de sangue colhidas nos “guthrie cards” foi estudada a possibilidade de usar o método de nested PCR para pesquisa do HCMV em amostras de urina colhidas em papel de filtro.

1.1. Descrição do citomegalovirus

1.1.1 – Estrutura e genoma do vírus

O HCMV é o maior membro da família *Herpesviridae* com um diâmetro de aproximadamente 200 nm (Britt e Boppana, 2004). O seu genoma consiste numa cadeia dupla de DNA genómico linear de aproximadamente 230 Kbp, que codifica mais de 35 proteínas estruturais e glicoproteínas (Gaytant et al., 2002; Tanaka et al., 2005), estando rodeado por uma estrutura icosaédrica designada por cápside. Esta estrutura, de 100 nm de diâmetro, possui na sua composição componentes proteicos que incluem proteínas tais como, UL86, UL85 e UL46 (Britt e Boppana, 2004; Landolfo et al., 2003) as quais parecem ter um importante papel na maturação do virião (Landolfo et al., 2003) (Figura 1).



A envolver a cápside existe uma camada chamada tegumento, constituída por proteínas que podem estar envolvidas na maturação do virião ou influenciar eventos

celulares e virais na fase inicial da infecção. Algumas dessas proteínas são a ppUL82 (pp71), ppUL84, ppUL69 e ppUL83 (pp65) (Britt e Boppana, 2004).

O tegumento, por sua vez, é delimitado, pelo invólucro fosfolipídico, que é formado por uma bicamada lipídica com origem na célula hospedeira, na qual estão inseridas um grande número de glicoproteínas virais (Landolfo et al., 2003; Ma et al., 2006). O invólucro fosfolipídico contém 6 glicoproteínas, incluindo gpUL55 (gB), gpUL73 (gN), gp UL74 (gO), gpUL75 (gH), UL100 (gM), e gpUL115 (gL). Estas glicoproteínas desempenham um papel essencial na entrada do vírus em células hospedeiras, na difusão célula-célula e na maturação do virião (Britt e Mach, 1996).

1.1.2 – Ciclo replicativo do vírus

Durante a infecção, é conhecido que o citomegalovirus se replica produtivamente em células epiteliais, células endoteliais, granulócitos e hepatócitos (Plachter et al., 1996; Kahl et al., 2000; Bissinger et al., 2002), no entanto, as únicas células que são totalmente permissivas à sua replicação *in vitro* são os fibroblastos humanos (Revello e Gerna, 2002).

O ciclo de replicação do HCMV começa com a ligação do vírus à superfície da célula (Hengel et al., 1998), seguido da fusão do invólucro do vírus com a membrana celular, ocorrendo a entrada da nucleocápside e das proteínas do tegumento no citoplasma da célula hospedeira (Browne et al., 2001; Landolfo et al., 2003) (Figura 2). A entrada do vírus é o resultado de uma cascata de interações entre as proteínas virais e celulares.

Após fusão, os componentes do virião são rapidamente transportados para o núcleo, onde ocorre a replicação, começando a síntese do DNA viral 16 horas após a infecção (Mocarski e Courcelle, 2001), a formação de cápsides do HCMV e o empacotamento do DNA viral. Inicialmente, as cápsides, são envolvidas com a membrana nuclear adquirindo um invólucro primário derivado da sua camada interna (Mocarski & Courcelle, 2001). Em seguida, atravessam o lúmen e fundem-se com a

camada exterior da membrana nuclear ou da membrana do retículo endoplasmático, perdendo o seu invólucro primário e avançando para o citoplasma. Aqui, as partículas do virião do HCMV adquirem o tegumento. Nas vesículas do complexo de Golgi, as cápsides com o tegumento recebem o seu invólucro definitivo (Sanchez et al., 2000), sendo retidas nestas e transportadas até à superfície celular (Pass, 2001). O vírus acumula-se no citoplasma e é libertado no compartimento extracelular 72 hr após o início da infecção (Landolfo et al., 2003).

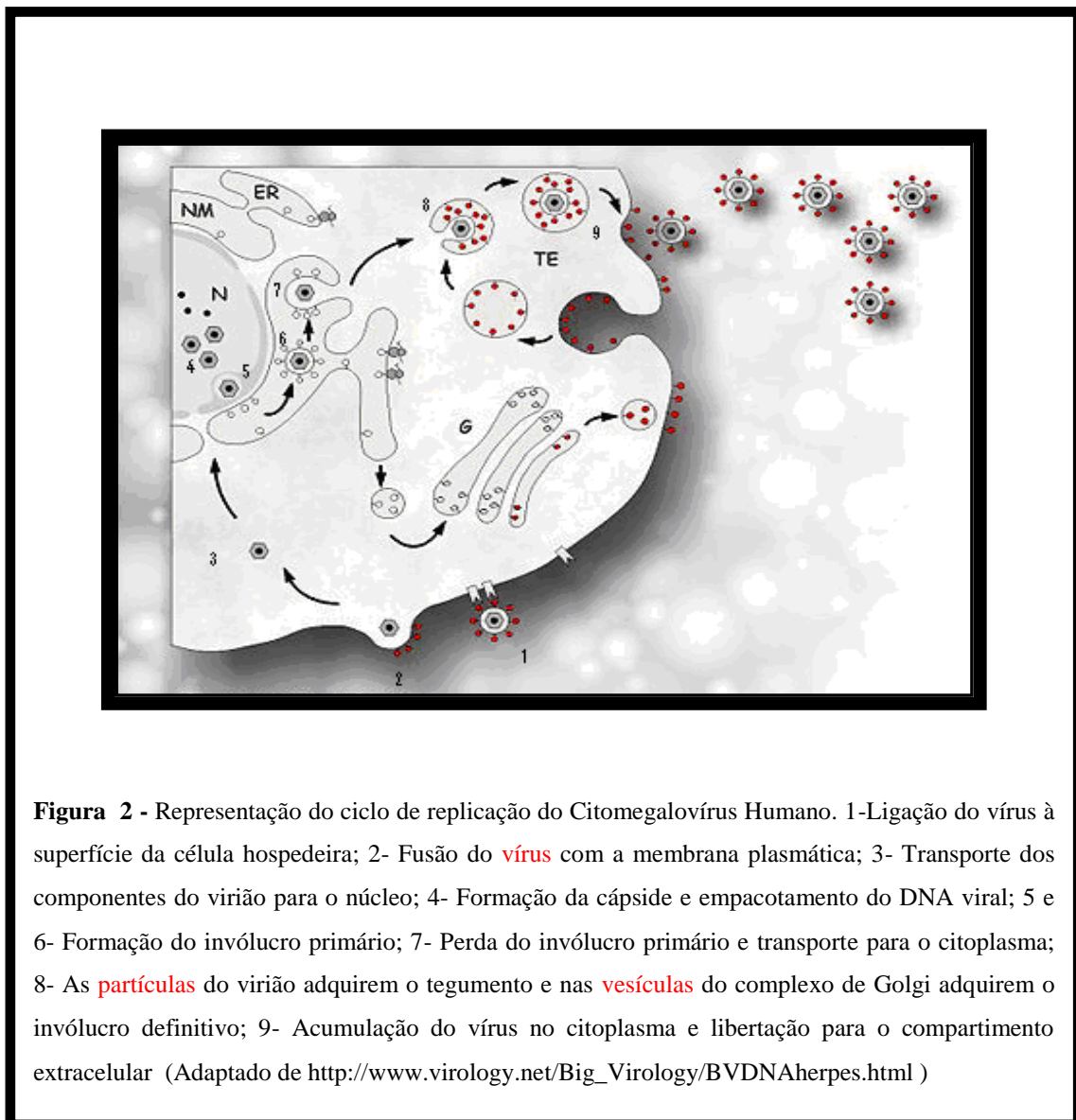


Figura 2 - Representação do ciclo de replicação do Citomegalovírus Humano. 1-Ligação do vírus à superfície da célula hospedeira; 2- Fusão do vírus com a membrana plasmática; 3- Transporte dos componentes do virião para o núcleo; 4- Formação da cápside e empacotamento do DNA viral; 5 e 6- Formação do invólucro primário; 7- Perda do invólucro primário e transporte para o citoplasma; 8- As partículas do virião adquirem o tegumento e nas vesículas do complexo de Golgi adquirem o invólucro definitivo; 9- Acumulação do vírus no citoplasma e libertação para o compartimento extracelular (Adaptado de http://www.virology.net/Big_Virology/BVDNAherpes.html)

1.2. Infecção pelo Citomegalovírus Humano

O HCMV é um vírus endêmico sem variação sazonal. Estudos sobre a seroprevalência têm mostrado que a infecção por HCMV ocorre em todas as populações humanas variando de 30 a 90% dependendo dos factores socioeconómicos e da zona geográfica (Gandhi e Khanna, 2004).

Na maioria dos países desenvolvidos, cerca de 50% da população adulta terá provas serológicas de infecção passada. Nas regiões em desenvolvimento, a seroprevalência pode ser tão elevada como 90 a 100% em crianças mais velhas e adultos (Pass, 2001) (Figura 3).

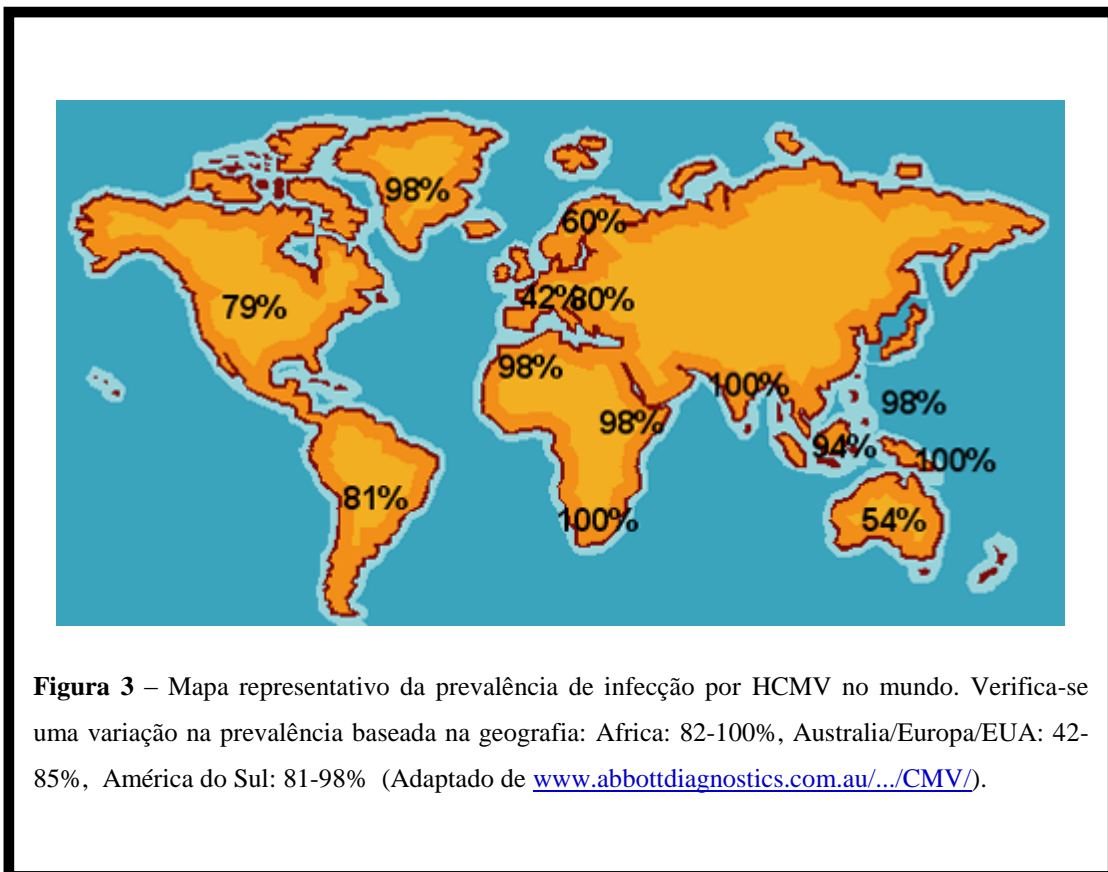


Figura 3 – Mapa representativo da prevalência de infecção por HCMV no mundo. Verifica-se uma variação na prevalência baseada na geografia: África: 82-100%, Australia/Europa/EUA: 42-85%, América do Sul: 81-98% (Adaptado de www.abbottdiagnostics.com.au/.../CMV/).

