



Infecção congénita pelo Citomegalovírus – avaliação de um novo método de rastreio

Sofia Almeida¹, Paula Gouveia¹, Arminda Jorge², António Mendes³, Célia Duarte⁴, Nélia Faria⁵, Paulo Paixão⁶

1. Serviço de Patologia Clínica, Centro Hospitalar Cova da Beira, Covilhã
2. Serviço de Pediatria, Centro Hospitalar Cova da Beira, Covilhã
3. Serviço de Pediatria, Hospital Sousa Martins, Guarda
4. Serviço de Obstetrícia, Centro Hospitalar Cova da Beira, Covilhã
5. Serviço de Obstetrícia, Hospital Sousa Martins, Guarda
6. Departamento de Microbiologia, CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

Resumo

Introdução: O vírus citomegálico humano é considerado o primeiro agente de infecção congénita nos países desenvolvidos, afectando cerca de 0,2 a 2% de todos os recém-nascidos. Das crianças infectadas, 12,7% são sintomáticas ao nascimento e 13,5% das assintomáticas irão desenvolver sequelas durante os primeiros anos de vida, de acordo com uma meta-análise recente.

Objectivo: estudo da aplicação de um método que recorre à utilização de *pools* de amostras de urina para o rastreio desta infecção congénita.

Material e Métodos: Foram estudadas 800 urinas de recém-nascidos. As urinas foram testadas pelo método de referência e foram posteriormente divididas em *pools* de 20 urinas e testadas por uma técnica de *nested*-PCR, segundo um algoritmo estabelecido.

Resultados: Das 800 urinas testadas, três foram positivas pelo método de referência. Quando testadas usando o método proposto, três das 40 *pools* testadas apresentaram um resultado positivo, correspondendo às três amostras positivas pelo método de referência

Discussão: verificou-se uma concordância total entre o método de referência e o método das *pools* aqui descrito. Esta metodologia das *pools*, ao permitir uma redução bastante significativa, quer nos tempos de execução quer nos custos em reagentes, abre a possibilidade efectiva de utilizar esta técnica para o rastreio da infecção congénita por CMV nos recém-nascidos.

Palavras chave: Vírus citomegálico humano, infecção congénita, rastreio, urina, *pools*

Acta Pediatr Port 2011;42(5):205-8

Human Cytomegalovirus Congenital Infection – evaluation of a new screening method

Abstract

Background: Human cytomegalovirus (CMV) is the most frequent cause of congenital infection, occurring in 0.2 to 2% of all live births in developed countries. From all infected babies, 12,7% are symptomatic at birth, and 13,5% will suffer late sequelae in the first years of life, according with a recent meta-analysis.

Aim: evaluation of a urine pool method for the screening of this infection.

Material and Methods: Urine samples from 800 newborns were tested individually by the reference method, and after that divided in 20 urine pools that were tested by nested PCR, according to a pre-defined algorithm.

Results: Three urine samples tested positive by the reference method. When tested by the pool method, three out of the 40 pools the tested positive, corresponding to the three positive samples.

Discussion: The results of the pool method achieved a complete agreement with the reference method, but with substantial cost and labour reduction. This opens the possibility of using this procedure as a real screening method for CMV congenital infection.

Key words: Human cytomegalovirus, Congenital infection, prevalence, screening, urine, pools

Acta Pediatr Port 2011;42(5):205-8

Introdução

Da história da saúde pública do século XX fazem parte várias histórias de sucesso no campo da prevenção de malformações

Recebido: 18.02.2010

Aceite: 11.10.2011

Correspondência:

Sofia Isabel Aguiar Almeida
Serviço de Patologia Clínica - Laboratório de Virologia
Centro Hospitalar Cova da Beira
Quinta do Alvito
6200 – Covilhã
salmeida@fcsaude.ubi.pt

congénitas e da mortalidade infantil. De facto, a vacinação contra o vírus da rubéola praticamente eliminou o síndrome da rubéola congénita, a educação das mães no que diz respeito ao consumo de álcool durante a gravidez permitiu reduzir o síndrome fetal alcoólico e o consumo de suplementos vitamínicos, nomeadamente de ácido fólico, permitiu diminuir a incidência de casos de defeitos do tubo neural. No entanto, notavelmente ausente desta lista de sucessos, está a prevenção da infecção congénita pelo vírus citomegálico humano (CMV)¹.

