

Catarina Fernandez Serrano

Licenciado em Análises Clínicas e Saúde Pública

Rastreio da Infecção Congénita por HCMV: Estudo Multicêntrico Nacional

Catarina Fernandez Serrano

Licenciado em Análises Clínicas e Saúde Pública

Rastreio de Infecção Congénita por HCMV: Estudo Multicêntrico Nacional

Rastreio da Infecção Congénita por HCMV: Estudo Multicêntrico Nacional

Catarina Fernandez Serrano

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública

Orientador: Paulo Jorge Cruz Paixão, Professor Auxiliar,
NMS|FCM – Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Nova de Lisboa

Coorientador: Maria de Jesus Chasqueira, Professora Auxiliar Convidada,
NMS|FCM – Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente:	Jaime Mota, Professor Auxiliar, FCT-NOVA
Arguente:	Perpétua Gomes, Professora Associada, Instituto Universitário Egas Moniz
Orientador:	Paulo Jorge Cruz Paixão, Professor Auxiliar, NMS FCM

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa
novembro, 2021

Copyright © Catarina Fernandez Serrano, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Elementos bibliográficos resultantes da dissertação:

Artigo publicado:

Fernandez C, Chasqueira MJ, Marques A, Rodrigues L, Marçal M, Tuna M, Braz MC, Neto AS, Mendes C, Lito D, Rocha P, Vasconcellos G, Menezes MF, Sousa MJ, Nunes C, Paixão P. Lower prevalence of congenital cytomegalovirus infection in Portugal: possible impact of COVID-19 lockdown? Eur J Pediatr. 2021 Sep 30:1–4. doi: 10.1007/s00431-021-04271-0.

Dedicatória e Agradecimentos

Ao candidatar-me ao Mestrado em Microbiologia Médica soube que a minha “boa vida” iria ficar suspensa por aproximadamente dois anos, e em parte assim foi. Entrei numa nova jornada académica, com todas as emoções possíveis de presenciar, foram dois anos repletos de desafios, altos, baixos, ganho de conhecimentos, com tristezas e frustração nas vésperas de frequências e entregas de trabalhos, com os triunfos das boas notas na pauta, momentos que nos enchem de orgulho e outros que nem tanto, ganho de amizades, partilha de momentos únicos que não se voltam a repetir, a força, a confiança e o apoio gerado por todos os envolvidos no percurso que termina com esta dissertação. Independentemente do que escreva nesta página, estas palavras nunca expressarão o real sentimento de gratidão aos envolvidos neste percurso, apenas representam um vislumbre do que realmente sinto.

Após o término deste manuscrito a nostalgia começa, recordam-se os primeiros dias em laboratório, passando dos dias em que pouco fazemos aos dias em que a confiança no nosso trabalho é geral. E é neste momento nostálgico que surgem os agradecimentos mais sentidos, agradecimentos estes à equipa do laboratório da NMS|FCM. À Augusta Marques e à Lúcia Rodrigues, inicialmente pela forma calorosa como me acolheram, mas mais que isso, por me mostrarem que tudo é possível, pelas explicações, exigências, críticas e sugestões, por toda a ajuda no trabalho. À Professora Doutora Maria de Jesus Chasqueira, pela sua coorientação neste ano prático, pelos concelhos e sugestões, pelas discussões construtivas sobre o projeto, por me possibilitar os desabafos, pela confiança no meu trabalho, e claro que no final pela pressão saudável para que este documento ficasse pronto a tempo. Ao meu orientador, Professor Doutor Paulo Paixão, pelo seu apoio, atenção e dedicação neste projeto, e acima de tudo por ter proposto este desafio que tornou este ano prático uma agradável aprendizagem. A todos vós a minha gratidão, pela confiança, pela vossa paciência, pelo encorajamento, pelo estímulo intelectual e emocional, e por me terem ajudado a atingir este objetivo, espero ter estado à altura.

Às amigas que não contava ganhar, à Ana Carolina Condez, à Susana Costa e à Alicia Tostão; pelo companheirismo nas noites de estudo e de trabalhos, pela cumplicidade, pelo apoio em todos os momentos que passámos, pelos planos que fazemos, mas nem sempre realizamos, pela festa que fazemos nas conquistas umas das outras, apesar de maioritariamente de forma virtualmente, pelas sugestões e opiniões e por fim pela companhia no regresso a casa.

A todos os envolvidos nas colheitas e envio dos produtos biológicos dos quatro hospitais envolvidos, sem este compromisso nada disto teria sido possível de concretizar.

Aos meus pais pelo carinho, por mais uma vez terem acreditado em mim e nas minhas escolhas pelo incentivo e apoio incondicional, ao meu irmão por continuar a alimentar a eterna rivalidade de quem consegue mais e melhor, e com isso nunca me deixar desistir de atingir os meus objetivos.

Ao meu namorado, pelo apoio e compreensão, em especial nos momentos de ausência, pela força e confiança transmitida, pelo carinho e afeto durante este percurso.

Resumo

O citomegalovirus humano (HCMV) é o principal causador de infeção congénita (IC) a nível mundial, estando a sua prevalência compreendida entre 0,2–2,2%. De todos os recém-nascidos afetados, apenas 10-15% apresentarão sintomatologia à nascença, e 10–15% dos assintomáticos desenvolverão sequelas a longo prazo, tal como a surdez neurossensorial não genética. É assim, perceptível o impacto na saúde pública e individual dos envolvidos, tal como económico.

A implementação de um rastreio universal para a infeção congénita por HCMV tem vindo a ser uma proposta de há vários anos, embora, até aos dias de hoje, ainda não se encontre em vigor, por falta de uma técnica economicamente viável e sustentável. Uma equipa portuguesa tem vindo a desenvolver a metodologia das *pools*, de modo a reduzir os tempos de processamento e custos associados. Este estudo pretende demonstrar a aplicabilidade do rastreio pós-natal através da metodologia das *pools* por PCR em tempo real, rastreando recém-nascidos, entre os 0 e os 15 dias de idade, de 4 hospitais portugueses com elevado número de nascimentos. Para este rastreio foram colhidas amostras de saliva e agrupadas em *pools* de 10, sendo que em caso de a *pool* obter um resultado positivo, as amostras constituintes da mesma foram analisadas individualmente. Nos resultados positivos, foi solicitada a recolha de amostra de uma urina de modo a obter a confirmação do resultado obtido na saliva.

Foram rastreados 3759 recém-nascidos, tendo sido detetadas 12 salivas positivas que, após confirmação com as amostras de urina, resultaram em 8 casos de infeção congénita e 4 falsos positivos (prevalência de 0,21%). Esta metodologia demonstrou ser aplicável a larga escala, pela facilidade de colheita de amostras e por uma redução significativa dos custos.

Termos chave: Infeção Congénita, HCMV, Rastreio pós-natal, *Pools*, saliva

Abstract

Human cytomegalovirus (HCMV) is the main cause of congenital infection all over the world, its prevalence ranges from 0,2 to 2,2%. Of all affected newborns, only 10 to 15% will show symptoms at birth, and 10 to 15% of the asymptomatic ones will develop long-term sequelae, such as non-genetic sensorineural deafness. In this way, the impact on the public and individual health as the economic ones is noticeable.

The implementation of the universal screening for HCMV CI has been suggested for several years, however, it has not yet been implemented, due to a lack of an economically viable and sustainable technic. Portuguese teams have been developing the pool methodology, to reduce processing times and cost associated with the screening. This study aims to demonstrate the applicability of post-natal screening through the *pool* methodology by real-time PCR. Were screen newborns aged between zero and 15 days from 4 Portuguese hospitals with high birth rates. To carry out this screening, saliva samples were collected and grouped into *pools* of 10. In case the pool obtained a positive result, the saliva samples were analyzed individually, subsequently, the respective hospital was asked to collect a urine sample corresponding to the positive saliva, to obtain a confirmation result.

A total of 3759 newborns were screened, of which 8 *pools* were positive, corresponding to 12 positive salivas. After confirmation with de urine sample, were found 4 cases of false positives and 8 cases of congenital infection, obtaining a prevalence of 0,21%. This methodology proved to be applicable on a large scale, due to the ease of taking samples and a significant reduction in costs.

Keywords: Congenital infection, HCMV, Screening, *Pools*, saliva

Índice

Elementos bibliográficos resultantes da dissertação:	II
Dedicatória e Agradecimentos:	III
Resumo:	V
Abstract:	VII
Índice:	IX
Índice de Figuras:	XI
Índice de Tabelas:	XIII
Índice de Gráficos:	XV
Listas de Abreviaturas, Siglas e Símbolos:	XVII
1. Introdução:	1
1.1. Contextualização Histórica do Citomegalovírus:	1
1.2. Família <i>Herpesviridae</i> :	2
1.3. Género Citomegalovírus:	3
1.3.1. Estrutura Viral:	5
1.3.2. Replicação Viral:	7
1.4. Infecção Congénita:	8
1.4.1. Infecção Congénita pelo Vírus Citomegálico Humano	10
1.4.1.1. Epidemiologia:	11
1.4.1.2. Transmissão:	12
1.4.1.2.1. Transmissão Vertical:	12
1.4.1.2.2. Transmissão Horizontal:	13
1.4.1.3. Manifestações Clínicas:	14
1.4.1.4. Prevenção da Infecção:	17
1.4.1.4.1. Medidas de Higiene:	18
1.4.1.4.2. Imunização Passiva:	19
1.4.1.4.3. Imunização Ativa:	20
1.4.1.5. Diagnóstico:	23
1.4.1.5.1. Na Gestante:	23
1.4.1.5.2. No Feto:	25
1.4.1.5.3. No Recém-Nascido:	26
1.4.1.6. Tratamento:	27
1.4.1.7. Rastreio Pós-Natal:	29
1.4.1.8. Técnica de PCR:	32
1.5. Objetivos do Estudo:	38
2. Materiais e Métodos:	39
2.1. Seleção do material para a colheita e transporte das amostras de saliva:	39
2.1.1. Avaliação das zaragatoas:	39
2.1.1.1. Determinação da capacidade de absorção das zaragatoas:	39
2.1.1.2. Medição do DNA recuperado:	39

2.1.2. Avaliação dos meios de transporte: _____	40
2.2. Limite de detecção do protocolo de análise implementado para o presente rastreo: ..	40
2.3. Rastreo Pós-Natal:.....	41
2.3.1. População Alvo: _____	41
2.3.2. Colheita de amostras: _____	41
2.3.3. Processamento das amostras de saliva: _____	42
2.4. Algoritmo do protocolo de Rastreo:	46
2.5. Tratamento de dados:.....	47
3. Resultados e Discussão:.....	48
3.1. Análise do material selecionado para colheita e transporte das amostras de saliva: .	48
3.1.1. Avaliação das zaragatoas: _____	48
3.1.1.1. Análise da capacidade de absorção das zaragatoas: _____	48
3.1.1.2. Análise do DNA recuperado: _____	48
3.1.2. Avaliação dos meios de transporte: _____	50
3.2. Limite de detecção do protocolo implementado para o presente rastreo:	50
3.3. Rastreo Pós-Natal:.....	51
3.3.1. Caracterização da população do estudo: _____	51
3.3.2. Resultados do rastreo _____	62
3.3.3. Prevalência da infecção congênita de HCMV: _____	63
3.4. Custos associados à metodologia das <i>Pools</i> :	69
4. Conclusão:	70
5. Referências Bibliográficas:.....	72

Índice de Figuras

<i>Figura 1.1– Estrutura de virião da família Herpesviridae.</i>	3
<i>Figura 1.2 – Organização do genoma do HCMV.</i>	6
<i>Figura 1.3 – Taxas de seroprevalências mundiais em mulheres em idade reprodutiva (12 aos 49 anos) com a prevalência de infecção congénita para o HCMV.</i>	11
<i>Figura 1.4 – Percentagem de mulheres com conhecimento sobre diferentes doenças, transmissão e prevenção.</i>	17
<i>Figura 1.5 – Esquema de diagnóstico pré-natal da infecção por HCMV.</i>	24
<i>Figura 1.6 – Número estimado de casos anuais de crianças com sequelas causado por diferentes doenças.</i>	30
<i>Figura 1.7 – Curva de calibração de um template degradado.</i>	35
<i>Figura 1.8 – Curva de amplificação com base na fluorescência gerada.</i>	36
<i>Figura 1.9 –Curva de amplificação com identificação da linha base, threshold e cycle threshold.</i>	36
<i>Figura 2.1 – Esquema de diluições efetuadas para determinação da absorção e libertação de amostra pelos diferentes tipos de zaragatoas</i>	40
<i>Figura 2.2 – Esquema do método do PCR em tempo Real</i>	44
<i>Figura 2.3 – Ciclo de Amplificação da técnica de PCR in House</i>	44
<i>Figura 3.1 – Correlação do tempo de gestação, número de amostras mensais e períodos de confinamento em Portugal</i>	68

Índice de Tabelas

<i>Tabela 2.1. – Concentrações e quantidades dos reagentes para a mistura de reagentes da PCR em tempo real</i>	43
<i>Tabela 2.2 – Sequência de primers e sonda utilizados no presente trabalho</i>	43
<i>Tabela 3.1 - Absorção das diferentes matrizes por zaragatoas tipo Rayon e Dacron</i>	48
<i>Tabela 3.2 – Recuperação de DNA usando zaragatoas do tipo Dacron e Rayon.</i>	49
<i>Tabela 3.3 – Avaliação da reprodutibilidade de resultados em meios de transporte diferentes</i>	50
<i>Tabela 3.4– Determinação da sensibilidade do protocolo de análise para o rastreio</i>	51
<i>Tabela 3.5 – Nados-vivos de mães residentes em Portugal</i>	52
<i>Tabela 3.6 – Número absoluto e percentagens das amostras de saliva por hospital</i>	53
<i>Tabela 3.7 – Género dos participantes no rastreio Pós-Natal</i>	53
<i>Tabela 3.8– Distribuição das amostras segundo o tempo decorrido entre o nascimento e chegada das amostras de saliva ao laboratório da FCM</i>	55
<i>Tabela 3.9 – Número de nados-vivos por local de residência da mãe, área metropolitana de Lisboa e Porto, entre junho de 2020 e janeiro de 2021</i>	61
<i>Tabela 3.10 – Número de nados-vivos por local de residência da mãe entre junho de 2020 e agosto de 2021</i>	61
<i>Tabela 3.11 – Resultados da PCR;</i>	62
<i>Tabela 3.12 – Prevalência da Infecção congénita por HCMV para o presente estudo</i>	63
<i>Tabela 3.13 – Estimativa pontual e intervalos de confiança para estudos independentes e comparação entre eles.</i>	64
<i>Tabela 3.14 – Custos associados à análise de amostras individuais vs. Pools de 10 amostras</i>	69

Índice de Gráficos

<i>Gráfico 3.1– Distribuição das amostrasde saliva analisadas no presente estudo por hospital.</i>	<i>53</i>
<i>Gráfico 3.2 – Distribuição dos Recém-nascidos por género</i>	<i>54</i>
<i>Gráfico 3.3 – Distribuição das amostras do Hospital Cuf Descobertas segundo o intervalo de tempo em dias entre o nascimento e a chega ao laboratório</i>	<i>55</i>
<i>Gráfico 3.4 – Distribuição das amostras do Hospital Cuf Porto segundo o intervalo de tempo em dias entre o nascimento e a chega ao laboratório</i>	<i>56</i>
<i>Gráfico 3.5 – Distribuição das amostras do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, em dias segundo o intervalo de tempo entre o nascimento e a chega ao laboratório da FCM</i>	<i>56</i>
<i>Gráfico 3.6 – Distribuição o das amostras do Hospital São Francisco Xavier segundo o intervalo de tempo, em dias, entre o nascimento e a chega ao laboratório da FCM</i>	<i>57</i>
<i>Gráfico 3.7 – Distribuição das amostras do Hospital Cuf Porto ao longo dos meses</i>	<i>57</i>
<i>Gráfico 3.8 – Distribuição das amostras do CHLO ao longo dos meses</i>	<i>58</i>
<i>Gráfico 3.9 – Distribuição das amostras do HCD ao longo dos meses</i>	<i>58</i>
<i>Gráfico 3.10 – Distribuição das amostras do HVFX ao longo dos meses</i>	<i>59</i>
<i>Gráfico 3.11 – Distribuição do número total de amostras recebidas por mês</i>	<i>59</i>
<i>Gráfico 3.12 – Distribuição dos casos positivos de infeção congénita no CHLO</i>	<i>66</i>
<i>Gráfico 3.13 – Distribuição dos casos positivos de infeção congénita no HVFX</i>	<i>66</i>
<i>Gráfico 3.14 – Distribuição dos casos positivos do rastreio</i>	<i>67</i>

Listas de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

€ - Euro

α – alfa

β – beta

°C – graus Celsius

μL - microlitro

Ac – Anticorpo

APCs – células apresentadoras de antígenos

ATP – adenina trifosfato

CCI – controlo do controlo interno

CDC – do inglês *Center for Disease Control*

CHLO – Centro Hospitalar Lisboa Ocidental
(Hospital São Francisco Xavier)

CI – Controlo Interno

CMV – Citomegalovírus

CN – Controlo Negativo

CP¹ – complexo pentamérico

CP – Cuf Descobertas

CP² – Controlo Positivo

ct – do inglês *cycle threshold*

DC – do inglês *dendritic cells*

DDO – Doença de Declaração Obrigatória

DI - Doença das Inclusões

DIC – Doença de Inclusões Citomegálica

DNA – do inglês *deoxyribonucleic acid*

dNTPs – desoribonucleótidos trifosfato

DP – Desvio Padrão

DVGS – Doença do Vírus das Glândulas Salivares

E – do inglês *Early*

EBV – Vírus Epstein-Barr

ECDC – do inglês *European Center for Disease Prevention and Control*

EUA – Estados Unidos da América

Fwrd – do inglês *forward*

gB/H/L/M/N – Glicoproteínas

gc - Complexo Glicoproteico

GCV – Ganciclovir

HCD – Hospital Cuf Descobertas

HCMV – do inglês *Human Cytomegalovirus*

HCMV-HIG – Imunoglobulina Hiperimune
Específica para HCMV

HHV – do inglês *Human Herpesvirus*

HIG – Imunoglobulina Hiperimune

HIV – do inglês *Human Immunodeficiency Virus*

HVFX – Hospital de Vila Franca de Xira

HSV – Herpesvírus Simplex

IC – Infecção congénita

ICTV – do inglês *International Committee on the Taxonomy of Viruses*

IE – do inglês *immediate early*

IgG – Imunoglobulina da classe G

IgM – Imunoglobulina da classe M

INE – Instituto Nacional de Estatística

INF – Interferão

IR_s/IR_i – do inglês *Internal repeats*

Kg – do inglês *Kilogram*

Kpb – Quilo pares de bases

L – do inglês *Late*

LA – Líquido Amniótico

LNA – do inglês *locked nucleic acid*

LTP – do inglês *Large Tegument Protein*

mg – miligrama

MGB – do inglês *Minor Groove-Binding*

MHC – complexo de histocompatibilidade

mL - mililitro

(n) – população

NEQAS – do inglês *National External Quality Assurance Scheme*

NF-KB – fator nuclear Kappa B

NK – do inglês *Natural Killer*

Nm – Nanómetros

NMS|FCM – *New Medical School* | Faculdade de Ciências Médicas

nPCR – *nested PCR*

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

pp – do inglês *phosphoprotein*

PPP – Parceria Público Privada
PRR – recetores de reconhecimento de padrões
PVN – Plano de Vacinação Nacional
qPCR – PCR em tempo real
r² – coeficiente de determinação
Rev – do inglês *reverse*
RPMI – do inglês *Roswell Park Memorial Institute*
RN – Recém-nascido
RNA – do inglês *ribonucleic acid*
RT-PCR – Transcriptase Reversa PCR
SINAVE – Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica
SPK – do inglês *spiked*
SNC – Sistema Nervoso Central
TLR – recetores *Toll-Like*
TNF – fator de necrose tumoral
TR_s/TR_L – do inglês *Terminal repeats*
HSA – albumina de soro humano
UI – Unidades Internacionais
U_L – do inglês *Unique Long*
U_s – do inglês *Unique Short*
ValACV – Valganciclovir
VGS – Vírus das Glândulas Salivares
VGCV – Valganciclovir
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana
VLP – do inglês *Enveloped virus-like particles*
VTM – meio de transporte para vírus
VZV – do inglês *Varicella-zoster virus*

1. Introdução

1.1. Contextualização Histórica do Citomegalovírus

A primeira referência de inclusões celulares foi realizada em 1881 onde foram descritas como corpos homogêneos no núcleo, tendo estas alterações sido observadas em células renais de um recém-nascido com sífilis e na glândula parótida de uma criança (Ho 2008; Riley 1997).

No início do séc. XX, devido ao grande desenvolvimento tecnológico, houve a nível médico-científico um crescente interesse no estudo dessas inclusões. Assim, com base em tecidos humanos e animais pós-mortem, foram estudadas as características citológicas e estruturais desses tecidos. Em 1904, foram realizadas as primeiras ilustrações destas inclusões celulares, através da observação de órgãos afetados de outra criança com sífilis, tendo esta ilustração permitido a identificação de outros casos. Nesta altura, estas estruturas chegaram a ser comparadas com estruturas parecidas com protozoários, tendo sido considerado por breves instantes ser o agente causador de Sífilis, dado os consecutivos casos onde eram verificadas. Esta hipótese foi rapidamente descartada com a descoberta da bactéria *Treponema pallidum*. Três anos mais tarde, no ano de 1907, o agente causador das inclusões celulares foi nomeado como sendo um protozoário pertencente à classe Esporozoário pelo Professor Ludwig (Vonglahn and Pappenheimer 1925).

Ao longo da década de 20, surgiram diversas referências a este agente, tendo sido considerado amebas, coccídeos e esporozoários. Alguns autores como Goodpasture, Talbot, Lange e Müller discordaram em que este agente etiológico fosse um protozoário pois o tamanho das células observadas nas preparações histológicas seria demasiado grande para atravessar a placenta, suspeitando que se tratasse de um vírus. Em 1921 B. Lipschütz, a primeira pessoa a fazer estudo cuidadoso e minucioso sobre inclusões celulares causadas pelos vírus *Herpes genitalis*, *Herpes zoster* e *Herpes febrilis*, constata que as estruturas e lesões apresentadas nos tecidos por este agente desconhecido seriam idênticas às produzidas pelo herpesvírus. Posteriormente Goodpasture e Teague argumentaram com base em estudos desenvolvidos pelos próprios, e com alguma base nos estudos desenvolvidos por B. Lipschütz, que as inclusões apresentadas no núcleo eram idênticas às provocadas especificamente pelo herpes vírus podendo assim ser um vírus relacionado, sugerindo deste modo uma ligação entre ambos (Riley 1997; Vonglahn and Pappenheimer 1925).

Ainda em 1921 Farber e Wolbach introduziram pela primeira vez o termo Doença do Vírus das Glândulas Salivares (DVGS) devido aos inúmeros casos verificados com alterações nas células das glândulas salivares, as inclusões nucleares (Riley 1997).

Por volta de 1950 houve diversos estudos que demonstraram uma série de novos casos de infeção por este vírus, em diferentes tecidos humanos como rins, fígado, adenoides e glândulas salivares. No seguimento de diversos estudos envolvendo alterações citológicas nas glândulas salivares, o agente causador obteve outros termos sinónimos como Vírus das Glândulas Salivares (VGS), Doença das Inclusões (DI), Doença das Inclusões Citomegálicas (DIC), supondo-se ser específico de cada espécie animal (Rowe et al. 1956; Smith 1956). Em todas as infeções foram observadas as mesmas alterações, como gigantismo celular com inclusões nucleares, com

tamanho, estrutura e coloração características que as diferenciavam de outros vírus conhecidos. Deste modo foi afirmado que as alterações citológicas seriam patognomônicas (Smith 1956) . Em 1952, um estudo de Fetterman demonstrou a presença do vírus na urina de crianças infetadas, levando à conclusão de que a DIC poderia ser diagnosticada em vida através existência da presença de células com inclusões neste líquido biológico, suspeitando ainda que a infecção poderia ser mais comum do que inicialmente pensado e que o seu desfecho nem sempre seria fatal (Weller 1970; Weller et al. 1957).

Por volta de 1954, num estudo realizado com 3 estirpes de vírus indutores de inclusões intracelulares, obtidas de crianças submetidas a tonsilectomia e adenoidectomia no Hospital pediátrico de Washington D.C. e no Instituto Nacional de Saúde de Clínica Central, também nos Estados Unidos Da América (EUA), foi possível observar efeitos citopatogênicos após um período de incubação de 7 a 50 dias, idênticos aos observados em estudos anteriores. Foi considerado haver uma correlação entre as alterações produzidas e os testes serológicos, assumindo-se tratar-se do mesmo vírus, hipótese esta corroborada por estudos anteriores que correlacionavam as alterações com o VGS (Rowe et al. 1956).

Em 1960, Weller sugere a alteração do nome do VGS para o termo atualmente usado Citomegalovírus (CMV) dadas as alterações citológicas observadas em cultura de células aquando do desenvolvimento do vírus (Weller 1970).

Nove anos mais tarde foi isolado, pela primeira vez, o CMV de um líquido amniótico tendo sido este um ponto de viragem para o diagnóstico pré-natal (Davis et al. 1971; Grose and Weiner 1990). A partir deste feito, foram confirmadas outras infecções congénitas através de sangue fetal, em 1982 obtido por de fetoscopia e em 1988 através de uma amostra colhida do cordão umbilical por cordocentese (Grose and Weiner 1990).

1.2. Família *Herpesviridae*

Segundo os dados de 2019 do *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV), a ordem *Herpesvirales* é constituída por 3 famílias, onde consta a família *Herpesviridae*, que por sua vez está organizada em 3 subfamílias, *alfaherpesvirinae*, *betaherpesvirinae* e *gama herpesvirinae*, que contém 13 géneros e 107 espécies (ICTV 2019).

A família *Herpesviridae* é uma extensa família de vírus, em que todos os seus membros são morfológicamente idênticos, ubíquos e com capacidade de causar desde infeções assintomáticas a graves. No entanto os membros desta família distinguem-se entre si pelas suas características biológicas e epidemiológicas (Duque and Paixão 2014; Strauss and Strauss 2008).

Quanto à estrutura, estes vírus têm um tamanho compreendido entre os 100 e os 300nm, possuem uma cápside icosaédrica constituída por cerca de 162 capsómeros proteicos que revestem o genoma viral. Contêm exteriormente um invólucro glíco-lipídico-proteico onde se encontram várias glicoproteínas importantes no processo de infeção e uma matriz/tegumento que permite a associação entre a cápside e o invólucro, como pode ser observada na Figura 1.1 (Champoux et al. 2004; Duque and Paixão 2014; Strauss and Strauss 2008).

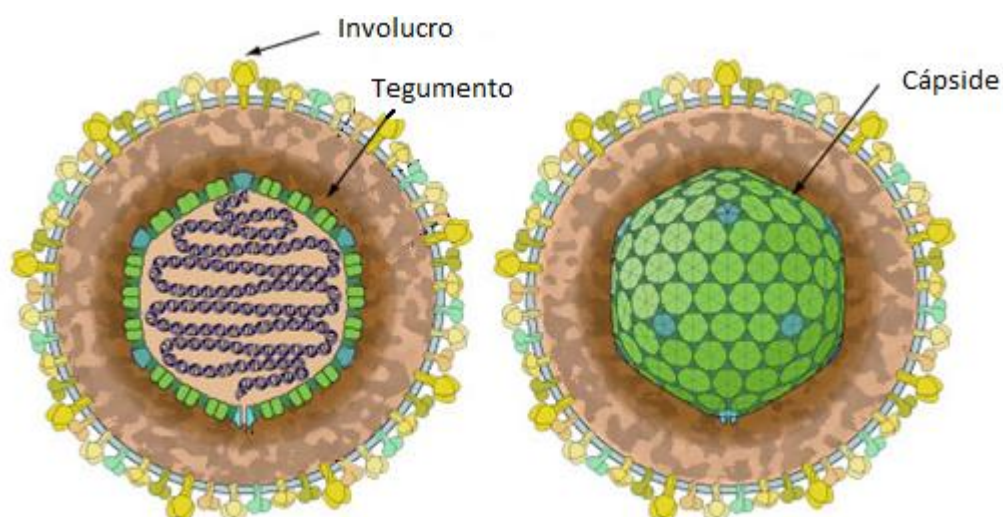


Figura 1.1– Estrutura de virião da família Herpesviridae. Adaptado de ViralZone 2017

O genoma destes vírus é um ácido desoxirribonucleico (DNA) de cadeia dupla e linear, com uma variação de tamanho compreendida entre os 120 e 240 kpb, consoante a espécie (Champoux et al. 2004; Duque and Paixão 2014).

Das 107 espécies que pertencem a esta família, existem oito com capacidade comprovada de infectar o ser humano, o herpes simples humano 1 e 2 (HSV-1, HSV-2), o vírus citomagálico humano (CMV), o vírus da varicela-zoster (VZV), o vírus de Epstein-Barr (EBV), e os vírus do herpes humano tipo 6 (HHV-6), 7 (HHV-7) e 8 (HHV-8) (Drew 2004; ICTV 2019).

A divisão da família em 3 subfamílias deve-se ao seu genoma e comportamento biológico (Duque and Paixão 2014). A subfamília α -herpesvirinae é composta por 5 géneros incluindo o *Simplexvirus* onde se incluem o HSV-1 e 2/ α -herpesvirus humano 1 e 2 e o género *Varicellovirus* que como o nome indica inclui o VZV/ α -herpesvirus humano 3 (ICTV 2019). A subfamília β -herpesvirinae engloba 4 géneros, sendo um deles o género Citomegalovírus que engloba 11 espécies, sendo o β -herpesvirus humano 5 a espécie com capacidade de infectar o Ser Humano, também conhecido por CMV (HCMV, do inglês Human Cytomegalovirus) ou vírus do herpes humano tipo 5 (HHV-5) (ICTV 2019). Já a subfamília γ -herpesvirinae é constituída por 4 géneros, onde a espécie EBV/ γ -herpesvirus humano 4 faz parte do género *Lymphocryptovirus* (ICTV 2019).

1.3. Género Citomegalovírus

O CMV é um vírus ubíquo com distribuição mundial. É um vírus com uma potente capacidade imunogénica, acionando no sistema imunitário do hospedeiro uma resposta imunitária que envolve a imunidade inata e adaptativa (Crough and Khanna 2009). Apesar da resposta produzida pelo hospedeiro, o CMV tem a aptidão de se adaptar à mesma, alcançando um equilíbrio homeostático onde se estabelece uma infeção crónica e latente (La Rosa and Diamond 2012).

É um vírus oportunista em imunocomprometidos, como no caso de doentes transplantados, doentes infetados com o vírus da imunodeficiência humano (VIH), cancro ou na imunossenescência relacionada com a idade, e por ser o causador da infeção congénita mais

frequente (Morcarski et al. 2013; Pellett and Roizman 2007). Em indivíduos imunocompetentes o CMV raramente causa complicações, sendo a maioria das infecções assintomáticas. No entanto, em alguns casos pode presenciar-se uma síndrome mononucleosica com febre, mialgias, linfadenopatias, hepatomegalia. Pode ainda observar-se outro tipo de complicações, apesar de raras, como artralgia, artrite, colite ulcerosa, pneumonia, hepatite, meningite e miocardite (Crough and Khanna 2009).

Sabe-se que o CMV tem a capacidade de infectar uma ampla variedade de células in vivo, como fibroblastos, células epiteliais, endoteliais, monócitos e macrófagos, leucócitos e células dendríticas, sendo possível verificar nas células infectadas alterações citopatológicas características (inclusões nucleares e citoplasmáticas) (Revello and Gerna 2004). Segundo o tipo de células infectadas, assim podemos ter diferentes fases da infecção: por exemplo, a latência pode verificar-se nos monócitos mas a diferenciação de monócitos em macrófagos pode despoletar a reativação e replicação viral; a infecção de células epiteliais e fibroblastos permitem a proliferação viral, mas é a infecção das células endoteliais e hematopoiéticas que mais contribuem para a disseminação viral (La Rosa and Diamond 2012).