A prevalência da infecção primária e infecção recorrente por HCMV em mulheres grávidas difere nos vários tipos de populações, variando de 0,7% a 4% para a infecção primária, e até 13,5% para a infecção recorrente (Daniel et al., 1995). As taxas

de infecção por HCMV são mais elevadas nos grupos populacionais de baixo nível socioeconómico, o que pode estar relacionado com a má higiene pessoal. Os factores de risco para infecção por HCMV são os seguintes: baixa escolaridade, outras infecções genitais, idades inferiores a 30 anos e um estreito contacto com as crianças até 2 anos (Fowler e Pass, 2001; Walmus et al., 1988).

O vírus pode aparecer após infecção primária ou secundária (reinfecção ou reactivação). Infecção primária é definida como a infecção que ocorre em indivíduos seronegativos, ou seja, que nunca foram infectados antes, enquanto a infecção secundária pode resultar quer da reactivação do vírus latente (reactivação) ou da infecção com uma estirpe diferente (reinfecção).

Após infecção, o vírus é excretado intermitentemente na urina, secreções orofaríngeas, secreções vaginais e cervicais, no leite materno, no sêmen e lágrimas, num período que pode ir de meses a anos (Stagno, 1995)

A transmissão do HCMV pode ocorrer de pessoa para pessoa por meio de contágio parentérico (sangue e hemoderivados), inter-humano através do contacto directo com fluidos corporais (urina, saliva, leite materno, sangue, lágrimas, sêmen e fluido vaginal), via materno-fetal (canal de parto, pós-parto ou transmissão intra-uterina) e por meio de transplantes de órgãos (Bowden et al., 1991; Ornoy e Diav-Citrin, 2006).

As creches são um local de transmissão significativa do HCMV. Desde a década de 1970, investigadores têm documentado altas taxas de seropositividade para HCMV entre crianças que frequentam creches. Cerca de 20% a 40% das crianças em creches eliminam o vírus durante anos, sendo por isso uma importante fonte de contaminação para outras crianças, pais e indivíduos que trabalham nas creches (Adler, 1985). A transmissão do vírus de criança para criança neste grupo etário ocorre, frequentemente, pelas mãos em contacto com a boca e brinquedos (Ross e Boppana, 2004).

As manifestações da infecção por HCMV variam com a idade e imunocompetência do hospedeiro. Embora a infecção primária pelo CMV em adultos saudáveis seja, usualmente, assintomática em alguns grupos de alto risco, incluindo indivíduos transplantados e indivíduos infectados pelo HIV, a infecção por HCMV pode ter uma maior gravidade (Ornoy e Diav-Citrin, 2006; Rafailidis et al., 2008; Madhavan et al., 2007). Nestes indivíduos podem ocorrer reinfecções numa taxa muito mais elevada, quando comparado com os indivíduos imunocompetentes.

O HCMV é a causa mais comum de infecção viral nos indivíduos com HIV, induzindo danos em órgãos. A manifestação clínica mais frequente nestes indivíduos é a retinite (Figura 4), que se manifesta em 21 a 45% dos pacientes (Hoover et al., 1993).

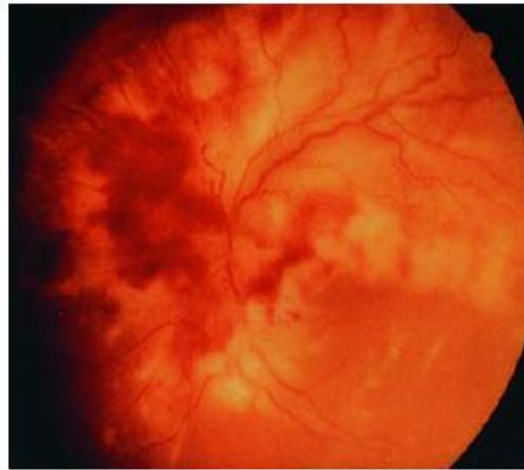


Figura 4 – Patologia retinal causada pelo citomegalovirus num indivíduo com HIV, mostrando necrose retinal com hemorragia. (Adaptado de Gregory e Taylor, 2003)

Nos indivíduos transplantados a manifestação da infecção por HCMV depende do tipo de órgão transplantado. Em transplantados de medula óssea, a infecção por HCMV ocorre como uma pneumonia com uma elevada mortalidade. No caso de transplantados de fígado, a hepatite pode ser problemática. Para indivíduos transplantados de rim, a presença de febre, mialgia, hepatomegalia, leucopenia, linfócitos atípicos e artralgias são as manifestações mais comuns de infecção por HCMV (Mandell et al., 2000).

1.2.1 Infecção Congénita

A infecção congénita por HCMV é uma importante causa de mortalidade e morbidade fetal e neonatal, afectando cerca de 1% (0,2% - 3%) de todos os recém-nascidos (Alford et al., 1990; Demmler, 1991; Lazzarotto et al., 2003). A incidência da infecção congénita é elevada uma vez que as mães podem transmitir o vírus aos fetos após infecção primária ou recorrente (Revello e Gerna, 2004; Stagno et al., 1982), dependendo a severidade da infecção, em parte, do estado imunitário da mãe (Fowler et al., 1992).

O mecanismo de transmissão do vírus ainda não é conhecido, provavelmente os leucócitos maternos infectados são transmitidos através da placenta para a circulação fetal, resultando em viremia com infecção de múltiplos órgãos (Daniel et al., 1995).

Tal como o mecanismo de transmissão do vírus, é também desconhecida a razão porque algumas mulheres, mesmo com infecção recorrente e elevados níveis de anticorpos contra o HCMV, transmitirem o vírus ao feto, enquanto outras sem anticorpos contra o HCMV, durante a infecção primária, não o transmitirem. Alguns estudos sugerem que a carga viral pode ser um importante factor na transmissão do vírus.

Durante a gravidez a infecção por HCMV pode resultar de infecção primária, reinfecção, ou reactivação. Uma vez que a prevalência de imunidade para o HCMV é elevada entre as mulheres, 30%-90% (Gandhi e Khanna, 2004), a transmissão do vírus por reactivação é a maior causa de infecção congénita. No entanto, a maior preocupação é centrada na infecção primária materna, devido ao seu potencial para danos fetais significativos quando a infecção é adquirida e transmitida durante o primeiro trimestre de gravidez (Stagno et al., 1986).

Durante a infecção primária, a transmissão do vírus para o feto ocorre na ausência de imunidade materna (mulher seronegativa para o HCMV), enquanto durante a infecção recorrente, a transmissão do vírus para o feto ocorre na presença de imunidade materna (mulher seropositiva para o HCMV).

Como consequência, 1-4% das mulheres seronegativas adquirem a infecção primária durante a gravidez, ocorrendo a transmissão do vírus em 20-40% dos casos (Biri et al., 2006; Malm e Engman, 2007; Revello e Gerna, 2002; Revello e Gerna, 2004). No caso de infecção recorrente ou reactivação durante a gravidez, observada em

10-30% das mulheres seropositivas, o risco de transmissão para o feto é baixo ocorrendo em 0.5-1.5% dos casos, e a maioria destas crianças parecem normais quando nascem (Biri et al., 2006; Malm e Engman, 2007) (Figura 5).

Das crianças com infecção congénita pelo HCMV, 90% não possuem sinais clínicos ou sintomas à nascença e cerca de 10% apresentam infecção sintomática, a qual envolve múltiplos órgãos manifestando-se como icterícia, hepatoesplenomegália, petéquias, microcefalia, deficiência motora, corioretinites, calcificações cerebrais, letargia, dificuldade respiratória e convulsões. Estes casos de infecção congénita sintomática apresentam uma taxa de mortalidade de 20-30%. (Boppana et al., 1997; Fowler et al., 1997; Stagno, 1995). No entanto, 5 a 15% das crianças com infecção congénita assintomática irá desenvolver sequelas neurológicas, mais propriamente perda auditiva neurossensorial (Dahle et al., 2000; Demmler, 1994; Fowler et al., 1997).

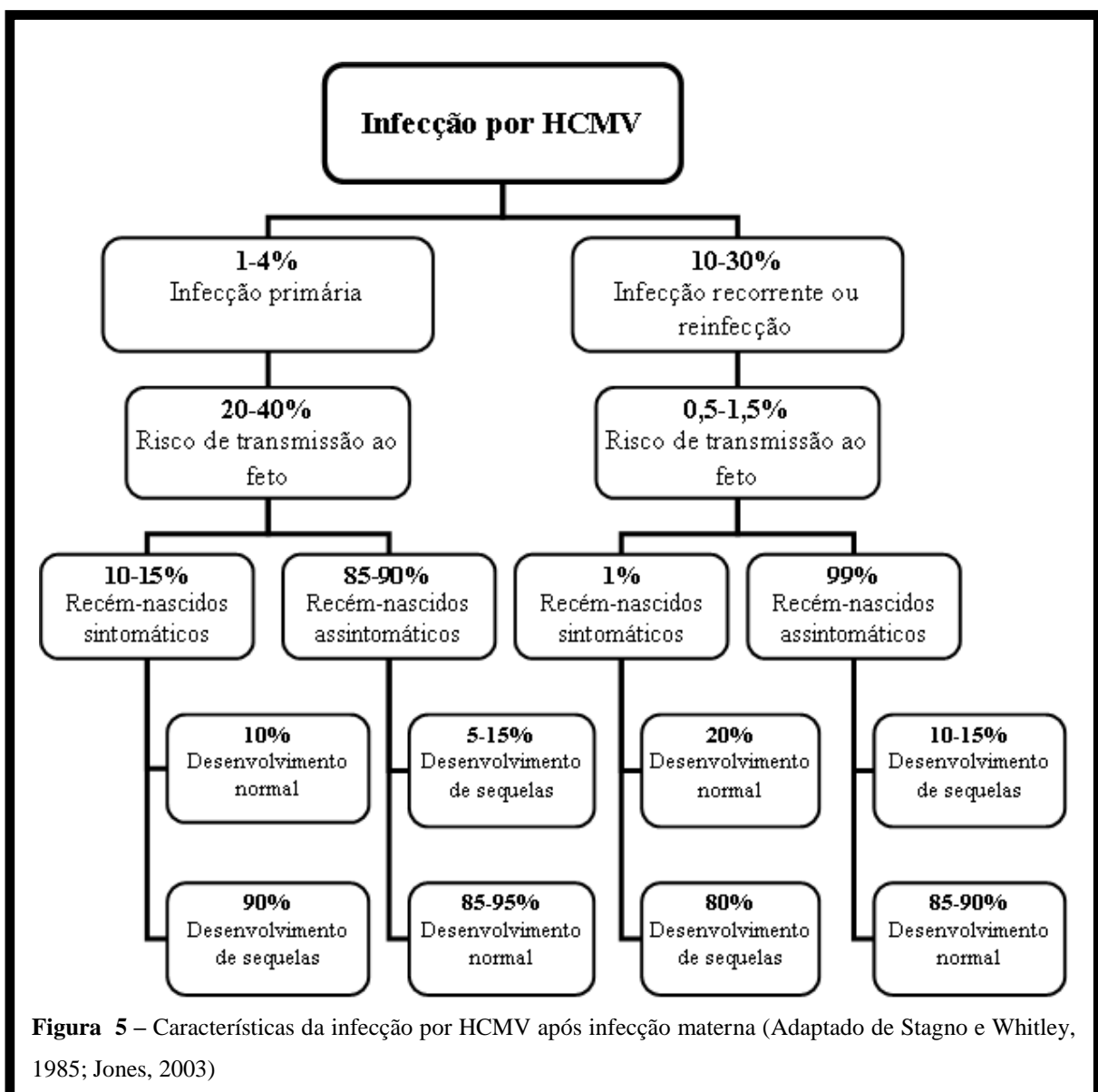


Figura 5 – Características da infecção por HCMV após infecção materna (Adaptado de Stagno e Whitley, 1985; Jones, 2003)

1.3. Tratamento e prevenção de infecção pelo HCMV

Actualmente, não há nenhum tratamento para a infecção primária por HCMV durante a gravidez. Antivirais utilizados no tratamento de infecções por HCMV em indivíduos imunocomprometidos são inibidores da polimerase (Ganciclovir, cidofovir, Foscarnet) e inibidores da tradução (Fomivirsen) (Crumpacker, 1996).