Actualmente o CMV é considerado o primeiro agente de infecção congénita nos países desenvolvidos, afectando cerca de 0,2 a 2% de todos os recém-nascidos². Das crianças infectadas durante a gestação por este vírus, de acordo com uma meta-análise recente, cerca de 12,7%³ serão sintomáticas ao nascimento, com sinais e sintomas que podem incluir o baixo peso para a idade gestacional, microcefalia, calcificações intracranianas, esplenomegalia e/ou hepatomegalia, icterícia, petéquias, anemia hemolítica, pneumonia, coriorretinite diminuição da acuidade auditiva, entre outras^{4,5}. Das restantes, assintomáticas ao nascimento, 13,7% poderão desenvolver sequelas importantes durante os primeiros anos de vida, como alterações no desenvolvimento psico-motor e surdez³.

De todos os meios para tentar minorar a situação actual, o desenvolvimento de uma vacina eficaz é considerado por alguns como o mais promissor. No entanto, apesar dos esforços e progressos feitos nos últimos 30 anos, a falta de interesse manifestada pela indústria farmacêutica e vários desafios ao nível técnico, fazem com que a data do seu aparecimento seja por enquanto incerta⁶. Enquanto essa data não surge e tendo em consideração que a principal via de transmissão deste vírus às grávidas é o contacto directo com crianças, especialmente os seus próprios filhos⁷, tem sido proposto que o aconselhamento de medidas de higiene simples, como lavar as mãos após contacto com urina ou saliva de crianças ou evitar dar beijos na região da boca das crianças, pode diminuir a transmissão do vírus às mães e consequentemente baixar a prevalência desta infecção congénita⁸.

Têm sido efectuados alguns esforços nos últimos anos, na tentativa de diminuir a percentagem de crianças com sequelas devidas à infecção pelo CMV, melhorando assim a qualidade de vida destas crianças. Dentro das várias propostas, contam-se as terapêuticas com compostos antivíricos, nomeadamente com o ganciclovir ou o seu derivado, o valganciclovir, em crianças seriamente afectadas^{9,10}, e medidas de suporte não farmacológico, como a intervenção precoce com estimulação neuro-sensorial, a terapia da fala e a educação especial para as crianças com sequelas, dado que existem evidências de que o diagnóstico precoce e o estabelecimento destas medidas poderão melhorar a sua qualidade de vida^{11,12}. Dado que, como referido anteriormente, a maioria irá nascer sem sintomas, só um programa de rastreio virológico à nascença poderá detectar estas crianças.

Em 2005 foi proposto um novo método de rastreio, que se baseia na adaptação de um princípio utilizado em alguns bancos de sangue¹³, e que consiste na detecção do ácido desoxirribonucleico (ADN) do CMV por uma técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR) em *pools* de amostras de urina de recém nascidos. Este princípio das *pools* permite reduzir significativamente custos e tempos de execução e pode ser aplicado ao diagnóstico da

infecção congénita por CMV. Os resultados preliminares deste trabalho foram já anteriormente publicados¹⁴, mas este método ainda não foi, até agora, aplicado a uma situação real de rastreio.

Assim, o objectivo do presente estudo visa a comparação do método das *pools* de urina com o método de referência, numa população de recém-nascidos aos quais se efectuou o rastreio da infecção congénita citomegálica.

Material e Métodos

População

A participação no presente estudo foi proposta a todas as puérperas de dois Hospitais da Beira Interior (Hospital Pêro da Covilhã e Hospital Sousa Martins), entre Janeiro de 2007 e Dezembro de 2008. Estes dois Hospitais registam anualmente cerca de 1600 partos. Foram incluídos no estudo os 800 recém-nascidos cujas mães aceitaram participar no estudo e a quem foi possível efectuar a colheita durante o período de internamento.