Ao estabelecer-se a infecção o sistema imunitário do hospedeiro reconhece as partículas virais ativas, os viriões, ativando uma serie de mecanismos e vias de resposta. A imunidade contra este vírus é multifacetada, centrando-se nos linfócitos T, células *natural-killers* (NKs) e anticorpos, que têm um papel muito importante no controlo da disseminação viral em indivíduos com infecção latente (Crough and Khanna 2009).

Tal como nos restantes membros da família *Herpesviridae*, o CMV ao infectar o seu hospedeiro vai desencadear uma infecção em três fases distintas (Picarda and Benedict 2018).

A primeira fase é constituída pela replicação sistemática, que ativa o sistema imune inato por via de moléculas imuno-sensoriais denominadas de recetores de reconhecimento de padrões (PRRs), que desencadearão a ativação de NKs e iniciam a produção de uma ampla gama de anticorpos, células T e de memória (Picarda and Benedict 2018). Esta primeira via de resposta é responsável por controlar a infecção na primeira fase, desempenhando assim um papel fundamental contra o CMV, sendo desencadeada por um tipo de PRRs, os recetores Toll-like (TLRs), em particular pelos TLR2. Esta ativação ocorre através da interação dos TLR2 com as glicoproteínas de superfície B (gB) e H (gH) do vírus, levando à libertação de citocinas inflamatórias que irão recrutar células do sistema imunitário inato, como as células NK, as células apresentadoras de antígenos (APCs) e macrófagos, que iniciam a regulação positiva de moléculas que interferem na ativação da imunidade adaptativa. As APCs irão originar interferão alfa e beta (IFN- α/β), enquanto que os macrófagos serão responsáveis por ativar as células NKs (Crough and Khanna 2009). As NK são células do sistema imunitário inato importantes na ativação e maturação da imunidade adaptativa, dada a capacidade de produção de citosinas num curto espaço de tempo, sendo assim consideradas o elo de ligação entre o sistema imunitário inato e adaptativo. (La Rosa and Diamond 2012).

A segunda fase é caracterizada pela persistência viral nos tecidos que vai modelar a resposta inata e adaptativa durante meses ou anos (Picarda and Benedict 2018). A imunidade adaptativa é

considera a responsável pela neutralização dos viriões (Picarda and Benedict 2018). O CMV tem uma grande capacidade de codificar proteínas, o que fornece uma grande variedade de alvos antigénicos que poderão ser apresentados pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) às células T (Khan 2007). Deste modo, no decorrer da primoinfeção são desenvolvidos anticorpos específicos para múltiplas proteínas do CMV, incluindo proteínas estruturais do tegumento, glicoproteínas de superfícies e proteínas não estruturais (La Rosa and Diamond 2012). Os dois principais alvos de neutralização por parte dos anticorpos são a gB que é responsável por 50% dos anticorpos neutralizantes contra CMV e está envolvida na adesão e entrada do vírus na célula e a gH, glicoproteína envolvida na fusão entre o invólucro viral e a membrana da célula hospedeira (Crough and Khanna 2009).

E por fim, a terceira fase baseia-se na fase de latência disseminada, onde há uma expressão viral restrita que poderá promover um aumento da imunidade no hospedeiro, caso o seu sistema imunitário não esteja debilitado por outras comorbilidades (Picarda and Benedict 2018). Em suma, o hospedeiro vai presenciar uma primoinfeção, seguindo-se um período de latência e reativação (Drew 2004).

Existem evidências que apontam para uma contribuição positiva dos anticorpos na proteção e controlo eficaz da infeção por CMV, em particular na disseminação viral e gravidade da infeção (Crough and Khanna 2009). No entanto, a resposta imunitária não é capaz de parar a replicação viral durante os primeiros meses da infeção, nem consegue evitar a ativação e excreção viral intermitente ou mesmo uma reinfeção (Johnson, Anderson, and Pass 2012).

1.3.1. Estrutura Viral

A estrutura do CMV é muito idêntica à dos restantes herpes vírus, tendo a partícula viral um tamanho compreendido entre os 200 e 230nm, e a nucleocápside 130nm. Este vírus alberga um genoma de 240 kpb, o maior de todos os herpes vírus, com capacidade de codificar pelo menos 167 genes codificadores de proteínas (Morcarski et al. 2013; Pellett and Roizman 2007). O genoma do CMV pertence à classe E, representando uma das estruturas genómicas mais complexas (Davison 2007). Este é constituído por duas regiões/sequências, sequência única longa (UL) e sequência única curta (US), ladeado por regiões invertidas repetidas internas (IR_S e IR_L) e terminais (TR_S e TR_L) tanto nas sequências curtas como longas. Deste modo o genoma do CMV tem a seguinte organização TR_L-UL-IR_L-IR_S-US-TR_S, como pode ser observado na figura 1.2.. As IR e TR contêm os sinais de corte e montagem do genoma para além de promoverem a isomerização do mesmo durante a replicação. Estas inversões de sequências permitem gerar quatro isómeros equimolares e independentes consoante a orientação da US e UL. Atualmente ainda não é compreendida a utilidade da isomerização, mas pensa-se que poderá interferir na infeção de certos tipos de células (Morcarski et al. 2013; Pellett and Roizman 2007; Shenk et al. 2008). É importante referir que a expressão do genoma viral é influenciada pelo tipo de células e é reprimida em células não diferenciadas e nas fases tardias da replicação (Morcarski et al. 2013; Pellett and Roizman 2007).

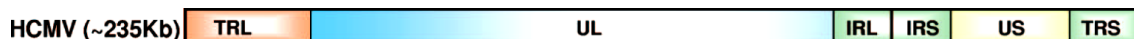


Figura 1.2 – Organização do genoma do HCMV. Adaptado de Crough and Khanna 2009. *Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. Clinical Microbiology Reviews Vol.22, No 1., p.77*

O seu DNA encontra-se numa cápside icosaédrica constituída por 162 capsómeros, formados por 4 proteínas, produzidas pelos genes *UL86*, *UL46*, *UL85* e *UL48A* (Morcarski et al. 2013; Pellett and Roizman 2007).

A cápside por sua vez é revestida pelo tegumento que consiste num compartimento que contém a maioria das proteínas do virião, sendo estas maioritariamente fosforiladas e imunogénicas. A função das proteínas do tegumento pode dividir estas em 2 grupos, proteínas que desempenham funções estruturais e são importantes no processo de entrada da partícula viral nas células hospedeiras, e proteínas não estruturais que são proteínas que interferem na resposta imunológica da célula hospedeira à infeção (Crough and Khanna 2009). A proteína mais abundante no tegumento é a fosfoproteína 65 (pp65, do inglês *phosphoprotein*), codificada pelo gene *UL83*, esta é altamente imunogénica e pode ser usada para os testes de antigenémia, que são utilizados para monitorização e diagnóstico das infeções por CMV em imunodeprimidos. Outros genes do HCMV como o *UL32*, *UL48* e *UL82* codificam proteínas fundamentais para o processo de infeção. Dentro destes, a pp71, que advém do gene *UL82*, é a responsável pela ativação da transcrição celular e fase imediatamente precoce (IE). A pp150, produto do gene *UL32*, é essencial para a maturação da nucleocápside. Já a maior proteína do tegumento (LTP, do inglês *large tegument protein*), que advém do gene *UL48* é responsável por estabilizar a nucleocápside (Morcarski et al. 2013; Pellett and Roizman 2007).

O tegumento, por sua vez, encontra-se envolto por uma bicamada lipídica, o invólucro, composto por 23 glicoproteínas. Apenas 6 destas glicoproteínas são essenciais para a replicação viral, encontrando-se organizadas em três grandes complexos glicoproteicos (gc) (Choi, El-Hamdi, and McGregor 2019), gcl que inclui a glicoproteína B (gB), gclI constituído por gM e gN, gclII composto por gH, gL, gO. A gB, é codificada pelo gene *UL55*, forma um trímero que irá provocar uma alteração conformacional de modo a fundir o invólucro viral com a membrana celular, permitindo assim a entrada do vírus. O segundo complexo, gclI, é constituído por gM e gN, produtos dos genes *UL100* e *UL73* respetivamente, sendo importantes na fase de maturação. O terceiro complexo é formado pela gH, gL e gO, produtos do gene *UL75*, *UL115*, *UL74* respetivamente, funcionam em conjunto com a gB aumentando a eficácia de adesão e fusão à membrana (Morcarski et al. 2013; Pellett and Roizman 2007; Shenk et al. 2008). Para além dos complexos mencionados, o HCMV codifica outro complexo, o complexo pentamérico (CP¹) ou pentâmero, que inclui a gH, gL, pUL128, pUL130 e pUL131. O CP¹ é essencial para a infeção de células endoteliais, epiteliais e mieloides (Gerna et al. 2017; Rustandi et al. 2021), dado os produtos dos genes *UL128-131* serem determinantes na infeção dos monócitos, em especial a pUL128 que tem a capacidade de bloquear as função das citosinas/quimiocinas libertadas por estes (Straschewski et al. 2011). Para além destas interações no ciclo replicativo do vírus, são ainda os principais alvos dos anticorpos neutralizantes do hospedeiro.

1.3.2. Replicação Viral

Dos vírus pertencentes à família *Herpesviridae* o CMV é o que possui o ciclo mais longo, em que após a infecção a síntese genômica leva 16 a 24h para iniciar, não havendo novos viriões até 72 a 96 horas (Fortunato et al. 2000).

O primeiro passo do ciclo replicativo consiste na interação das glicoproteínas virais com os recetores celulares de modo que a entrada do vírus na célula e replicação do seu genoma seja possível. Esta entrada pode ocorrer por fusão do invólucro viral com a membrana da célula a pH neutro, ou por endocitose como é verificado nas células epiteliais devido à presença de um pH baixo (Shenk et al. 2008).

Após a entrada na célula, para que se inicie o processo de infecção, tem de ocorrer a transcrição e replicação do genoma no núcleo da célula hospedeira, processo este que ocorre em três fases encadeadas. A primeira fase consiste na expressão dos genes imediatamente precoces (IE, do inglês *Immediate Early*, ou α), etapa esta dependente dos fatores do hospedeiro para sua expressão e onde há transcrição de proteínas importantes para a regulação de genes e controlo celular necessários para as etapas seguintes. Seguidamente inicia-se a transcrição dos genes precoces (E, do inglês *Early*, ou β), que codificam para funções associadas com a replicação do DNA viral, e por fim inicia-se a fase de transcrição dos genes tardios (L, do inglês *Late*, ou γ), onde há a produção de proteínas estruturais (Fortunato et al. 2000; Murray 2016; Sinclair and Sissons 2006).

Como mencionado anteriormente, tal como os restantes membros da família *Herpesviridae*, o CMV tem a capacidade de estabelecer fases de latência prolongadas no hospedeiro com reativações esporádicas. Os mecanismos usados pelo CMV para permanecer em fase de latência ou desencadearem uma reativação ainda não são totalmente conhecidos, embora seja habitualmente aceite que a linhagem de células mieloides será o local onde o vírus permanece latente. A latência consiste na existência de genoma viral na ausência de viriões, ou seja, nesta fase o DNA viral pode ser detetado numa grande diversidade de células como linfócitos, monócitos, células da medula óssea, células dendríticas (DCs) imaturas e endoteliais, entre outras, no entanto não são transportadas partículas virais infecciosas. Estima-se assim que nesta fase sejam transportadas quantidades inferiores a 0.01% de genoma viral em células mononucleadas do sangue periférico e medula óssea, sendo que cada uma destas células infetadas terá entre 2 a 13 cópias de genoma viral (Crough and Khanna 2009; Sinclair and Sissons 2006). A reativação após um período de latência está relacionada com o estado imunitário do hospedeiro. Deste modo, ao longo da vida do hospedeiro, poderão ocorrer diversos episódios de reativação com possível desenvolvimento de doença severa, consoante a suscetibilidade/estado imunológico do hospedeiro (Stuar P. Adler 1988). Desta forma, a reativação está frequentemente associada a imunossupressão, processos inflamatórios, infecciosos, hormonais ou stress. Apesar de não se saber exatamente o mecanismo que leva à reativação da infecção, pensa-se que o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) seja o desencadeador/impulsionador de todo o processo. A TNF- α liga-se ao recetor TNF das células infetadas em latência ativando a proteína quinase C, enzima com funções

reguladoras da atividade de outras proteínas por fosforilação, e o fator nuclear kappa B (NF-κB) que é um complexo proteico com função de transcrição; deste modo são transcritos os genes IE que irão desencadear a replicação viral (Crough and Khanna 2009).

1.4. Infecção Congénita

A nível europeu nascem cerca de 5.2 milhões de crianças por ano. Nesta totalidade de nascimentos, são observados 2.5% de anomalias congénitas (Lanzoni et al. 2017). Estas anomalias causam um grande impacto em termos de saúde pública, por afetarem a qualidade de vida das crianças e suas famílias, quer a nível de perda de anos de vida, quer pelo aumento dos custos económicos devido aos cuidados médicos, serviços sociais, acompanhamento psicológico e educacional apropriados, entre outros. As anomalias congénitas têm ainda uma grande contribuição na mortalidade fetal e infantil, sendo a maior causa de abortos espontâneos ou malformações incompatíveis com a sobrevivência no útero (Dolk, Loane, and Garne 2010).

As anomalias congénitas podem dever-se a causas genéticas ou ambientais. As anomalias genéticas podem ter como etiologias mais comuns as trissomias, microdeleções ou mutações pontuais, que podem ser herdadas do código genético dos pais, ou por exposição a fatores ambientais, como medicamentos teratogénicos. As causas ambientais incluem infeções maternas como a rubéola, a toxoplasmose, o citomegalovírus, as deficiências nutricionais, comorbidades maternas como diabetes e/ou obesidade, medicamentos, exposição a fatores de poluição, exposição ao tabaco, ingestão de álcool, consumo cocaína ou exposição a outros químicos (Dolk et al. 2010).

As infeções maternas podem afetar o feto ou recém-nascido em três momentos diferentes. A infeção pré-natal/congénita que é transmitida da mãe para o feto durante a gravidez pela via placentária, a infeção perinatal que ocorre durante o processo de nascimento por contacto direto com sangue ou outros fluidos biológicos contaminados e a infeção pós-natal que é adquirida após o nascimento, através da via respiratória, digestiva (amamentação) ou transfusional (Aloy, Mussons, and Domínguez 2012).

As infeções congénitas são habitualmente denominadas pelo acrónimo TORCH, acrónimo este que identifica um grupo de microrganismos capazes de causar infeções congénitas, tendo cada letra a conotação a um parasita, vírus ou bactéria. Assim, T representaria Toxoplasmose, O – Outros agentes, R – Rubéola, C – Citomegalovírus, H – Herpesvírus simplex 1 e 2. Posteriormente este acrónimo ganha mais uma letra passando a denominar-se de TORCHS, referindo-se a letra S a Sífilis. Esta denominação pode não ser a mais correta nos dias de hoje, uma vez que o número de agentes patogénicos aumentou significativamente, havendo necessidade e obrigação de denominar cada agente etiológico causador de infeção congénita. No entanto é habitualmente usado como simplificador de linguagem (Barnusell et al. 2014). O grau de afetação do feto dependerá sempre do microorganismo envolvido, estado serológico da gestante e semana de gestação em que ocorre a infeção, diminuindo geralmente o risco de afetação fetal à medida que a gravidez progride (INSA 2014).

Apesar da maioria destas infeções serem assintomáticas, devido ao grande impacto que têm a nível da saúde pública é de extrema relevância a adoção de medidas de prevenção, diagnóstico, acompanhamento e tratamento em todas as fases da gestação, desde a conceção até aos primeiros anos de vida da criança (Barnusell et al. 2014).

Algumas destas infeções congénitas são prevenidas através de planos de vacinação, determinação e avaliação serológica da grávida, para além de medidas de higiene. O programa de vacinação nacional (PVN) português inclui, desde 1984, a vacina contra a rubéola a todas as crianças, desde 1995 a vacina contra hepatite B para todos os adolescentes (para todos os recém-nascidos a partir de 2000) o que confere assim uma grande taxa de imunidade à população. Para além da vacinação, no caso específico das grávidas são ainda divulgadas medidas de prevenção contra a toxoplasmose e vantagens no rastreio do HIV, Hepatite C, Hepatite B, Sífilis, a colonização pelo *Streptococcus agalactiae* e, em casos de risco, os obstetras podem ainda recomendar a realização do rastreio do CMV (Lito et al. 2013).

Em Portugal existe um sistema nacional de vigilância epidemiológica (SINAVE), que consiste num sistema de vigilância em Saúde Pública responsável pela identificação de situações de risco, recolha, análise e divulgação de dados referentes a doenças transmissíveis. É da responsabilidade deste sistema a divulgação de uma lista de doenças de declaração obrigatória (DDO), na qual existem apenas três referentes à infeção congénita, sendo estas a toxoplasmose congénita, a sífilis congénita e a rubéola (DGS n.d.). Em 2018 foram confirmadas 60 infeções congénitas por sífilis na União Europeia, das quais 3 ocorreram em Portugal. Dado nesse mesmo ano o número de nados vivos em Portugal ter sido de 87 020, obtemos uma prevalência para 2018 inferior a 0.01% de infeção congénita por este agente (ECDC 2020). No caso da Sífilis congénita, esta tem vindo a aumentar nos últimos anos por via sexual, como consequência de um aumento de comportamentos de risco (Domachowske and Abuali 2019). Já no caso da Toxoplasmose congénita, segundo os dados dos relatórios epidemiológicos do European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), em 2015 houve 273 casos confirmados e em 2016 houve 242 casos confirmados em toda a Europa (ECDC 2017, 2018). Apesar de nestes relatórios não aparecerem dados referentes a Portugal, num estudo realizado num hospital do interior centro entre 2000 e 2015, foram reportados 22 casos de toxoplasmose congénita havendo assim uma prevalência de 5,6 por cada 10 000 nados vivos nesta região. A infeção congénita por toxoplasmose tem uma prevalência variável consoante a região demográfica, sendo a prevalência média na União Europeia de 1 a 3 por cada 10 000 nados vivos (Andrade et al. 2018). No caso da rubéola, a vacinação infantil universal levou a uma redução drástica da circulação viral reduzindo ou eliminando o risco de exposição comunitário às grávidas. A vacinação contra a rubéola é tão eficaz que permitiu erradicar a infeção congénita por este agente em certos locais do planeta (Domachowske and Abuali 2019). Porém a incidência desta infeção congénita, a nível mundial, varia de forma notável entre períodos epidémicos variando entre os 0.4 e 3%, dependendo dos programas de vacinação existentes em cada país (Halwachs-Baumann et al. 2018). No entanto, dado aos movimentos anti-vacinação crescentes, pode voltar a ser um tema de grande preocupação no futuro.

1.4.1. Infecção Congénita pelo Vírus Citomegálico Humano

Como já foi referido, o HCMV é o responsável por causar uma infeção numa grande percentagem da população humana, tendo esta infeção uma seroprevalência mundial compreendida entre 30 e 90%. A seroprevalência do HCMV varia com fatores como o género, a etnia, o avanço da idade, comportamentos sexuais, fatores socio económicos e socioculturais (Crough and Khanna 2009; Halwachs-Baumann et al. 2018; Khan 2007).

A maioria das primoinfeções ocorre durante a infância e adolescência, no entanto também podem ocorrer na idade adulta. Na idade adulta esta infeção acarreta maior preocupação em grupos de risco, como no caso das grávidas, transplantados, doentes com HIV ou doentes com cancro, ou seja, doentes com algum grau de imunossupressão. A infeção por HCMV em certos grupos de doentes adultos com comprometimento do sistema imunitário encontra-se bastante controlada nos dias de hoje, dada a utilização de antivirais. Por outro lado, no caso da mulher grávida, a transmissão vertical in útero continua a representar um problema de saúde global com impacto na morbilidade e mortalidade dos recém-nascidos e com afetação socioeconómica significativa, estando presente em 0.2 a 2.2% de todos os nascimentos (Lopo et al. 2011; Revello and Gerna 2002). Para este agente etiológico não existe um rastreio obrigatório na gravidez, o que torna mais difícil detetar uma primoinfeção, para além de que os testes serológicos não permitem detetar reinfeções ou reativações por HCMV.

A infeção congénita por HCMV é a principal causadora de surdez não genética, atrasos no desenvolvimento e alterações a nível neuromotor e visual. Apesar de a transmissão da infeção congénita ocorrer tanto em grávidas seropositivas como seronegativas, sabe-se que os anticorpos anti-HCMV desempenham um papel importante na prevenção da transmissão da infeção (La Rosa and Diamond 2012). Facto este apoiado pelas estimativas de risco de transmissão vertical, em que mães seropositivas apresentam um risco de transmissão compreendido entre os 1.4% e 19.9%, em contraste com os 30% a 45% de risco de transmissão no caso de mães seronegativas que tenham a sua primoinfeção durante a gravidez (Halwachs-Baumann et al. 2018). O risco de afetação do feto é superior caso a infeção ocorra nas primeiras 16 semanas, altura em que ocorrer a migração neuronal para além do desenvolvimento de órgãos, no entanto a transmissão ao feto é superior se a infeção materna ocorrer numa altura mais avançada da gravidez (Domachowske and Abuali 2019).

Das crianças infetadas, apenas 10 a 15% apresentarão sintomatologia ao nascimento, como hepatite, icterícia, hepatomegalia, trombocitopenia, pneumonia, microcefalia, calcificações cerebrais, coriorretinites, entre outras. Das restantes 85 a 90% das crianças infetadas, sem sintomatologia à nascença, 10 a 15% passarão no rastreio auditivo neonatal universal, porém desenvolverão sequelas tardias nos primeiros cinco/seis anos de vida. Estima-se ainda que a taxa de mortalidade das crianças que nascem com sintomatologia ronde os 30% (Crough and Khanna 2009).

1.4.1.1. Epidemiologia

Como referido anteriormente, o HCMV encontra-se universalmente distribuído pela população humana, podendo infectar pessoas de todas as idades, etnias, classes socioeconómicas e culturais, sem variações sazonais ou epidémicas, embora a seroprevalência para o HCMV seja superior em países subdesenvolvidos em comparação com os países desenvolvidos (Halwachs-Baumann et al. 2018; Morcarski et al. 2013).

Em todos os estudos efetuados a nível global é possível verificar diferenças na prevalência consoante a distribuição geográfica. Inicialmente pensava-se que uma população com maior seropositividade significaria um menor risco de transmissão da infeção ao feto durante a gravidez, por não ocorrer uma primoinfeção. No entanto, ao longo dos anos, tem vindo a ser demonstrado que a alta seroprevalência na população leva a um maior número de infeções congénitas possivelmente associado a casos de reativação ou reinfeção, sendo assim perceptível que a prevalência das infeções congénitas é superior em populações com maior seropositividade para este agente etiológico (Halwachs-Baumann et al. 2018; Puhakka et al. 2017), podendo o mesmo ser verificado na figura 1.3, que representa um resumo esquemático realizado por Manicklal et al. 2013, baseado nos estudos concretizados por cada país sobre a seroprevalência do HCMV em mulheres férteis, entre os 12 e 49 anos de idade, e respetiva prevalência da infeção congénita.

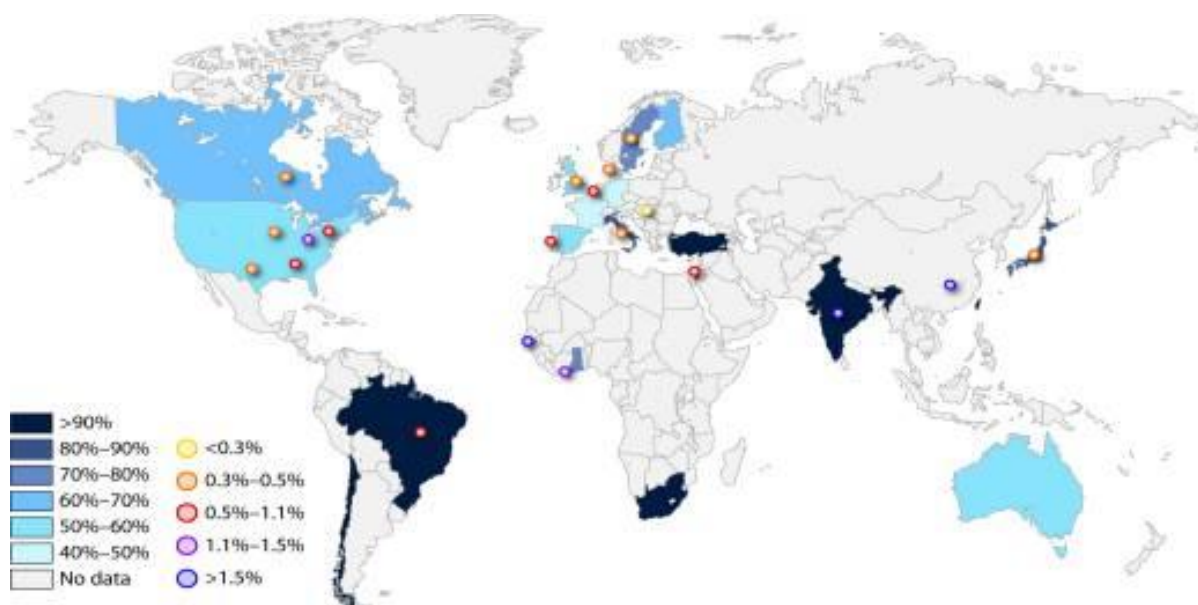


Figura 1.3 – Taxas de seroprevalências mundiais em mulheres em idade reprodutiva (12 aos 49 anos) com a prevalência de infeção congénita para o HCMV. Retirado de Manicklal et al. 2013. The "Silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clinical Microbiology Reviews* Vol.26, No 1., p.89

Como referido no ponto "1.4.1 Infeção Congénita pelo Vírus Citomegálico Humano", as gestantes com imunidade adquirida anteriormente apresentam um risco transmissão inferior, no entanto, no caso de reinfeção com uma nova estirpe a taxa de transmissão pode ser a mesma que a de uma primoinfeção. De tal modo que de todas as infeções congénitas, 70 a 80% dos recém-nascidos são descendentes de mulheres que já eram seropositivas para HCMV anteriormente à conceção. As glicoproteínas do invólucro podem ser usadas para identificar infeções

secundárias/reinfecções dada a grande variedade genética presente nestes genes, pois as glicoproteínas são alvos de neutralização por parte dos anticorpos do hospedeiro, estando envolvidas na entrada e disseminação do vírus, tendo um padrão específico consoante a estirpe envolvida (Halwachs-Baumann et al. 2018).

Através das diferenças no gene da gB, as estirpes podem ser organizadas em quatro genótipos diferentes gB1, gB2, gB3, gB4. No caso das infeções congénitas o genótipo correspondente à glicoproteína B tipo 1 é o mais frequentemente encontrado, seguindo-se o gB3, gB2 e gB4 (Halwachs-Baumann et al. 2018; Puhakka et al. 2020).

Para além dos polimorfismos que se verificam no gene *UL55*, também se pode verificar no gene *UL73*, que codifica a gN, existindo igualmente quatro tipos de gN, em que todas elas podem causar infeção congénita, sendo a mais frequente a gN4 e a menos frequente a gN2. Segundo alguns autores, os genótipos da gN podem estar associados com a virulência da estirpe de HCMV e consequentemente o desenvolvimento de sequelas nos recém-nascidos com infeção congénita. Num estudo desenvolvido em 2010 por Pignatelli et al., verificou-se que os recém-nascidos com o genótipo gN4 apresentavam sintomatologia à nascença e sequelas, enquanto que os recém nascidos infetados com as estirpes gN1 e gN3 eram assintomáticos à nascença e um prognóstico favorável a longo termo, tal como mencionado em estudos anteriores (Halwachs-Baumann et al. 2018; Pignatelli et al. 2003; Rossini et al. 2005). Porém, Puhakka et al. afirmam que os diferentes genótipos das glicoproteínas de invólucro não estão associados a infeções sintomática ou assintomáticas, nem têm relação direta com alterações do desenvolvimento neuro-motor, quando se recorre as Escalas de Desenvolvimento Mental de Griffiths.

Quanto à associação do genótipo a uma zona geográfica, num estudo realizado onde foram comparadas 223 estirpes de todo o mundo, não foi possível realizar esta associação nem descobrir uma origem comum. No entanto, é possível afirmar-se que ocorrem múltiplas infeções, dado detetar-se mais do que uma estirpe numa só pessoa, quer esta seja um indivíduo imunocomprometido ou imunocompetente (Morcarski et al. 2013).

1.4.1.2. Transmissão

A transmissão do HCMV, pode ser feita através de vários fluidos biológicos como a saliva, urina ou outros fluidos biológicos como secreções orofaríngeas, colostro, leite materno, lágrimas, sémen ou secreções cervicais e vaginais, transplante de órgãos e mais raramente transfusão de sangue e derivados (McCarthy et al. 2009; Morcarski et al. 2013)., podendo assim ocorrer por transmissão vertical e/ou horizontal.

1.4.1.2.1. Transmissão Vertical

A transmissão vertical consiste na transmissão da infeção da mãe para o feto ou recém-nascido (criança com tempo de vida compreendido entre o nascimento e os primeiros vinte e oito dias de vida), por três vias, 1) durante a gravidez, através da placenta, 2) durante o parto, por contacto com sangue ou fluidos cervicais e 3) no período pós-parto, pelo aleitamento ou saliva (Boppana 2006; Domachowske and Abuali 2019).

A transmissão congénita pode ocorrer após uma primoinfeção materna, reativação ou reinfeção, aumentando a sua taxa de transmissão ao longo dos trimestres da gravidez, dado o aumento de permeabilidade placentária associada ao aumento dos vasos sanguíneos. No primeiro trimestre a transmissão ronda os 30 a 40%, no segundo 38-44% e no terceiro verifica-se a maior taxa de transmissão 59-73%. No entanto, o risco de infeções congénitas e afetações do feto está mais associado a infeção primária e/ou às que ocorram no primeiro trimestre pela vulnerabilidade das células fetais à replicação do HCMV e falta de imunidade materna (Adler et al. 2004; Nigro 2017). De entre as infeções verticais, a infeção congénita, adquirida por transmissão placentária, é a mais preocupante devido às consequências que dela podem resultar, sendo a surdez neurosensorial a mais frequente.

No caso das infeções que sucedem no período pós-parto, estas resultam normalmente de infeções maternas recorrentes e não de primoinfeções, sendo que a forma de transmissão mais frequente é devida à ingestão do leite materno, pois 67-97% das puérperas HCMV-seropositivas excretam o vírus neste líquido biológico (Johnson et al. 2012; Lawrence 2006). A excreção viral pelo leite materno pode ocorrer até seis meses após o parto, sendo, no entanto, mais comum entre a segunda e décima segunda semana pós-parto (Boppana 2006; Morcarski et al. 2013; Yamamoto, Mussi-Pinhata, and Figueiredo 1999).