O HCMV é aparentemente sensível ao ganciclovir intravenoso. Dados recentes sugerem um papel benéfico para o tratamento com ganciclovir de recém-nascidos com infecção congénita sintomática. Nesses estudos, o tratamento com ganciclovir parece ter alguns efeitos benéficos sobre a audição, prevenindo a deterioração auditiva (Kimberlin et al., 2003).

Um resultado semelhante foi descrito por Michaels et al.(2003) os quais não encontraram nenhuma deterioração da perda auditiva em nove crianças com infecção congénita por HCMV que foram tratadas com ganciclovir. No entanto, o tratamento não foi associado a uma melhoria significativa no decurso da doença, e quase dois terços das crianças tratadas apresentavam um aumento do fígado e baço.

Além disso, estes medicamentos têm efeitos teratogénicos em animais, não sendo por isso recomendados durante a gravidez (Faqi et al., 1997).

Recentemente, a administração endovenosa de uma imunoglobulina humana na mulher grávida com uma infecção primária por HCMV tem sido pedida para proteger o feto (Nigro et al., 2005), porém ainda são necessários mais estudos para avaliar os resultados.

Devido às consequências de uma infecção congénita por HCMV no feto e no recém-nascido vários estudos têm sido realizados para desenvolver uma vacina que possa ser administrada a mulheres seronegativas em idade fértil, para prevenir a ocorrência de infecção primária por HCMV durante a gravidez (Revello e Gerna, 2002).

Uma vacina viva atenuada utilizando a estirpe Towne foi desenvolvida, no entanto, essa vacina foi incapaz de impedir a infecção em mulheres expostas a crianças que secretam o vírus (Adler et al., 1995). Havia também alguma preocupação no que se refere à capacidade da vacina para reactivar e infectar, e à possibilidade de que a vacina pudesse ser eliminada no colo do útero e no leite materno.

Entretanto, uma vacina de HCMV recombinante baseada na glicoproteína B tem sido desenvolvida, parecendo ser segura e imunogénica em ensaios preliminares (Pass e Burke, 2002).

Apesar de todos estes estudos, até ao momento nenhuma vacina está disponível e os tratamentos com fármacos também não são recomendados, portanto, é desejável reduzir o risco de exposição ao HCMV em mulheres grávidas.

Recomendações gerais para as mulheres grávidas em relação à infecção por HCMV incluem boas práticas de higiene pessoal, especialmente lavagem das mãos com água e sabão após o contacto com fraldas ou secreções orais (especialmente com uma criança que está na creche) (Bale et al., 1999; Dobbins et al., 1994). Estas medidas higiénicas representam um modo simples e importante para diminuir o risco de transmissão viral.

A mulher deve ser bem informada dos riscos de uma infecção por CMV durante a gravidez, deste modo, testes serológicos podem ajudar a determinar se uma mulher já teve uma infecção por HCMV. Se uma mulher tiver infecção primária por HCMV com presença de anticorpos IgM e / ou secreção do vírus na urina, é aconselhável aguardar cerca de 6 meses após a infecção primária para uma futura gravidez (Moienafshari et al., 1998; Ornoy, 2002). No entanto, Fowler et al. (2004) demonstraram num estudo recente que os fetos podem ser infectados pelo HCMV vários anos após a infecção primária materna.

1.4. Diagnóstico de infecção pelo HCMV

Diagnósticos exactos e rápidos são essenciais na prevenção e monitorização da infecção pelo HCMV, especialmente, em indivíduos imunocomprometidos.

O diagnóstico de infecção por HCMV pode ser efectuado por testes virológicos, serológicos e técnicas celulares e moleculares, como descrito na tabela 1. (Hassan e Connell, 2007)

Tabela 1- Testes laboratoriais usados para o diagnóstico de infecção pelo citomegalovirus humano (HCMV) (Adaptado de Hassan e Connell, 2007)

Teste	Amostra requerida	Método	Tempo do teste
Viológico			
DEAFF	Urina, saliva	“shell-vial”	24-48h
Serológico			
IgG, IgM Avidez IgG	Soro/plasma Soro	EIA/Western blotting Luminescência	3-5h 1h
Celular			
Antigenemia	Sangue, leucócitos	Imunofluorescência para a fosfoproteína pp65	5h
Molecular			
Amplificação de ácidos nucleicos	Plasma, sangue, liquido amniótico, urina	PCR-quantitativa ou qualitativa	5h

DEAFF: detection of early antigen fluorescent foci; PCR: polymerase chain reaction

No caso de indivíduos imunodeprimidos a serologia é um teste útil para avaliar o risco de contrair infecção por HCMV, enquanto testes como antigenemia e quantificação do DNA do HCMV por PCR são importantes para monitorizar a diminuição da carga viral durante a terapêutica antiviral (Baldanti et al., 1998). Em indivíduos imunocompetentes o teste mais usado é o teste serológico e em caso de confirmação de infecção é utilizada a técnica de PCR quantitativa para determinação da carga viral (Revello e Gerna, 2002).

1.4.1. Diagnóstico de infecção por HCMV durante a gravidez

A maioria das infecções por HCMV encontradas em mulheres grávidas é assintomática, até mesmo durante a fase aguda. Menos de 5% das grávidas com infecção primária são sintomáticas (Pass e Boppana, 1999). Mesmo em casos com sintomas, as manifestações são inespecíficas e leves, como febre baixa e persistente, dor muscular e aumento dos gânglios linfáticos. Exames laboratoriais podem, por vezes, evidenciar linfocitose atípica e níveis de transaminases ligeiramente elevados. Uma vez que a gravidez, em geral, não afecta o curso clínico da infecção, exames laboratoriais são o melhor meio de estabelecer o diagnóstico (Lazarotto et al., 2008)

Geralmente, o diagnóstico de infecção materna por HCMV é feito por testes serológicos. Estes testes consistem na detecção de anticorpos IgG e IgM específicos para o HCMV e devem ser realizados durante o primeiro trimestre de gravidez. Se apenas forem detectados anticorpos IgG é sinal de uma infecção antiga, não havendo por isso necessidade de realizar mais testes. No caso de os testes serem negativos tanto para anticorpos IgG como para anticorpos IgM é necessário repetir os testes serológicos no segundo e terceiro trimestre de gravidez, de modo a assegurar que não ocorreu seroconversão, ou seja, que um teste negativo para anticorpos IgG passe a ser positivo.

A detecção de anticorpos IgM, com ou sem detecção de anticorpos IgG, pode indicar uma infecção recente. (Senok et al., 2006). No entanto, a interpretação destes resultados é muitas vezes difícil por uma série de razões: os anticorpos IgM podem persistir durante meses após a infecção primária ou reaparecer em cerca de 40% dos casos de reactivação ou reinfeção; e resultados de IgM falso-positivos podem ocasionalmente ocorrer após a infecção com outros vírus, tal como o vírus Epstein-Barr e em doenças autoimunes. Isto significa que a detecção de anticorpos IgM não é 100% específico de uma infecção primária por HCMV, sendo por isso necessária a confirmação dos resultados positivos (Munro et al., 2005 ; Senok et al., 2006)

Assim, para distinguir uma infecção primária de uma infecção não primária durante a gravidez, têm sido realizados testes de avididade dos anticorpos IgG (Grangeot-Keros et al., 1997; Revello e Gerna, 2002), através dos quais é medida a afinidade de ligação dos anticorpos IgG aos respectivos antigénios. Desde modo, os anticorpos IgG de baixa avididade são produzidos nos primeiros meses após infecção primária, enquanto o

subsequente aumento da sua avidéz ao longo do tempo é indicativo de uma infecção antiga (Munro et al., 2005 ; Senok et al., 2006)

Na figura 6 está representado o fluxograma representativo do diagnóstico da infecção por HCMV.

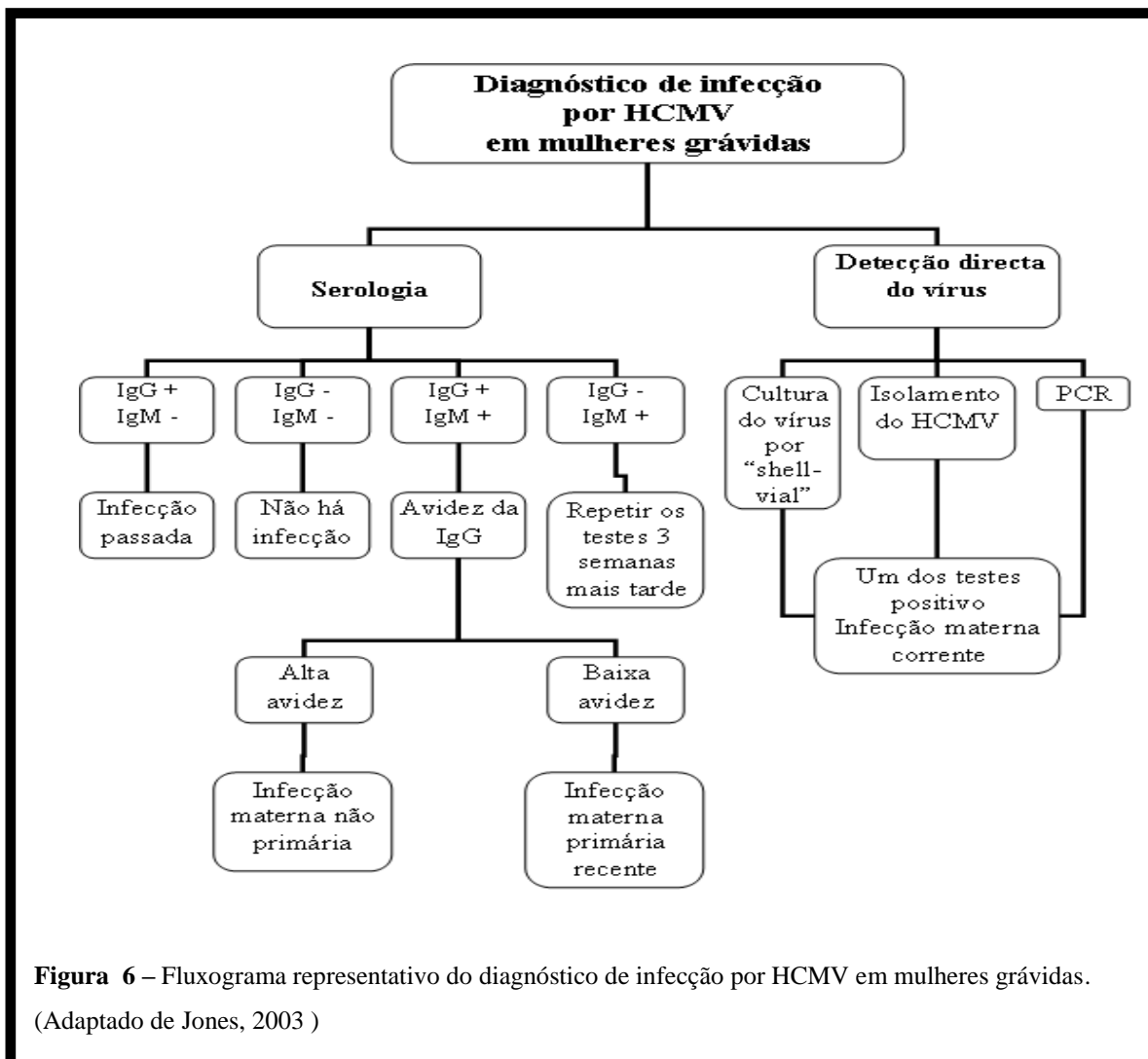


Figura 6 – Fluxograma representativo do diagnóstico de infecção por HCMV em mulheres grávidas. (Adaptado de Jones, 2003)

Outros testes usados para o diagnóstico de infecção na grávida é a detecção do DNA do HCMV no sangue por técnicas de amplificação do DNA, através da reacção da polimerase em cadeia (nested PCR) ou por técnicas de hibridação do DNA (PCR em tempo real) (Daiminger et al., 1994; Grangeot e Cointe, 2001; Tsai et al., 1996).