Amostras

A cada recém-nascido foi colhida, na primeira semana de vida, uma amostra de urina, com recurso a um saco colectador pediátrico. As amostras de urina foram enviadas refrigeradas para o laboratório de virologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Pêro da Covilhã (Directora do Serviço: Dra. Conceição Faria), onde foram processadas.

Pesquisa da virúria por cultura celular

As urinas foram testadas por cultura celular (método de referência), pelo método de *shell-vial*, com o recurso a células MRC-5, de acordo com o descrito por Gleaves e colaboradores¹⁵. Resumidamente, cada amostra de urina foi semeada num todo para cultura *shell vial*, com células MRC-5 confluentes, que após centrifugação a 700g durante uma hora foi incubado a 37°C durante 48 horas. Seguidamente, as células foram coradas por imunofluorescência indirecta, usando uma mistura de anticorpos anti CMV I.E.A. + E.A. e, na segunda incubação, um anticorpo secundário conjugado com fluoresceína (Argene 14-004) e observadas no microscópio de epifluorescência para pesquisa da fluorescência nuclear característica.

Pools de amostras de urina

As amostras de urina recebidas foram divididas em *pools* (mistura de amostras) de 20 urinas cada e testadas de acordo com o previamente descrito¹⁴. Resumidamente, as urinas foram divididas em grupos de 20 e cada grupo (*pool*) testado por uma técnica de *nested-PCR* (PCR de amplificação dupla). Se uma *pool* apresentou o resultado da *nested-PCR* negativo, as 20 amostras de urina usadas nessa *pool* foram consideradas como negativas. Uma *pool* com resultado positivo foi dividida em *pools* de cinco amostras cada, que foram novamente testadas pela mesma técnica; nas *pools* com resultados positivos as amostras foram testadas individualmente para determinação de qual ou quais as amostras positiva.

Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelas comissões de ética dos referidos hospitais e apresentado às puérperas, que livremente decidiram a participação dos seus filhos neste estudo. As mães que concordaram assinaram um protocolo de consentimento informado.

Resultados

Pesquisa da virúria por cultura celular

Das 800 urinas testadas, três apresentaram um resultado positivo quando testadas individualmente pelo método de referência.

Pools de amostras de urina:

Das 40 *pools* testadas, apenas três apresentaram um resultado positivo, o que permitiu concluir que todas as urinas usadas para preparar as restantes 37 *pools* eram negativas.

As três *pools* positivas foram divididas em *pools* de cinco urinas cada, estando os resultados obtidos representados no Quadro. Esta metodologia das *pools* permitiu identificar correctamente as três amostras que tinham sido positivas pelo método de referência, sem qualquer resultado falsamente positivo nas restantes 797 amostras.

Quadro - Resultados da PCR (reacção em cadeia da polimerase) das três *pools* Positivas

Pools 20	Pools 5	Urinas individuais				
Pool nº 12	Positivo	12.1	Negativo			
		12.2	Negativo			
	Positivo			12.3.1	Negativo	
				12.3.2	Positivo	
			12.3	Positivo	12.3.3	Negativo
					12.3.4	Negativo
					12.3.5	Negativo
		12.4	Negativo			
	Pool nº20	Positivo		20.1	Negativo	
				20.2	Negativo	
			20.3	Negativo		
Positivo				20.4.1	Negativo	
				20.4.2	Negativo	
			20.4	Positivo	20.4.3	Negativo
					20.4.4	Negativo
			20.4.5	Positivo		
Pool nº27	Positivo		27.1	Negativo		
				27.2.1	Negativo	
	Positivo			27.2.2	Negativo	
			27.2	Positivo	27.2.3	Negativo
					27.2.4	Positivo
					27.2.5	Negativo
			27.3	Negativo		
	27.4	Negativo				

Pools – mistura de amostras

Discussão

A possibilidade de implementação de programas de rastreio neonatal para o CMV tem vindo a adquirir peso na comunidade científica internacional¹⁶, pois só dessa forma será possível detectar todas as crianças que nascem infectadas por este vírus, nomeadamente as cerca de 13,5% que, nascendo assintomáticas, irão desenvolver posteriormente sequelas importantes. O método das *pools* aqui testado já tinha sido anteriormente testado por nós em *pools* simuladas (19 amostras de urina negativas mais uma positiva), tendo correctamente detectado as 17 amostras positivas obtidas de crianças com infecção congénita sintomática e assintomática¹⁴. Tinha igualmente sido anteriormente testado com *pools* de urinas de crianças com suspeita de infecção congénita (sintomáticas ou assintomáticas, estas últimas referenciadas por suspeita de infecção materna durante a gravidez), tendo também neste caso a correspondência com o método de referência sido total, detectando quinze amostras positivas em 180 testadas¹⁴.