Por fim, a transmissão perinatal da infeção é possível de ocorrer durante o parto pelo facto de, aproximadamente, 10% de todas as mulheres seropositivas excretarem HCMV nas secreções vaginais e cervicais. Na altura do parto estas percentagem variam entre 2% a 28%. A transmissão vertical por secreções vaginais/cervicais no período perinatal é verificável em 50% das crianças descendentes de mulheres seropositivas com excreção viral ativa, pelo contacto direto com estes fluídos (Morcarski et al. 2013; Yamamoto et al. 1999). Estas taxas de excreção cervical e vaginal de HCMV variam ao longo da gravidez, sendo normalmente mais baixas no início da mesma, podendo aumentar conforme o estabelecimento da imunossupressão temporária associada à gravidez, esta imunossupressão está frequentemente dependente dos níveis de estrogénios e progesterona de modo a evitar a rejeição fetal (Boppana 2006; Nigro 2017). É de notar que estas duas formas de transmissão perinatal têm períodos de disseminação que variam entre os 4 a 12 meses e não estão, normalmente, associadas a infeções sintomáticas ou à morbilidade da infeção, exceto em casos de recém-nascidos prematuras com baixo peso. Contudo, qualquer tipo de transmissão vertical apresenta um grande impacto na epidemiologia do HCMV, dado que as crianças infetadas in útero, durante o parto ou durante o aleitamento irão excretar o vírus durante anos, tornando-se uma fonte de contágio para outras crianças, educadores de infância, familiares ou qualquer outra pessoa, através das diferentes vias de transmissão (Boppana 2006; Morcarski et al. 2013; Onorato et al. 1985).

1.4.1.2.2. Transmissão Horizontal

A transmissão horizontal pode ser dividida em subgrupos de transmissão, como transmissão nosocomial e transmissão na comunidade, havendo sempre o contato direto ou indireto, por objetos ou fluidos biológicos contaminados.

Em relação à transmissão nosocomial, os transplantes de órgãos ou a administração de derivados sanguíneos, como concentrados de eritrócitos ou plaquetas, são considerados os meios de transmissão mais importantes nos hospitais, aumentando o risco de doença em recém-nascidos e doentes imunocomprometidos (Boppana 2006; Onorato et al. 1985). Recém-nascidos com baixo peso, inferior a 1,250 Kg, ou politransfundidos, apresentam um maior risco de infeção, pelo que devem ser administrados sangue ou órgãos de dadores seronegativos para HCMV. No caso do sangue e seus hemoderivados esta preocupação não é requerida em Portugal dado todas as unidades de hemoderivados já serem desleucocitadas por rotina (EU Optimal Blood Use 2010; Onorato et al. 1985). Dado o HCMV poder ser transmitido através de todos os fluidos biológicos, não sendo o sémen uma exceção, como medida preventiva a Sociedade de Fertilização Americana recomenda o rastreio serológico a todos os dadores de sémen (Boppana 2006; Onorato et al. 1985). No caso de profissionais de saúde não se verifica um aumento do risco de infeção nem de transmissão, o que aponta para medidas preventivas de disseminação como a higienização (Morcarski et al. 2013).

Quanto às transmissões horizontais, destaca-se a transmissão criança para criança, criança para adulto ou adulto para adulto. Independentemente da forma de transmissão, a pessoa infetada irá excretar o vírus durante meses ou anos, de forma intermitente ou continua. O período de excreção está normalmente dependente da idade e estado imunológico do infetado, sendo este período superior nas crianças (Morcarski et al. 2013).

Segundo diversos estudos, existe uma grande incidência na disseminação do HCMV em creches e/ou infantários, causada pela transmissão viral de criança para criança, através de contacto direto ou indireto com saliva e urina contaminadas, por via da partilha de chucas ou brinquedos. As altas taxas de seroprevalência e excreção viral do HCMV, da infeção não congénita, são normalmente verificadas em crianças com idades compreendidas entre os 12 a 36 meses, podendo o HCMV ser excretado por um período de até 2 anos, havendo assim um aumento no risco de contágio das restantes crianças, educadoras e familiares próximos. Segundo alguns estudos, existindo um membro da família que tenha sero-convertido a taxa de infeção para os restantes membros familiares suscetíveis em seroconverter seria de 53% em 6 meses. Deste modo as crianças que frequentem estes espaços podem aumentar o risco de seroconversão das mães grávidas e consequentemente transmissão aos fetos (Stuar P. Adler 1988; Morcarski et al. 2013).

No caso da transmissão adulto-adulto esta ocorre mais frequentemente a partir da adolescência, na população sexualmente ativa, sendo o contacto íntimo um meio importante de transmissão (Adler et al. 2004; Morcarski et al. 2013). É sabido que a excreção viral do HCMV ocorre em 7% da população adulta saudável seropositiva, aumentando para 20% no caso de pessoas com diversos parceiros sexuais ou portadoras de outras doenças sexualmente transmissíveis (Morcarski et al. 2013).

1.4.1.3. Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas desta infeção podem ser muito variáveis, sendo a maioria das infeções assintomáticas. No entanto, apesar de menos frequente, em alguns casos é possível

verificar uma síndrome gripal, síndrome mononucleosica ou mesmo síndromes graves como no caso dos imunocomprometidos (Morcarski et al. 2013; Peres et al. 2016).

A síndrome mononucleosica por HCMV, nos adultos, é caracterizada por febres entre os 39°C e 40°C por períodos superiores a 10 dias, mialgias, prostração, cefaleias e fadiga. No entanto, a presença de sinais e sintomas como os associados à mononucleose por EBV, faringite, adenopatias e esplenomegalia, são raras na síndrome provocada por HCMV, à exceção dos prematuros. A nível laboratorial é comum observar-se no leucograma e esfregaço sanguíneo uma linfocitose com linfócitos atípicos, enquanto nos parâmetros bioquímicos é frequente a elevação das transaminases e bilirrubinas (Morcarski et al. 2013).

A infeção congénita pelo citomegalovírus humano é considerada a principal causa de surdez neurossensorial adquirida, tal como de malformações congénitas, paralisia cerebral, atrasos no desenvolvimento cognitivo, malformações oftalmológicas e atrasos psicomotores. Como mencionado anteriormente, no ponto 1.4.1. “Infeção congénita pelo Vírus Citomegálico Humano”, a maioria dos recém-nascidos infetados não apresentará qualquer sintomatologia à nascença ou terá uma sintomatologia mínima e não específica como baixo peso, idade gestacional ligeiramente inferior ou trombocitopenia isolada, não levando a uma suspeita clínica e subsequentemente a um diagnóstico. Esta infeção congénita tem um grande peso sobretudo a nível da morbilidade infantil, de tal modo que 60-90% das crianças que nascem sintomáticas e 10-15% das que nascem com infeção assintomáticas irão desenvolver uma ou mais sequelas neurológicas ou oftalmológicas ao longo dos primeiros anos de vida. Na totalidade das infeções congénitas, são observados atrasos cognitivos em 50-80% dos nascimentos, perdas auditivas em 30-60%, danos visuais em 20-35% e afetação neurológica e motora em 30-60% (Morcarski et al. 2013; Peres et al. 2016). Alterações imagiológicas cerebrais poderão ser encontradas em 5% a 20% das crianças assintomáticas, nestas alterações estão incluídas calcificações, leucomalácia periventricular e ventriculomegália (Harrison 2015).

Apesar de não existir um critério de definição estabelecido para a doença sintomática por HCMV, diversos estudos têm vindo a ser desenvolvidos no intuito de obter informação de quais os sintomas mais e menos frequentes à nascença. Como sintomatologia mais frequente é possível observar, atrasos no desenvolvimento intrauterino, baixo percentil para o tamanho e idade gestacional, hepatoesplenomegália com ou sem hepatite, petéquias, icterícia, microcefalias. Nos achados laboratoriais verifica-se aumento das transaminases, hiper-bilirrubinemia conjugada e trombocitopenia (Halwachs-Baumann et al. 2018; Marsico and Kimberlin 2017). Como sintomatologia e achados clínicos menos frequente tem-se a hidrúpsia fetal, anemia hemolítica, miocardite, colite, letargia associada a achados neurológicos e convulsões. No entanto, estes sinais e sintomas apesar de não serem frequentes têm uma prevalência superior em prematuros, idade gestacional inferior a 32 semanas, podendo nestes casos acrescentar-se a esta lista um quadro “sepsis-like”, pneumonia e morte fetal (Harrison 2015).

A nível da mortalidade associada ao HCMV existe uma taxa que ronda os 30% dos recém-nascidos mais afetadas, estando estas mortes relacionadas com disfunções hepáticas, hemorragias intracranianas, coagulação intravascular disseminada ou infeções bacterianas

secundárias, sendo que estas mortes ocorrem normalmente nos 3 primeiros meses de vida (Halwachs-Baumann et al. 2018; Harrison 2015).

As manifestações mais devastadoras são as que interferem com desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), pelo facto de os danos neste sistema serem irreversíveis. A infeção congénita por HCMV, para além de ser considerada a principal causa de surdez neurosensorial não genética tem vindo a ser reportada como a causa viral mais frequente de atrasos no desenvolvimento neurológico (Marsico and Kimberlin 2017). A infeção no SNC terá uma fase aguda e posteriormente um processo de cicatrização e calcificação; estes danos serão perceptíveis através de dificuldades na sucção, hipertonia, hipotonia, microencefalias ou crises convulsivas. Outras alterações neurológicas podem ainda ser verificadas como lesões multifocais, aumento ventricular, atrofia cerebral e encefalopatias. Estas alterações poderão ser detetadas através de ressonâncias magnéticas, tomografias computacionais ou ecografias, poderá ainda recorrer-se a métodos mais sensíveis para deteção de alterações na resposta auditiva, visual e sensorial.

A nível oftalmológicas o HCMV pode desencadear deficiências visuais e estrabismo causadas por coriorretinite, atrofias óticas, cicatrizes maculares, defeitos na córnea (Halwachs-Baumann et al. 2018; Peres et al. 2016) .

Como já mencionado a infeção congénita por HCMV é a principal causa de surdez de origem não genética em crianças. Esta sequela pode estar presente à nascença ou surgir tardiamente (Marsico and Kimberlin 2017) , sendo de carácter neurosensorial com características progressivas ou flutuantes, possivelmente associadas com a latência e reativação viral e consequente a resposta inflamatória local por parte do hospedeiro. As crianças sintomáticas apresentarão maioritariamente perda auditiva bilateral, enquanto as crianças assintomáticas a perda auditiva unilateral encontra-se em predomínio (Halwachs-Baumann et al. 2018). Contudo, de todas as crianças infetadas 50% irão sofrer perdas auditivas graduais ou abruptas nos primeiros 6 anos de vida, apesar de ser mais comum o aparecimento destas sequelas nos primeiros 33 meses de vida em crianças sintomáticas e nos primeiros 44 meses em crianças assintomáticas (Halwachs-Baumann et al. 2018; Marsico and Kimberlin 2017) . Por este motivo é de extrema importância o seguimento e acompanhamento destas crianças durante os primeiros 10 anos de modo a avaliar, de forma a reduzir e intervir o mais cedo possível no aparecimento de sequelas tardias (Domachowske and Abuali 2019; Halwachs-Baumann et al. 2018; Peres et al. 2016).

Nas ecografias pré-natais, podem verificar-se alterações no feto como intestino hiperecogénico, ascite, espessamento da placenta, calcificações hepáticas ou cerebrais e morte intrauterina. Nos achados laboratoriais do líquido amniótico, sangue do cordão umbilical ou sangue fetal é possível a determinação de HCMV por reação em cadeia de polimerase (PCR do inglês *Polimerase Chain Reaction*) (Harrison 2015).

Como já mencionado, as infeções peri e pós-natais não desencadeiam uma grande taxa de morbilidade nas crianças infetadas, contudo poderão estar associadas a pneumonias intersticiais de gravidade variável, hepatoesplenomegalia, linfocitose atípica, anemia, linfadenopatias e exantemas em crianças prematuras (Peres et al. 2016).

1.4.1.4. Prevenção da Infecção

Ainda não existem medidas de erradicação do risco de infecção, no entanto existem ações que permitem minimizar a transmissão, devendo estas ser implementadas em diferentes grupos e de diferentes formas. Está comprovado que a prevenção materna é um dos fatores mais importantes para a redução da prevalência da infecção congénita e, deste modo, para reduzir a incidência mundial destas infeções é necessária a iniciativa de diversas decisões estratégicas preventivas de disseminação na comunidade como medidas de higiene, imunização passiva ou ativa (Adler et al. 2004; James and Kimberlin 2016).

O primeiro passo para a prevenção de uma infecção consiste na implementação de informação à comunidade sobre a infecção por HCMV, que é pouco conhecida por parte da população comum. Em estudos realizados sobre o conhecimento desta infecção por parte da população, verificou-se que apenas 13 a 22% das mulheres e 7% dos homens sabem da existência do HCMV e possíveis afetações, sendo uma percentagem de conhecimento muito inferior às de outras condições/infeções na infância, podendo ser demonstrado pela percentagem de conhecimento da população sobre o HIV, cerca de 98% da população tem conhecimento da infecção crónica apesar de esta na atualidade ser muito mais controlada. Na figura 1.4 pode observar-se a percentagem de conhecimento por parte das mulheres sobre diferentes agentes infecciosos, doenças e condições de saúde que podem afetar o recém-nascido (Cannon et al. 2012; Halwachs-Baumann et al. 2018).

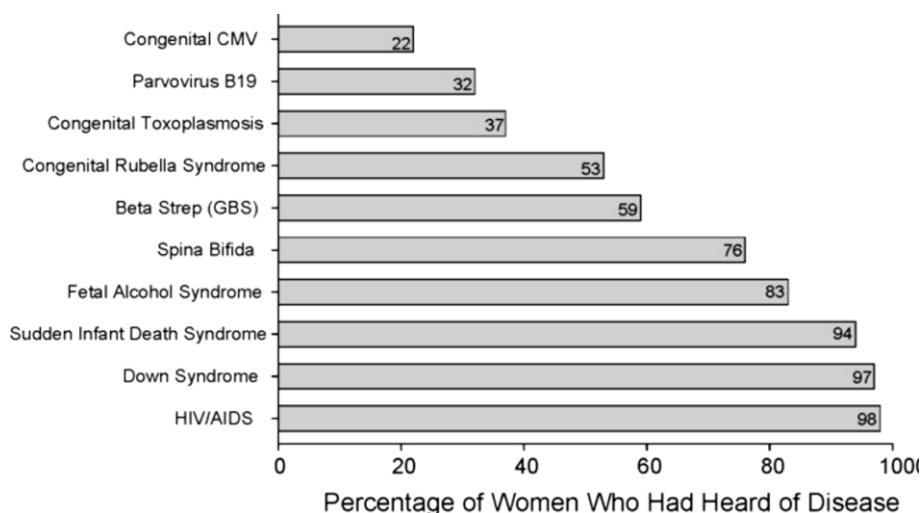


Figura 1.4 – Percentagem de mulheres com conhecimento sobre diferentes doenças, transmissão e prevenção. Retirado de Cannon 2009. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness, *Journal Clinical Virology*, p.7.

As taxas de conhecimento sobre o HCMV variam de forma significativa consoante idade, etnia, região demográfica, graus de escolaridade, no entanto, apenas 22% das mulheres com graus de escolaridade superiores têm conhecimento da infecção congénita por HCMV (Cannon et al. 2012).

1.4.1.4.1. Medidas de Higiene

Dada a inexistência de uma vacina e/ou tratamento consensualmente aceite e aprovado para administração em grávidas, fetos e recém-nascidos recorre-se a medidas de prevenção primária, ou seja, identificação e fornecimento de informação adequada através de intervenções educacionais de implementação de medidas de higiene, havendo diversos estudos que demonstram uma redução da transmissão em grupos que interiorizam e seguem estas ações (Halwachs-Baumann et al. 2018; Onorato et al. 1985). Estes programas de prevenção têm vindo a ser realizados ao longo dos anos em grupos de grávidas nos quais se conseguem alcançar as mesmas conclusões, uma diminuição das taxas de seroconversão da grávida quando lhes são fornecidas informações de higiene detalhadas, tal como sobre a infeção por HCMV no início da gravidez, levando a uma redução na contração de infeção por HCMV e consequentemente a diminuição de fetos infetados (Vauloup-Fellous et al. 2009).

As medidas de higiene devem ser interiorizadas principalmente por grávidas, mulheres que pretendam engravidar (Adler et al. 2004; Revello et al. 2015), educadores de infância/amas, no entanto devem também ser partilhadas com os pais e familiares próximos. Essas medidas são 1) lavar as mãos após a muda de fraldas, alimentar, assuar ou lavar as crianças, manusear brinquedos ou chuchas, 2) não partilhar utensílios de higiene ou alimentação com a criança, 3) não beijar a criança na boca ou região peri-bocal, 4) limpar frequentemente os brinquedos ou qualquer área que tenha estado em contacto com saliva ou urina (Harrison 2015; Vauloup-Fellous et al. 2009).

Existem outros fluxos ideacionais que afirmam que as medidas de higiene deveriam recair também no leite materno, embora estas medidas se refiram à transmissão perinatal e não à infeção congénita. Relativamente ao leite materno, dados os inúmeros benefícios comprovados no desenvolvimento de órgãos, sistema imunitário, sistema neurológico e dadas algumas propriedades anti-inflamatórias para os recém-nascidos, esta fonte nutricional não lhes deverá ser privada caso as mães sejam seropositivas para o HCMV dado o risco de excreção viral. Contudo, cerca de 4,3-4,5% dos recém-nascidos prematuros com idades gestacionais inferiores a trinta semanas e peso à nascença inferior a 1500 gramas, filhos de mães seropositivas para HCMV, desenvolverem uma de síndrome “sepsis-like” por infeção de HCMV após ingestão de leite materno (Hayashi et al. 2011; Lanzieri et al. 2013). Alguns autores defendem que seria benéfico a inativação viral do leite materno antes de alimentar estes recém-nascidos, permitindo o corte de um dos ramos da cadeia de transmissão vertical. Nestes estudos desenvolvidos com o intuito de inativar o HCMV no leite, são abordadas técnicas como a pasteurização, a congelação, a exposição a ultravioletas ou microondas (Bardanzellu, Fanos, and Reali 2019; CDC Centers for Disease Control 2020a). Segundo alguns autores a pasteurização é uma boa técnica para a prevenção da transmissão da infeção, sendo abordado duas formas diferentes de a executar, uma pasteurização com exposição prolongada que consegue eliminar por completo o HCMV por degradação de ácidos nucleicos. Esta técnica requer uma exposição de trinta minutos a uma temperatura entre os 62.5-63°C o que conduz a uma alteração na composição do leite com redução das propriedades nutricionais, imunológicas e endocrinológicas. A outra técnica de pasteurização apresenta uma exposição

menor no tempo, mas a temperaturas elevadas (72°C por 5-15 segundos), permitindo a inativação do HCMV com menor comprometimento das propriedades imunológicas e nutricionais. A técnica de congelação não altera a composição do leite, porém quanto à eficácia da eliminação viral os estudos desenvolvidos são discordantes, havendo alguns que indicam que a congelação a -20°C por vários dias é eficaz enquanto outros indicam que esta técnica não elimina o risco de transmissão, apenas permite verificar uma diminuição na carga viral, havendo assim a possibilidade de transmissão. Quanto às técnicas de irradiação com ultravioletas, no caso dos ultravioletas-C, foi demonstrada a preservação de vários componentes estruturais do leite, no entanto a erradicação não é completa existindo a necessidade de desenvolver mais estudos sobre os efeitos secundários a nível imunológico, nutricional e da bioatividade celular para além de ser tecnologia não acessível à população em geral. Por outro lado, o uso de microondas de alta potência consegue eliminar por completo o vírus, no entanto diminui os componentes imunológicos do leite (Bardanzellu et al. 2019; Lawrence 2006).

Em suma, quanto à prevenção da transmissão pelo leite materno, não existem recomendações contra a amamentação por parte de mães seropositivas para HCMV nem um método ou técnica aceite e totalmente eficaz na eliminação viral, havendo a necessidade de mais estudos e metodologias que não interfiram nos benefícios que este produto acarreta para os recém-nascidos.

1.4.1.4.2. Imunização Passiva

A imunização passiva consiste na administração de anticorpos a um indivíduo não imune que foi exposto a uma infeção/doença à qual a imunização ativa não se encontra disponível, está contraindicada ou não tenha sido administrada anteriormente ao contacto com o agente causador da doença ou infeção; deste modo, fornece-se uma proteção imediata. Para a imunização passiva são habitualmente usados produtos como imunoglobulinas *standard*, imunoglobulina hiperimune, soros, antitoxinas, e anticorpos monoclonais (Tavares, Ribeiro, and Oliveira 2005). Desempenhando-se uma ação protetora direta por neutralização ou indireta, por ativação da via de complemento e de células citotóxicas (Cekinović et al. 2008).

A presença de anticorpos maternos contra o HCMV é considerada importante na proteção da infeção congénita, porém não é totalmente protetora para o feto, sendo este facto confirmado pela existência de casos de infeção congénita em mulheres com IgG para este vírus. No entanto é sabido que a presença destes anticorpos reduz a severidade e risco de transmissão da infeção (Adler et al. 2004; Onorato et al. 1985). Neste sentido, desenvolveu-se a imunoglobulina hiperimune específica para HCMV (HCMV-HIG), que consiste num produto estéril de proteínas plasmáticas, com concentração aproximada de 60mg/mL, em que 98% corresponde imunoglobulinas da classe G (IgG). Estas preparações intravenosas são obtidas através de várias doações plasmáticas de dadores com altos títulos de anticorpos (Ac.) IgG neutralizantes de alta avidéz. Este composto contém ainda a capacidade imunomoduladora que envolve o sistema de complemento, atividade e expressão de citoquinas, ativação de linfócitos (McCarthy et al. 2009; Nigro 2017; Nigro and Adler 2020).

Em 2005, num estudo não aleatorizado realizado por Nigro et al., demonstrou-se que a administração da CMV-HIG a mulheres grávidas com primoinfeção diminuía as taxas de transmissão ao feto de 40% para 16%, e o risco de infecção congénita de 50% para 3%. Dado os resultados promissores apresentados no estudo mencionado e noutros com resultados idênticos, diversos estudos neste âmbito têm vindo a ser desenvolvidos com o intuito de tratamento ou prevenção da infecção congénita através da administração da HIG (Revello et al. 2014). Se os resultados se comprovassem num ensaio clínico, mesmo com uma taxa de eficácia na redução da infecção congénita que rondasse os 47%, recompensaria o custo da introdução do rastreio universal e o tratamento para infecção primária (Lazzarotto et al. 2020).

Diversos estudos demonstraram que uma infecção por HCMV durante a gravidez altera a espessura placentária com precursões negativas no fornecimento de nutrientes e aporte de oxigénio ao feto. Deste modo, e segundo o estudo de Nigro et al. de 2005 a administração da CMV-HIG seria benéfica para o feto pois permitiria a diminuição das cargas virais placentárias e em circulação na gestante dada a capacidade desta imunoglobulina em inibir a replicação viral por neutralização ou efeito imunomodelador, contribuindo assim para a diminuição do risco infecção congénita. No entanto, há estudos que demonstram que esta administração acarreta maiores riscos que benefícios à gravidez, como partos prematuros, restrição do crescimento intrauterino, eclampsia pós-parto (Khalil, Jones, and Ville 2017; Nigro et al. 2005; Revello et al. 2014). Deste modo houve a necessidade de desenvolver ensaios clínicos aleatórios, controlados, em larga escala com uma população diversificada de modo a poderem retirar-se conclusões consensuais quanto à possível administração da CMV-HIG.

Entre 2011 e 2021 decorreu nos EUA um ensaio clínico aleatório e controlado sobre a administração da CMV-HIG na prevenção e tratamento de transmissão vertical do HCMV (ClinicalTrials.gov, NCT01376778), no qual foi demonstrado que a administração da imunoglobulina hiperimune após as 24 semanas gestacionais não diminui a incidência da infecção congénita nem a morte perinatal quando comparado o grupo de intervenção com o grupo placebo, não sendo assim recomendado a uso da globulina hiperimune na prevenção da infecção congénita em grávidas com primoinfeção (Hughes et al. 2021). Na Europa, encontra-se a decorrer um ensaio clínico com a mesma finalidade (ClinicalTrialsRegister.eu, EudraCT No. 2007-004692-19) (EU Clinical Trials Register n.d.).

Apesar do recente resultado obtido no estudo americano, alguns autores defendem que só após o término do ensaio europeu, com resultados favoráveis à diminuição da infecção congénita, haverá consenso sobre a CMV-HIG na prevenção ou tratamento da infecção congénita (Marsico and Kimberlin 2017).

1.4.1.4.3. Imunização Ativa

O desenvolvimento de uma vacina contra o HCMV tem vindo a ser um desafio desde há 40 anos, sendo apontado como uma das prioridades do século vinte e um, na consequência das limitações e dificuldades de implementação das medidas preventivas a toda a população (Johnson

et al. 2012), juntamente com os custos associados e os impactos que esta infecção tem na qualidade de vida da população (Harrison 2015).

A vacina ideal seria aquela com capacidade de reduzir o impacto da infecção por HCMV através da proteção a pessoas seronegativas e ser capaz de induzir um estado imunitário que prevenisse reativações ou reinfeções (Marsico and Kimberlin 2017). Estas vacinas devem induzir a imunidade celular e humoral, pois o envolvimento de ambos os ramos do sistema imunitário são essenciais para a prevenção da doença, sendo que as proteínas mais apelativas a incluir numa vacina contra o HCMV são as glicoproteínas de superfície gB e gH, a proteína do tegumento pp65 e as proteínas não estruturais da fase imediatamente precoce (Pass and Burke 2002).

Existem diversas vacinas em estudo contra o HCMV, podendo estas ser agrupadas em cinco grupos distintos, vacinas vivas atenuadas, vacinas de subunidades, vacinas por vetores, vacinas com partículas subvirais e vacinas de ácidos nucleicos (Fowler, Stagno, and Pass 2003; Marsico and Kimberlin 2017).

As vacinas de subunidades podem ainda ser agrupadas em três categorias, proteicas, péptidicas e VLPs (do inglês, *enveloped virus-like particles*). A vacina gB/MF59, que se encontra em estudos de fase II, consiste numa vacina de subunidades proteica que combina a capacidade imunogénica contra o complexo glicoproteico B, que contém pelo menos sete epítomos neutralizantes e outros que estimulam linfócitos T citotóxicos, e o adjuvante MF59, que consiste numa emulsão de óleo em água de modo a ajudar a induzir uma melhor resposta imune (Adler 2013; CDC Centers for Disease Control 2021). Esta vacina é considerada como segura e imunogénica, no entanto tem a capacidade de induzir uma maior resposta em crianças do que em adultos, tendo sido eficaz em apenas 50% das mulheres jovens seronegativas, o que não deixa de apresentar um resultado promissor (Adler 2013). Nos estudos e ensaios clínicos realizados até à data, é sugerido a administração de três doses (Schleiss, Permar, and Plotkin 2017). No entanto, dado a grande diversidade genética e molecular das várias estirpes, suspeitava-se ser pouco provável que esta vacina com apenas um componente antigénico conseguisse deter uma ampla capacidade imunogénica para proteger contra qualquer infecção causada por HCMV (James and Kimberlin 2016). Neste seguimento, apostou-se em vacinas multivalentes, de modo a tentar aumentar a capacidade imunogénica. Uma das tentativas consistiu em produzir a vacina gB/pp65, mas que, ao contrário do esperado, possuía uma menor capacidade indutora de anticorpos quando comparada com a gB/MF59, para além de não reduzir a transmissão placentária da infecção (James and Kimberlin 2016).

As vacinas VLPs consistem em estruturas proteicas que mimetizam o vírus selvagem, mas não contêm genoma viral. As vacinas VLP propostas apresentam diferentes combinações da gB com o CP¹ das glicoproteínas gH/gL/UL128/130/131, gM e gN (Schleiss et al. 2017). A gB é uma glicoproteína conservadora em diferentes estirpes virais, e considerada também o maior alvo de neutralização pelos anticorpos; no entanto, pensa-se que o CP¹ apresenta também um papel fundamental na resposta de neutralização pelos anticorpos neutralizantes (Manicklal et al. 2013). Já as vacinas de péptidos usam fragmentos de proteínas com capacidade de induzir o sistema imunitário (Chiurchiu et al. 2013), em específico as células T citotóxicas, pois está demonstrado

que estas são importantes na proteção da transmissão placentária e de doença fetal (Schleiss et al. 2017).

A vacina Towne é uma vacina viva atenuada, que advém de uma estirpe isolada de uma criança com infecção congênita, estirpe esta que foi atenuada por diversas passagens em cultura de fibroblastos. Deste modo a vacina Towne é uma vacina viva atenuada, que não reativa, não produz virémia nem excreção viral para além de ter uma reatogenicidade limitada, ou seja, a capacidade de a vacina causar uma reação adversa local ou sistêmica é reduzida (Adler 2013; Hervé et al. 2019; Pass and Burke 2002). Esta vacina para além de ser considerada segura tem a capacidade de induzir anticorpos neutralizantes por períodos mínimos de 84 meses e induz ainda uma resposta imune celular apesar de limitada, tal como na vacina gB/MF59 a indução de anticorpos na crianças é superior à dos adultos (Adler 2013). No entanto a vacina Towne falhou na prevenção de infecção após transplantes e em mulheres com filhos que frequentem creches (Chiurciu et al. 2013). De modo a aumentar a imunogenicidade e capacidade protetora desta vacina, criou-se quatro vacinas quiméricas Towne-Toledo, vacinas que contêm uma parte do genoma da Towne e parte da Toledo, estando estas em estudo de fase I. A parte Toledo desta vacina quimérica deriva de um isolado de HCMV, não atenuado, com capacidade de causar doença quando fornecido em grandes doses. No entanto, até à data esta vacina não demonstrou replicação viral e os participantes demonstram boa tolerância (Adler 2013; Chiurciu et al. 2013).

Nas vacinas de vetores contra o HCMV, usa-se a estrutura de outros vírus para apresentar proteínas, antígenos ou genes imunogénicos específicos do vírus ao qual queremos induzir imunidade. Neste caso, as combinações mais usadas recaem no uso da gB, pp65 e dos genes imediatamente precoces. Numa das formulações assentes nesta tipologia de vacina, fez-se uso do vírus da varíola aviária que permite a inserção de genes externos no seu DNA, tendo a vantagem de não conseguir concluir o seu ciclo replicativo em humanos, ou seja, nas células infetadas há a transcrição dos genes precoces, no entanto não são formados viriões. Contudo, apesar de segura, dado a transcrição limitada, esta vacina não produziu títulos de anticorpos neutralizantes suficientes (Pass and Burke 2002; Schleiss et al. 2017). Outros potenciais vetores são os alphavírus, adenovírus e outros vírus da varíola (Chiurciu et al. 2013). Um dos projetos de vacina de vetores mais recente consiste na utilização do vírus atenuado da coriomeningite linfocítica como apresentador da gB e pp65, o estudo de fase I já terminou e demonstrou capacidade de induzir anticorpos neutralizantes para além de que as pessoas envolvidas neste estudo apresentam resposta específicas contra gB e pp65 (Schleiss et al. 2017).

Quanto às vacinas de ácidos nucleicos temos como exemplo a vacina mRNA (mRNA1647) que se encontra em avaliação da segurança e imunogenicidade, ou seja, em estudo de fase II, estando a mesma registada como NCT04975893 (Clinicaltrials.gov 2021a). Esta vacina combina seis RNAs mensageiros, em que cinco deles codificam as subunidades do complexo pentamérico do HCMV e outro codifica a proteína gB, dado estes serem essenciais à entrada do HCMV nas células epiteliais (Moderna Inc 2020). Nesta tipologia de vacinas existe ainda a vacina ASP0113, que é uma vacina de DNA direcionada para a gB e pp65, através de dois plasmídeos em que um deles codifica para a proteína pp65 com uma alteração na proteína quinase e o outro codifica para

uma porção da gB da estirpe AD169. Na fase I desta vacina não se verificou efeitos adversos para os participantes, no entanto verificou-se pequenas alterações nas respostas específicas das células T e anticorpos, em que os intervenientes seropositivos apenas apresentaram aumento na resposta das células T para a pp65. Na fase II apresentou ser segura e com capacidade de reduzir de forma significativa a ocorrência e recorrência da virémia (Clinicaltrials.gov 2021b; Schleiss et al. 2017)., Em março de 2021 saíram os resultados da fase III deste estudo, onde não se demonstrou uma vacina tão promissora como outrora aparentava, dado não ser significativamente efetiva na indução da resposta imune para o HCMV (Ljungman et al. 2021).