Na nested PCR são efectuados dois passos, o produto de amplificação inicial serve como um modelo para a segunda ronda, a qual é realizada com dois primers internos (nested). Ela aumenta significativamente a especificidade da análise e a sua sensibilidade, permitindo que a amplificação do produto final seja directamente determinada pela coloração do gel após electroforese com brometo de etídio (Vinogradskaya et al., 1995).

Outros métodos de diagnóstico (NASBA) capazes de detectar mRNA do HCMV, um marcador de replicação viral activa, estão disponíveis e são susceptíveis de proporcionar uma abordagem mais sensível para a determinação do curso clínico da infecção (Senok et al., 2006).

1.4.2. Diagnóstico de infecção congénita no feto

Nos casos onde a infecção primária por HCMV é diagnosticada durante a gravidez, devem ser tomadas algumas precauções devido ao elevado risco de transmissão intra-uterina e suas consequências no desenvolvimento do feto. Por isso, o diagnóstico pré-natal é recomendado para mulheres com infecção primária por HCMV contraída nos primeiros trimestres da gravidez e em caso de anomalias fetais sugestivas de infecção (Guerra et al., 2000; Lazzarotto et al., 2000a).

O diagnóstico pré-natal é possível através de: (1) cordocentese para detecção de anticorpos IgM, (2) cultura directa do líquido amniótico ou detecção de DNA do HCMV por PCR (Danie et al., 1995).

O DNA do HCMV e os anticorpos IgM podem também ser detectados no cordão umbilical (cordocentese). No entanto, como a sensibilidade diagnóstica é menor no cordão umbilical do que no líquido amniótico, e o risco de aborto espontâneo é maior após a cordocentese, a análise do líquido amniótico (amniocentese) é o método recomendado para o diagnóstico da infecção fetal pelo HCMV.

Uma decisão crítica no diagnóstico pré-natal é quando proceder à amniocentese. Dois factores devem ser considerados: em primeiro lugar, na maioria dos casos, são necessárias pelo menos 6-9 semanas após infecção materna para o vírus ser eliminado na urina do feto em quantidades suficiente para ser detectado no líquido amniótico (Ruellan, Eugene et al., 1996). Em segundo lugar, a doença fetal é mais severa se a

transmissão do CMV ocorrer durante as primeiras 12-16 semanas de gestação (Pass et al., 2006). Devido a estes factores, a amniocentese é realizada entre a 21ª e 22ª semana de gestação (Lazzarotto et al., 1999).

O líquido amniótico é submetido a uma detecção directa do HCMV em cultura e a uma detecção do genoma viral através de PCR.

Para a detecção directa do HCMV no líquido amniótico era usada a cultura celular tradicional (Figura 7). Nesta técnica, o crescimento do vírus na amostra produzia um efeito citopatogénico característico facilmente detectado por microscopia óptica (Daiminger et al., 1994; Pass et al., 1995)

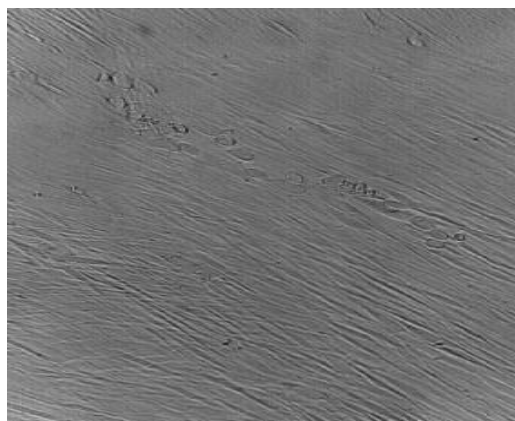


Figura 7 - Detecção de infecção pelo HCMV através da identificação de efeitos citopatogénicos numa monocamada de fibroblastos humanos (Adaptado de Landolfo et al, 2003).

Embora este método de cultura celular tenha uma elevada sensibilidade, pode demorar 2 a 4 semanas ou mais até ao aparecimento de efeitos citopatogénicos visíveis, isto acontece principalmente quando a quantidade de vírus na amostra é baixa (Ross and Boppana, 2004; Chou, 1990). Por isso, métodos de cultura rápidos têm sido desenvolvidos, assim como o método de “shell vials”, com uma sensibilidade e especificidade comparável ao padrão da cultura celular, e apresentando resultados entre 24 a 36 horas. (Grangeot-Keros et al., 2001; Pass, 2002; Ross e Boppana, 2004; Trincado et al.,2002).

Na técnica de cultura celular em “shell vials”, uma monocamada de fibroblastos humanos é inoculada com líquido amniótico. Os núcleos de fibroblastos infectados são corados por imunofluorescência utilizando um anticorpo monoclonal reactivo com a proteína p72 do HCMV, permitindo assim a avaliação de culturas muito antes do aparecimento de efeitos citopatogénicos (Daniel et al., 1995 ; Landolfo et al., 2003; Revello e Gerna, 2002).

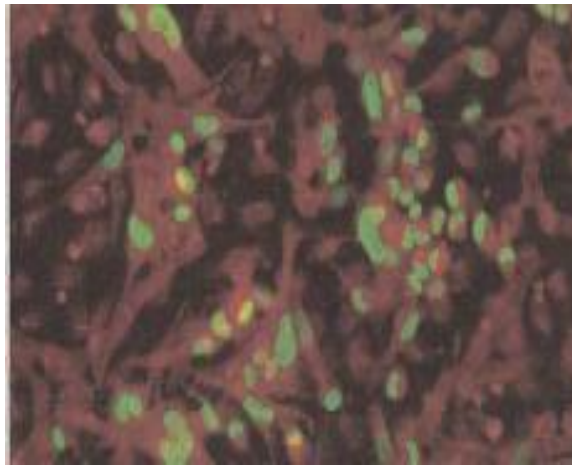


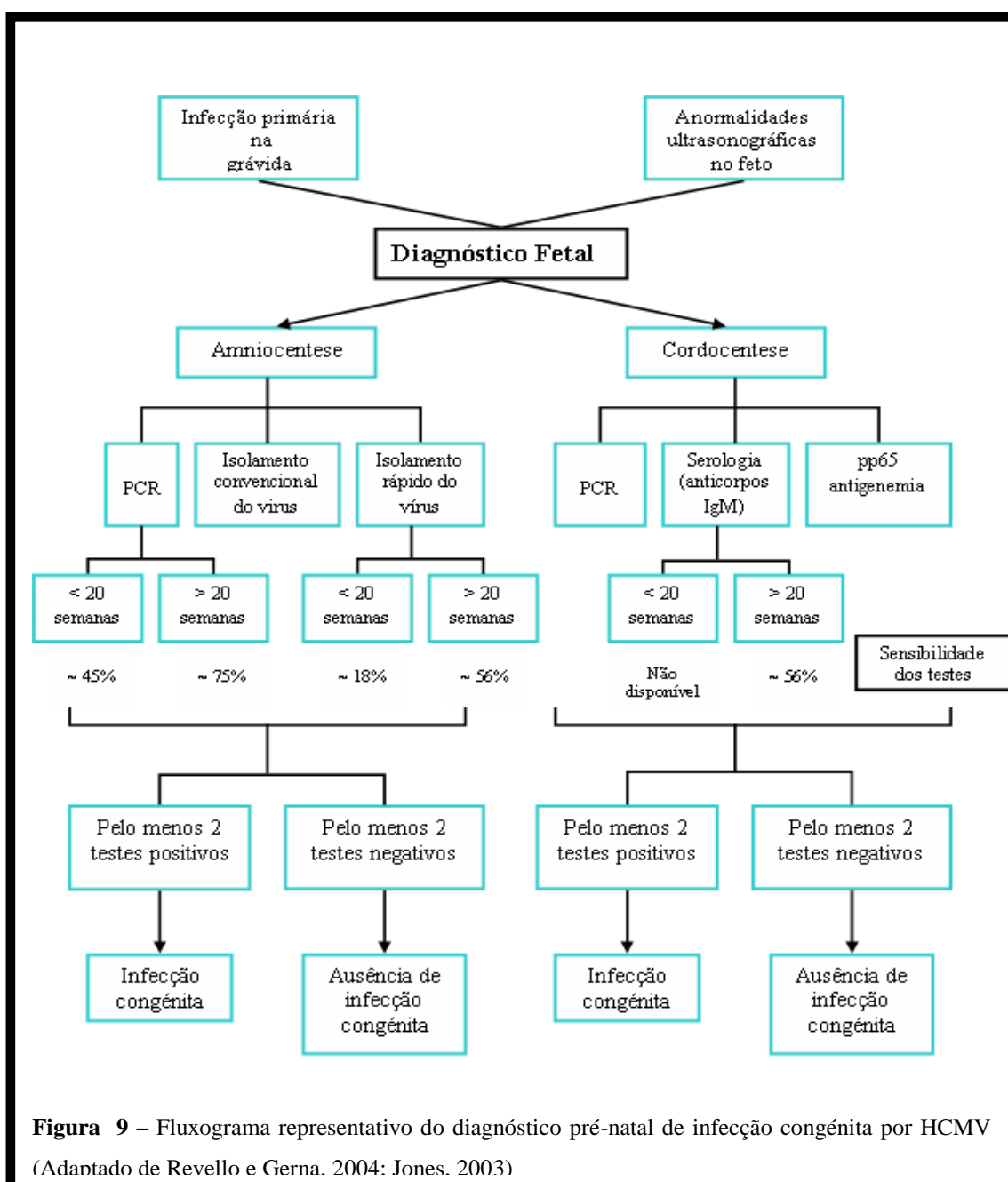
Figura 8 - Técnica de “shell-vial”. Células endoteliais infectadas com HCMV 96h após infecção.

No entanto, o isolamento do vírus através da cultura do líquido amniótico pode identificar infecção fetal, mas o processo não é sensível (70-80%) e tem um elevado número de resultados falsos-negativos (Donner et al., 1994; Mulongo et al., 1995).

Por outro lado, a pesquisa qualitativa de DNA do CMV no líquido amniótico tem uma boa sensibilidade e especificidade (90-98% e 92-98%, respectivamente) no que diz respeito à transmissão viral da mãe para o feto (Ruellan, Eugene et al., 1996; Lipitz et al., 1997; Revello et al., 1998, Guerra et al., 2000; Enders et al., 2001). No caso de ambas as técnicas serem negativas e de a colheita ter sido realizada após a 21ª semana, a infecção fetal pode ser excluída com um elevado grau de certeza (Guerra et al., 2000; Lazzarotto et al., 2000a; Gouarin et al., 2002).

Quando se detecta infecção fetal por HCMV, testes auxiliares de diagnóstico como a ultrasonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética podem ser usados para detectar possíveis lesões no feto. A ultrasonografia tem a vantagem de não ser invasiva e poder detectar uma série de anormalidades no feto, incluindo microcefalia, ascite, hepatomegalia, dilatação ventricular, atraso do crescimento intra-uterino, calcificação intra-craniana, ou calcificação abdominal. No entanto a sua sensibilidade é baixa e identifica correctamente não mais que 5% dos bebés infectados (Ville, 1998).

Na figura 9 está representado o fluxograma representativo do diagnóstico pré-natal de infecção congénita por HCMV.