No presente estudo, o primeiro realizado numa situação real de rastreio, foi possível detectar por este método as três urinas que tinham sido positivas pelo método de referência, sendo todas as outras, 797 no total, consideradas como negativas. Assim, verificou-se uma concordância total, nas 800 amostras testadas, entre o método das *pools* e o método de referência, apresentando o primeiro uma sensibilidade e uma especificidade de 100% em comparação com o método de referência.

Quando analisado o preço por teste, este método permite reduzir o preço em cerca de 90% (dependendo da prevalência) quando comparado com um teste individual, sendo assim possível fazer o diagnóstico da infecção congénita pelo CMV por um valor aproximado ao de um teste serológico.

Em suma, o método das *pools* revelou neste estudo sensibilidade e especificidade similares ao método de referência, mas tem a possibilidade de reduzir substancialmente o trabalho laboratorial e o preço por teste, abrindo assim a possibilidade da sua utilização no rastreio neo-natal da infecção congénita pelo CMV.

Agradecimentos

À Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde pelo financiamento do estudo – Trabalho premiado pela Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde, Ministério da Saúde, PI nº2/2007.

Aos Enfermeiros dos Serviços de Obstetrícia dos dois Hospitais envolvidos, pela colaboração na recolha das amostras.

Ao Serviço de Patologia Clínica do Hospital Sousa Martins, pela colaboração no armazenamento das amostras.

Referências

1. Cannon MJ, Davies KF. Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC Public Health*. 2005;5:70.
2. Revello MG, Gerna G. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Clin Virol*. 2004;29(2):71-83.

3. Dollard S, Grosse S, Ross D. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* 2007;17:355-63
4. Ross SA, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis. *Semin Pediatr Infect Dis* 2005;16:44-9.
5. Istaş AS, Demmler GJ, Dobbins JG, Stewart JA. Surveillance for congenital cytomegalovirus disease: a report for the National Congenital Cytomegalovirus Disease Registry. *Clin Infect Dis* 1995; 20:665-70.
6. Plotkin SA. Is there a formula for an effective CMV vaccine? *J Clin Virol* 2002; 25:S13 - S21.
7. Fowler KB, Pass RF. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women: exposure to young children and recent onset of sexual activity. *Pediatrics* 2006;118:e286-92
8. Adler SP, Finney JW, Manganello AM, Best AM. Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus among pregnant women. *J Pediatr* 2004; 145:485-91.
9. Kimberlin DW, Lin CY, Sanchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, et al. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J Pediatr* 2003; 143:16-25.
10. Michaels MG, Greenberg DP, Sabo DL, Wald ER. Treatment of children with congenital cytomegalovirus infection with ganciclovir. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:504-509.
11. Fowler KB, McCollister FP, Dahle AJ, Boppana S, Britt WJ, Pass RF. Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 1997; 130:624-30.
12. Guralnick MJ. Effectiveness of early intervention for vulnerable children: a developmental perspective. *Am J Ment Retard* 1998; 102:319-45.
13. Allain JP. Genomic screening for blood-borne viruses in transfusion settings. *Clin Lab Haematol* 2000 Feb;22:1-10.
14. Paixão P, Almeida S, Gouveia P, Binda S, Caroppo S, Barbi M. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in urine pools. *J Virol Methods* 2005;128:1-5.
15. Gleaves C, Smith T, Shuster E, Pearson G. Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985; 21:217-21.
16. Grosse SD, Dollard S, Ross DS, Cannon M. Newborn screening for congenital cytomegalovirus: options for hospital-based and public health programs. *J Clin Virol* 2009; 46 (Suppl 4): S32-S36.