As vacinas com partículas virais ainda não chegaram aos ensaios clínicos, no entanto, nos estudos pré-clínicos, demonstram capacidade de prevenir infeção em células epiteliais e fibroblastos, promovendo a imunidade celular e humoral a várias proteínas estruturais do HCMV. Estas vacinas não contêm qualquer parte da estrutura da cápside ou genoma, no entanto contêm glicoproteínas virais, proteínas do tegumento e partículas do invólucro, estas são obtidas após a infeção do HCMV em culturas de células (Chiurciu et al. 2013; Schleiss et al. 2017).

1.4.1.5. Diagnóstico

1.4.1.5.1. Na Gestante

Os métodos de diagnóstico laboratoriais disponíveis recorrem à deteção viral, à presença do vírus ou dos seus componentes virais, ou à deteção da resposta do sistema imunitário após contacto direto com o agente etiológico em questão (Gerna, Baldanti, and Revello 2004; Halwachs-Baumann et al. 2018). A determinação serológica das imunoglobulinas G e M específicas é o método *gold standard* para determinação de uma infeção primária para o HCMV através da seroconversão. Este é o método de rastreio usado nas grávidas ou mulheres em processo de conceção. Esta determinação serológica é considerada simples de executar, rápida e precisa, tendo como objetivo principal a determinação do estado imunológico ou diagnóstico de infeção primária (Adler et al. 2004; CDC Centers for Disease Control 2020b; Khalil et al. 2017). No entanto, nos acompanhamentos pré-gestacionais, a determinação do HCMV nem sempre é efetuada.

A presença do anticorpo (Ac.) IgM HCMV apenas fornece informação sobre o contacto com o agente etiológico, pois esta imunoglobulina pode permanecer no sangue durante vários meses após a infeção (Khalil et al. 2017), sendo que em média é detetada até dois meses. No entanto, a sua persistência em circulação dependerá de indivíduo para indivíduo, havendo casos em que a sua presença pode ser detetada até nove meses (Halwachs-Baumann et al. 2018; Saldan et al. 2017); poderá também estar presente em reinfeções e reativações ou ainda em casos de reativação cruzada com outros agentes virais, ou por influência de doenças de foro reumatoide, para além de que esta imunoglobulina pode ser detetada por estimulações policlonais não específicas do sistema imune. Por estes motivos, a sua presença não é um sinal seguro de infeção primária recente (Halwachs-Baumann et al. 2018; Johnson et al. 2012; Khalil et al. 2017). Em relação à IgG, quando esta é detetada recorre-se ao teste da avidéz, para definir se se trata de uma infeção recente ou antiga, pelo facto de este teste expressar a força de ligação entre o anticorpo e o antigénio, que aumenta com o passar do tempo após a primoinfeção (Johnson et al.

2012). Ou seja, este teste determina a proporção de IgG ligada ao antígeno após submetidos a agentes desnaturantes; uma alta avidéz apresenta uma proporção superior a 60%, indicando uma infecção com mais de três meses, enquanto que uma avidéz baixa tem uma proporção inferior a 30%, sugerindo que a infecção decorreu à menos de três meses, dado a maturação total dos anticorpos se verificar por volta das 25 semanas após primoinfecção (Halwachs-Baumann et al. 2018; Khalil et al. 2017). Assim sendo, se todas as grávidas fossem testadas para a avidéz entre as 6 e as 18 semanas de gestação conseguiria identificar-se quais teriam maior risco de ter um feto/recém-nascido com infecção congénita, enquanto que a determinação da avidéz após este período não permite essa correlação dado o tempo que os anticorpos levam a maturar (Halwachs-Baumann et al. 2018). O esquema de diagnóstico pré-natal para a infecção por HCMV encontra-se ilustrado na figura 1.5.

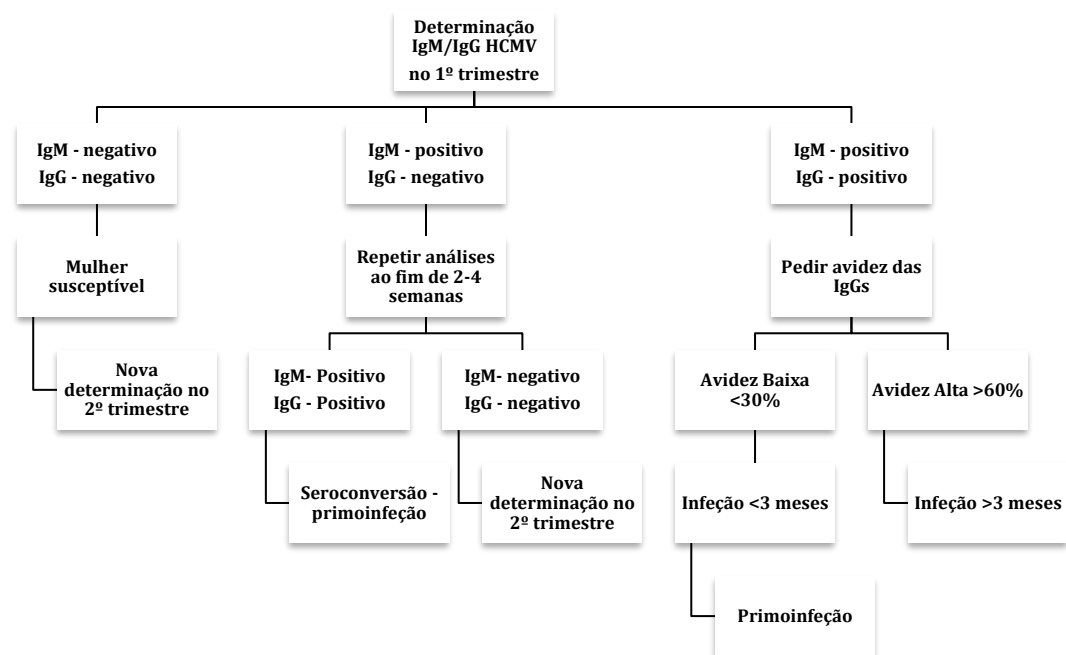


Figura 1.5 – Esquema de diagnóstico pré-natal da infecção por HCMV. Adaptado de Halwachs-Baumann et al. 2018.

Existem ainda outras metodologias para analisar uma infecção por HCMV, contudo não são frequentemente usadas no contexto da grávida devido aos custos. Estas técnicas são a antigenémia, cultura viral e técnicas de biologia molecular, como a PCR. Segundo alguns estudos, a determinação carga viral de HCMV no sangue por PCR seria importante nas grávidas por esta poder servir como indicador de infecção materna recente. Segundo alguns, ela poderia inclusivamente relacionar-se com o atingimento fetal, mas há a necessidade de mais estudos sobre a determinação de cargas virais na grávida e a sua correlação com as sequelas (James and Kimberlin 2016; Nigro and Adler 2020).

1.4.1.5.2. No Feto

A suspeita de infecção fetal por HCMV sucede uma primoinfecção materna ou alterações ecográficas em gestantes seropositivas. Nestes casos, para confirmação, poderá recorrer-se a exames imagiológicos, para além da ecografia, como ressonância magnética, e à deteção e quantificação viral no sangue fetal e no líquido amniótico (Revello and Gerna 2004; Saldan et al. 2017). Segundo alguns estudos, as ecografias realizadas durante a gravidez demonstram uma baixa sensibilidade relativamente ao diagnóstico da infecção congénita, mas podem ser combinadas com ressonâncias magnéticas cerebrais, aumentando assim a sensibilidade e a possibilidade de realizar um prognóstico da infecção, entre as 30 e 34 semanas de gestação (Lazzarotto et al. 2020; Manicklal et al. 2013).

Para confirmação da suspeita, recorre-se com maior frequência à determinação por PCR do HCMV no líquido amniótico (LA), dado o feto excretar HCMV na urina. A amniocentese só deve ser realizada a partir da 20^a ou 21^a semana gestacional e 6 a 8 semanas após a infecção materna, de modo a garantir que a passagem placentária do HCMV ocorreu, passagem esta que requer no mínimo 3 semanas, e o correto funcionamento do sistema renal do feto, evitando assim um resultado falso-negativo (Johnson et al. 2012; Saldan et al. 2017). Alguns estudos indicam que, se a amostra for colhida e conservada nas condições ideais a sensibilidade deste diagnóstico ronda os 100% (Khalil et al. 2017).

A deteção viral no LA pode ser realizada por diferentes metodologias, pelo método convencional que consiste no isolamento viral por cultura celular ou por técnicas de biologia molecular que detetam o genoma viral. A cultura celular foi até recentemente considerada “*gold standard*” para diagnóstico pré-natal de infecção congénita por HCMV, pois esta técnica apresenta uma alta especificidade. No entanto devido à menor sensibilidade, morosidade, processo trabalhoso, e reduzida disponibilidade a todos os laboratórios pelos custos, foi substituída por técnicas de biologia molecular que apresentam alta especificidade e sensibilidade para além de serem técnicas mais acessíveis e menos trabalhosas (Khalil et al. 2017; Revello and Gerna 2004).

Como outra opção pode recorrer-se à cordocentese, técnica que permite a recolha de sangue fetal para deteção e quantificação de cargas virais, antígenos específicos, parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos como IgMs do feto (Nigro 2017; Saldan et al. 2017). A determinação da IgM fetal específica para HCMV permite a realização do diagnóstico pré-natal, dado apresentar alta especificidade, para além de ter sido verificado que a sua presença é mais frequente em fetos com alterações bioquímicas e ecográficas associadas à infecção, apesar da sua baixa sensibilidade. Pode ainda recorrer-se à antigenémia, que consiste na deteção do antígeno viral pp65 nos leucócitos, à DNAémia que é a deteção do DNA viral no sangue e à mRNAémia que consiste na determinação do RNA mensageiro que surge na primeira fase do ciclo replicativo viral (Revello and Gerna 2004). Contudo, existem mais riscos associados à cordocentese em comparação com a amniocentese, sendo que na cordocentese o risco de perda fetal é cerca de duas vezes superior e a sensibilidade e especificidade apresentada é inferior à amniocenteses (Halwachs-Baumann et al. 2018). Deste modo, este método de colheita de produto biológico, apesar de permitir a obtenção de sangue fetal in útero para a deteção do vírus ou seus

componentes, não é recomendado para uso num diagnóstico pré-natal de rotina devido à sensibilidade e especificidade limitada quando comparados com outras técnicas (Revello and Gerna 2004).

1.4.1.5.3. No Recém-Nascido

Existem diversas metodologias que permitem a realização de um diagnóstico de infecção por HCMV nas crianças. Consoante a idade da criança poderá recorrer-se a uma metodologia mais adequada à situação ou finalidade de diagnóstico.

O diagnóstico da infecção congénita deve ser realizado nas primeiras 2 a 3 primeiras semanas de vida do recém-nascido, sendo recomendado pela CDC a pesquisa do DNA viral por técnicas de biologia molecular, mais propriamente por PCR, em amostras de saliva e confirmado o resultado com amostras de urina dado os recém-nascidos infetados in útero excretarem grandes quantidades virais e pelo facto de poder haver contaminação da amostra através do leite materno (CDC Centers for Disease Control 2020b; Chiopris et al. 2020). Contudo, o que é feito por rotina é a pesquisa de DNA viral em amostras de urina.

É de notar que a pesquisa deste agente etiológico pode ser feita noutros produtos biológicos e por outros métodos, apesar de não ser tão frequente, como sangue do cordão umbilical, que é considerada uma amostra pouco fidedigna dada a possibilidade de contaminação por células maternas; sangue fetal, mas com o risco de falsos negativos, dado que a virémia não está presente em todos os recém-nascidos infetados; sangue seco em papel de filtro (*Guthrie Cards*) (Chiopris et al. 2020; Jückstock et al. 2015; Nigro 2017).

A determinação das IgM específicas para HCMV no sangue dos recém-nascidos, à nascença, apresenta alta especificidade, no entanto baixa sensibilidade, pelo facto dos anticorpos do tipo IgM não atravessarem a placenta. No entanto a baixa sensibilidade está associada à imaturidade sistema imunitário dos recém-nascidos, podendo haver um atraso ou falta de produção destes anticorpos por parte do recém-nascido, tanto que a presença de IgM específicos pode variar numa percentagem de 20-70%, não sendo deste modo a melhor abordagem para este rastreio (Halwachs-Baumann et al. 2018; Lunardi, Lorenzoni, and Ghirri 2020; Yan and Fedorko 2002).

O isolamento viral por cultura de células, através de amostras de saliva ou urina, foi durante muito tempo o método de referência. No entanto, esta técnica é laboriosa, dispendiosa, requer manutenção de células para cultura não sendo acessível a todos os laboratórios, o efeito citopático do HCMV pode levar muito tempo a ser verificado, pode haver contaminação pela flora microbiana comensal com efeitos tóxicos para o crescimento viral, tendo sido substituída por outras, inicialmente pela deteção precoce de antígenos por fluorescência ou "*Shell Vial*" que consiste numa técnica de cultura rápida, em células dispostas em monocamada, na qual se submete a amostra a uma centrifugação de baixa velocidade e adiciona-se anticorpos monoclonais para os antígenos precoces, IE1/IE2, do HCMV de modo a detetar a replicação viral ativa e consequentemente as células de cultura infetadas. Através desta técnica os resultados eram obtidos em vinte e quatro horas ao invés das quatro a seis semanas exigidas pela cultura tradicional. Mais tarde estas técnicas de cultura foram substituídas por técnicas de biologia

molecular quantitativas e qualitativas dado exibirem maior sensibilidade. Das diferentes metodologias de PCR que têm vindo a ser usadas para o diagnóstico da infeção congénita por HCMV, como é o caso da *nested* e PCR de tempo real, todas são consideradas técnicas de baixo custo, não tão afetadas pelas condições de transporte e armazenamento das amostras, para além de terem a vantagem da existência de kits comerciais e automatização permitindo a obtenção de resultados em menor tempo útil (Boppana 2006; Chiopris et al. 2020; Marsico and Kimberlin 2017; Murray 2016).

Em casos de surgimento de alterações neurossensoriais ou motoras numa criança em idade pré-escolar, o pediatra poderá suspeitar de sequelas que advieram de uma infeção congénita. Neste caso, dado a idade da criança, mesmo que detetável não seria fiável a determinação do HCMV numa amostra de sangue, urina ou saliva por não se conseguir distinguir entre uma infeção congénita ou pós-natal. Deste modo, a determinação da infeção congénita poderia ser realizada através de amostras sangue seco colhidas nos primeiros dias de vida, como ocorre no despiste de doenças genéticas e metabólicas pelo Teste de Guthrie (Chiopris et al. 2020; Marsico and Kimberlin 2017). Apesar de o DNA viral do HCMV ser estável nestes cartões por cerca de 18 anos (Manicklal et al. 2013), estas amostras na maioria dos países industrializados não são armazenadas por longos períodos de tempo por questões éticas, número de nascimentos anuais, políticas de proteção de dados, acarretando assim uma limitação ao diagnóstico tardio (Cannon et al. 2014). Na Europa, o armazenamento destes cartões varia entre meses a 10 anos, sendo que em Portugal, estes cartões são guardados por um período de 5 anos permitindo assim a possibilidade de um diagnóstico tardio desta infeção congénita (Loeber et al. 2021).

Os resultados deste teste podem acarretar um maior número de falsos negativos dado a sua grande variabilidade de sensibilidade, que poderá estar relacionada com a extração, protocolo de PCR, quantidade de sangue seco e pelo facto de nem todos os recém-nascidos possuírem cargas virais elevadas no sangue à nascença. Consequentemente, um resultado positivo permite diagnosticar uma infeção congénita por HCMV, porém um resultado negativo não a exclui (Chiopris et al. 2020; Marsico and Kimberlin 2017).

1.4.1.6. Tratamento

O tratamento pré-natal assenta em duas vertentes: impedir a transmissão mãe-feto e tratar o feto infetado durante a gravidez de modo a reduzir o risco e severidade da infeção (Khalil et al. 2017).

O tratamento em grávidas infetadas permanece aos dias de hoje controverso e não recomendado. No entanto, diversos estudos têm vindo a ser feitos com valaciclovir (valACV), já existindo evidências de diminuir a circulação viral no feto, aparentando ser seguro para o mesmo, estando também demonstrado em alguns ensaio clínicos (Johnson et al. 2012; Manicklal et al. 2013; Zammarchi et al. 2020), um deles o registado como NCT02351102 (Clinicaltrials.gov 2019), que o uso de valACV oral, 8mg duas vezes ao dia, reduz a transmissão vertical e consequentemente infeção fetal após uma primoinfeção no início da gravidez. Contudo, os próprios autores sugerem que se realizem mais estudos e com uma população mais vasta de modo a

averiguar a duração de tratamento aconselhada e a efetividade ao longo do tempo (Shahar-Nissan et al. 2020). Outro estudo, realizado em França, com recurso a valACV durante a gravidez sugere os mesmos resultados, isto é, que um tratamento precoce poderia ser eficaz na redução viral na gestante e consequentemente diminuição do risco de contração da infeção por parte do feto (Codaccioni et al. 2019).

Apesar de estes avanços clínicos e terapêuticos, continua a haver a necessidade de mais estudos com maior número de intervenientes de modo a confirmar um antiviral que possa ser administrado às grávidas sem afetação do feto, ao contrario do que foi verificado com o ganciclovir (GCV), que apresenta um potencial mutagénico em estudos animais (Manicklal et al. 2013).

Contudo, encontra-se disponível tratamento para recém-nascidos infetados com base na sintomatologia apresentada à nascença, moderada a grave, com o intuito de prevenir o desenvolvimento de sequelas tardias ou atenuar algumas das presentes (Lazzarotto et al. 2020). Em 2003 foram publicados os primeiros resultados referentes ao ensaio clínico com GCV intravenoso numa dosagem de 6 mg/Kg (Kimberlin et al. 2003), duas vezes ao dia durante seis semanas, tendo neste ensaio clínico demonstrado uma melhoria da audição em seis meses. Apesar dos resultados promissores, o seu uso sempre ficou limitado pelos efeitos secundários inerentes e à necessidade de um acesso intravenoso (Weimer and Permar 2019). Deste modo, anos mais tarde comprovou-se que a administração de valganciclovir (VGCV) oral, numa dosagem de 16mg/Kg, duas vezes ao dia, produzia efeitos idênticos aos obtidos como GCV (Kimberlin et al. 2015; Marsico and Kimberlin 2017).

Assim sendo, aos dias de hoje, é recomendado a administração oral do VGCV, no entanto pode ser aconselhado a administração intravenosa de GCV consoante a gravidade da doença causada pelo HCMV e pela capacidade e tolerância do recém-nascido à alimentação e medicação oral. Para tratamento de doença severa recomenda-se a administração intravenosa de GCV de 12 em 12 horas numa concentração de 6 mg/Kg, sendo administrado por um período máximo de seis semanas. Para o tratamento de doença não severa é aconselhado a administração oral de VGCV de 12 em 12 horas, como o anterior, mas numa concentração superior, 16 mg/Kg, por um período de seis a doze meses (Chiopris et al. 2020; Harrison 2015; Kimberlin et al. 2015; Marsico and Kimberlin 2017; Weimer and Permar 2019).

A eficácia destes tratamentos tem demonstrado melhorias a longo prazo a nível auditivo e do desenvolvimento neurológico (Marsico and Kimberlin 2017). Contudo, dado os efeitos secundários associados a estes tratamentos é exigida monitorização enquanto decorrem. Para efetuar tal controlo é pedido um hemograma completo com contagem de plaquetas, semanalmente em caso de administração intravenosa de GCV ou mensalmente se administração oral de VGCV, pelo facto de 25% a 60% dos recém-nascidos em tratamento com GCV desenvolver neutropenia em contraste com os 20% dos recém-nascidos submetidos a tratamento com VGCV. Esta neutropenia é reversível após termino de medicação. São também pedidos exames à função hepática e renal dada a toxicidade a curto prazo (Chiopris et al. 2020; Harrison 2015; Marsico and Kimberlin 2017).

No caso de recém-nascidos assintomáticos o tratamento não é recomendado, uma vez que não existem evidências que demonstrem um benefício maior que o risco (Lazzarotto et al. 2020;

Weimer and Permar 2019). No entanto, encontra-se em desenvolvimento um ensaio clínico de fase II, registrado como NCT03301415, com VGCV em crianças assintomáticas estando previsto terminar em 2024 (Clinicaltrials.gov 2017).

1.4.1.7. Rastreio Pós-Natal

Como mencionado anteriormente, até aos dias de hoje não existe uma recomendação nacional ou internacional das autoridades de saúde na monitorização sistemática da gestante quanto ao HCMV, por falta de uma vacina disponível e terapêutica antiviral consensualmente aprovada para tratamento da infecção na grávida, levando à não deteção dos estados serológicos da gestante nem da maioria das seroconversões durante a gravidez, o que favorece a manutenção das taxas de transmissão (Billette de Villemeur, Tattevin, and Salmi 2020; Nigro 2017). Deste modo, os casos determinados durante a gravidez advêm de infecções que provocaram alterações ecográficas, que no caso do HCMV representam uma relativamente baixa percentagem dos casos, ou dos casos em que o obstetra pediu a monitorização das gestantes com seroconversão (Stuar P. Adler 1988).

Com a implementação do rastreio auditivo neonatal universal, alguns recém-nascidos com infecção congénita por HCMV são detetados dado as alterações auditivas já presentes, e seguidamente passam a ser acompanhados por especialistas de otorrinolaringologia, audiologia, tal como pediatras especialistas em doenças infecciosas. No entanto, muitos recém-nascidos infetados ficam por diagnosticar e acompanhar, dado este rastreio não ter sido concebido com o intuito de detetar este agente etiológico, para além de que a maioria dos recém-nascidos infetados são assintomáticos à nascença (Harrison 2015).

Nas últimas décadas, alguns especialistas em HCMV têm apoiado a implementação de um rastreio direcionado ou universal para a infecção congénita por HCMV nos recém-nascidos, baseando-se em diversos argumentos, muitos deles já mencionados, dos quais enumerarei novamente três, I) a infecção congénita por HCMV é mais comum que a síndrome de Down, síndrome fetal alcoólica ou espinha bífida, entre outras doenças fetais/infantis com sequelas a longa prazo, como pode ser verificado na figura 1.6 , II) se a prevenção for a única opção disponível para minimizar a prevalência da infecção congénita, ter-se-á de rastrear todas as mulheres antes de engravidarem de modo a poder aconselhá-las e poder fazer o acompanhamento do feto e futura criança sempre que a mãe for seropositiva ou sofrer uma seroconversão e III) os sintomas e alterações ecográficas não são específicas desta infecção (Harrison 2015; Khalil et al. 2017).

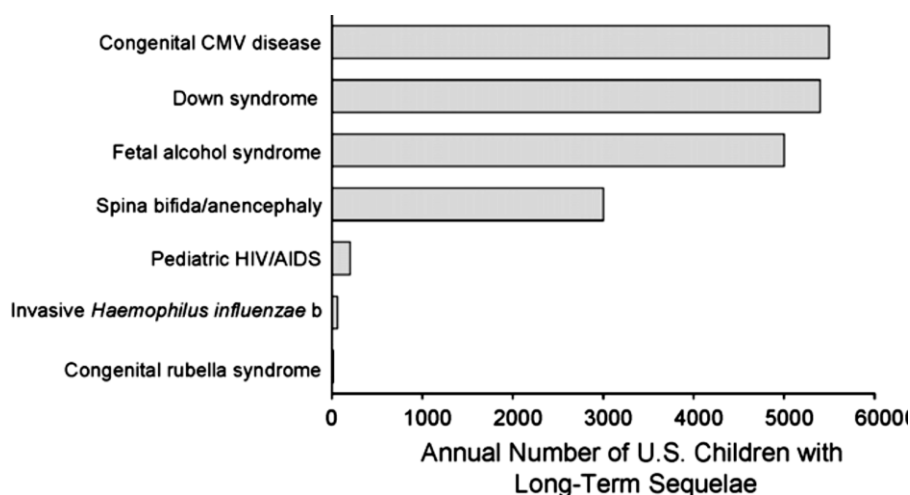


Figura 1.6 – Número estimado de casos anuais de crianças com sequelas causado por diferentes doenças. Retirado de Cannon 2009, *Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness*, *Journal Clinical Virology*, p.7.

O rastreio direcionado seria uma abordagem para recém-nascidos com rastreio auditivo alterado, o que não incluiria os recém-nascidos assintomáticos e com possibilidade de desenvolvimento tardio de sequelas ou em recém-nascidos em que as mães tiveram a sua primoinfeção durante a gravidez. Já o rastreio universal permitiria a detecção de todos os casos desta infecção congênita. O rastreio universal assenta na determinação do HCMV por PCR em amostras de urina ou saliva nas 2 a 3 primeiras semanas de vida, pois como já mencionado após este intervalo a detecção do HCMV não permite averiguar se se deve a uma infecção pós-natal ou congênita (Harrison 2015).

Na atualidade as amostras de eleição para o diagnóstico de infecção congênita são as de urina e saliva. No entanto, em termos de rastreio, a análise destas amostras não poderia ser com recurso à técnica de cultura, mas sim de PCR, sendo que esta permite um rastreio em massa (Lunardi et al. 2020). Quanto às amostras de urina analisadas por técnicas de PCR, estas apresentam vantagens como as grandes quantidades virais excretadas (Griffiths 2017; Lunardi et al. 2020). No entanto, as desvantagens assentam no desconforto e dificuldade da colheita, uma vez que a amostra é colhida em sacos urinários pediátricos que são desconfortáveis para as crianças. Esses sacos devem ser trocados de meia em meia hora, caso a amostra obtida não seja a suficiente, o que pode causar irritações cutâneas devido à cola presente nestes sacos adesivos. Deste modo, um rastreio universal com esta amostra não será dos mais fáceis de aplicar, apesar de já ter sido proposto outras formas de colheita de urina como por exemplo em cartões de filtro colocados na fralda. Quanto às amostras de saliva, estas são consideradas as ideais para um futuro rastreio universal pela facilidade da colheita, com custos semelhantes aos custos das amostras de urina. (CDC Centers for Disease Control 2020b; Chiopris et al. 2020; Lunardi et al. 2020). O rastreio através das salivas apresenta uma alta sensibilidade e especificidade, 97.4-100% e 99.9% respetivamente (Ronchi et al. 2017). No entanto existe uma pequena percentagem de falsos positivos relacionados a esta amostra, que poderá estar associada a contaminações, pois esta amostra requer condições específicas de colheita como não ser colhida na sala de partos pela possibilidade de contaminação com as secreções cervicais, nem no período de até uma hora após

o aleitamento (Chiopris et al. 2020; Fernandes et al. 2021; Lunardi et al. 2020). Deste modo, para garantir que não são fornecidos resultados falsos positivos, os resultados positivos obtidos em amostras de saliva são confirmados com amostras de urina (Fernandes et al. 2021; Lazzarotto et al. 2020; Lunardi et al. 2020).

Há investigadores que estimam que só nos EUA o custo anual gasto com crianças infetadas atinga os 4 mil milhões de dólares (Ronchi et al. 2017). Um estudo retrospectivo Europeu, estima que os custos diretos associados aos cuidados de saúde da infeção congénita, demonstra que cada criança infetada acarretam aos sistemas de saúde cerca de 6 113€, enquanto que os custos inerentes a crianças sem infeção rondam os 3 570€, havendo assim um incremento de 2 500€ por criança com infeção nos primeiros 6 anos de vida, sendo que as crianças sintomáticas à nascença representam uma maior despesa. Foi ainda possível observar que os custos associados ao surgimento de incapacidades ou sequelas tardias é superior em crianças com infeção congénita por HCMV, chegando este valor perto dos 17 250€ ao invés de 8 332€, sendo assim o dobro das despesas. Neste estudo, apenas foram incluídos custos diretos relacionados com a saúde, não englobando outros gastos como apoios educacionais, perda de produtividade ou dias de ausência ao trabalho pelos pais, supondo-se assim que os custos reais sejam superiores (Korndewal et al. 2018). Segundo Retzler et al., os custos diretos equivalem apenas a 40% dos custos totais associados a uma criança com infeção congénita por HCMV (Retzler et al. 2019). É assim perceptível que, a não realização do rastreio pré e pós-natal têm um grande custo associado, devido à não deteção da infeção nas crianças com maior risco de contração de infeção congénita, pelos inúmeros testes que são realizados em idades pré-escolares por aparecimento tardio de sequelas, aos internamentos ou admissões hospitalares, tratamentos não direcionados, para além do impacto na saúde mental dos pais devido a todo o processo envolvido na busca de um diagnóstico, como o *stress* e a ansiedade pela falta de respostas (Cannon et al. 2014).

Neste sentido o rastreio universal apresenta ser uma forma eficaz de poupança de custos e recursos de modo a tornar este rastreio ainda mais rentável. Diferentes estudos portugueses têm vindo a desenhar e desenvolver esquemas de rastreio em *pools* de 10 e 20 amostras, em urinas e salivas, de modo a incentivar as entidades de saúde à implementação do rastreio pelas vantagens que trariam às famílias e pelo lado da poupança económica desta abordagem (Fernandes et al. 2021; Paixão et al. 2005, 2012; Silva et al. 2020).

Em 2005, foi realizado o primeiro estudo com *pools* de urina para deteção de infeção congénita, neste estudo primeiramente comparou-se os resultados obtidos por *nested*-PCR (nPCR) com o método tradicional de cultura por *shell-vial*. De seguida foi testada a capacidade de deteção de um resultado positivo no meio de dezanove negativos, tendo sido verificado resultados corretos e correlacionáveis com a cultura. Para além de esta metodologia apresentar uma sensibilidade e especificidade idênticas, permite alcançar uma poupança significativa, 90%, caso aplicada em rastreios pós-natais (Paixão et al. 2005). Seis anos mais tarde, dado os avanços tecnológicos e a sua maior acessibilidade foi desenvolvido um estudo idêntico, mas com outra metodologia de PCR, PCR em tempo real (qPCR), dado esta técnica ser menos suscetível a contaminações e por requerer menos tempo para processamento. Neste estudo, não foram

observados falsos negativos ou falsos positivos quando comparado com o método de cultura, para além de não terem sido detetados inibidores quando usados controlos internos nas amostras, apresentado assim o método das *pools* uma ótima sensibilidade e uma forma acessível de rastrear os recém-nascidos (Paixão et al. 2012). Dadas as dificuldades associadas à colheita de urina num recém-nascido, em 2019, foi publicado um estudo assente na mesma ideologia das *pools* por qPCR mas com amostras de saliva. Neste estudo testaram-se *pools* de 10 e 20 amostras, onde foi demonstrado que ambas as abordagens têm 100% de sensibilidade e especificidade quando comparadas com a análise individual, podendo assim haver uma poupança de custos de 85% no caso das *pools* de 10 e 89% nas *pools* de 20 (Silva et al. 2020).

Mais tarde foi desenvolvido um pequeno estudo piloto com *pools* de 10, de modo a averiguar se esta técnica seria aplicável num rastreio. Neste estudo, que decorreu durante 8 meses, onde foram rastreados 1 492 recém-nascidos nascidos em dois hospitais da zona de Lisboa, tendo sido identificadas catorze amostras positivas, das quais apenas dez representavam uma infeção congénita, tendo-se assim verificado quatro falsos positivos com cargas virais muito baixas, possivelmente devido a contaminações pelo leite materno (Fernandes et al. 2021).