1.4.3. Diagnóstico de infecção congénita no recém-nascido

Como já foi referido anteriormente, o HCMV é a causa mais frequente de infecção congénita infectando 1% (0,2% - 3%) de todos os recém-nascidos. Apesar de 90% das crianças infectadas congenitamente pelo HCMV não possuírem sinais clínicos ou sintomas à nascença, o diagnóstico desta infecção é importante uma vez que 5 a 15% das crianças com infecção congénita assintomática irá desenvolver sequelas neurológicas mais tarde (Dahle et al., 2000; Demmler, 1994; Fowler et al., 1997).

Como os recém-nascidos com infecção congénita excretam grandes quantidades de vírus na urina e secreções respiratórias, o isolamento do HCMV em fibroblastos humanos (cultura celular) a partir de urina ou outras secreções, como saliva, nas três primeiras semanas de vida continua a ser o método mais sensível e confiável de diagnóstico de infecção congénita por HCMV (Rawlinson, 1999). Sendo por isso, a cultura celular o método de referência para o diagnóstico de infecção congénita pelo HCMV nos recém-nascidos. No entanto, este método apresenta algumas limitações, para além de ser moroso e dispendioso, pode ser facilmente dificultado por factores como a inviabilidade das células e/ou a perda de infectividade das amostras, que podem reduzir significativamente a sensibilidade da técnica.

Devido a estes factores, o técnica de cultura celular tem sido substituída pelo método de PCR, no qual o DNA do HCMV pode ser detectado na urina e no líquido cefalorraquidiano, onde a sua presença parece estar, significativamente, associada com o atraso no desenvolvimento (Schlesinger et al., 2003).

A detecção de anticorpos IgM no sangue também pode auxiliar no diagnóstico de infecção congénita. Os anticorpos IgM maternos não podem ser transferidos através da placenta. Sendo os anticorpos IgG na criança, principalmente, anticorpos transferidos maternalmente, a demonstração de anticorpos IgM no recém-nascido antes da 2^a-3^a semana de idade é indicativo de uma infecção congénita. No entanto, apenas 70% dos recém-nascidos com infecção congénita por HCMV têm anticorpos IgM ao nascer (Revello et al., 1999). Quando os anticorpos IgM estão presentes no recém-nascido, o diagnóstico pode ser confirmado pela detecção do vírus.

Após 2-3 semanas de vida, testes serológicos e virológicos deixarão de distinguir infecção congénita de infecção perinatal por HCMV, pois um resultado positivo após a terceira semana pode ser consequência do contacto com secreções vaginais durante o

parto, exposição ao leite materno ou a produtos derivados do sangue (Revello e Gerna, 2002).

A possibilidade de um diagnóstico retrospectivo para além do prazo de 3 semanas, tem evoluído através da análise do DNA do HCMV em amostras de sangue colhidas em cartões de papel “guthrie cards” (DBS). As amostras de DBS são rotineiramente recolhidas de crianças na idade de 3-5 dias a fim de diagnosticar doenças metabólicas e hereditárias. Em 1996, uma equipa italiana (Barbi et. al, 1996) descreveu pela primeira vez a utilização destes cartões para a pesquisa do DNA do HCMV, abrindo caminho à possibilidade de diagnóstico retrospectivo do agente etiológico de situações compatíveis com infecção congénita pelo HCMV, como perda auditiva ou encefalopatias (Barbi et al., 2000; Barbi et al. 2006).

Desde então, vários grupos de investigadores têm usado diferentes métodos de PCR para amplificar o DNA do HCMV extraído do sangue recolhido em “guthrie cards”.

No entanto, devido à quantidade de vírus no sangue durante a infecção ser menor do que na urina ou saliva, e de modo a facilitar a colheita e armazenamento das amostras, é pertinente a possibilidade de usar a técnica de nested PCR para detecção de DNA do HCMV em amostras de urina recolhidas em “guthrie cards”.

2. OBJECTIVOS

Tendo em conta as limitações apresentadas pelo método de referência para a pesquisa da infecção congénita em recém nascidos até à 2-3^a semana de vida, nomeadamente no que diz respeito à colheita, transporte e armazenamento das amostras, este trabalho teve como objectivo principal:

- Estudar a possibilidade de aplicar o método de nested PCR ao diagnóstico de infecção congénita por HCMV, utilizando amostras de urina colhidas em papel de filtro.

E como objectivos secundários:

- Determinar a sensibilidade analítica da técnica de nested PCR quando aplicada na pesquisa do DNA do HCMV em urinas de recém nascidos colhidas em papel de filtro

- Comparar a pesquisa do DNA do HCMV em urinas de recém nascidos colhidas em papel de filtro com o método de referência (pesquisa do vírus por cultura celular)

- Estudar a exequibilidade da colocação do papel de filtro na fralda

3. MÉTODOS

3.1. Amostras estudadas

Para a realização deste trabalho foram usadas 273 urinas de recém-nascidos colhidas nas 3 primeiras semanas de vida.

3.1.1 Colheita das amostras

Todas as amostras foram colhidas usando um saco colector colocado em contacto com os órgãos genitais da criança. Posteriormente a urina foi transferida para um tubo e enviada ao laboratório para processamento.

Paralelamente em 155 crianças foi colhida uma segunda amostra de urina colocando na fralda um quadrado de papel de filtro. Depois de impregnado com urina, o papel de filtro foi retirado da fralda e depois de seco foi enviado ao laboratório para processamento.

3.2. Métodos

3.2.1. Cultura celular em “shell vial”

Todas as urinas foram previamente testadas pelo método de referência – cultura celular pelo método de shell vial, o que permitiu a sua divisão em urinas positivas e negativas.

Para isso, foram usados shell vial com células MRC-5 confluentes. Cada shell vial foi inoculado com 300µL de uma diluição de urina a 1/2 em “hanks balanced salt

solution” (HBSS) e centrifugado durante 1 hora a 700 rpm. No final da centrifugação adicionou-se 1 mL de Meio Essencial Mínimo (MEM) a 2% e deixou-se incubar na estufa de CO₂ durante 48 horas.

Passadas as 48 horas, a lamela existente no fundo do shell vial contendo as células, foi colocada numa lâmina e corada por uma técnica de imunofluorescência usando um anticorpo monoclonal anti IEA + EA do HCMV (Gleaves et al., 1985) e um segundo anticorpo conjugado com fluoresceína.

Cada lamela foi observada ao microscópio para a pesquisa de coloração nuclear característica.

3.2.2. Quantificação das urinas positivas

As urinas positivas para o HCMV foram quantificadas por uma técnica de PCR em tempo real. Procedeu-se a uma extracção com um Kit da Quiagen seguida de uma amplificação por PCR em tempo real.

- Extracção Quiagen

Para a extracção das amostras pipetou-se 20 µL de protease para um tubo de 1,5 mL, aos quais foram adicionados, primeiramente, 200 µL de amostra e de seguida 200 µL de tampão de lise, agitando-se no vortex durante 15 segundos e deixou-se as amostras a incubar a 56 °C durante 10 minutos.

Após incubação, adicionou-se 200 µL de etanol (96 – 100%) a cada amostra e agitou-se imediatamente.

As amostras foram aplicadas em colunas QIAamp colocadas em tubos eppendorf de 2 mL e centrifugadas a 8000 rpm, durante 1 minuto. Descartou-se, o líquido contido nos tubos e procedeu-se a dois passos de lavagem das colunas. No primeiro adicionou-se 500 µL de tampão AW1 às colunas e centrifugou-se a 8000 rpm, durante 1 minuto e no segundo adicionou-se 500 µL de tampão AW2 e centrifugou-se à velocidade máxima (13000 rpm) durante 3 minutos, descartando sempre o líquido contido nos tubos. Após

as lavagens procedeu-se a uma nova centrifugação à velocidade máxima (13000 rpm) durante 1 minuto, de modo a limpar a membrana da coluna de qualquer resíduo.

Por fim, colocou-se as colunas em novos tubos de 1,5 mL e procedeu-se à eluição do DNA viral contido na membrana da coluna com 50 µL de tampão AE. Após a adição do eluente as colunas foram incubadas à temperatura ambiente durante 5 minutos e de seguida centrifugadas a 8000 rpm, durante 1 minuto. No fim, os extraídos foram guardados para posterior amplificação

- Amplificação por PCR em tempo real

Para cada amostra preparou-se uma mistura de amplificação usando uma mistura de amplificação comercial para PCR em tempo real, à qual se adicionou 7 µM dos primers CMV F (5'-CCC TCC GGC AAG CTC TTT-3') e CMV R (5'-CAG GTC CTC TTC CAC GTC AGA-3') e 0,3 µM de sondas CMV.

De seguida pipetou-se 5 µL de cada amostra para os respectivos tubos "smartcycler", perfazendo um volume final de 25 µL e colocaram-se no equipamento para PCR em tempo real "Smart Cycler" da Cepheid, onde as amostras foram incubadas a 94°C durante 5 minutos, seguida de 50 ciclos de desnaturação a 94°C durante 20 segundos e "annealing" a 60°C durante 1 minuto.

3.2.3. Sensibilidade analítica da técnica

Para a determinação da sensibilidade analítica da técnica foram usadas 2 urinas positivas, enviadas ao laboratório de patologia clínica e previamente testadas pelo método de cultura celular.

Cada amostra foi diluída recorrendo a diluições sucessivas de base 10 em MEM sem aditivos e aplicadas em papel de filtro.

Resumidamente, foram aplicados 40 µL de cada diluição de urina em diferentes círculos de papel de filtro que se deixaram secar à temperatura ambiente.

Esta técnica foi ainda usada para a preparação das amostras simuladas usadas no estudo.

3.2.4. Extracção do DNA viral do papel de filtro

Para a eluição da urina dos cartões cortou-se 1/6 de cada círculo dos cartões e colocou-se num tubo eppendorf de 0,2 ml. De seguida, pipetou-se 45 µL de MEM para cada tubo e guardaram-se no frigorífico a 4°C “overnight”. Cada amostra foi processada em duplicado.

No dia seguinte, foi realizada a extracção por choque térmico (Paixão et al., 2005). Para isso, os tubos eppendorf, contendo as urinas, foram aquecidos a 56°C durante 60 minutos, e de seguida a 99°C durante 7 minutos. Após refrigeração rápida até aos 4°C, os produtos foram congelados a -80°C “overnight”.

3.2.5. Amplificação do DNA viral

Uma região do gene da glicoproteína 58, do DNA viral extraído, foi amplificada usando a técnica nested PCR, a qual compreende duas fases de amplificação.

Na primeira fase de amplificação (1ªPCR), a mistura de amplificação para cada amostra foi preparada com a seguinte composição: PCR buffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP's, 0,25 µM dos primers gB1 (5'-gaggacaacgaaatcctgttggca-3') e gB2 (5'-gtcgacggtggagatactgctgagg-3'), 1U Taq polymerase e água destilada ultra pura, para um volume de 45µL.

Para evitar contaminações, a cada tubo foi adicionada uma gota de óleo mineral.

De seguida, foram pipetados 5 µL de cada amostra para os respectivos tubos eppendorf, perfazendo um volume final de 50 µL, e colocados num termociclador, onde as amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos,

seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, “annealing” a 58°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. Após os 35 ciclos segue-se um último ciclo de extensão a 72°C durante 5 minutos. Terminada a amplificação, os produtos da 1ªPCR são centrifugados para posterior utilização.

Na segunda fase de amplificação (2ªPCR), a mistura de amplificação para cada amostra também foi preparada como descrito anteriormente para a 1ªPCR, sendo neste caso, os primers utilizados os gB3 (5'-accaccgcactgaggaatgtag-3') e gB4 (5'-tcaatcatgcgtttgaagaggta-3'), com concentração de 0,5 µM cada.

De seguida, foram pipetados 1 µL de cada produto da 1ªPCR para os respectivos tubos eppendorf, perfazendo também um volume final de 50 µL, e colocados num termociclador, onde as amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, “annealing” a 50°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. Após os 30 ciclos segue-se um último ciclo de extensão a 72°C durante 5 minutos.