Desde 2007 tem vindo a ser recomendado o rastreio de infeção congénita para HCMV através de amostra de saliva. Os valores das cargas virais detetadas por PCR nas amostras de saliva e urina têm vindo a ser um assunto de debate na última década, quer referente aos falsos-positivos detetados nas amostras de saliva quer à comparação das cargas virais detetadas nas amostras de urina e saliva. Quanto aos falsos-positivos detetados nas amostras de saliva, existe consenso que as cargas virais são inferiores quando comparadas com verdadeiros positivos, no entanto, não existe um valor base definido e com a possibilidade do seu surgimento leva há necessidade de confirmação com amostra de urina, pois uma carga viral baixa pode dever-se a uma contaminação materna ou a uma colheita inadequada (CDC Centers for Disease Control 2020b; Exler et al. 2019; Yamamoto et al. 2006). Autores como Exler et al., apesar de defenderem a facilidade da colheitas das amostras de saliva, demonstram que as cargas virais detetadas nas amostras de urina são superiores às detetadas na saliva, enquanto outros não verificam diferenças nas cargas virais nos produtos biológicos mencionados (Cardoso et al. 2015; Exler et al. 2019). Deste modo seriam necessários mais estudos em larga escala, de modo a averiguar se as cargas virais detetadas nas amostras de saliva e urina são significativamente diferentes ou estão dependentes da colheita.

1.4.1.8. Técnica de PCR

As reações de polimerase em cadeia são técnicas enzimáticas de amplificação *in vitro*, simples de aplicar, que permitem obter inúmeras sequências/fragmentos de DNA, recorrendo à capacidade da enzima DNA polimerase em sintetizar uma cadeia complementar de DNA, através de uma cadeia molde, por ciclos repetitivos de temperatura (Garibyan and Avashia 2013), ciclos repetitivos de desnaturação, hibridação e extensão (Mullis et al. 1986). Deste modo, esta técnica tem vindo a ser considerada fundamental para diagnósticos nas áreas de microbiologia e virologia, sendo a *gold standard* para a deteção de ácidos nucleicos (Kadri 2020; Mackay, Arden, and Nitsche 2002).

Para a aplicação da técnica de PCR é necessário a cadeia molde/sequência de DNA de interesse, *primers*, desoribonucleótidos trifosfato (dNTPs), DNA polimerase e tampão, e posteriormente submetê-los às fases que caracterizam um ciclo de PCR. A fase de desnaturação inicial é seguida de duas fases que se repetem, hibridação e alongação, havendo no final um passo de extensão. Teoricamente em cada ciclo a quantidade de DNA duplica, ocorrendo assim uma síntese exponencialmente (2^n) ao fim de cada ciclo, até se atingir o *plateau* de amplificação, onde após cada ciclo não se observa um aumento de produto amplificado por esgotamento de reagentes, quer de *primers* quer de dNTPs. Deste modo, o número de ciclos em cada PCR dependerá do propósito do estudo e quantidade presente na amostra inicial e/ou necessário para análise. Em cada ciclo verifica-se a fase de desnaturação, onde ocorre a separação da dupla cadeia de DNA, por aumento de temperatura que é cerca de 94-96°C, uma vez que temperaturas acima dos 80°C quebram as pontes de hidrogénio que sustentam a cadeia dupla de DNA. Esta desnaturação permite o início da fase seguinte, a hibridação dos *primers* à cadeia molde, processo este que pode ocorrer na gama de temperaturas de 40-72°C, designada de temperatura de *annealing*. Este intervalo de temperatura vai permitir restabelecer as pontes de hidrogénio em zonas complementares, sendo que esta temperatura depende do tamanho e constituição dos *primers*, interferindo assim na especificidade da ligação. Por fim segue-se a extensão, onde ocorre a replicação do DNA através da ação da Taq polimerase de DNA e dos dNTPs a uma temperatura de 72°C (Baumforth et al. 1999; Kadri 2020; Mullis et al. 1986).

Para analisar os produtos da PCR, tradicionalmente submete-se os mesmos a uma eletroforese em gel de agarose ou acrilamida, que através da aplicação de um campo elétrico permite separar os fragmentos de DNA com base no seu tamanho e peso molecular. Ao gel pode ser adicionado um composto fluorescente, que quando visto com luz ultravioleta permite observar qual foi a migração dos diferentes fragmentos. De modo a facilitar a deposição da amostra nos poços do gel é frequentemente adicionado um tampão de deposição (*greensafe*), que para além de ajudar visualmente o operador, permite ainda que a amostra fique no poço até ao início da corrida do gel (Kadri 2020; Ylmaz, Ozic, and Gok 2012).

Os fragmentos de menores dimensões migrarão mais e mais rápido, ou seja, a migração ocorre consoante o tamanho e peso molecular, no entanto, esta também pode ser influenciada pela concentração de agarose no gel, quanto mais concentrada for, menor serão os poros e consequentemente menor será a velocidade de migração. No entanto, estas condicionantes permitem separação facilitada de pequenos fragmentos. A cada série é adicionado um marcador de tamanho molecular conhecido, que permite comparar o tamanho do fragmento presente na nossa amostra com as standardizadas no marcador (Garibyan and Avashia 2013; Kadri 2020; Ylmaz et al. 2012).

Todas as técnicas de PCR apresentam diversas vantagens quando comparadas com os métodos tradicionais, como por exemplo a rapidez na obtenção do resultado e a alta sensibilidade e especificidade. O PCR convencional é uma ótima técnica para identificar um microrganismo, mas apresenta a desvantagem de os resultados obtidos serem somente qualitativos (Garibyan and Avashia 2013). No seguimento dos diferentes fins para os quais estas técnicas são usadas,

surgiram diversas variantes da PCR como qPCR, PCR multiplex, nPCR, PCR in situ, transcriptase reversa PCR (RT-PCR), entre outras (Baumforth et al. 1999; Kadri 2020).

No caso do PCR em tempo real, para além de permitir a deteção do microrganismo, como no PCR convencional, permite ainda a quantificação do DNA presente (Garibyan and Avashia 2013).

No PCR em tempo real, a amplificação e a deteção ocorrem em simultâneo através da deteção da fluorescência produzida, sendo esta proporcional aos produtos da PCR, minimizando assim qualquer risco de contaminação no processo de quantificação (Kadri 2020; Yan and Fedorko 2002). Para a monitorização dos produtos da PCR tem de haver sondas ou mesmo amplicões marcados com moléculas fluorescentes (Mackay et al. 2002), havendo distintas possibilidades como, sondas de hidrólise/*TaqMan*®, molecular *beacons*, *minor groove-binding* (MGB), *locked nucleic acid* (LNA) ou uma sondas de hibridação (Jebbink et al. 2003; Shipley 2006).

Dado neste trabalho de dissertação se recorreu a sondas de hidrólise, as mesmas serão brevemente explicadas (Roche Diagnostics 2016; Shipley 2006).

As sondas de hidrólise emitem fluorescência quando a atividade exonuclease da *Taq* polimerase as quebram, estas sondas são comumente conhecidas como sondas *TaqMan*®. Sendo estas marcadas em ambas as extremidades, na extremidade 5' estão marcadas com o *reporter*/fluorocromo e na extremidade 3' um *quencher*. O fluorocromo emite fluorescência enquanto o *quencher* a absorve. Deste modo, enquanto os dois estiverem ligados à sonda, não é detetado qualquer sinal de fluorescência, no entanto, na fase de elongação a *Taq* polimerase, que tem atividade exonuclease de 5'-3', ao fazer a extensão da cadeia complementar quebra a sonda se a ocorrendo libertação de fluorescência. A *Taq* polimerase apenas quebra a sonda se a mesma estiver hibridada com a sequência alvo, sendo que o aumento de fluorescência é diretamente proporcional à acumulação de produtos de PCR (Jebbink et al. 2003; Kadri 2020; Roche Diagnostics 2016; Shipley 2006). É de notar que para esta deteção de fluorescência é necessário um termociclador ligado a um computador e respetivo programa/sistema de leitura de emissões de fluorescência, que no final apresentará os resultados através de gráficos (Shipley 2006; ThermoFisher 2014).

A curva de calibração é obtida através de um *template* definido, ou seja, uma amostra com concentração conhecida, à qual se realizam sucessivas diluições de modo a obter diferentes pontos com concentrações conhecidas e estabelecidas nas diluições seriadas. Desta curva resulta o *slope*, o coeficiente de determinação (r^2) e o y-interseção que demonstram a eficácia, precisão e sensibilidade, ou seja, esta curva para além de permitir determinar a concentração das nossas amostras por extrapolação, permite ainda avaliar outros parâmetros do ensaio através dos índices mencionados anteriormente. O r^2 permite averiguar como correu a reação de PCR, pois indica a exatidão das diluições e precisão da pipetagem, refletindo a linearidade da curva padrão. O y-interseção representa o limite de deteção da reação, indicando a sensibilidade e quão exato foi quantificado o *template*. Num ensaio ideal, eficiência de 100%, o *slope* deve ser de -3.32, o y-interseção deve estar compreendida entre 33 e 37 ct e o r^2 deve ser de 1.00. Como pode ser verificado na figura 1.7, um ensaio com eficiência de 95-100% é aceitável, no entanto, é de ter em consideração que se o y-interseção for superior a 37 ou inferior a 33 indica que o *template* não foi

corretamente determinado. No caso de valores elevados a causa pode ser a deterioração do *template*, resultando de ciclos de congelação e descongelação ou do armazenamento de concentrações muito reduzidas (ThermoFisher 2014).

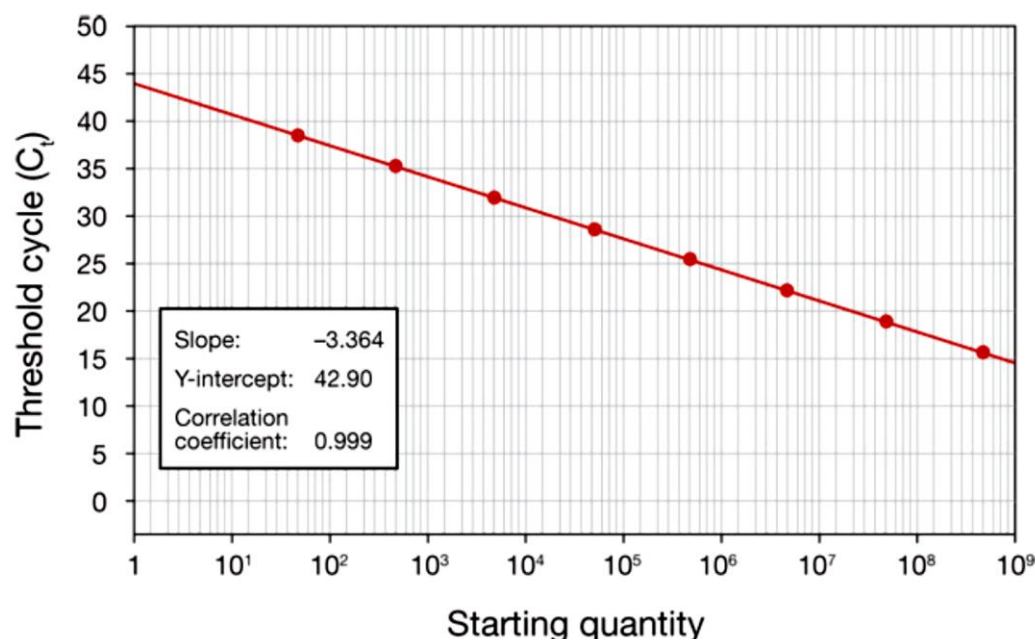


Figura 1.7 – Curva de calibração de um template degradado. Retirado de Thermo Fisher 2014, *Real-time PCR handbook*

No gráfico de amplificação, figura 1.8, é possível verificar duas fases, uma fase exponencial e uma fase plateau, para além de ser possível observar aspetos fundamentais para a interpretação dos resultados como a linha base, a linha *threshold* e o *threshold cycle* de cada amostra, como representado na figura 1.9. A linha base é determinada pelo ruído de fundo produzido pelo detetor e reagentes através da fluorescência gerada nos primeiros ciclos da PCR, normalmente entre o terceiro e o décimo quinto ciclo. A linha *threshold* consiste no sinal de fluorescência que reflete um aumento estatístico significativo acima da linha base para ser detetado, normalmente a linha *threshold* corresponde a dez vezes o desvio padrão da linha base (Jebbink et al. 2003; ThermoFisher 2014).

O *cycle threshold* (ct) é definido como o número do ciclo em que a quantidade de fluorescência gerada na reação intersesta e ultrapassa a linha *threshold*, sendo este valor usado para determinar a quantidade de DNA presente, quanto menor o ct maior a concentração de amostra presente pois o ct e a concentração são inversamente proporcionais (Qiagen 2013; ThermoFisher 2014).

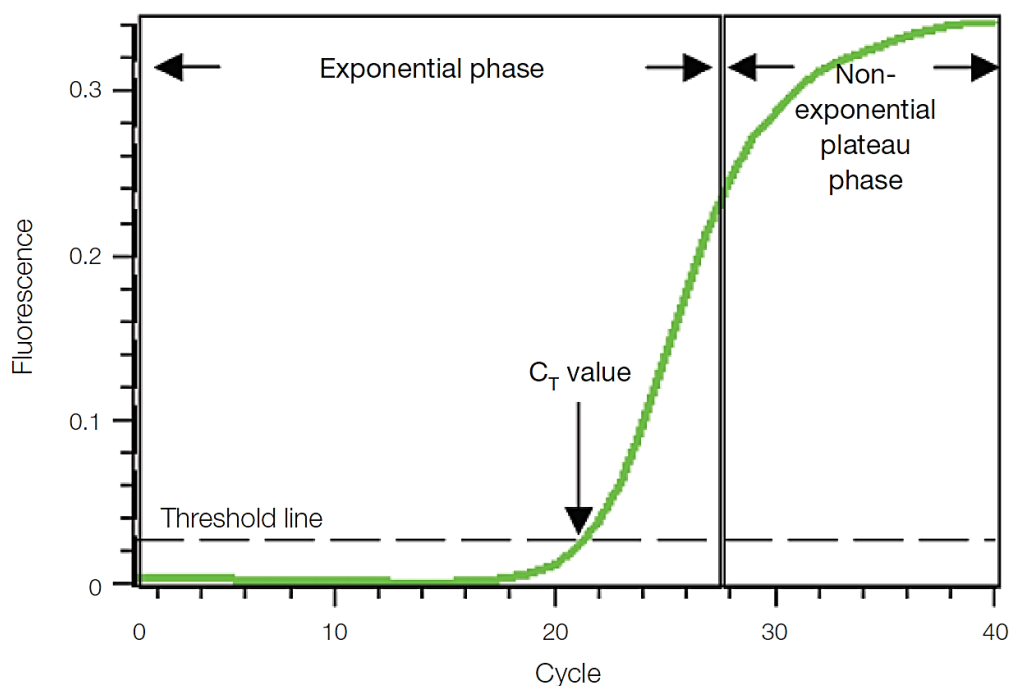


Figura 1.8 – Curva de amplificação com base na fluorescência gerada. Retirado de ThermoFisher 2014, *Real-Time PCR Applications Guide*.

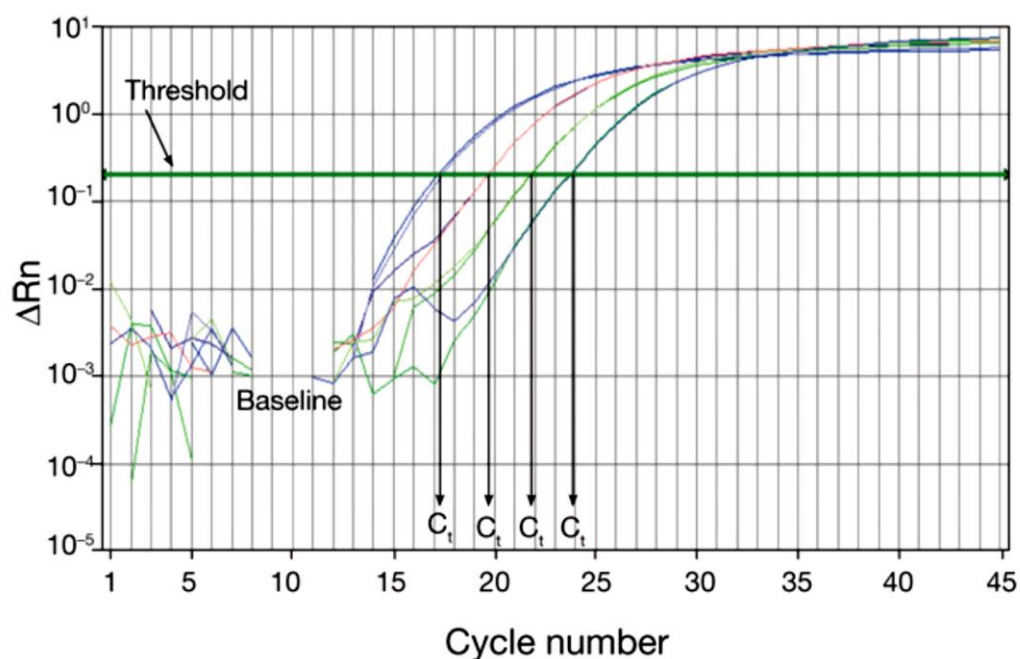


Figura 1.9 – Curva de amplificação com identificação da linha base, threshold e cycle threshold. Retirado de ThermoFisher 2014, *Real-time PCR handbook*.

Tal como mencionado anteriormente o PCR em tempo real é o método utilizado para determinar a quantidade de ácidos nucleicos numa amostra, existindo duas formas de realizar esta quantificação, sendo as mesmas a quantificação relativa e absoluta. A quantificação relativa consiste numa medida de comparação entre duas amostras, obtendo-se assim uma proporção/ratio, em que o resultado é dado com um aumento ou diminuição relativamente ao outro. Dado os resultados obtidos neste tipo de quantificação, esta medida costuma ser usado para a

expressão de genes. Na quantificação absoluta tem-se uma amostra de concentração conhecida que é diluída de forma seriada e amplificada de modo a gerar uma curva padrão, onde posteriormente, por extrapolação dos cts das amostras desconhecidas à curva padrão se obtém a quantificação das mesmas (BioRad 2006; ThermoFisher 2014).

Até à data não existe um método de diagnóstico/testagem aprovado para quantificação do HCMV, havendo características inerentes a cada método que podem afetar o resultado, como método de extração dos ácidos nucleicos, *primers* e sondas usadas (Kraft, Armstrong, and Caliendo 2012). Neste sentido e devido à grande variedade e variabilidade de métodos disponíveis para detecção de cargas virais do HCMV e os diferentes tipos de amostras onde essa detecção pode ser feita, torna-se difícil a comparação dos resultados entre laboratórios. Desta forma, a Organização Mundial de Saúde, em outubro de 2010, estabeleceu o primeiro padrão de quantificação internacional para o HCMV, NIBSC *code* 09/162. Este padrão consiste numa preparação com o vírus completo da estirpe Merlin HCMV em tampão Tris-HCl e albumina de soro humano (Tris-HSA), com uma concentração de 5×10^6 Unidades Internacionais (UI) por mililitro. A implementação do padrão internacional teve como intuito a uniformização das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, servindo como calibrador de referências em UI obtendo-se assim um sistema de notificação dos resultados universal que permitir a rastreabilidade e comparação independentemente da metodologia usada (Fryer et al. 2010, 2016).

1.5. Objetivos do Estudo

Este estudo tem como principal objetivo a confirmação da aplicabilidade do rastreio pós-natal para a infeção congénita por HCMV utilizando a metodologia de *pools* de saliva, e a técnica PCR. Pretendeu-se, igualmente, demonstrar que as cargas virais detetadas na *pool* e na amostra individual de saliva são sobreponíveis após correção com o fator de diluição usado, neste caso de 1/10. Este projeto foi conduzido em quatro hospitais portugueses com elevada taxa de nascimentos, Hospital CUF Descobertas Lisboa, Hospital São Francisco Xavier, Hospital de Vila Franca de Xira e Hospital CUF Porto, pretendeu-se estimar a prevalência da infeção congénita nas áreas regionais onde se enquadram estes quatro hospitais.

Pretendeu-se ainda que este estudo desencadeie um reforço na divulgação deste importante agente etiológico, das sequelas da infeção congénita nos recém-nascidos e dos custos associados à doença, pois sendo o rastreio aplicável, a nível nacional, ou até mundial, quer as morbilidades nas crianças, quer os custos sociais e os associados à prestação dos cuidados de saúde seriam inferiores.

Dada a situação pandemia em que vivemos, pretendeu-se avaliar a interferência da infeção Covid-19 na prevalência da infeção por HCMV.

2. Materiais e Métodos

2.1. Seleção do material para a colheita e transporte das amostras de saliva

O presente estudo iniciou-se em junho de 2020, em plena pandemia COVID-19. Este facto afetou a obtenção do material necessário para a colheita e transporte da amostra por haver rotura de stocks nos fornecedores, nomeadamente, em zaragatoas e meios de transporte, porque também estavam a ser utilizados para a COVID-19.

Para resolver a situação nos primeiros nove meses do estudo utilizou-se zaragatoas do tipo Rayon (FLmedical, Torreglia, Italy), e posteriormente, zaragatoas do tipo Dacron. Por esta razão optou-se por efetuar um estudo comparativo de modo a conferir se a capacidade de absorção e libertação do DNA nos dois tipos de zaragatoas era idêntico. O intuito deste estudo comparativo consistiu em garantir que estavam a ser utilizadas condições de análise similares às do estudo piloto realizado por Fernandes et al, entre outubro de 2018 e maio de 2019.

A mesma dificuldade foi sentida na aquisição dos tubos com o meio de transporte. Assim, numa primeira fase do estudo, preparou-se meios de transporte, que consistiu na utilização de tubos estéreis de 3mL (CryoGen® - CLEARLine®), livres de DNases, RNases, DNA, RNA, inibidores de PCR e ATP, para os quais se pipetou 750µL de meio Gibco Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640). Posteriormente, passou-se a utilizar o meio de transporte VTM da Zybio®. Desta forma, de modo a manter as mesmas condições de análise houve a necessidade de retirar meio dos tubos, a fim de ficarem com 750µL de meio, garantindo que não era introduzido um viés na análise por diluição. Também neste caso, houve necessidade de averiguar se as condições de análise se manteriam dadas as diferenças de matrizes e casas comerciais.

2.1.1. Avaliação das zaragatoas

2.1.1.1. Determinação da capacidade de absorção das zaragatoas

Para avaliar se havia diferenças na absorção dos dois tipos de zaragatoas disponíveis, foi testada a sua capacidade de absorção utilizando três matrizes diferentes, RPMI, água purificada e saliva. Os ensaios foram realizados em triplicado para cada tipo de zaragatoa e para cada matriz. Assim, transferiu-se diferentes volumes de cada uma das três matrizes para tubos Eppendorf e submergiu-se as zaragatoas, por 5-10 segundos, após a remoção das zaragatoas, mediu-se o volume remanescente

2.1.1.2. Medição do DNA recuperado

Para avaliar se a capacidade de libertação do DNA diferia em função do tipo de zaragatoa que era utilizado recorreu-se a amostras *spiked* (SPK) preparadas no laboratório utilizando uma amostra positiva. Assim, utilizou-se uma *pool* de amostras de saliva negativas para HCMV, previamente testadas por PCR, às quais foi adicionada uma amostra de plasma positiva para HCMV, com concentração conhecida. Todas as amostras encontravam-se armazenadas no laboratório de microbiologia da NMS|FCM.

Preparou-se cinco amostras com matriz de saliva, identificadas de A1 a A5, em que a primeira foi obtida através de uma diluição de 1/2 (amostra positiva e pool de amostras negativas)

e as restantes por diluições seriadas de 1/10, figura 11. Cada tipo de zaragatoa foi testado em triplicado.

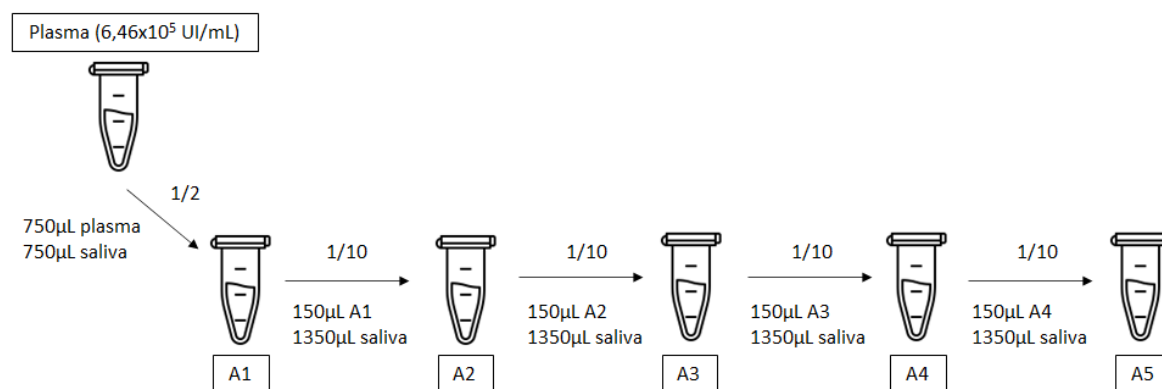


Figura 2.1 – Esquema de diluições efetuadas para determinação da absorção e libertação de DNA pelos dois tipos de zaragatoas

Após a preparação das diferentes diluições, as zaragatoas foram inseridas por 5-10seg. e posteriormente transferida para tubos estéreis de 3mL com 750µL de RPMI, tentando simular a colheita de saliva nos recém-nascidos.

O processamento das amostras assim obtidas seguiu o mesmo protocolo das amostras do rastreio, ver ponto 2.3.3..

2.1.2. Avaliação dos meios de transporte

Com a avaliação dos dois meios de transporte pretendeu-se averiguar se a mudança de meio interferiria nos resultados do estudo. Para esta análise comparativa recorreu-se a duas amostras positivas para HCMV com diferentes cargas virais, que se encontravam armazenadas no laboratório de microbiologia da NMS|FCM.

Nesta fase do estudo as únicas zaragatoas disponíveis no mercado eram as do tipo Dacron, razão pelo qual foram as únicas a fazer parte desta testagem. O processamento de análise foi o usado na testagem da capacidade de absorção das zaragatoas, isto é, absorção da amostra por 5-10 seg, seguida de inserção da zaragatoa no meio de transporte respetivamente, tubos com 750µL de RPMI ou tubos VTM, seguindo-se depois o protocolo das amostras do rastreio, ver ponto 2.3.3..

2.2. Limite de deteção do protocolo de análise implementado para o presente rastreio

Dado que o rastreio envolveu a determinação de cargas virais houve a necessidade de determinar o limite de deteção do protocolo implementado.

Para tal recorreu-se a uma amostra de plasma com concentração conhecida de HCMV de modo a avaliar qual a sensibilidade do protocolo implementado e se este permitiria detetar todas as infeções congénitas. A amostra de plasma tinha uma carga inicial de 1080000 UI/mL ($1,08 \times 10^6$

UI/mL). A partir do extrato de DNA prepararam-se 5 diluições, por forma a obter as concentrações de A= $1,08 \times 10^4$ UI/mL, B= $1,08 \times 10^3$ UI/mL, C =333 UI/mL, D=167 UI/mL, E =83 UI/mL.

Os pontos A, B e E foram testados em duplicado, enquanto os pontos C e D foram testados em triplicado na PCR, dado supor-se que o limite de deteção se encontraria nos pontos C e D.

2.3. Rastreio Pós-Natal

Como o principal objetivo do estudo consistiu na avaliação da aplicabilidade do rastreio pós-natal para a deteção de infeção congénita por HCMV recorrendo aa pools de saliva, o desenho do estudo incluiu a seleção da população alvo, colheita de amostras de saliva na população alvo, preparação das *pools*, extração de DNA e realização da PCR.

2.3.1. População Alvo

Para a realização do estudo foram incluídos os nados vivos nascidos entre 1 de junho de 2020 e 31 de outubro de 2021, com idades inferiores a duas semanas de vida, provenientes de quatro hospitais portugueses, Hospital CUF Descobertas Lisboa (HCD), Hospital CUF Porto (CP), Hospital São Francisco Xavier do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (CHLO) e Hospital de Vila Franca de Xira (HVFX).

O estudo foi autorizado e aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde de cada um dos hospitais envolvidos, e todos os representantes legais dos nados-vivos assinaram o consentimento informado, autorizando a recolha de uma amostra de saliva. As amostras foram codificadas nos hospitais de origem e só a equipa responsável pela colheita teve acesso aos dados dos participantes. Todos os resultados obtidos no estudo foram reportados à equipa médica que acompanhou os recém-nascidos.

2.3.2. Colheita de amostras

Para a realização do estudo foram recolhidas amostras de saliva e urina aos recém-nascidos envolvidos, sendo que as amostras de urina apenas foram colhidas aos recém-nascidos que tiveram uma amostra de saliva positiva por PCR.

Como referido anteriormente, durante o estudo para as colheitas de amostras inicialmente utilizou-se zaragatoas estéreis do tipo Rayon e posteriormente do tipo *Dacron*. Foi recomendado que a colheita fosse efetuada antes da mamada ou 1 hora após esta. Foi recomendado que a zaragatoa fosse introduzida na cavidade oral da criança durante 5 a 10 segundos e posteriormente transferida para o tubo contendo o meio de transporte e fossem conservadas a 4°C até ao transporte para o laboratório de microbiologia da NMS|FCM. No laboratório, as amostras foram registadas numa base de dados interna e agrupadas em *pools* de 10 amostras.

No caso de uma *pool* positiva, as amostras que a constituíam foram analisadas individualmente. Para a amostra que deu resultado positivo foi solicitado ao hospital respetivo, a recolha de uma amostra de urina para confirmação da possível infeção congénita. Para a colheita da amostra de urina utilizou-se saco coletor estéril. A urina foi conservada dentro do saco coletor, à temperatura de 4°C, até enviada e processada no laboratório da NMS|FCM.

2.3.3. Processamento das amostras de saliva

Todos os processamentos foram realizados segundo as normas de segurança instituídas no laboratório da NMS|FCM, utilizou-se material estéril, de uso único, para além de que, todo o manuseamento das amostras, preparação de pools, extração de DNA e preparação da mistura de reagentes foi executado em câmara de segurança biológica em áreas distintas de modo a prevenir contaminações.

A separação das amostras para tubos de congelação e preparação de pools foi realizada numa câmara de biossegurança nível II (NuAiRe™, Biological Safety Cabinets, Class II), e entre cada amostra procedeu-se à desinfeção das luvas com lixívia diluída a 3%. A extração do DNA e sua aplicação na placa de 96 poços para a PCR foram realizadas noutra câmara de biossegurança de nível II (NuAire™, Biological Safety Cabinets, Class II). Quanto à mistura de reagentes necessária para as reações de amplificação esta foi realizada numa câmara de PCR localizada noutra sala, a sala de reagentes.

O protocolo de processamento, extração e deteção foi testado e aplicado em estudos anteriores realizados no laboratório de microbiologia da NMS|FCM (Fernandes et al. 2021; Silva et al. 2020). O protocolo de extração e amplificação utilizados estão sujeitos a um programa de avaliação externa do NEQAS garantindo assim uma boa fiabilidade nos resultados obtidos.

Preparação da base de dados

Após a receção das amostras no laboratório, foi atribuída uma codificação interna, diferente para cada hospital. Os tubos foram identificados com o novo código (iniciais do hospital e numeração alfa numérica sequencial), a etiqueta original do hospital foi retirada e agrupada com as outras etiquetas da mesma pool. A correspondência entre as duas numerações foi registada numa base de dados informatizada, onde foi inserida a data de entrada no laboratório, a idade do RN, o sexo, o nº da *pool* onde foi inserida a amostra, o resultado da PCR e a data do resultado.

Preparação das *pools*:

Prepararam-se *pools* de 10 amostras. Numa primeira fase os tubos foram agitados, 15 segundos num agitador vórtex, em seguida foram centrifugados a 2000 rotações por minuto (rpm) (Rotina 380R, Hettich) durante 5 minutos, à temperatura de 20°C.

Cada *pool* foi preparada pipetando 20µL de cada amostra, perfazendo um volume total de 200µL. Esta mistura foi armazenada a 4°C até à extração. O volume restante de amostra foi armazenado a -20°C até ao final do estudo.

Extração do DNA

Para a realização da extração de DNA recorreu-se ao Kit comercial “PureLink Genomic DNA Minikit, da Invitrogen” seguindo o protocolo do fabricante. A extração iniciou-se com um volume de 200µL e no final utilizou-se um volume de 50µL de tampão Tris para eluir o DNA da coluna. O eluato foi conservado a -20°C até à realização da qPCR.

Os procedimentos anteriores foram maioritariamente realizados no mesmo dia ou em dois dias consecutivos, exceto nos casos em que não estavam disponíveis 10 amostras para preparar uma pool, se aguardou mais do que um dia. No entanto, nas situações em que a colheita de saliva foi realizada depois dos 6 dias de idade, o processamento da *pool* teve carácter urgente e o volume em falta para os 200µL foi repostado com RPMI para manter a proporção.

Mistura de Reagentes para a qPCR

Para a realização da qPCR, utilizou-se uma mistura reacional de 25µL, onde 20µL corresponderam à mistura de reagente e 5µL ao eluato previamente obtido, Tabela 2.1.

Na mistura de reagentes utilizou-se os *primers*, e sonda Taqman® (Tabela 2.2.) específicos para uma região do gene UL83, que codifica para a pp65. Esta mistura foi preparada numa sala específica, designada de sala de reagentes.

Tabela 2.1. – Concentrações e quantidades dos reagentes para a mistura de reagentes da PCR em tempo real

	Volume	Concentração
Primer Frwd	1µL	4µM
Primer Rev	1µL	4µM
Sonda Taqman®	0.75µL	0.3µM
Água ultrapura	7.25µL	
Master Mix Luna® Universal Probe	10µL	1X

Tabela 2.2 – Sequência de primers e sonda utilizados no presente trabalho

Primer	Sequência do primer (5'-3')
Fwd	CCCTCCGGCAAGCTCTTT
Rev	CAGGTCCTCTTCCACGTCAGA
Sonda	Sequência da sonda (5'-3')
	FAM-TGCACGTCACGCTGG-MGB

Para o qPCR utilizou-se uma placa de 96 poços (Sarstedt, *Numbrecht, Germany*) que foi selada com uma película aderente (Sarstedt, *Numbrecht, Germany*) após a adição do eluato na sala de extração. Esta placa foi transportada da sala de reagentes para a câmara de biossegurança da sala de extração numa caixa específica fechada. Nesta sala foram adicionados os controlos positivos, negativo, as amostras e seus controlos internos. O Controlo positivo corresponde a um extrato do sobrenadante de uma cultura da estirpe AD169. diluído para uma concentração de

4.4×10^5 UI/mL, o CI corresponde ao mesmo extrato com uma diluição inferior (concentração de 4.4×10^6 UI/mL) e o CN corresponde a água pura, (figura 2.2).

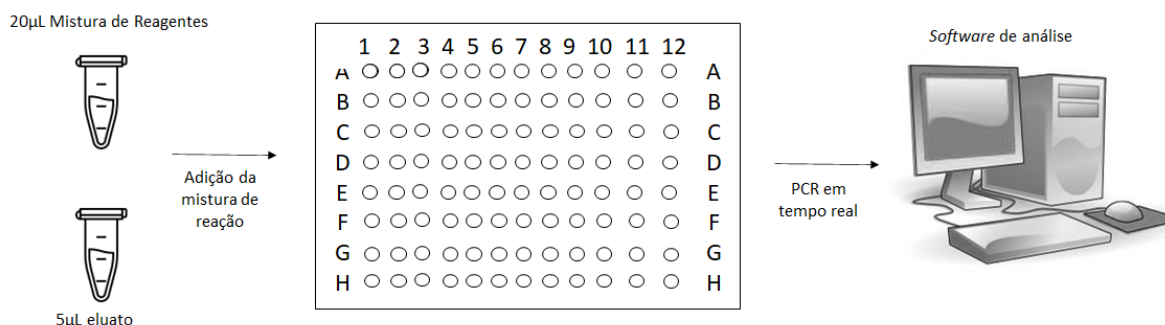


Figura 2.2 – Esquema do método do PCR em tempo Real

Protocolo de amplificação da qPCR

Para amplificação e detecção dos fragmentos de DNA recorreu-se ao termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific) com as condições, esquematizadas na Figura 2.3.

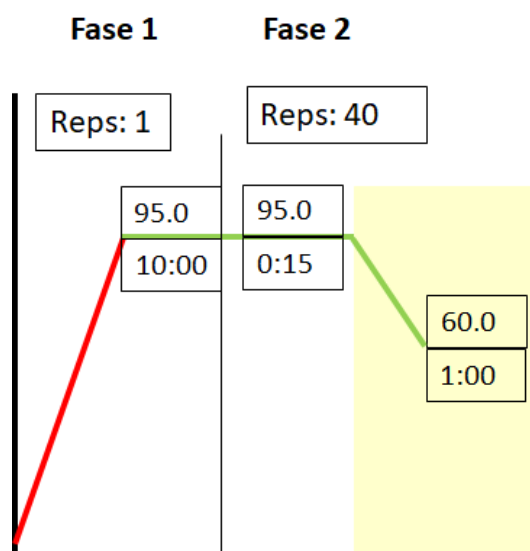


Figura 2.3 – Ciclo de Amplificação da técnica de qPCR in House

Todas as amostras foram analisadas em duplicado e como já mencionado, para cada amostra fez-se um CI e em cada série da PCR foram adicionados um controlo positivo (CP²), um controlo negativo (CN) e um controlo do controlo interno (CCI), servindo estes para validar os resultados da serie da qPCR.

Para validação da série da qPCR considerou-se necessário que:

- O CP² obtivesse amplificação e com um valor no intervalo de 35.83 ± 1.26 ct;
- O CN não apresentasse amplificação;
- O CI de cada amostra se situasse no intervalo de ± 2 ct relativamente ao valor obtido quando foi pipetado isoladamente (CCI), isto é, quando se pipetou 2 µL do eluato com a concentração de 4.4×10^6 UI/mL. O valor deste controlo situou-se em média nos 33.83 ± 1.00 ct.

Na avaliação dos resultados dos duplicados das amostras avaliou-se se eram reprodutíveis e coincidentes, ambos negativos ou positivos e se situavam no intervalo $15 \leq ct \leq 39$. Nos casos de amostras com resultados discordantes, ou se o CI da amostra diferisse em mais/menos de 2 cts do CCI repetiu-se a PCR da amostra. Casos algum dos outros controlos (CP², CCI, CN) não apresentasse o resultado esperado, a serie de PCR foi repetida.

Processamento de *pool* positiva

Ao obter-se uma *pool* com resultado positivo, as amostras constituintes da mesma eram extraídas individualmente e foi realizado a PCR para cada uma das 10 salivas. Após execução da PCR identificou-se a(s) amostra(s) positiva(s) e requereu-se, a colheita da amostra de urina para confirmação do resultado (antes das 3 semanas de vida do recém-nascido). As amostras de urina foram processadas individualmente segundo o mesmo protocolo de extração e PCR.

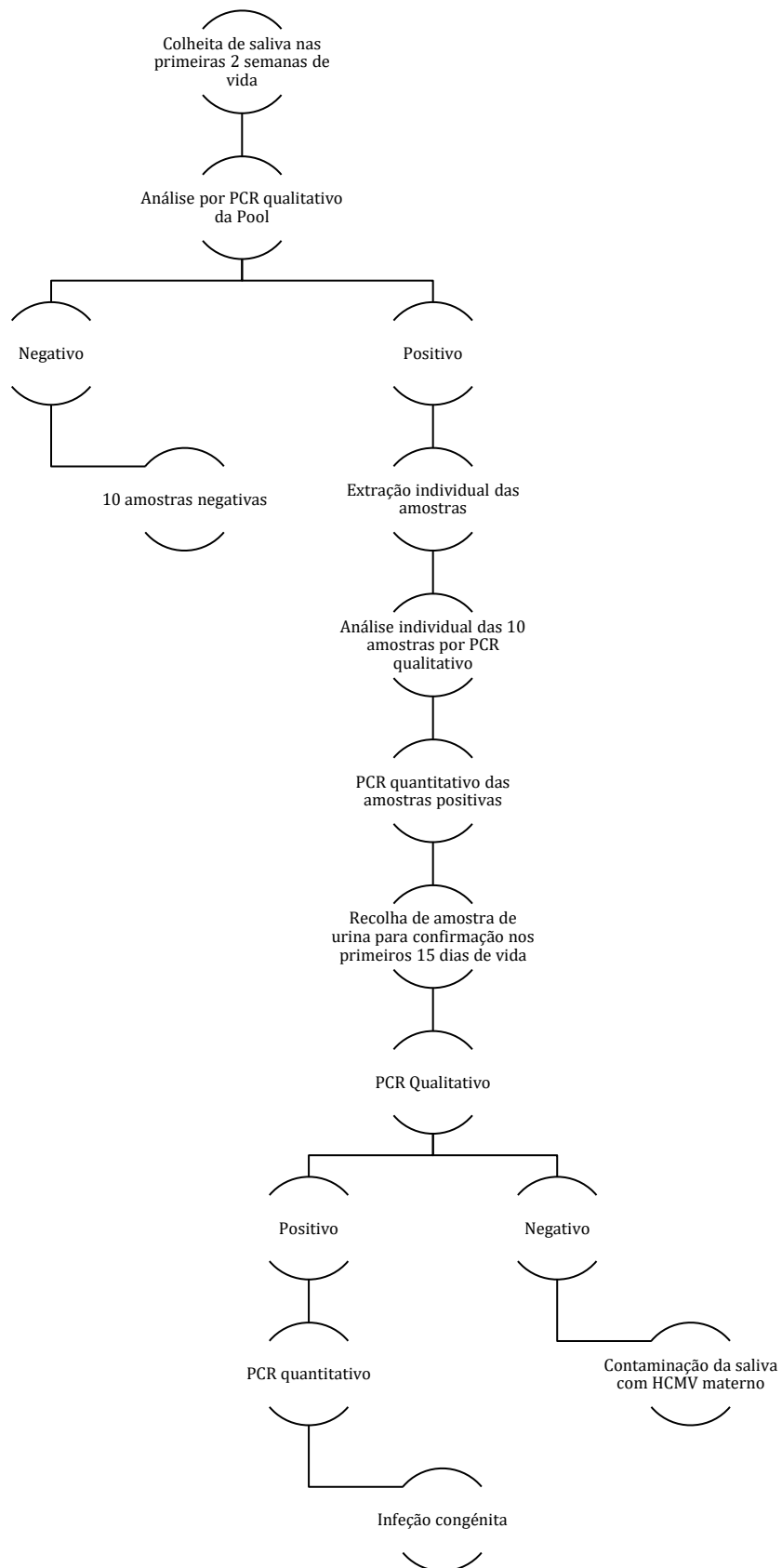
Quantificação das amostras:

Após confirmação de um resultado positivo, recorreu-se à quantificação da *pool*, da amostra de saliva individual e da amostra de urina.

Para a quantificação das cargas virais presentes nas amostras realizou-se um qPCR quantitativo, recorrendo ao primeiro padrão internacional da OMS para o HCMV, NIBSC 09/162 (Fryer et al. 2016) para traçar a curva padrão.

Este padrão foi comercializado liofilizado com uma concentração inicial de 5×10^6 UI/mL. Neste estudo, após reconstituição, realizaram-se três diluições sucessivas de 1/10 de modo a obter três pontos com concentrações distintas, $1,25 \times 10^5$ UI/mL, $1,25 \times 10^4$ UI/mL e $1,25 \times 10^3$ UI/mL. A quantificação das amostras é obtida por extrapolação na curva padrão obtida na qPCR em que está inserida.

2.4. Algoritmo do protocolo de Rastreio



2.5. Tratamento de dados

Os dados deste estudo foram analisados recorrendo ao software SPSS (versão 26), e às funcionalidades do Microsoft Office Excel, de forma a calcular a média aritmética e o desvio padrão (métodos estatísticos descritivos).

A prevalência da infeção congénita nos hospitais envolvidos foi obtida com recurso ao software epidemiológico EpiTools - Epidemiological Calculators pelo método exato ou Clopper-Pearson.

A comparação entre os estudos foi realizada através do cálculo do intervalo de confiança para diferentes proporções, usando uma aproximação à distribuição Normal e o método de Newcombe.

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise do material selecionado para colheita e transporte das amostras de saliva

3.1.1. Avaliação das zaragatoas

3.1.1.1. Análise da capacidade de absorção das zaragatoas

Nos primeiros nove meses do estudo (junho de 2020 a janeiro de 2021) usaram-se zaragatoas do tipo Rayon previamente adquiridas, tal como no estudo piloto realizado entre outubro de 2018 e maio de 2019. Porém dado a rotura de stocks nos fornecedores, houve a necessidade de alterar o tipo de zaragatoas para as do tipo Dacron. Ambas são constituídas por fibras sintéticas, as do tipo Dacron são de poliéster e as do tipo Rayon correspondem a fibras sintéticas obtidas da polpa da madeira.

De acordo com o estudo apresentado pela equipa de Zasada et al. a composição e a estrutura da zaragatoa podem ter um impacto significativo na eficiência de recolha e liberação da amostra.

Neste sentido fomos testar com as nossas zaragatoas a capacidade de absorção.

Os resultados desta avaliação nas três matrizes testadas, tabela 3.1., mostram que a absorção das zaragatoas do tipo Dacron na matriz RPMI e água absorvem mais que as do tipo Rayon. Conclusões coincidentes com o indicado no artigo de Zasada. No entanto, quando se submeteu as zaragatoas à matriz saliva verifica-se o oposto, a absorção média pelas zaragatoas do tipo Dacron é de 76µL e nas zaragatoas tipo Rayon é de 87µL. Apesar da diferença de volumes absorvidos não serem significativos, este fato poderá estar relacionado com as características das fibras que constituem cada tipo de zaragatoas tal como da densidade do meio, quer a água como o meio RPMI têm densidades inferiores à da saliva.

Tabela 3.1 - Absorção das diferentes matrizes por zaragatoas tipo Rayon e Dacron

Experiência	RPMI		H ₂ O		Saliva	
	Rayon	Dacron	Rayon	Dacron	Rayon	Dacron
1	40 µL	130 µL	70 µL	140 µL	79 µL	71 µL
2	80 µL	135 µL	90 µL	110 µL	67 µL	80 µL
3	60 µL	130 µL	70 µL	100 µL	116 µL	77 µL
Média ±DP	60 µL ±16,3	132 µL ±2,4	77 µL ±9,4	117 µL ±17	87 µL ±20,9	76 µL ±3,7

3.1.1.2. Análise do DNA recuperado

Para proceder à análise de DNA recuperado recorreu-se a dois momentos de avaliação, como pode ser visto na tabela 3. 2.. O primeiro momento de avaliação corresponde à concentração das diferentes diluições, realizado em duplicado, enquanto a segunda medição consiste na concentração obtida após aplicação do protocolo do rastreio, realizada em triplicado. Os valores esperados foram obtidos por diluições sucessivas, o ponto A1 foi obtido após uma diluição de ½ da amostra inicial com concentração de 1,08x10⁶UI/mL, e os pontos A2, A3, A4 e A5 por diluições sucessivas de 10.

Através da tabela 3.2. verifica-se que os valores de diluição obtidos corresponderam à mesma ordem de grandeza dos valores esperados. E que na maioria dos casos, quando aplicado

o protocolo de rastreio, isto é, inserção da zaragatoa no meio de transporte, existe uma diluição na concentração de DNA, dez vezes. Sendo passível de extrapolar que as concentrações detetadas nas amostras de saliva por este método, seguindo este protocolo, serão na realidade dez vezes superiores aos resultados fornecidos.

No ponto A5, dado o valor esperado estar mais próximo do limite de detecção da técnica, os valores discordantes são aceitáveis.

Segundo Zasada et al. a concentração do DNA detetado está dependente quer do tipo de zaragatoa quer do tampão usado, no entanto, no estudo desenvolvido no âmbito desta dissertação com estes dois tipos de zaragatoa e com o meio RPMI não se verificaram alterações na concentração de DNA detetada. Quando se comparou a concentração de DNA obtida nas zaragatoas testadas, verificou-se que as cargas virais foram idênticas, encontrando-se na mesma ordem de grandeza, indo ao encontro dos resultados anteriormente obtidos na capacidade de absorção das zaragatoas. Deste modo a alteração das zaragatoas do tipo Rayon para Dacron não modificou as condições de análise no presente estudo quando comparado com o estudo piloto. As avaliações realizadas, garantiram que esta alteração não interferiu com o cálculo da prevalência da infeção congénita por HCMV do estudo.

Tabela 3.2 – Avaliação da capacidade de recuperação de DNA usando zaragatoas do tipo Dacron e Rayon. VE-Valor Esperado; a) não foi realizado a média

			Concentração obtida após inserção no meio de transporte (UI/mL)		Média (UI/mL)
	Concentração da diluição (UI/mL)	Média (UI/mL)			
A1 VE: 5,4x10 ⁵ UI/mL	3,72 x10 ⁵ UI/mL	3,82x10 ⁵ UI/mL	Rayon	1,00 x10 ⁵ UI/mL	9,25x10 ⁴ UI/mL
				1,01 x10 ⁵ UI/mL	
				7,61 x10 ⁴ UI/mL	
	3,92 x10 ⁵ UI/mL		Dacron	1,41 x10 ⁵ UI/mL	1,02x10 ⁵ UI/mL
				9,59 x10 ⁴ UI/mL	
				7,01 x10 ⁴ UI/mL	
A2 VE: 5,4x10 ⁴ UI/mL	2,80 x10 ⁴ UI/mL	2,74x10 ⁴ UI/mL	Rayon	6,93 x10 ³ UI/mL	7,18x10 ³ UI/mL
				6,35 x10 ³ UI/mL	
				8,28 x10 ³ UI/mL	
	2,68 x10 ⁴ UI/mL		Dacron	9,11 x10 ³ UI/mL	8,48x10 ³ UI/mL
				8,01x10 ³ UI/mL	
				8,32 x10 ³ UI/mL	
A3 VE: 5,4x10 ³ UI/mL	2,61x10 ³ UI/mL	2,72x10 ³ UI/mL	Rayon	9,79 x10 ² UI/mL	9,11x10 ² UI/mL
				7,38 x10 ² UI/mL	
				1,02 x10 ³ UI/mL	
	2,83x10 ³ UI/mL		Dacron	7,46 x10 ² UI/mL	8,96x10 ² UI/mL
				7,69 x10 ² UI/mL	

				1,17 x10 ³ UI/mL	
A4 VE: 5,4x10 ² UI/mL	4,47x10 ² UI/mL	6,08x10 ² UI/mL	Rayon	2,82 x10 ² UI/mL	2,06x10 ² UI/mL
				2,09 x10 ² UI/mL	
				1,26 x10 ² UI/mL	
	7,69 x10 ² UI/mL	Dacron	1,55 x10 ² UI/mL	1,29x10 ² UI/mL	
			85,03		
			1,48 x10 ² UI/mL		
A5 VE: 54 UI/mL	2,72 x10 ² UI/mL	a)	Rayon	Negativo	negativo
				Negativo	
				Negativo	
	negativo	Dacron	Negativo	a)	
			Negativo		
			83,1		

3.1.2. Avaliação dos meios de transporte

Para a análise dos meios de transporte recorreu-se a uma PCR semi-quantitativa, onde foram obtidos os valores de ct. Um valor baixo de ct corresponde a uma grande concentração de ácidos nucleicos e vice versa (Public Health England 2020; Qiagen 2013). Nesta avaliação dos meios de transporte, pretendeu-se averiguar se a mudança de meio resultaria nalguma alteração dos resultados. Na avaliação dos resultados usou-se, como regra de aceitação variações até dois cts de diferença, o que corresponde a concentrações na mesma ordem de grandeza.

Os resultados médios obtidos são apresentados na tabela 3. 3..

Para as duas amostras, as diferenças dos cts nos dois meios estiveram dentro do critério de aceitação.

Dado a concordância dos valores obtidos, concluiu-se que a alteração do meio de transporte não interfere nos valores obtidos para o rastreio em causa.

Tabela 3.3 – Avaliação da interferência dos meios RPMI e VTM (os valores apresentados são a média dos duplicados)

Meio	Amostra 1	Amostra 2
RPMI	26,10	31,94
VTM	26,06	30,75

3.2. Limite de deteção do protocolo implementado para o presente rastreio

Na avaliação do limite de deteção do protocolo a utilizar no presente estudo, analisou-se as 5 diluições realizadas a partir do extrato de DNA com a concentração de 1,08x10⁸ UI/mL e obteve-se os resultados apresentados na tabela 3. 4..

É de notar que os pontos C e D foram testados em triplicado, e os restantes foram testados em duplicado.

Tabela 3.4– Determinação da sensibilidade do protocolo implementado para o presente estudo

	Concentração esperada (UI/mL)	Concentração obtida (UI/mL)	Média (UI/mL)
A	1,08x10 ⁴	1,4x10 ⁴	1,33x10 ⁴ UI/mL
		1,2x10 ⁴	
B	1,08x10 ³	1,66x10 ³	1,79x10 ³ UI/mL
		1,69x10 ³	
C	3,60x10 ²	4,19x10 ²	5,02x10 ² UI/mL
		5,97x10 ²	
		4,91x10 ²	
D	1,80x10 ²	2,61x10 ²	2,88x10 ² UI/mL
		2,56x10 ²	
		3,47x10 ²	
E	90	91,93	71,49 UI/mL
		51,05	

Dado que o **limite de deteção** corresponde à última diluição com resultados positivos consistentes e neste ensaio, todas as diluições testadas obtiveram resultados positivos assumindo-se que a **sensibilidade** do protocolo é de 71UI/mL. Esta avaliação permitiu ainda, mostrar que a variação intra-ensaio é muito baixa, os resultados foram reprodutíveis e concordantes.

3.3. Rastreio Pós-Natal

3.3.1. Caracterização da população do estudo

No seguimento dos estudos anteriormente realizados no laboratório, nos quais se testou a aplicabilidade da metodologia de *pools* na deteção da infeção congénita por HCMV, pretendeu-se com o presente estudo implementá-la num rastreio pós-natal em larga escala.

Analisando as estatísticas em Portugal do Instituto Nacional de Estatística (INE) de 2017 a 2020, tabela 3.5., é possível verificar uma média anual de 86044 nados vivos (INE 2021). Segundo a equipa de Paixão, em Portugal a prevalência da infeção congénita por HCMV é de 1,1% (Paixão et al. 2009), correspondendo ao nascimento de aproximadamente 949 nados-vivos infetados, congenitamente por este vírus por ano. Destes, apenas 10-15% (95 a 142) apresentarão sintomatologia à nascença. Existindo 10 a 15% (83 a 125) nados-vivos assintomáticos com risco de virem a desenvolver sequelas tardias associadas à infeção, obtendo-se assim um número significativo de recém-nascidos potencialmente afetados pelo HCMV.

Tabela 3.5 – Nados-vivos de mães residentes em Portugal. Fontes de Dados: INE – Estatísticas de Nados-vivos, PORDATA. Última atualização 27-04-2021. Consultado a 11-11-2021 em <https://www.pordata.pt/DB/Portugal/Ambiente+de+Consulta/Tabela>

Anos	Total Nados-vivos
2017	86154
2018	87020
2019	86579
2020	84426
Média	86044

A infeção congénita por HCMV apenas pode ser diagnosticada nas 3 primeiras semanas de vida, após este período não é possível distinguir entre uma infeção congénita de uma infeção perinatal.

A população alvo (n) deste estudo, foram nados-vivos de quatro hospitais portugueses com grandes taxas de nascimentos, um do sector público, dois privados e uma parceria público privada (PPP) tentando assim colmatar um viés de amostragem por classes económico-sociais. A recolha decorreu, durante 16 meses, de 1 de junho de 2020 a 31 outubro de 2021. A seleção dos recém-nascidos baseou-se somente em dois fatores, nascer num destes quatro hospitais e os pais aceitarem a participação do seu bebé no estudo, tendo para tal assinado um consentimento informado. No total participaram no estudo 3759 recém-nascidos.

As amostras de saliva foram colhidas nas duas primeiras semanas de vida de modo que, em caso de positividade fosse possível a recolha de uma amostra de urina nas três semanas de vida para confirmação do diagnóstico de infeção congénita.

Durante o desenrolar do estudo deram entrada 3767 amostras no laboratório da NMS|FCM, das quais 8 foram excluídas do estudo, três não tinham zaragatoa, uma veio sem meio de transporte, uma a idade do recém-nascido era superior à permitida para o diagnóstico de infeção congénita e três correspondiam a colheitas repetidas. Deste modo, foram consideradas como válidas 3759 amostras de salivas, destas 36,1% (n=1357) corresponderam a recém-nascidos provenientes do CHLO, 25,5% (n=957) do HCD, 13,1% (n=494) da CP e 25,3% (n=951) do HVFX, gráfico 3.1 e tabela 3.6.

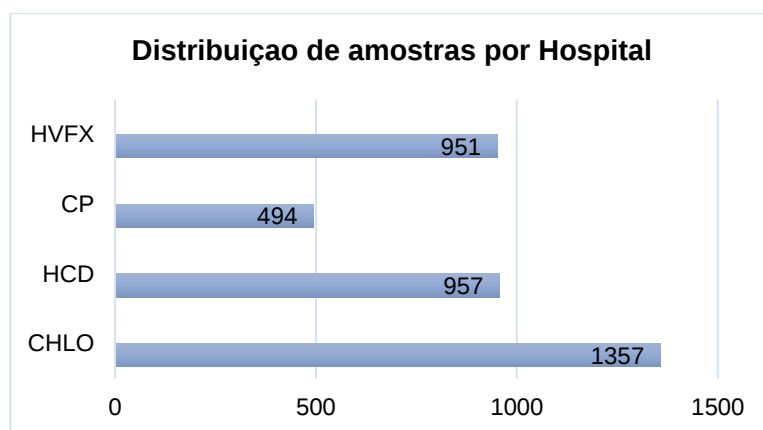


Gráfico 3.1– Distribuição das amostras de saliva analisadas no presente estudo por hospital. HVFX – Hospital Vila Franca de Xira, CP – Hospital Cuf Porto, HCD – Hospital Cuf Descobertas Lisboa, CHLO – Hospital São Francisco Xavier – Centro Hospitalar Lisboa Ocidental

Tabela 3.6 – Número absoluto e percentagens das amostras de saliva enviadas por cada hospital. HVFX – Hospital Vila Franca de Xira, CP – Hospital Cuf Porto, HCD – Hospital Cuf Descobertas Lisboa, CHLO – Hospital São Francisco Xavier – Centro Hospitalar Lisboa Ocidental

	Frequência	Percentagem
CHLO	1357	36,1
HCD	957	25,5
CP	494	13,1
HVFX	951	25,3
Total	3759	100,0

Apesar do baixo número de amostras enviadas pelo CP, a inserção deste hospital teve o objetivo de avaliar se a prevalência de infeção congénita por HCMV é diferente da verificada nos hospitais da região de Lisboa e Vale do Tejo.

Tabela 3.7 – Distribuição da população em estudo por género

		Frequência	Percentagem
Válido	Masculino	1878	50,0
	Feminino	1873	49,8
	Não Definido	7	,2
	Total	3758	100,0
Omisso	Sistema	1	,0
Total		3759	100,0

Quanto ao género, verifica-se praticamente uma sobreposição do sexo dos participantes, isto é, 49,8% (1873) recém-nascidos do género feminino e 50% (1878) do género masculino. Nos restantes 0,2% (7) a informação foi omissa. Analisando o gráfico 3.2, verifica-se que a percentagem do género masculino e feminino intra hospital segue o mesmo padrão.

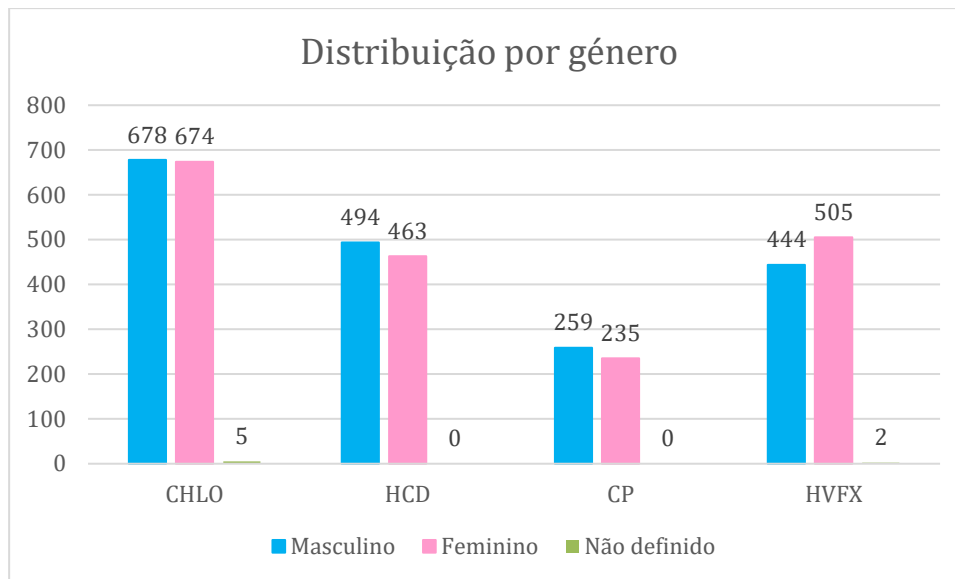


Gráfico 3.2 – Distribuição dos Recém-nascidos por gênero

Segundo estudos anteriores (Fernandes 2021; Silva 2020), o rastreio da infecção congênita recorrendo à metodologia de *pools* é viável com 10 ou 20 amostras, no entanto, dado o intervalo de dias entre o nascimento e a chegada das amostras ao laboratório da NMSJFCM, e ao baixo número de amostras rececionadas, optou-se por realizar este estudo com recurso a *pools* de 10 amostras de modo a que o resultado das salivas positivas fosse obtido em tempo útil de forma a permitir a confirmação de infecção congênita nas primeiras duas semanas de vida e assim fornecer um diagnóstico a todos os recém-nascidos envolvidos.

Ao longo dos meses foi possível observar uma distribuição não uniforme do número de amostras quer intra-hospitalar, gráfico 3.7, 3.8, 3.9 e 3.10, quer inter-hospitalar, gráfico 3.11, sendo a média de amostras por mês de 221.

Como se pode verificar na tabela 3.8, onde se apresenta uma estratificação da população, é possível verificar que na maioria dos casos, 50,7% (n=943), as amostras chegaram ao laboratório 1 ou 2 dias após o nascimento, verificando-se que a moda populacional foi de dois dias. Contudo 13,9% (n=519) das amostras ultrapassou os 5 dias, justificando mais uma vez a metodologia das *pools* de 10. O intervalo de tempo que decorre entre o nascimento e a chegada da amostra ao laboratório variou consoante o hospital, sendo que a maior amplitude foi verificada no CHLO e a menor no CP, gráficos 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6. Contudo, na maioria, a avaliação da moda por hospital reflete o mesmo que a avaliação global, no HVFX e no HCD a moda do intervalo de tempo decorrido entre o nascimento e a chegada das amostras ao laboratório encontra-se em 1 dia, com 406 e 298 amostras, respetivamente, no CHLO é de 2 dias (245 amostras) e no CP é de 4 dias (125 amostras).