3.2.6. Electroforese em gel de agarose

Para confirmar a presença da banda alvo de 100 kb, os produtos foram analisados electroforeticamente em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídio e os fragmentos visualizados através de luz ultravioleta usando um transiluminador.

O gel de agarose foi preparado em tampão Tris-HCl (TBE). Para tal, foi pesado 1,5 g de agarose e adicionou-se 50 mL de TBE 1X, sendo posteriormente o balão colocado numa placa de aquecimento. Após aquecimento foi adicionado 10 µL de brometo de etídio e colocada a mistura no respectivo suporte. Depois da polimerização do gel, colocou-se o suporte na tina de electroforese, pipetou-se 10 µL de azul bromofenol para cada tubo de produto amplificado, sendo aplicados 10 µL da mistura nos respectivos poços. Os produtos migraram durante 15 minutos e foram visualizados através de luz ultravioleta usando um transiluminador. A distância que o fragmento

percorreu a partir do ponto de aplicação, foi comparada com a distância que outros fragmentos de tamanhos conhecidos percorreram no mesmo gel. Esses fragmentos são os marcadores de peso molecular, misturas de segmentos de DNA de tamanhos variáveis e equidistantes entre si, e que são aplicados em um poço no gel no início do processo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Divisão das amostras de urina em positivas e negativas

Inicialmente foram recolhidas 273 amostras de urinas de recém-nascidos até às três primeiras semanas de vida, as quais foram testadas pelo método de cultura celular em shell vials.

Das 273 amostras, foi detectada a presença do HCMV em 18 urinas, sendo as restantes 255 urinas negativas, como se pode verificar no gráfico 1.

Através dos resultados obtidos pelo método de referência, foi possível dividir as urinas em 2 grupos:

- urinas positivas: 18 urinas
- urinas negativas: 255 urinas

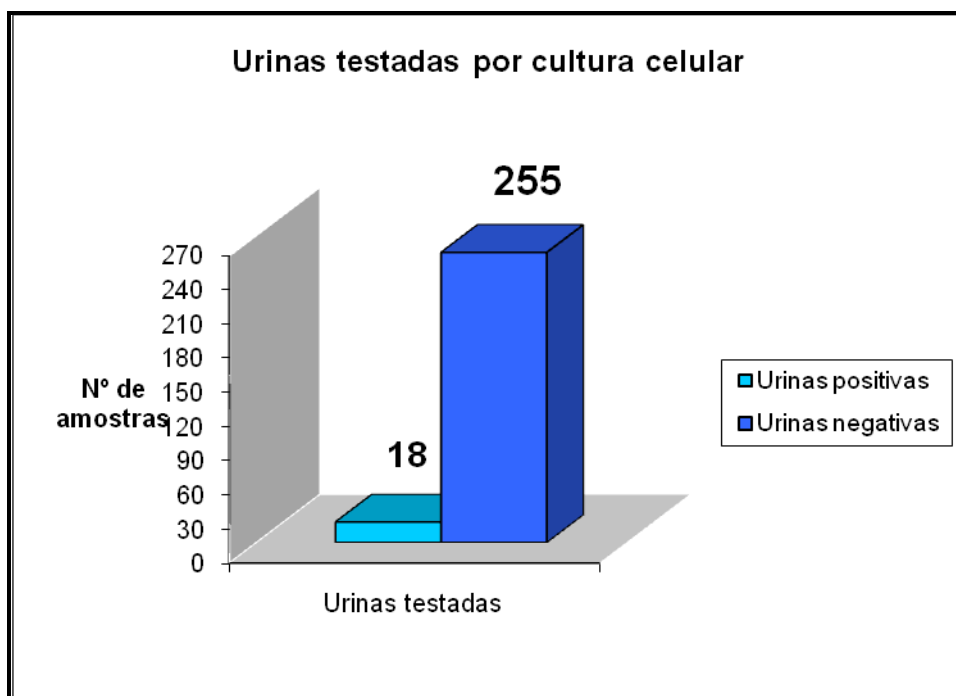


Gráfico 1 – Número de urinas positivas e negativas detectadas pelo método de referência (método de cultura celular)

De acordo com o gráfico 2, os resultados obtidos correspondem a uma percentagem de 7% (18) de urinas positivas e 93% (255) de urinas negativas, respectivamente.



Gráfico 2 – Percentagem de urinas positivas e negativas obtidas pelo método de referência

4.1.1. Quantificação da carga viral das urinas positivas

Após a divisão em urinas positivas e negativas, relativamente ao HCMV, foi determinada a carga viral das urinas positivas através do método de PCR em tempo real.

Os resultados obtidos estão representados na tabela 2.

Tabela 2 – Registo das cargas virais das urinas positivas pelo método de referência

Nº amostra	Carga viral (cópias/mL)
1	103 450
2	35 000
3	209 231
4	>3 570 000
5	>3 570 000
6	>3 570 000
7	277 250
8	126 375
9	2 145 560
10	2 171 927
11	>3 570 000
12	>3 570 000
13	171 478
14	471 013
15	>3 570 000
16	>3 570 000
17	>3 570 000
18	>3 570 000

Como se pode concluir através da observação da tabela anterior, as urinas testadas neste trabalho cobrem uma gama de cargas virais entre 35 000 cópias/mL e > 3 570 000 cópias / mL, permitindo assim testar o método da detecção do DNA do HCMV em papéis de filtro não só em urinas com cargas virais altas mas também com cargas virais intermédias e até mesmo baixas.

Apesar das diferenças de quantificação encontradas de método para método estes valores estão de acordo com os valores obtidos por outras equipas, o que reforça a ideia de que a gama de urinas por nós testada vai ao encontro dos valores que se espera encontrar nas crianças com infecção congénita.

Halwachs-Baumann et al. (2002) realizaram um estudo sobre as cargas virais do HCMV em várias amostras de fluidos corporais, conseguindo detectar, na urina de recém-nascidos com infecção congénita assintomática uma carga viral média de 460 000 cópias/mL e com infecção congénita sintomática, uma carga viral média de 380 000 cópias/mL.

Um outro estudo sobre a associação entre a carga viral do HCMV na infância e a perda auditiva foi realizado por Boppana et al.(2005). Este grupo de investigadores determinou a carga viral de HCMV existente na urina de crianças com infecção congénita sintomática e assintomática, correlacionando-a com a perda auditiva. Conseguiram detectar uma carga viral média de 94 500 pfu/mL para o grupo de infecção congénita assintomática e uma carga viral média de 435 000 pfu/mL para o grupo de infecção congénita sintomática. Apesar de as unidades dos resultados deste trabalho serem diferentes das por nós usadas e das usadas no trabalho anteriormente referido, os resultados nunca serão menores do que em cópias por mL. As unidades pfu (plaque forming unit) dizem respeito à quantidade de vírus capaz de formar uma “placa” em cultura celular, e considerando que cada vírus viável forma uma placa e que cada vírus tem uma cópia de DNA, o numero de cópias por mL na amostra será sempre pelo menos igual ao numero de pfu, devendo sempre ser maior, porque os vírus que perderam a sua capacidade infecciosa não são quantificáveis por cultura celular (pfu/mL), sendo quantificáveis por PCR.

4.2. Sensibilidade da Técnica

Depois de divididas as urinas em positivas e negativas e de determinada a carga viral das positivas, procedeu-se à determinação da sensibilidade analítica da técnica de nested PCR quando usada para a pesquisa do DNA do HCMV em papeis de filtro impregnados com a urina de recém nascidos.

Para isso foi usada uma das urinas do estudo com uma carga viral elevada (urina 18) e uma urina de uma criança com infecção congénita, mas colhida quando a criança já tinha um ano de vida, apresentando já uma carga viral mais baixa (26 000 cópias / mL).

Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3 – Registo das cargas virais das urinas e suas respectivas diluições

Amostras	Carga viral inicial (cópias/mL)	Diluições efectuadas			
		1:10 (cópias/mL)	1:100 (cópias/mL)	1:1000 (cópias/mL)	1:10000 (cópias/mL)
Urina 18	15 000 000	1 500 000	150 000	15 000	1 500
	Detectou	Detectou	Detectou	Não detectou	Não detectou
Urina de criança com infecção congénita	26 000	2 600	260	26	2
	Não detectou	Não detectou	Não detectou	Não detectou	Não detectou

Assim, dos resultados anteriores pode-se concluir que a técnica detecta consistentemente urinas com 150 000 cópias por mL, não detectando urinas com concentração de 26 000 cópias.

4.3. Comparação do método de nested PCR aplicado em urinas colhidas em papel de filtro com o método de referência

Quando comparada a pesquisa do DNA do HCMV por nested PCR em urinas aplicadas em papel de filtro com o método de referência, os resultados estão indicados na tabela 4.

Tabela 4 – Comparação dos resultados obtidos pelo método de referência e pelo método de nested PCR em urinas aplicadas em papel de filtro

		Nested PCR	
		Positivos	Negativos
Cultura celular	Positivos	18	0
	Negativos	0	100

Pela observação da tabela podemos verificar que os resultados obtidos através do método de nested PCR estão totalmente de acordo com os resultados obtidos pelo método de referência (cultura celular). Todas as amostras de urina com resultado

positivo pelo método de referência, foram também positivas pelo método de nested PCR, o mesmo acontecendo com todas as amostras negativas. Deste modo, verifica-se que o método de nested PCR em urinas aplicadas em papel de filtro apresenta uma boa sensibilidade e especificidade em comparação com o método de cultura celular.

Os resultados para todas as amostras de urina positivas, analisadas pelo método de referência e pelo método de nested PCR quando aplicadas em papel de filtro, estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5– Registo de resultados obtidos pelo método de referência e pelo método de nested PCR em urinas aplicadas em papel de filtro

Urinas	Resultados		Cargas virais (cópias/mL)
	Método de referência	Método de nested PCR em urinas aplicadas em papel de filtro	
1	Positiva	Positiva	103 450
2	Positiva	Positiva	35 000
3	Positiva	Positiva	209 231
4	Positiva	Positiva	>3 570 000
5	Positiva	Positiva	>3 570 000
6	Positiva	Positiva	>3 570 000
7	Positiva	Positiva	277 250
8	Positiva	Positiva	125 000
9	Positiva	Positiva	2 145 560
10	Positiva	Positiva	2 171 927
11	Positiva	Positiva	>3 570 000
12	Positiva	Positiva	>3 570 000
13	Positiva	Positiva	171 478
14	Positiva	Positiva	471 013
15	Positiva	Positiva	>3 570 000
16	Positiva	Positiva	>3 570 000
17	Positiva	Positiva	>3 570 000
18	Positiva	Positiva	>3 570 000

Pela observação da tabela podemos verificar que nas urinas aplicadas em papel de filtro e testadas pela técnica de nested PCR conseguiu-se detectar urinas com uma carga viral de 35 000 cópias / mL.

Todas as urinas positivas testadas pelo método de nested PCR em urinas aplicadas em papel de filtro, apresentaram valores superiores a 150 000 cópias/mL, com excepção das amostras nº 2 e nº 8, que apresentaram um valor de cópias entre as 26 000 e as 150 000 cópias. Estes resultados estão de acordo com os resultados da determinação da sensibilidade analítica da técnica de nested PCR em urinas aplicadas em papel de filtro em que se verificou que a técnica já não conseguiu detectar concentrações de 26 000 cópias por mL

Assim, com a técnica de nested PCR em urinas aplicadas em papel de filtro, conseguiu-se detectar concentrações de pelo menos 35 000 cópias por mL.

Como se verificou uma correlação total dos resultados, para verificar a exequibilidade das colheitas, testou-se um total de 155 urinas colhidas em papel de filtro colocado directamente nas fraldas dos recém-nascidos. Como se pode observar na tabela 6, de todas as urinas testadas não foi possível confirmar a detecção de nenhum positivo uma vez que não se obteve nenhum, no entanto não se detectou nenhum falso positivo.