Tabela 3.8– Distribuição das amostras segundo o tempo decorrido entre o nascimento e chegada ao laboratório da FCM

		Frequência	Porcentagem
Dias	0	96	2,6
	1	863	23,0
	2	943	25,1
	3	475	12,6
	4	458	12,2
	5	397	10,6
	6	271	7,2
	7	150	4,0
	8	41	1,1
	9	25	,7
	10	15	,4
	11	10	,3
	12	2	,1
	13	1	,0
	14	3	,1
	16	1	,0
	Sub-total	3751	99,8
Omisso		8	,2
Total		3759	100,0

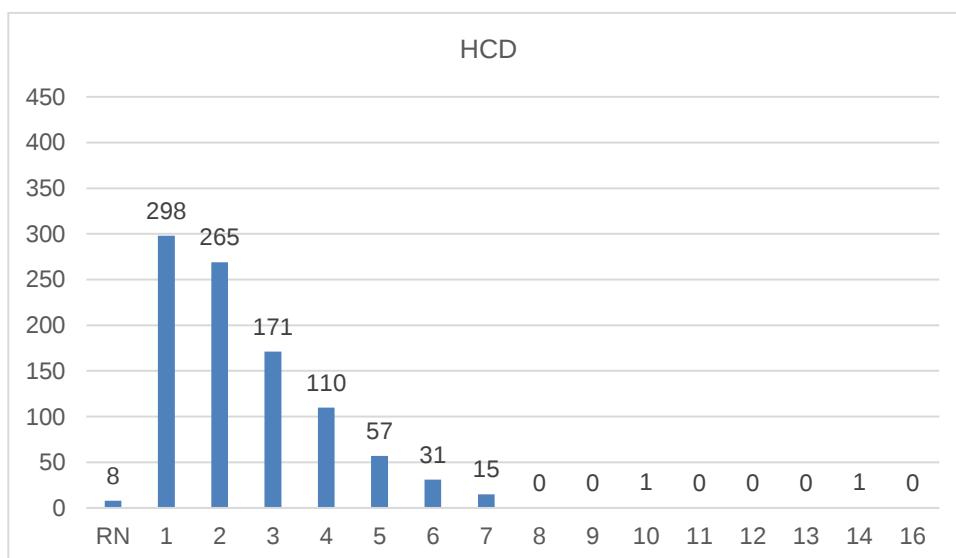


Gráfico 3.3 – Distribuição das amostras do Hospital Cuf Descobertas segundo o intervalo de tempo em dias entre o nascimento e a chega ao laboratório

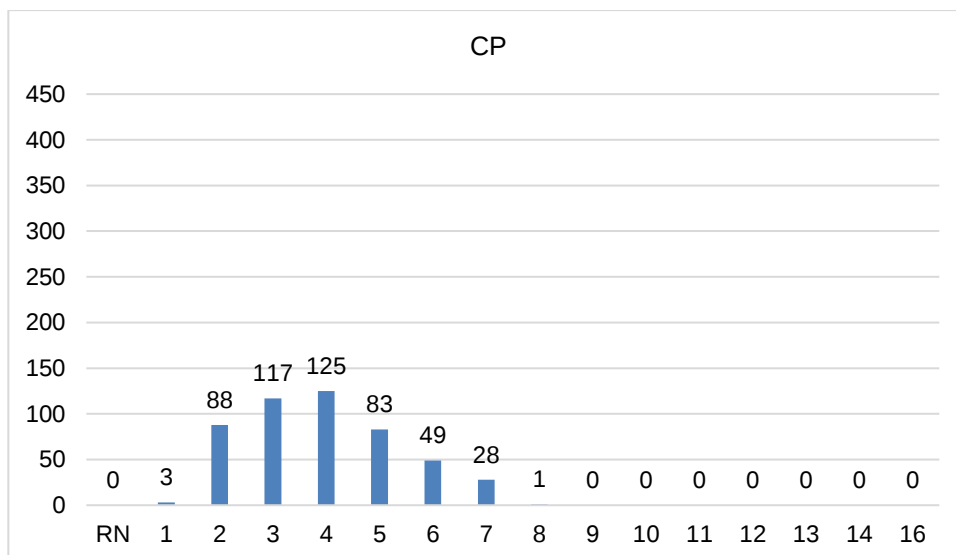


Gráfico 3.4 – Distribuição das amostras do Hospital Cuf Porto segundo o intervalo de tempo em dias entre o nascimento e a chega ao laboratório

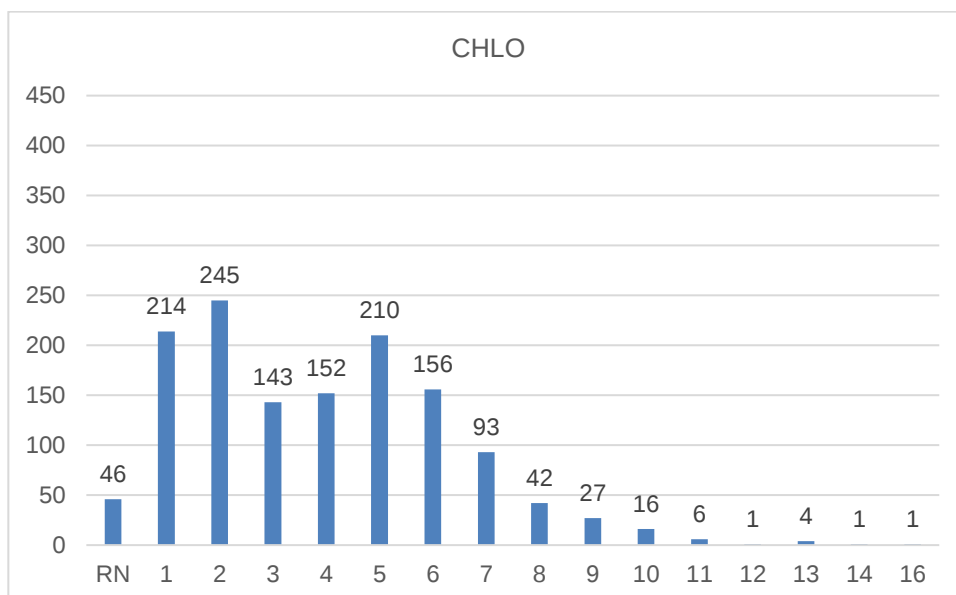


Gráfico 3.5 – Distribuição das amostras do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, em dias segundo o intervalo de tempo entre o nascimento e a chega ao laboratório da FCM

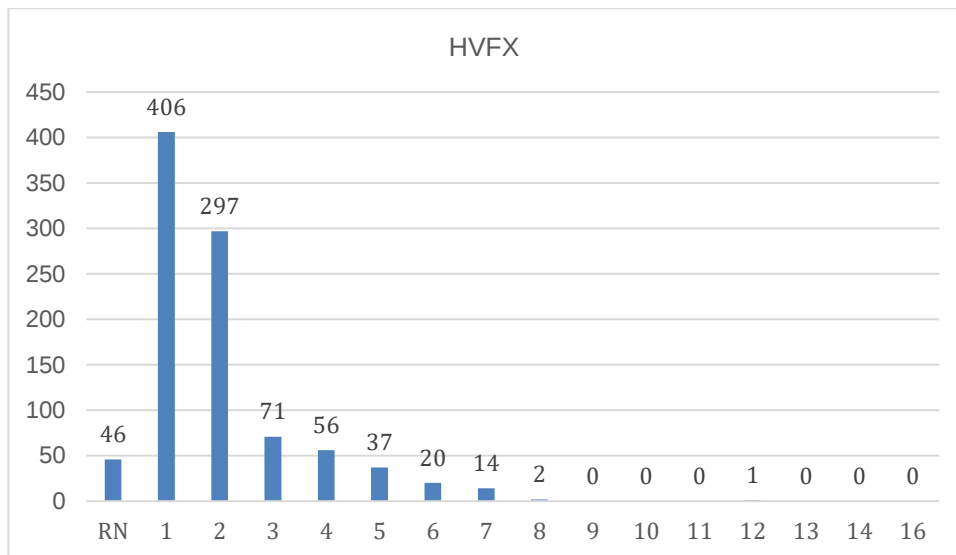


Gráfico 3.6 – Distribuição o das amostras do Hospital São Francisco Xavier segundo o intervalo de tempo, em dias, entre o nascimento e a chega ao laboratório da FCM

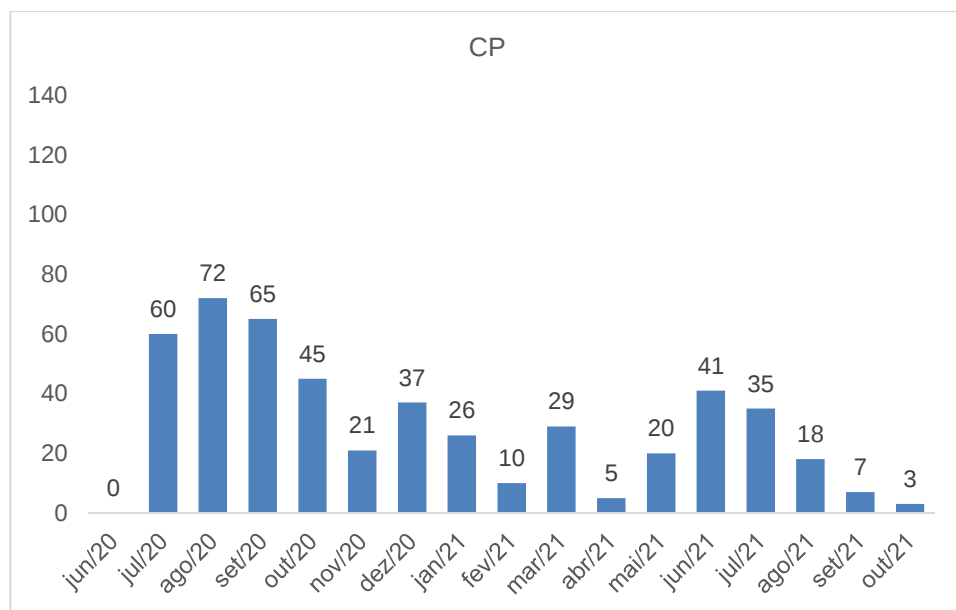


Gráfico 3.7 – Distribuição das amostras do Hospital Cuf Porto ao longo dos meses

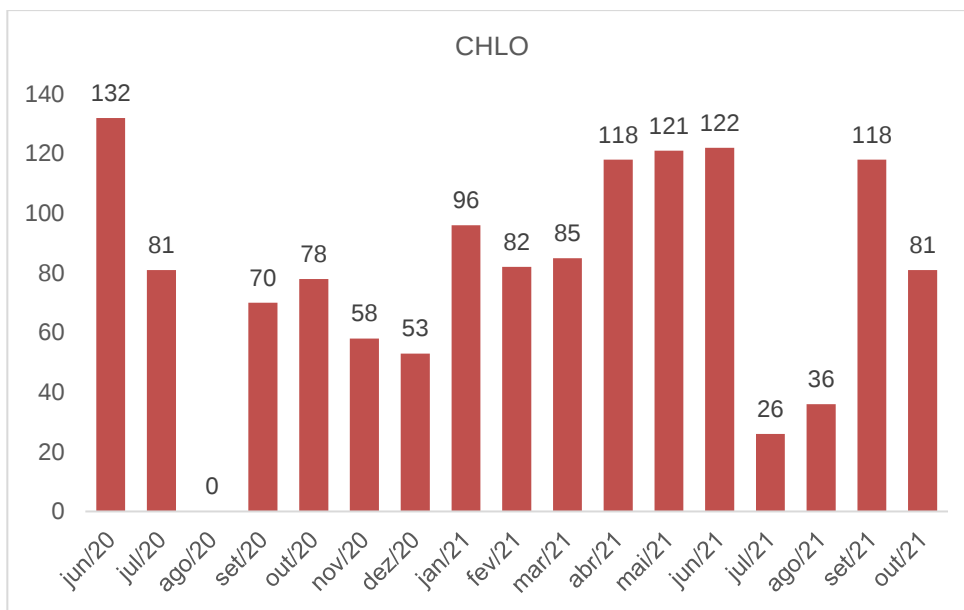


Gráfico 3.8 – Distribuição das amostras do CHLO ao longo dos meses

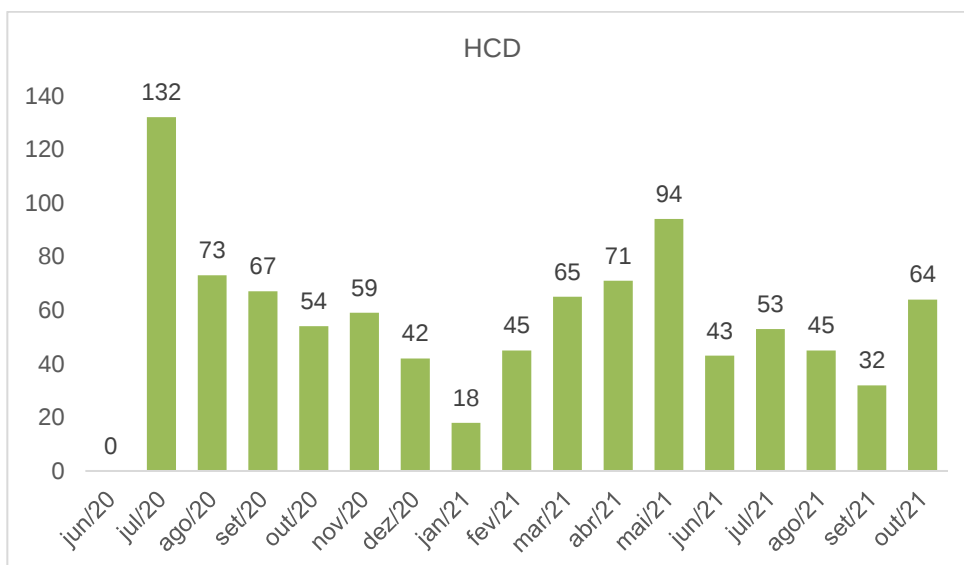


Gráfico 3.9 – Distribuição das amostras do HCD ao longo dos meses

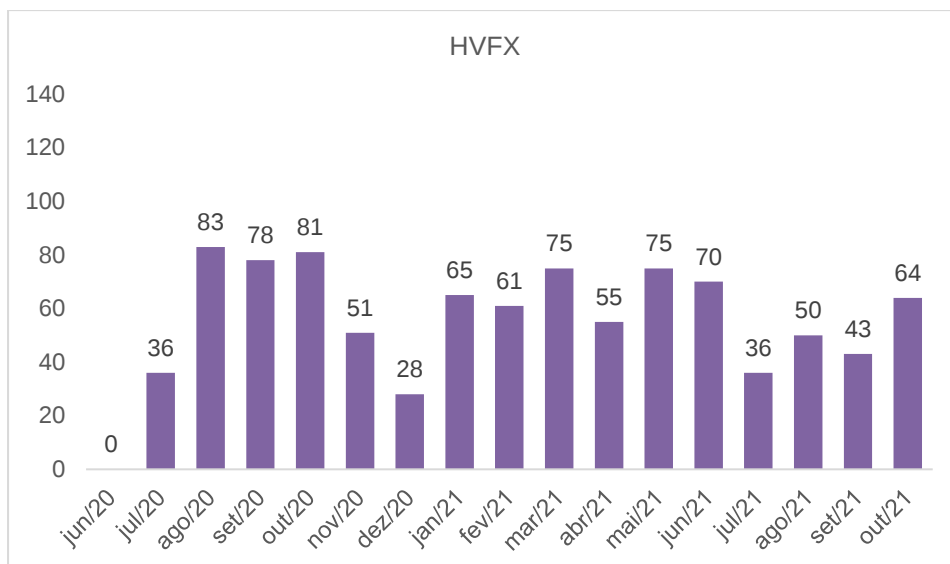


Gráfico 3.10 – Distribuição das amostras do HVFX ao longo dos meses

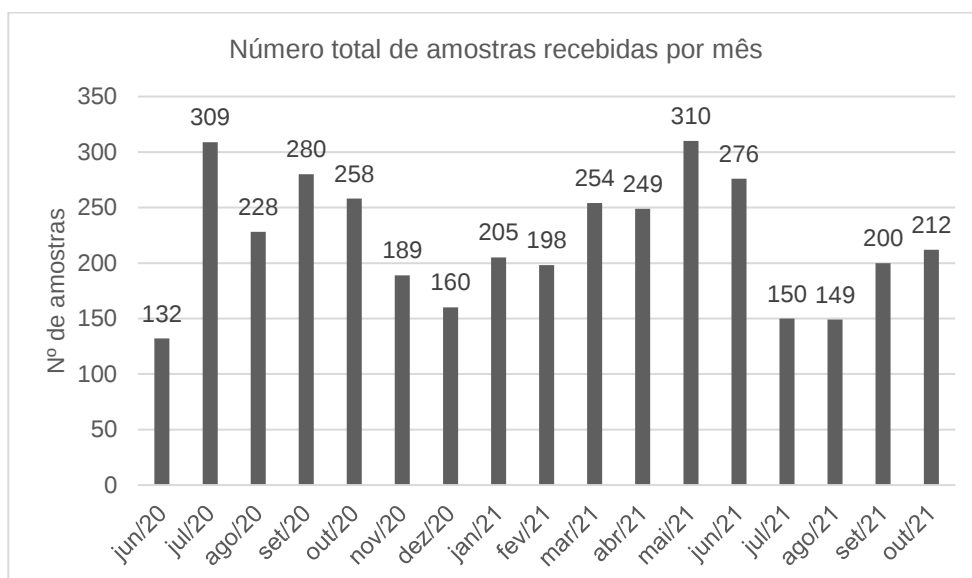


Gráfico 3.11 – Distribuição do número total de amostras recebidas por mês

Consultando os dados preliminares do INE quanto ao número de nados-vivos por local de residência da mãe entre junho de 2020 e agosto de 2021, (tabela 3.9), e comparando com o número de amostras, testadas durante o mesmo período, verifica-se que foram analisados apenas 8,55% (n=2863) de todos os nados-vivos da área metropolitana de Lisboa e 3,17% (n=484) da área metropolitana do Porto, respetivamente os locais onde se inserem os hospitais participantes. Deste modo pode haver um viés dos resultados do estudo devido à não participação. Ressalve-se que na análise dos dados da área metropolitana do Porto, este estudo, contou apenas com participação de um hospital privado, e na área metropolitana de Lisboa houve a participação de três hospitais, um hospital privado, um público e uma PPP. O estudo pode ter como limitação, as condições culturais e socioeconómicas dos pais dos recém-nascidos, podendo ter influenciado a participação no estudo.

Analisando a nível nacional, tabela 3.10, com os dados preliminares disponível à presente data para o mesmo período, verificou-se o nascimento de 101139 nados-vivos sendo possível averiguar que apenas se testou 3,31% (n=3347) desta população. Dada a baixa percentagem de nados-vivos testados, a prevalência de infecção congénita para HCMV obtida neste estudo não poderá ser extrapolada para nível nacional, representado apenas a prevalência da infecção congénita por HCMV nos quatro hospitais envolvidos e em contexto da pandemia Covid-19.

Tabela 3.9 – Número de nados-vivos por local de residência da mãe, área metropolitana de Lisboa e Porto, entre junho de 2020 e janeiro de 2021 Quadro extraído a 11 de novembro de 2021 de <http://www.ine.pt>, última atualização dos dados a 11 de novembro de 2021 (INE 2021).

Local de residência da mãe (NUTS - 2013)	Nados-vivos (N.º) por Local de residência da mãe (NUTS - 2013) e Sexo; Mensal														
	Período de referência dos dados														
	Agosto 2021	Julho 2021	Junho 2021	Maio 2021	Abril 2021	Março 2021	Fevereiro 2021	Janeiro 2021	Dezembro 2020	Novembro 2020	Outubro 2020	Setembro 2020	Agosto 2020	Julho 2020	Junho 2020
	Sexo														
	HM														
	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º
Área Metropolitana do Porto	1085	1108	1019	1025	1027	1068	939	982	1045	1 034	1 214	1 228	1 163	1 218	1 065
Área Metropolitana de Lisboa	2301	2318	2177	2289	2093	2158	1840	1984	2 044	2 246	2 438	2 559	2 444	2 407	2 202

Nados-vivos (N.º) por Local de residência da mãe (NUTS - 2013) e Sexo;
Mensal- INE

Tabela 3.10 – Número de nados-vivos por local de residência da mãe entre junho de 2020 e agosto de 2021 Quadro retirado a 11 de novembro de 2021 de <http://www.ine.pt>, última atualização dos dados a 11 de novembro de 2021

Local de residência da mãe (NUTS - 2013)	Nados-vivos (N.º) por Local de residência da mãe (NUTS - 2013) e Sexo; Mensal														
	Período de referência dos dados														
	Agosto 2021	Julho 2021	Junho 2021	Maio 2021	Abril 2021	Março 2021	Fevereiro 2021	Janeiro 2021	Dezembro 2020	Novembro 2020	Outubro 2020	Setembro 2020	Agosto 2020	Julho 2020	Junho 2020
	Sexo														
	HM														
	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º	N.º
Portugal	7036	6854	6431	6721	6243	6600	5681	5926	6 287	6 843	7 377	7 662	7 218	7 438	6 822

Nados-vivos (N.º) por Local de residência da mãe (NUTS - 2013); Mensal - INE,

3.3.2. Resultados do rastreio

Os resultados obtidos em cada serie da qPCR foram validados após a avaliação dos controlos adicionados a cada série de PCR, o CP², o CN, CCI e o CI de cada amostra.

Para a obtenção dos resultados seguiu-se o Algoritmo do protocolo do rastreio, tendo sido preparadas e analisadas 380 *pools*, a partir das 3759 amostras de saliva recebidas durante os 16 meses do estudo, obtendo-se 370 *pools* negativas e 10 *pools* positivas, com 12 amostras de saliva positivas. Destas 8 confirmaram ser infeções congénitas (confirmação após análise da amostra de urina colhida nas primeiras duas semanas de vida), tabela 3.11, as restantes 4 amostras de saliva positivas representam resultados falso-positivos, por possível contaminação com leite materno.

Tabela 3.11 – Resultados do PCR quantitativa; *amostras analisadas noutra laboratório

	Pool 10 amostras	Amostra individual	Saliva	Urina	
Pool 23	83,46 UI/mL	CHLO 164	2,5 X10 ³ UI/mL	Negativo	–
Pool 24	1,34x10 ⁶ UI/mL	CHLO 168	3,19 X10 ⁷ UI/mL	5,65x10 ⁵ UI/mL	Infeção congénita
Pool 145	3,0x10 ⁵ UI/mL	CHLO 426	3,0x10 ⁶ UI/mL	2,7x10 ⁵ UI/mL	Infeção congénita
Pool 208	72,74 UI/mL	CHLO 669	89,01 UI/mL	Negativo	–
Pool 214	2,32x10 ⁵ UI/mL	CHLO 688	1,28x10 ⁶ UI/mL	5.5x10 ⁵ UI/mL	Infeção congénita
		CHLO 689	72,06 UI/mL	Negativo	–
Pool 258	2,0x10 ⁵ UI/mL	CHLO 877	2,9x10 ⁶ UI/mL	5,4x10 ³ UI/mL	Infeção congénita
Pool 318	5,33x10 ² UI/mL	HVFX 772	4,03x10 ³ UI/mL	7,84x10 ⁴ UI/mL	Infeção congénita
Pool 326	1,17x10 ⁶ UI/mL	CHLO 1125	1,63x10 ⁷ UI/mL	1,54x10 ⁶ UI/mL	Infeção congénita
Pool 333	1,66x10 ⁴ UI/mL	CHLO 1148	1,81x10 ³ UI/mL	Negativo	–
		CHLO1150	2,47x10 ⁵ UI/mL	*	Infeção congénita
Pool 356	1,9x10 ⁴ UI/mL	CHLO1264	3,5x10 ⁵ UI/mL	2,5x10 ⁵ UI/mL	Infeção congénita

De modo a minimizar a obtenção de resultados falsos-positivos, foi solicitado à equipa hospitalar que possível fossem seguidas as recomendações de colheita do CDC, ou seja, efetuar a mesma antes da mamada ou 1h após esta (CDC,2020).

Após análise das concentrações de cargas virais de HCMV obtidas nas amostras de saliva positivas, verificou-se que as amostras correspondentes a falsos positivos têm valores muito inferiores, rondando as dezenas UI/mL, enquanto as amostras referentes às infeções congénitas apresentam concentrações superior a 10³ UI/mL. Obteve-se, no entanto, duas exceções, as amostras CHLO 164 e CHLO 1148, em que a carga viral de HCMV na saliva foi na ordem dos 10³ UI/mL, o que poderá levar à suspeita de uma colheita realizada num período muito próxima à última mamada.

Como referido no ponto 2.3.3. “Processamento das amostras de saliva” do Material e Métodos, no protocolo de PCR testaram-se as *pools* em duplicado o que permitiu detetar valores baixos de DNA. Na *pool* 208, foram repetidamente obtidos resultados inconclusivos, isto é, num poço um resultado negativo e no duplicado um valor positivo mas com um ct muito elevado (entre os 38 e 39,5), o que fez suspeitar de uma possível amostra positiva com baixa carga viral. Ao

separar e analisar as 10 amostras individualmente foi possível determinar que a amostra CHLO 669 era positiva, demonstrando assim que os resultados inconclusivos obtidos na análise da *pool* correspondiam à presença de amostras em que a carga viral se encontra próxima do limite de detecção.

Na análise dos resultados quantitativos obtidos nas amostras de saliva positivas e respetivas *pools* verifica-se, que são sobreponíveis após correção com o fator de diluição usado (1/10), ou seja, as amostras individuais apresentam uma concentração de DNA 10 vezes superior à concentração presente na *pool*. É ainda possível verificar que as cargas virais detetadas nas amostras de saliva das infeções congénitas apresentaram valores compreendidos entre 4.03×10^3 UI/mL e 1.63×10^7 UI/mL enquanto as amostras de urina variaram entre $2,7 \times 10^5$ UI/mL e $1,54 \times 10^6$ UI/mL. Verifica-se que a carga viral nas amostras de saliva é 10 vezes superior à das amostras de urina. Contudo, dado o baixo número de conjuntos saliva-urina analisados, (n=8), não é possível retirar conclusões definitivas destes dados.

As únicas exceções, são a amostra HVFX 772, da *pool* 318, em que o valor da carga viral da amostra de saliva é na amostra de urina e a amostra CHLO 1264 em que os valores estão na mesma ordem de grandeza.

Na tabela 3.13 encontram-se em falta o resultado da quantificação da urina porque o RN foi transferido para outro hospital onde foi confirmada a infeção congénita por análise da urina (resultado positivo por PCR comercial).

3.3.3. Prevalência da infeção congénita de HCMV

Na determinação da prevalência e respetivo intervalo de confiança a 95% da infeção congénita por HCMV utilizou-se a ferramenta Epitools *Epidemiological Calculators*, na opção “*confidence limits for a proportion*” com o método exato ou *Clopper-Pearson*, dado a amostragem tratar-se de uma proporção pequena. Com os 8 casos positivos na totalidade de 3759 amostras analisadas obteve-se uma prevalência de 0,21% de infeção congénita por HCMV para os 4 hospitais envolvidos (tabela 3.12). Este valor de prevalência é inferior ao que foi identificado em estudos anteriores, numa amostragem a nível nacional, a prevalência situou-se 1,1% (Paixão et al. 2009), e numa amostragem em dois hospitais de Lisboa (HCD e HVFX) realizada entre outubro de 2018 e maio de 2019 o valor foi de 0,67% (Fernandes 2021)

Tabela 3.12 – Prevalência da Infeção congénita por HCMV para o presente estudo

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95 % CL	Upper 95 % CL
Clopper-Pearson exact	8	3759	0.0021	0.0009	0.0042

A prevalência alcançada neste estudo encontra-se também a baixo das percentagens para a infeção congénita por HCMV em países desenvolvidos, que variam entre 0,4 – 2,2 (Lopo et al. 2011). Contudo, a prevalência detetada continua a ser superior a outras doenças congénitas de notificação obrigatória e com planos de rastreio implementados, como a sífilis e a toxoplasmose congénita. No caso da sífilis congénita a prevalência é inferior a 0.01% e da toxoplasmose

congénita a sua prevalência é variável consoante a região demográfica, sendo a prevalência média na União Europeia de 1 a 3 por cada 10 000 nados vivos (Andrade et al. 2018; ECDC 2020).

O decréscimo encontrado no presente estudo, comparativamente ao estudo anteriormente realizado, em 2009, pela equipa de Paixão incluindo amostras representativas das diferentes regiões de Portugal continental (Paixão, 2009), poderá estar a ser influenciado pelas características da população testada, isto é, testou-se recém-nascidos em que os progenitores residem em grandes centros urbanos, mais propriamente em duas capitais de distrito, o que pode levar, por exemplo, a um maior conhecimento sobre os diferentes agentes etiológicos que podem afetar o feto durante a gravidez, diferentes níveis de escolaridade ou ainda diferentes hábitos de higiene.

Apesar do aparente decréscimo na prevalência, a implementação do rastreio continua a ser de extrema importância, porque permite a identificação de recém-nascidos assintomáticos, o seu acompanhamento com a deteção/tratamento precoce de eventuais sequelas da infeção congénita por CMV e ainda, porque permite a monitorização de incidência da infeção congénita e a definição de estratégias de promoção de saúde, tais como, a disseminação da informação adequada sobre a transmissão do HCMV e como evitá-la.

Dado as diferenças na prevalência da infeção congénita por HCMV, comparativamente ao ensaio piloto (realizado entre 2018 e 2019 por (Fernandes et al.), procedeu-se a uma análise comparativa entre os dois, quando o número total de amostras foi similar (2019: n=1492, 10 amostras positivas; 2020: n=1277, 2 amostras positivas) (Fernandez et al. 2021). Na tabela 3.13 verifica-se a prevalência para cada estudo com o número de amostras totais mencionado, sendo que a prevalência em 2018/2019 era de oito vezes superior quando comparada com prevalência de 2020. Comparando os estudos, observa-se que o intervalo de confiança para 95% não contém o valor zero, ambos os limites são negativos, o que significa que houve diferenças significativas entre os dois anos ao nível de significância de 5%, que permite concluir que a diferença na prevalência é estatisticamente significativa. (Fernandez et al. 2021)

Tabela 3.13 – Estimativa pontual e intervalos de confiança para estudos independentes e comparação entre eles. ¹Exact binomial, ²Distribuição normal, ³Baseado no método combinado de Newcombe (Newcombe 1998)

	Estimativa pontual (%)	95% Intervalo de Confiança (%)
2019	0.67	(0.32, - 1.23) ¹
2020	0.078	(0.00, 0.44) ¹
Comparação 2020-2019	-0.0059	(-0.01, -0.002) ² (-0.0012, -0.0115) ³

Tal como mencionado no artigo desenvolvido durante esta dissertação (Fernandez et al. 2021), e com os dados obtidos para outras infeções infantis num estudo Italiano referente ao mesmo período pandémico (Belingheri et al. 2021), esta diminuição na prevalência pode estar influenciada com a pandemia Covid-19. Isto porque, para controlo da disseminação da infeção Covid-19 o Estado Português decretou o confinamento durante os meses de março a junho de 2020. Durante este confinamento as creches, infantários, pré-escolas, fecharam e, por consequentemente, os pais ficaram confinados em casa com os seus filhos, o que indiretamente parece ter evitado a propagação do HCMV, em específico às progenitoras grávidas demonstrando

assim, como já foi anteriormente referido estes locais são um importante foco de transmissão do vírus (Adler et al. 2004; Stuar P. Adler 1988). A 22 de janeiro de 2021, as creches, infantários, pré-escolas, voltam a fechar dado o aumento exponencial de casos e mortes associados à infeção Covid-19 voltando a reabrir quase dois meses depois, a 15 de março. Estes dados podem ser observados na figura 3.1, onde se tenta demonstrar a relação entre o período gestacional normal, com o número de amostras obtidas no estudo por mês e as duas fases de confinamento. No gráfico 3.14 pode ainda observar-se em que meses surgiram os casos positivos de infeção congénitas por HCMV.