Tabela 6 – Registo dos resultados obtidos pelo método de referência e pelo método de nested PCR aplicado a urinas colhidas em papel de filtro

Amostras	Resultados	
	Método de cultura celular	Método de nested PCR em urinas colhidas em papel de filtro
Positivas	0	0
Negativas	155	155

A totalidade dos resultados obtidos pelo método de referência e pelo método de nested PCR em urinas colhidas em papel de filtro pode observar-se na tabela 7.

Tabela 7 – Registo dos resultados obtidos pelo método de referência e pela técnica de nested PCR em urinas aplicadas/colhidas em papel de filtro, e respectiva sensibilidade e especificidade da técnica de PCR

Amostras	Resultados			Sensibilidade da nested PCR	Especificidade da nested PCR
	Método de cultura celular	Método de nested PCR em urinas aplicadas em papel de filtro	Método de nested PCR em urinas colhidas em papel de filtro		
Positivas	18	18	0	100 %	100 %
Negativas	255	100	155		

Assim, o método de nested PCR testado em urinas aplicadas/colhidas em papel de filtro apresenta uma sensibilidade e especificidade de 100% para o diagnóstico de infecção congénita nas primeiras três semanas de vida, em comparação com o método de referência.

O método de cultura celular em “shell vials” para além de ser moroso e dispendioso, pode ser facilmente dificultado por factores como a inviabilidade das células ou como a perda de infectividade das amostras, que podem reduzir significativamente a sensibilidade do teste, o que requer que a amostra seja colhida em sacos esterilizados e que seja devidamente refrigerada. Estas limitações do método, complicam o seu uso e dificultam a sua aplicabilidade a um grande número de amostras.

Já o método de nested PCR aplicado a urinas colhidas em papel de filtro facilita a colheita de urina através da colocação do papel de filtro directamente em contacto com os genitais do recém-nascido, assim como o seu transporte e armazenamento à temperatura ambiente sem riscos de perda de infectividade.

Das amostras positivas foram ainda testadas 10 urinas 6 meses após a sua aplicação no papel de filtro, tendo-se mantido a sua positividade. Deste modo, os cartões podem ser guardados pelo menos durante 6 meses, permitindo estudar as amostras retrospectivamente.

Os resultados obtidos neste estudo também estão concordantes com os resultados obtidos por Yamamoto et al. (2001) relativamente à sensibilidade e especificidade da técnica de nested PCR aplicada a amostras de urinas colhidas em papel de filtro. Estes autores realizaram um estudo no qual obtiveram uma sensibilidade e especificidade de 100 % para o método de nested PCR aplicado em urinas colhidas em papel de filtro. No entanto, este grupo de investigadores apenas conseguiu testar 4 urinas positivas, enquanto no presente estudo foi possível testar 18 urinas positivas.

A técnica de nested PCR tem sido também utilizada por muitos grupos de investigadores em amostras de sangue colhidas em guthrie cards no diagnóstico de infecção congénita por HCMV.

Alguns estudos com guthrie cards também têm sido utilizados em indivíduos com perda auditiva neurossensorial ou com outros problemas neurológicos como objectivo de determinar a percentagem de casos atribuídos à infecção congénita por HCMV.

Barbi et al.(2000), utilizaram o método de nested PCR para testar guthrie cards em crianças com perda auditiva neurossensorial, no qual 20 a 30% dos casos foram atribuídos a infecção congénita por HCMV. Neste estudo o método apresentou uma especificidade de 99%, e uma sensibilidade de 100% comparado com o método de referência. Os autores Paixão et al. (2009) usaram também o método de nested PCR em sangue colhido em guthrie cards, no qual obtiveram uma sensibilidade e especificidade de 93% e 100 %, respectivamente.

Em comparação com os estudos anteriormente descritos, os cartões da urina apresentam vantagens relativamente aos guthrie cards, uma vez que a carga viral na urina (4.2×10^5 cópias por mL) é maior que a carga viral no sangue (2.3×10^3 cópias por mL) (Halwachs-Baumanna et al., 2002), e a sensibilidade e especificidade da técnica de nested PCR na pesquisa de HCMV nos cartões de urina é melhor do que qualquer estudo realizado em guthrie cards.

Assim, os cartões com urina, poderiam ser usados não só para o diagnóstico de infecção congénita por HCMV à nascença mas também em programas de screening, à semelhança do que é proposto para os Guthrie cards, e para distinguir infecção congénita de infecção peri-natal a partir da 3^a semana de vida do recém-nascido.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, a detecção de DNA viral do citomegalovirus em urina colhida em papel de filtro até às três primeiras semanas de vida pode ser um bom método de diagnóstico de infecção congénita por HCMV nos recém-nascidos.

Os resultados obtidos demonstram que o método de nested PCR aplicado a urinas colhidas em papel de filtro pode ser uma alternativa ao método de cultura celular. Embora não tenha sido possível confirmar nenhum resultado positivo, nas urinas colhidas em papel de filtro colocado directamente na fralda dos recém-nascidos, uma vez que não houve nenhum, também não se detectou nenhum falso positivo. Além disso, o método de nested PCR aplicado a urinas colhidas em papel de filtro apresentou uma sensibilidade e especificidade de 100 % em comparação com o método de referência.

O método de nested PCR apresenta ainda outras vantagens, relativamente ao método de referência, no que se refere à colheita, transporte e armazenamento das amostras, o qual poderá ser efectuado à temperatura ambiente sem que haja perda de infectividade das amostras.

O método de nested PCR aplicado a urinas colhidas em papel de filtro durante as três primeiras semanas de vida do recém-nascido também apresenta vantagens em relação aos Guthrie cards. Assim, este método pode ser uma opção para o diagnóstico retrospectivo de infecção congénita por HCMV, para estudos epidemiológicos e screening neonatal, e também para distinguir infecção congénita de infecção perinatal por HCMV após as três semanas de vida do recém-nascido.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Realizado este trabalho, sugerem-se as seguintes perspectivas futuras:

- Aplicar o método a um maior número de urinas colhidas em papel de filtro, colocado directamente nas fraldas dos recém-nascidos

- Testar o método em amostras de urina colhidas em papel de filtro um ou mais anos após a sua recolha, de modo a verificar a sua viabilidade após esse tempo

7. BIBLIOGRAFIA

📖 Adler, S.P.(1991). *Cytomegalovirus and child day care: Risk factors for maternal infection*. *Pediatr Infect Dis J* **10**, 590

📖 Adler, S.P.(1985). *The molecular epidemiology of cytomegalovirus transmission among children attending a day care center*. *J Infect Dis* **152**, 760-768

📖 Adler, S.P.; Starr, S.E.; Plotkin, S.A.; Hempfling, S.H.; Buis, J.; Manning, M.L. et al. (1995). *Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age*. *J Infect Dis* **171**, 26–32.

📖 Alford, A.A; Stagno, S.; Pass, R.F. et al. (1990). *Congenital and perinatal cytomegalovirus infection*. *Rev Inf Dis* **12**, 745-751

📖 Baldanti, F.; Revello, M.G.; Percivalle, E.; Gerna, G. (1998). *Use of the human cytomegalovirus (HCMV) antigenemia assay for diagnosis and monitoring of HCMV infections and detection of antiviral drug resistance in the immunocompromised*. *Journal of Clinical Virology* **11**, 51–60

📖 Bale, J.F.; Zimmerman, B.; Dawson, J.D.; Souza, I.E.; Petheram, S.J.; Murph, J.R. (1999). *Cytomegalovirus transmission in child care homes*. *Arch Pediatr Adolesc Med* **153**, 75-9.

📖 Barbi, M.; Binda, S.; Caroppo, S.; Ambrosetti, U.; Corbetta, C.; Sergi, P.(2003). *A wider role for congenital cytomegalovirus infection in sensorineural hearing loss*. *Pediatr Infect Dis J* **22**, 39–42

📖 Barbi, M.; Binda, S.; Primache, V.; Caroppo, S.; Dido, P.; Guidotti, P.; et al. (2000). *Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital CMV infection*. *J Clin Virol* **17**, 159-65

- 📖 Boeckh, M.; Boivin, G. (1998). *Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications*. Clin Microbiol Rev **11**, 533-554.
- 📖 Boppana, S.B.; Fowler, K.B.; Pass, R.F.; Rivera, L.B.; Bradford, R.D.; Lakeman, F.D.; Britt, W.J. (2005). *Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss*. J. Pediatr. **146**, 817-823
- 📖 Bowden, R.A.; Slichter, S.J.; Sayers, M.H. et al.(1991). *Use of leukocyte-depleted platelets and cytomegalovirus-seronegative red blood cells for prevention of primary cytomegalovirus infection after marrow transplant*. Blood **78**, 246-250
- 📖 Burny, W.; Liesnard, C.; Donner, C.; Marchant, A. (2004). *Epidemiology, pathogenesis and prevention of congenital cytomegalovirus infection*. Expert Rev Anti Infect Ther **2**, 881-894.
- 📖 Chou, S. (1990). *New methods for diagnosis of cytomegalovirus infection*. Rev Infect Dis **12** (Suppl 7), 727-736.
- 📖 Crumpacker, C.S. (1996). *Ganciclovir*. N Eng J Med **335**, 721-9.
- 📖 Dahle, A. J.; Fowler, K.B.; Wright, J.D.; Boppana, S.B.; Britt, W.J.; Pass, R.F. (2000). *Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus*. J. Am. Acad. Audiol. **11**, 283–290.
- 📖 Daiminger, A.; Schalasta, G.; Betzl, D.; Enders, G. (1994). *Detection of human cytomegalovirus in urine samples by cell culture, early antigen assay and polymerase chain reaction*. Infection **22**, 24-28.
- 📖 Daniel, Y.; Gull, I.; Peyser, M.R.; Lessing, J.B. (1995). *Congenital cytomegalovirus infection*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology **63**, 7-16.

Demmler, G.J. (1991). *Infectious Diseases Society of America and Centers for Disease Control. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease*. Rev Infect Dis **13**, 315–329

Distefano, A.L.; Alonso, A.; Martin, F.; Pardon, F. (2004). *Human cytomegalovirus: detection of congenital and perinatal infection in Argentina*. BMC Pediatr **4**, 11

Dobbins, J.G.; Adler, S.P.; Pass, R.F.; Bale, J.F.; Grillner, L.; Stewart, J.A. (1994). *The risks and benefits of cytomegalovirus transmission in child day care*. Pediatrics **94**, 1016-8.

Donner, C.; Liesnard, C.; Brancart, F.; et al. (1994). *Accuracy of amniotic fluid testing before 21 weeks' gestations in prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection*. Prenat Diagn **14**, 1055-1059

Faqi, A.S.; Klug, A.; Merker, H.J.; Chahoud, I. (1997). *Ganciclovir induces reproductive hazards in male rats after short term exposure*. Hum Exp Toxic **16**, 505-11.

Fowler, K.B.; Pass, R.F.(1991). *Sexually transmitted diseases in mothers of neonates with congenital cytomegalovirus infection*. J Infect Dis **164**, 259-264.

Fowler, K.B.; Stagno, S.; Pass, R.F. (2004). *Interval between births and risk of congenital cytomegalovirus infection*. Clin Infect Dis **38**, 1035–7.

Gandhi, M.K.; Khanna, R. (2004). *Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments*. Lancet Infect Dis **4**, 725–38.

Gaytant, M.A.; Steegers, E.A.; Semmekrot, B.A.; Merkus, H.M.; Galama, J.M. (2002). *Congenital cytomegalovirus infections: review of the epidemiology and outcome*. Obstet Gynecol Surv **57**, 245–56.

Gentile, G.; Picardi, A.; Capobianchi, A.; Spagnoli, A.; Cudillo, L.; Dentamaro, T.; Tendas, A.; Cupelli, L.; Ciotti, M.; Volpi, A.; Amadori, S.; Martino, P.; Fabritiis, P. (2006). *A prospective study comparing quantitative Cytomegalovirus (CMV)*

polymerase chain reaction in plasma and pp65 antigenemia assay in monitoring patients after allogeneic stem cell transplantation. BMC Infectious Diseases, 6, 167

📖 Gerna,G.; Baldanti, F.; Revello, M.G., (2004).*Pathogenesis of Human Cytomegalovirus Infection and Cellular Targets. Human Immunology 65, 381-386*

📖 Gerna, G.; Furione, M.; Baldanti, F.; Percivalle, E.; Comoli, P.; Locatelli, F. (1995). *Quantitation of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients. Br J Haematol 91, 674-683.*

📖 Gerna, G.; Revello, M.G.; Percivalle, E.; Morina, F. (1992). *Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia. J Clin Microbiol 30, 1232-1237.*

📖 Gleaves, C.; Smith, T.; Shuster, E.; Pearson, G. (1985). *Comparison of Standard Tube and Shell Vial Cell Culture Techniques for the Detection of Cytomegalovirus in Clinical Specimens. J Clin Microbiol 21, 217-221.*

📖 Grangeot-Keros, L.; Cointe, D. (2001). *Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection. J Clin Virol. 21, 213-221.*

📖 Grangeot-Keros, L.; Mayaux, M. J.; Lebon, P.; Freymuth, F.; Eugene, G.; Stricker, R.; Dussaix, E. (1997). *Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. J. Infect. Dis. 175, 944–946.*

📖 Gregory, H.; Taylor, M.D. (2003). *Cytomegalovirus. American Family Physician 67, 519-524*

📖 Halwachs-Baumanna, G.; Gensera, B.; Pailera, S.; Engeleb, H.; Roseggerb, H.; Schalkc, A.; Kesslerd, H.; Truschnig-Wildersa, M. (2002) *Human cytomegalovirus load in various body fluids of congenitally infected newborns Journal of Clinical Virology 25, 81-87*

- 📖 Hassan, J. and Connell, J. (2007). *Translational Mini-Review Series on Infectious Disease: Congenital cytomegalovirus infection: 50 years on*. *Clinical and Experimental Immunology* **149**, 205–210.
- 📖 Hoover, D.R.; Saah, A.J.; Bacellar, H.; Phair, J.; Detels, R.; Anderson, R. et al. (1993). *Clinical manifestations of AIDS in the era of *Pneumocystis* prophylaxis*. *N Engl J Med* **329**, 1922-6.
- 📖 Jacobson, M.A.; Mills, J. (1988). *Serious cytomegalovirus disease in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)*. *Ann Intern Med* **108**, 585-594
- 📖 Johansson, P.J.H.; Jonsson, M.; Ahlfors, K.; et al. (1997). *Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection performed by polymerase chain reaction in blood stored on filter paper*. *Scand J Infect Dis* **29**, 465-468
- 📖 Jones, C.A. (2003). *Congenital Cytomegalovirus Infection*. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* **33**, 65-93
- 📖 Kearns, A.M.; Turner, A.J.; Eltringham, G.J.; et al. (2002). *Rapid detection and quantification of CMV DNA in urine using Light Cycler-based real-time PCR*. *J Clin Virol* **24**, 131-4
- 📖 Kimberlin, D.W.; Lin, C.Y.; Sanchez, P.J.; Demmler, G.J.; Dankner, W.; Shelton, M.; et al. (2003). *Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial*. *J Pediatr* **143**, 16–25
- 📖 Lazzarotto, T.; Guerra, B.; Lanari, M.; Gabrielli, L.; Landini, M. P. (2008). *New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection*. *Journal of Clinical Virology* **41**, 192–197
- 📖 Lazzarotto, T.; Varani, S.; Gabrielli, L.; Spezzacatena, P.; Landini, M.P. (1999). *New Advances in the Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection*. *Intervirology* **42**, 390–397

- 📖 Malinger, G.; Lev, D.; Zahalka, N.; Ben Aroia, Z.; Watemberg, N.; Kidron, D. et al. (2003). *Fetal cytomegalovirus infection of the brain: the spectrum of sonographic findings*. *Am J Neuroradiol* **24**, 28-32
- 📖 Mandell, G.L.; Douglas, R.G.; Bennett, J.E. (2000). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone
- 📖 Michaels, M.G.; Greenbergs, D.P.; Sabo, D.L.; Wald, E.R. (2003). *Treatment of children with congenital cytomegalovirus infection with ganciclovir*. *Pediatr Infect Dis J* **22**, 504–9
- 📖 Moienafshari, R.; Bar-Oz, B.; Ford-Jones, L.; Koren, G. (1998). *How long should someone wait after CMV infection to start pregnancy?* *Can Fam Physician* **44**, 2381–2
- 📖 Mori, T.; Okamoto, S.; Matsuoka, S.; Yajima, T.; Wakui, M.; Watanabe, R.; Ishida, A.; Iwao, Y.; Mukai, M.; Hibi, T.; Ikeda, Y. (2000). *Risk-adapted pre-emptive therapy for cytomegalovirus disease in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation*. *Bone Marrow Transplant* **25**, 765-769.
- 📖 Mulongo, K.N.; Lamy, M.E.; Van Lierde, M. (1995). *Requirements for diagnosis of prenatal cytomegalovirus infection by amniotic fluid culture*. *Clin Diagn Virol* **4**, 231-238
- 📖 Munro, S.C.; Hall, B.; Whybin, L.R.; Leader, L.; Robertson, P.; Maine, G.T.; Rawlinson, W.D. (2005). *Diagnosis of and Screening for Cytomegalovirus Infection in Pregnant Women*. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 4713–4718
- 📖 Nagy, A.; Tálosi, G.; Streitman, K.; Pintér, S.; Endreffy, E. (2005). *Quantitative cytomegalovirus load in urine and clinical outcome in neonates*. *Journal of Clinical Virology* **32**, 340–341

- 📖 Nigro G, Adler SP, La Torre T, Best AM. (2005). *Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection*. N Engl J Med **353**, 1350-62
- 📖 Ornoy, A. (2002). *The effects of cytomegalovirus (CMV) infection during pregnancy on the developing human fetus*. Harefuah **141**, 565–77
- 📖 Paixão, P.; Almeida, S.; Gouveia, P.; Vilarinho, L.; Osório, R.V. (2009). *Prevalence of human cytomegalovirus congenital infection in Portuguese newborns*. Eurosurveillance **14**, 9
- 📖 Pass, R.F. (2002). *Cytomegalovirus infection*. Pediatr Rev **23**, 13-169
- 📖 Pass, R.F. (2001). Cytomegalovirus, in Knipe DM, Howley PM (eds): *Fields Virology* (ed 4). Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins, pp2675-2705
- 📖 Pass, R. F.; Britt, W.J.; Stagno, S. (1995). *Cytomegalovirus, in Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET (eds): Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections* (ed 5). Washington, DC, American Public Health Association 253-271
- 📖 Pass, R.F.; Burke, R.L. (2002). *Development of cytomegalovirus vaccines: prospects for prevention of congenital CMV infection*. Semin Pediatr Infect Dis **13**, 196–204
- 📖 Pass, R.F.; Fowler, K.B.; Boppano, S. (1991). Progress in cytomegalovirus research. *Proceedings of the Third International Cytomegalovirus Workshop*. Edited by Landini MP. London, Excerpta Medica pp 3–10
- 📖 Pass, R.F.; Hutto, C. (1986). *Group day care and cytomegaloviral infections of mothers and children*. Rev Infect Dis **8**, 599
- 📖 Rawlinson, W.D. (1999). *Number 50: Diagnosis of human cytomegalovirus infection and disease*. Pathology **31**, 109-15

- 📖 Revello, M.G.; Gerna, G. (2002). *Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant*. Clin. Microbiol. Rev. **15**, 680–715
- 📖 Revello, M.G.; Percivalle, E.; Arbustini, E.; Pardi, R.; Sozzani, S.; Gerna, G., (1998). *In Vitro Generation of Human Cytomegalovirus pp65 Antigenemia, Viremia, and LeukoDNAemia*. J. Clin. Invest. **101**, 2686–2692
- 📖 Revello, M.G.; Zavattoni, M.; Baldanti, F.; Sarasini, A.; Paolucci, S.; Gerna, G. (1999). *Diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody in blood of congenitally infected newborns*. J Clin Virol **14**, 57-66
- 📖 Revello, M.G.; Zavattoni, M.; Furione, M.; Baldantini, F.; Gerna, G. (1999). *Quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid of mothers of congenitally infected fetuses*. J Clin Microbiol **37**, 3350-2
- 📖 Ross, S.A.; Boppana, S.B. (2004). *Congenital Cytomegalovirus Infection: Outcome and Diagnosis*. Semin Pediatr Infect Dis **16**, 44-49
- 📖 Scanga, L.; Chaing, S.; Powell, C.; Aylsworth, A.S.; Harrell, L.J.; Henshaw, G.N.; et al. (2006). *Diagnosis of Human Congenital Cytomegalovirus Infection by Amplification of Viral DNA from Dried Blood Spots on Perinatal Cards*. JMD **8**, No. 2
- 📖 Schleiss, M.R., (2007). *Prospects for Development and Potential Impact of a Vaccine Against Congenital Cytomegalovirus (CMV) Infection*. J Pediatr **151**, 564-70
- 📖 Schlesinger, Y.; Halle, D.; Eidelman, A.I.; Reich, D.; Dayan, D.; Rudensky, B.; Raveh, D.; Branski, D.; Kaplan, M.; Shefer, V.; Miron, D. (2003). *Urine polymerase chain reaction as a screening tool for the detection of congenital cytomegalovirus infection*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **88**, 371-374
- 📖 Senok, A.B.; Giacometti, L.; Botta, G.B. (2006). *Human Cytomegalovirus Infections in Pregnancy and the Newborn: Epidemiology, Laboratory Diagnosis and Medico-legal Aspects*. Kuwait Medical Journal **38** (2), 85-93

📖 Stagno, S. (1995). Cytomegalovirus, in Remington JS, Klein JO (eds): Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant (ed 5). Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp 389-424

📖 Stagno, S.; Pass, R.F.; Cloud, G.; Britt, W.J.; Henderson, R.E.; Walton, P.D.; Veren, D.A.; Page, F.; Alford, C.A. (1986). *Primary cytomegalovirus infection in pregnancy: incidence, transmission to fetus, and clinical outcome*. JAMA **256**, 1904–1908.

📖 Trincado, D.E.; Rawlinson, W.D. (2001). *Congenital and perinatal infections with cytomegalovirus*. J Paediatr Child Health **37**, 187-192.

📖 Tsai, C.H.; Tsai, F.J.; Shih, Y.T.; et al. (1996). *Detection of congenital cytomegalovirus infection in Chinese newborn infants using polymerase chain reaction*. Acta Paediatr. **85**, 1241-1243.

📖 Vinogradskaya, G.R.; Goryshin, I.Yu.; Berlin, Yu.A.; Lanzov, V.A. (1995). *Optimization of PCR-based diagnostics for human cytomegalovirus*. Journal of Virologicd Methods **53**, 103-112

📖 Walmus, B.F.; Yow, M.D.; Leter, J.W. et al. (1988). *Factors predictive of cytomegalovirus immune status in pregnant women*. J Infect Dis **157**, 172 177.

📖 Weller, T.H. (1970). *Cytomegaloviruses: the difficult years*. J Infect Dis **122**, 532-539

📖 Whitley, R.J.; Cloud, G.; Gruber, W.; Storch, G.A.; Demmler, G.J.; Jacobs, R.F.; et al. (1997). *Ganciclovir for the treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of a phase II study*. J Infect Dis **175**, 1080-6

📖 Winston, D.J.; Ho, W.G.; Champlin, R.E. (1990). *Cytomegalovirus infections after bone marrow transplantation*. Rev Infect Dis **12**, S776-S792

📖 Yamamoto, A.Y.; Mussi-Pinhata, M.M.; Pinto, P.C. ; et al. (2001). *Usefulness of blood and urine samples collected on filter paper in detecting cytomegalovirus by the polymerase chain reaction technique*. J Virol Methods **97**, 159-64.

📖 Zucca, C.; Binda, S.; Borgatti, R.; Triulzi, F.; Radice, L.; Butte, C.; Barkhaus, P.E.; Barbi, M. (2003). *Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection and cortical maldevelopment*. Neurology **61**, 710–712