Para além desta possível interferência existe ainda o facto de os cuidados de higiene, como a lavagem e desinfeção das mãos, terem sido reforçados durante o período de pandemia. As creches e infantários reforçaram a desinfeção de brinquedos existentes nas salas e proibiram que as crianças levassem os seus para estes recintos. É de ressaltar, como mencionado anteriormente, que o reforço da higiene é uma das medidas mais eficazes para a diminuição de qualquer propagação do HCMV.

Analisando a figura 3.1 em junção com os gráficos 3.12, 3.13 e 3.14, verificamos que os casos positivos foram obtidos nos meses de junho e dezembro de 2020, e março, maio, julho, agosto, setembro de 2021, ou seja, o primeiro e/ou segundo trimestre gestacional situam-se fora dos períodos de confinamento. Sendo que a taxa de transmissibilidade da infeção congénita é de 30-40% no primeiro trimestre e 38-44% no segundo, e em que o risco de aparecimento de sequelas no recém-nascido é superior quando a infeção ocorre no primeiro trimestre. Dado não termos acesso aos dados serológicos maternos, não foi possível verificar se as infeções congénitas diagnosticadas no rastreio advieram de infeções.

Dado estes períodos gestacionais coincidiram com a altura em que as creches e infantários estiveram em pleno funcionamento, e se os positivos ocorrerem em gestantes com filhos a frequentar estes estabelecimentos (dados não recolhidos no estudo) o risco de contacto com o HCMV foi maior e poderá ser o responsável pela infeção da gestante e a transmissão ao feto. Importa referir que a excreção viral do HCMV em crianças pode chegar até aos 36 meses de idade (Stuart P. Adler 1988; Morcarski. 2013).

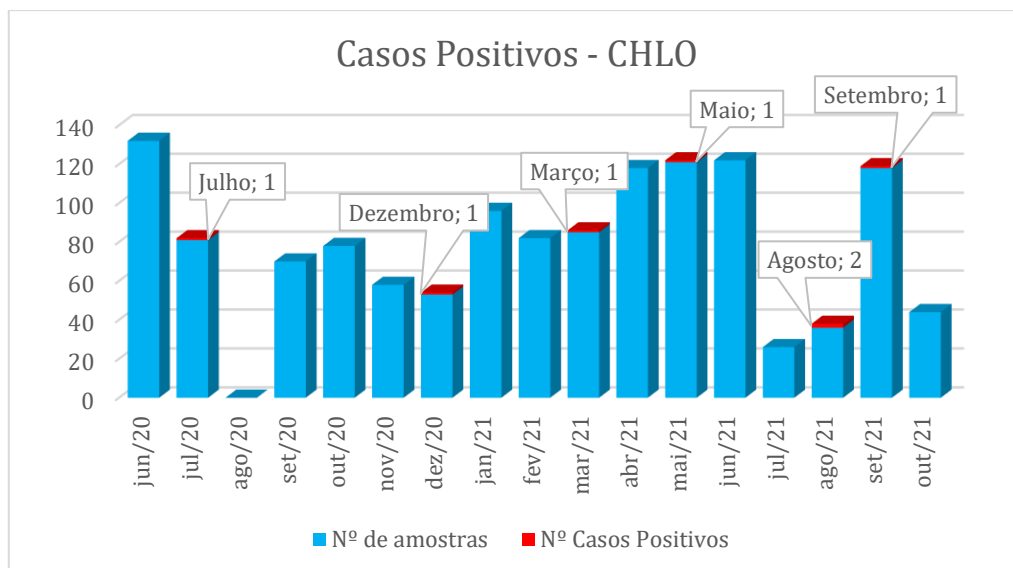


Gráfico 3.12 Distribuição dos casos positivos de infecção congénita no CHLO

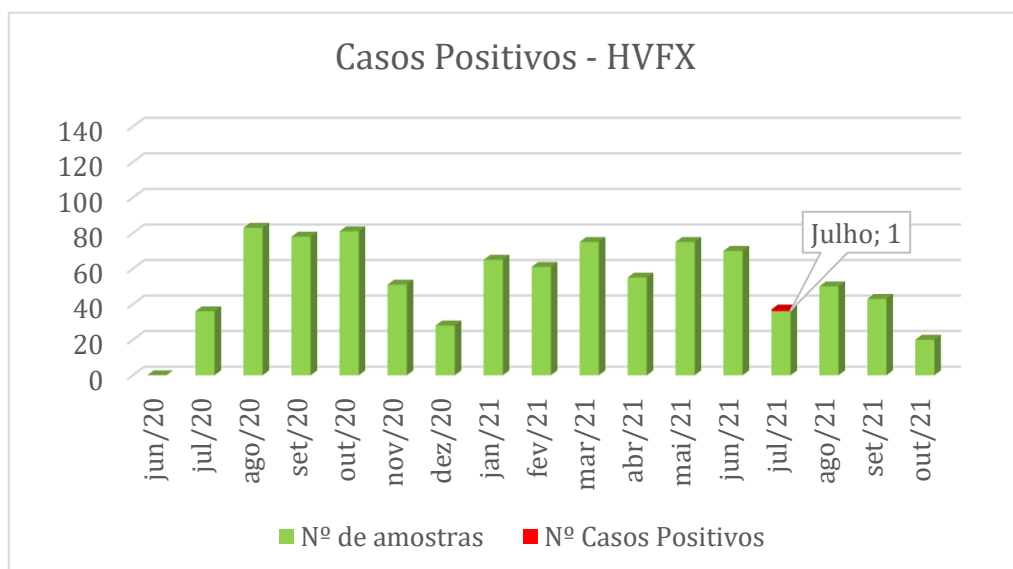


Gráfico 3.13 Distribuição dos casos positivos de infecção congénita no HVFX

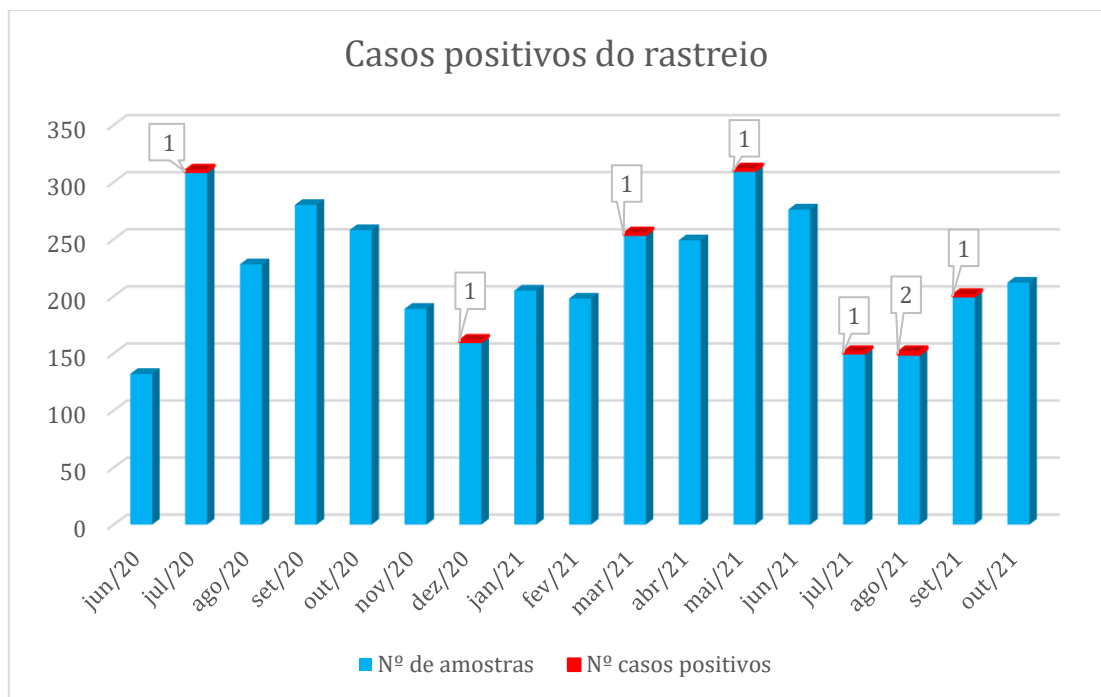


Gráfico 3.14 – Distribuição dos casos positivos do rastreio

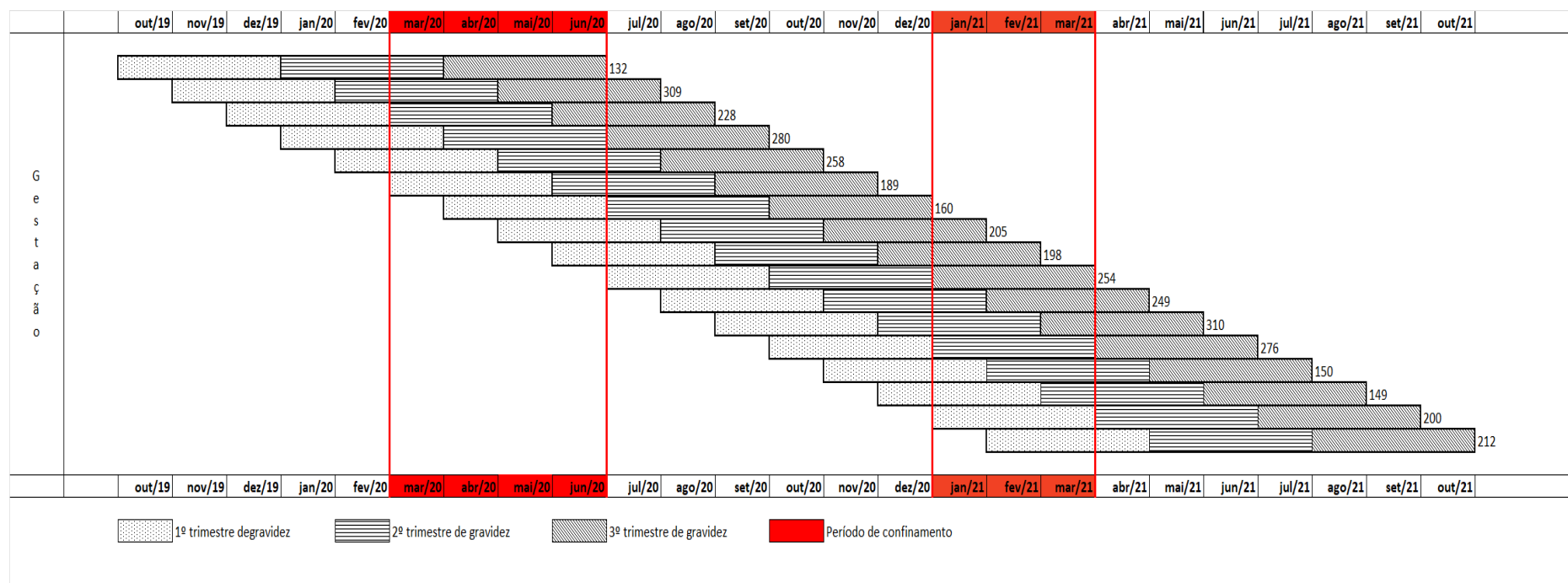


Figura 3.1 – Correlação do tempo de gestação, número de amostras mensais e períodos de confinamento em Portugal

3.4. Custos associados à metodologia das *Pools*

Na 3.14 são apresentados os custos associados à análise das amostras individuais e numa *pool*. Como, é possível verificar, a análise de uma amostra individual no laboratório MNS|FCM acarreta um valor de 8,45€, e deste modo se este estudo tivesse sido realizado pela análise individualizada das amostras ter-se-ia gasto 31 763,55€. No entanto, ao executar a análise em *pools* o preço por amostra a 1,31€, valor seis vezes menor, e consequentemente a uma poupança de 84,5%.

Assim, no âmbito deste estudo, a análise das 380 *pools* envolveu um gasto aproximado de 4 978€.

Tabela 3.14 – Custos associados à análise de amostras individuais vs. *Pools* de 10 amostras

	Amostra individual	Pool 10 amostras
Material	0,56€	5,21€
Extração de DNA	4,25€	4,25€
PCR	3,64€	3,64€
Total	8,45€	13,10€

No entanto, para o cálculo real do custo do estudo há que ter em consideração que uma *pool* positiva corresponde a 10 amostras de saliva que terão de ser analisadas individualmente, e posteriormente analisar as amostras de urina correspondentes às amostras de saliva positivas. Das 380 *pools* analisadas, 10 foram positivas, correspondente a 100 amostras de saliva que tiveram que ser reanalisadas individualmente. Destas 100 amostras de saliva, 12 obtiveram um valor positivo para HCMV, tendo sido pedido a recolha de amostra de urina para confirmação do resultado. Assim sendo, o custo real do estudo ficou em 5 924,40€.

Pela abordagem da análise das amostras individualmente, ter-se ia analisado as 3759 amostras por um valor de 8,45€, onde se obteria as mesmas 12 amostras de saliva positivas, correspondendo a 12 urinas para confirmação do resultado, perfazendo assim um valor de 31 966,35€.

Conclui-se assim que mesmo com a necessidade de confirmação dos resultados, com separação das *pools* para análise individual das amostras de saliva e posteriormente a análise das amostras de urina para confirmação dos resultados, consegue-se uma poupança aproximada de 82%.

4. Conclusão

Após a conclusão deste estudo experimental e da redação deste manuscrito, é possível reter como fundamental o rastreio da infeção congénita por HCMV, dado o peso na sociedade que a mesma representa. Porém, este rastreio não deve ser focado na grávida, como acontece para outras infeções preocupantes durante a gestação. Dado todos os fatores apresentados anteriormente, não seria eticamente correto um foco exclusivo na infeção da grávida, aumentando assim o *stress* aos futuros pais com mais um “se” que foge ao seu controlo. Todavia, dada a situação atual, isto é, ausência de profilaxia, tratamento, vacina ou rastreio, deveriam começar a aplicar-se programas de prevenção, informando corretamente estes futuros pais sobre a infeção, o seu agente etiológico e as medidas preventivas que podem adotar para minimizar a contração da mesma. Vivemos na era da informação, no entanto, nem sempre sabemos procurá-la ou no que acreditar, tornando-se assim uma responsabilidade pública a divulgação de cuidados de saúde básicos.

A prevalência mundial da infeção congénita por HCMV está compreendida entre 0,2 e 2,2%. Contudo, neste estudo realizado entre 2020/2021, verificou-se uma diminuição acentuada da prevalência da infeção congénita para HCMV em Portugal quando comparada com dados anteriores sobre a prevalência em Portugal (1,1%) (Paixão et al. 2009) ou mesmo na prevalência no estudo piloto realizado em 2019 (0,67%) (Fernandes et al. 2021), à semelhança do que aconteceu com outras infeções infantis como a varicela, rubéola, sarampo noutras cidades europeias no mesmo período (Belingheri et al. 2021). A possível explicação da diminuição da prevalência da infeção congénita por HCMV pode residir no confinamento implementado pelo governo no combate à pandemia Covid-19, tal como se suspeita quanto às restantes infeções infantis mencionadas (Belingheri et al. 2021; Fernandez et al. 2021), dado que com estas medidas as crianças deixaram de frequentar as creches/infantários, locais onde a transmissão de HCMV é comum e frequente quebrando assim a via de transmissão entre crianças e a transmissão aos seus familiares, para além de que com a pandemia houve um reforço nas medidas de higiene e cuidados de saúde quando em contacto com outros.

Neste estudo recorreu-se a *pools* de 10 amostras de saliva, dado o baixo número de amostras obtidas ao longo dos meses. Através desta metodologia foi possível detetar 8 casos, tendo sido demonstrando que esta metodologia não interferiria negativamente no diagnóstico, e traria a vantagem de um diagnóstico precoce e mais económico. O fato deste rastreio ser possível por via de amostras de saliva, para além de acarretar diversas vantagens, exige ao mesmo tempo a apreensão de medidas de uniformização, quer a nível da extração, metodologia de PCR usada, kits comerciais ou metodologia “*in house*” e ainda a nível das colheitas recaindo no tempo e altura de colheita, isto é, uma colheita que dure cerca de dez segundos e que seja efetuada antes da mamada ou pelo menos uma hora após a mesma, minimizando assim a possibilidade de falsos positivos e permitindo a obtenção de resultados reprodutíveis e de monitorização fiáveis.

Deste modo, o diagnóstico da infeção congénita deve obrigatoriamente passar pelo rastreio do recém-nascido. Deverá ser abordado com base num rastreio universal, só desta forma será possível detetar todos os casos de infeção congénita, assintomáticos ou não. Com a

implementação do rastreio através da metodologia apresentada, *pools* de saliva, seria possível a diminuição dos custos associados a cada análise em cerca de 80%, para além dos custos associados à infeção, quer por via da monitorização das sequelas presentes à nascença, e futuras, quer pelos tratamentos atempados com o devido acompanhamento educacional e psicológico resultando assim num ganho da qualidade de vida destas crianças e suas famílias.

Dado o considerável impacto económico que este vírus acarreta, a introdução de uma vacina com uma eficácia perto dos 100% seria o ideal, uma vacina com capacidade de proteger os seronegativos ou os imunocomprometidos e que impedisse a ocorrência da infeção congénita. No entanto, até aos dias de hoje, a mesma ainda não surgiu, dadas a complexidade deste agente viral e os desafios intrínsecos ao desenvolvimento de uma vacina. Contudo, existem diversos estudos e ensaios em desenvolvimento que se apresentam promissores, havendo talvez, num futuro relativamente próximo, a existência de uma vacina com as propriedades e eficácia desejadas para prevenir esta infeção congénita de tão baixa incidência.

5. Referências Bibliográficas

- Adler, Stuart P. 1988. "Cytomegalovirus Transmission among Children in Day Care, Their Mothers and Caretakers." *The Pediatric Infectious Disease Journal* 7(4):279–85. doi: 10.1097/00006454-198804000-00009.
- Adler, Stuart P. 2013. "Immunization to Prevent Congenital Cytomegalovirus Infection." *British Medical Bulletin* 107(1):57–68. doi: 10.1093/bmb/ldt023.
- Adler, Stuart P., Jack W. Finney, Anne Marie Manganello, and Al M. Best. 2004. "Prevention of Child-to-Mother Transmission of Cytomegalovirus among Pregnant Women." *The Journal of Pediatrics* 145(4):485–91. doi: 10.1016/j.jpeds.2004.05.041.
- Aloy, Josep Figueras, Francesc Botet Mussons, and Enriqueta Álvarez Domínguez. 2012. "Infecciones Por Citomegalovirus En El Periodo Neonatal." *Anales de Pediatría Continuada* 10(6):305–12. doi: 10.1016/S1696-2818(12)70104-X.
- Andrade, Joana Verdelho, Catarina Resende, Joana Campos, Cristina Batista, Cristina Faria, Cecília Figueiredo, Vitor Bastos, Nuno Andrade, and Isabel Andrade. 2018. "Recém-Nascidos Com Risco de Toxoplasmose Congênita, Revisão de 16 Anos." *Scientia Medica* 28(4):32169. doi: 10.15448/1980-6108.2018.4.32169.
- Bardanzellu, Flaminia, Vassilios Fanos, and Alessandra Reali. 2019. "Human Breast Milk-Acquired Cytomegalovirus Infection: Certainties, Doubts and Perspectives." *Current Pediatric Reviews* 15(1):30–41. doi: 10.2174/1573396315666181126105812.
- Barnusell, J. Badia, C. Figaró Voltà, M. Domingo Puiggròs, and V. Aldecoa Bilbao. 2014. "Infecciones Congénitas." *Pediatría Integral* XVIII(6):356–66.
- Baumforth, K. R. N., P. N. Nelson, J. E. Digby, J. D. O'Neil, and P. G. Murray. 1999. "Demystified ... the Polymerase Chain Reaction." *Molecular Pathology: MP* 52(1):1–10. doi: 10.1136/mp.52.1.1.
- Belingheri, Michael, Maria Emilia Paladino, Susanna Piacenti, and Michele Augusto Riva. 2021. "Effects of COVID-19 Lockdown on Epidemic Diseases of Childhood." *Journal of Medical Virology* 93(1):153–54. doi: 10.1002/jmv.26253.
- Billette de Villemeur, Agathe, Pierre Tattevin, and Louis-Rachid Salmi. 2020. "Hygiene Promotion Might Be Better than Serological Screening to Deal with Cytomegalovirus Infection during Pregnancy: A Methodological Appraisal and Decision Analysis." *BMC Infectious Diseases* 20(1):418. doi: 10.1186/s12879-020-05139-8.
- BioRad. 2006. *Real-Time PCR Applications Guide*.
- Boppana, Suresh b. 2006. "Cytomegalovirus." Pp. 73–86 in *Congenital and Perinatal Infections: A Concise Guide to Diagnosis*, edited by C. Hutto and G. B. Scott. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Cannon, Michael J. 2009. "Congenital Cytomegalovirus (CMV) Epidemiology and Awareness." *Clinical Virology* 6–10. doi: 10.1016/j.jcv.2009.09.002.
- Cannon, Michael J., Paul D. Griffiths, V. Aston, and William D. Rawlinson. 2014. "Universal Newborn Screening for Congenital CMV Infection: What Is the Evidence of Potential Benefit?" *Reviews in Medical Virology* 24(5):291–307. doi: 10.1002/rmv.1790.
- Cannon, Michael J., Kyresa Westbrook, Denise Levis, Mark R. Schleiss, Rosemary Thackeray, and Robert F. Pass. 2012. "Awareness of and Behaviors Related to Child-to-Mother Transmission of Cytomegalovirus." *Preventive Medicine* 54(5):351–57. doi: 10.1016/j.ypmed.2012.03.009.
- Cardoso, Emanuelle Santos De Carvalho, Bruna LaísDe Santos Jesus, Luciano Gamada Silva Gomes, Sandra Mara Bispo Sousa, Sandra Rocha Gadelha, and Lauro Juliano Marin. 2015. "The Use of Saliva as a Practical and Feasible Alternative to Urine in Large-Scale Screening for Congenital Cytomegalovirus Infection Increases Inclusion and Detection Rates." *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48(2):206–7. doi: 10.1590/0037-8682-0200-2014.
- CDC Centers for Disease Control. 2020a. "Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection - Clinical Overview." *Centers for Disease Control and Prevention*. Retrieved August 5, 2021 (<https://www.cdc.gov/cmv/clinical/overview.html>).
- CDC Centers for Disease Control. 2020b. "Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection - Laboratory Testing." *CDC, Center for Disease Control and Prevention*. Retrieved (<https://www.cdc.gov/cmv/clinical/lab-tests.html>).
- CDC Centers for Disease Control. 2021. "Adjuvanted Flu Vaccine." *CDC, Center for Disease Control and Prevention*. Retrieved (<https://www.cdc.gov/flu/prevent/adjuvant.htm>).

- Cekinović, Durdica, Mijo Golemac, Ester Pernjak Pugel, Jelena Tomac, Luka Cicin-Sain, Irena Slavuljica, Russell Bradford, Sonja Misch, Thomas H. Winkler, Michael Mach, William J. Britt, and Stipan Jonjić. 2008. "Passive Immunization Reduces Murine Cytomegalovirus-Induced Brain Pathology in Newborn Mice." *Journal of Virology* 82(24):12172–80. doi: 10.1128/JVI.01214-08.
- Champoux, James J., Frederick C. Neidhardt, W. Lawrence Drew, and James J. Plorde. 2004. *Sherris - Medical Microbiology - An Introduction to Infectious Diseases*. 4th ed. edited by K. J. Ryan and C. G. Ray. McGraw- Hill.
- Chiopris, Giulia, Piero Veronese, Francesca Cusenza, Michela Procaccianti, Serafina Perrone, Valeria Daccò, Carla Colombo, and Susanna Esposito. 2020. "Congenital Cytomegalovirus Infection: Update on Diagnosis and Treatment." *Microorganisms* 8(1516):1–17. doi: 10.3390/microorganisms8101516.
- Chiurchiu, S., F. I. Calo Carducci, F. Rocchi, A. Simonetti, G. Bonatti, S. Salmaso, D. Melchiorri, L. Pani, and P. Rossi. 2013. "Is HCMV Vaccine an Unmet Need? The State of Art of Vaccine Development." *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 26(1):15–26. doi: 10.1177/039463201302600102.
- Choi, K. Yeon, Nadia S. El-Hamdi, and Alistair McGregor. 2019. "Inclusion of the Viral Pentamer Complex in a Vaccine Design Greatly Improves Protection against Congenital Cytomegalovirus in the Guinea Pig Model." edited by R. M. Sandri-Goldin. *Journal of Virology* 93(22). doi: 10.1128/JVI.01442-19.
- Clinicaltrials.gov. 2017. "Asymptomatic Congenital CMV Treatment - NCT03301415." *U.S. National Library of Medicine - Clinicaltrials.Gov*. Retrieved (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03301415>).
- Clinicaltrials.gov. 2019. "Valacyclovir to Prevent Vertical Transmission of Cytomegalovirus After Maternal Primary Infection During Pregnancy - NCT02351102." *U.S. National Library of Medicine - Clinicaltrials.Gov*. Retrieved (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02351102>).
- Clinicaltrials.gov. 2021a. "A Long-Term Extension Study to Evaluate the Immunogenicity and Safety of Cytomegalovirus (CMV) MRNA-1647 Vaccine: NCT04975893." *U.S. National Library of Medicine - Clinicaltrials.Gov*. Retrieved (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT04975893>).
- Clinicaltrials.gov. 2021b. "A Study to Evaluate a Therapeutic Vaccine, ASP0113, in Cytomegalovirus (CMV)-Seropositive Recipients Undergoing Allogenic Hematopoietic Cell Transplant (HCT)(HELIOs) - NCT01877655." *U.S. National Library of Medicine - Clinicaltrials.Gov*. Retrieved (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01877655>).
- Codaccioni, Camille, Christelle Vauloup-Fellous, Emmanuelle Letamendia, Julien Saada, Alexandra Benachi, and Alexandre J. Vivanti. 2019. "Case Report on Early Treatment with Valaciclovir after Maternal Primary Cytomegalovirus Infection." *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction* 48(4):287–89. doi: 10.1016/j.jogoh.2019.01.003.
- Crough, Tania, and Rajiv Khanna. 2009. "Immunobiology of Human Cytomegalovirus: From Bench to Bedside." *Clinical Microbiology Reviews* 22(1):76–98. doi: 10.1128/CMR.00034-08.
- Davis, Larry E., Gerald V. Tweed, Tom D. Y. Chin, and Gerald L. Miller. 1971. "Interuterine Diagnosis of Cytomegalovirus Infection: Viral Recovery from Amniocentesis Fluid." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 109(8):1217–19. doi: 10.1016/0002-9378(71)90674-0.
- Davison, Andrew J. 2007. "Comparative Analysis of the Genomes." in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, edited by A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi. Cambridge University Press.
- DGS. n.d. "SINAVE MED." Retrieved (<https://www.dgs.pt/paginas-de-sistema/saude-de-a-a-z/sinave.aspx>).
- Dolk, Helen, Maria Loane, and Ester Garne. 2010. "The Prevalence of Congenital Anomalies in Europe." Pp. 349–64 in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 686. Springer Science+Business Media.
- Domachowske, Joseph, and Mayssa Abuali. 2019. *Introduction to Clinical Infectious Diseases*. edited by J. Domachowske. Cham: Springer International Publishing.
- Drew, W. Lawrence. 2004. "Herpesviruses." Pp. 555–57, 566–69 in *Sherris -Medical Microbiology*, edited by K. J. Ryan and C. G. Ray. McGraw- Hill.
- Duque, Vitor, and Paulo Paixão. 2014. "Herpesvírus Humanos." Pp. 68–96 in *Microbiologia Médica - vol.2*. Lidel - Edições Técnicas, Lda.
- ECDC. 2017. *Annual Epidemiological Report for 2016- Congenital Toxoplasmosis*.
- ECDC. 2018. *Annual Epidemiological Report for 2015 - Congenital Toxoplasmosis*.

- ECDC. 2020. *Congenital Syphilis*.
- EU Clinical Trials Register. n.d. "Clinical Trials for Eudract Number:2007-004692-19." *EU Clinical Trials Register*. Retrieved August 5, 2021 (https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search?query=eudract_number:2007-004692-19).
- EU Optimal Blood Use. 2010. *Manual Para Uso Ótimo Do Sangue*.
- Exler, Simone, Anja Daiminger, Michaela Grothe, Gunnar Schalasta, Gisela Enders, and Martin Enders. 2019. "Primary Cytomegalovirus (CMV) Infection in Pregnancy: Diagnostic Value of CMV PCR in Saliva Compared to Urine at Birth." *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 117:33–36. doi: 10.1016/j.jcv.2019.05.015.
- Fernandes, Cláudia, Augusta Marques, Maria de Jesus Chasqueira, Mónica Cró Braz, Ana Rute Ferreira, Ana Serrão Neto, Cândida Mendes, David Lito, Maria-Favila Menezes, Maria José Sousa, and Paulo Paixão. 2021. "Saliva Pools for Screening of Human Cytomegalovirus Using Real-Time PCR." *European Journal of Pediatrics* 180(4):1067–72. doi: 10.1007/s00431-020-03842-x.
- Fernandez, Catarina, Maria-Jesus Chasqueira, Augusta Marques, Lúcia Rodrigues, Mónica Marçal, Madalena Tuna, Mónica Cró Braz, Ana Serrão Neto, Cândida Mendes, David Lito, Paula Rocha, Gabriela Vasconcellos, Maria-Favila Menezes, Maria José Sousa, Carla Nunes, and Paulo Paixão. 2021. "Lower Prevalence of Congenital Cytomegalovirus Infection in Portugal: Possible Impact of COVID-19 Lockdown?" *European Journal of Pediatrics* (0123456789):1–4. doi: 10.1007/s00431-021-04271-0.
- Fortunato, Elizabeth A., Anita K. McElroy, Veronica Sanchez, and Deborah H. Spector. 2000. "Exploitation of Cellular Signaling and Regulatory Pathways by Human Cytomegalovirus." *Trends in Microbiology* 8(3):111–19. doi: 10.1016/S0966-842X(00)01699-1.
- Fowler, Karen B., Sergio Stagno, and Robert F. Pass. 2003. "Maternal Immunity and Prevention of Congenital Cytomegalovirus Infection." *JAMA* 289(8):1008–11. doi: 10.1001/jama.289.8.1008.
- Fryer, Jacqueline F., Alan B. Heath, Rob Anderson, and Philip D. Minor. 2010. "Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)-Based Assays." *WHO* 1–40.
- Fryer, Jacqueline F., Alan B. Heath, Philip D. Minor, Harald Kessler, William Rawlinson, Guy Boivin, Jutta Preiksaitis, Xiao-Li Pang, Côme Barranger, Sophie Alain, Céline Bressollette-Bodin, Klaus Hamprecht, Thomas Grewing, Pantelis Constantoulakis, Valeria Ghisetti, Maria R. Capobianchi, Isabella Abbate, Cristina Olivo, Tiziana Lazzarotto, Fausto Baldanti, Naoki Inoue, Fredrik Müller, Craig Corcoran, Diana Hardie, Jacqueline Prieto, Rob Schuurman, Anton van Loon, Shiaoan Ho, David Hillyard, Richard Hodinka, Marie Louise Landry, Angela Caliendo, Nell Lurain, Lee Sung, Margaret Gulley, Claire Atkinson, Jon Bible, and Malcolm Guiver. 2016. "A Collaborative Study to Establish the 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Technology." *Biologicals* 44(4):242–51. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.04.005.
- Garibyan, Lilit, and Nidhi Avashia. 2013. "Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)." *The Journal of Investigative Dermatology* 133(3):1–4. doi: 10.1038/jid.2013.1.
- Gerna, Giuseppe, Fausto Baldanti, and M. Grazia Revello. 2004. "Pathogenesis of Human Cytomegalovirus Infection and Cellular Targets." *Human Immunology* 65(5):381–86. doi: 10.1016/j.humimm.2004.02.009.
- Gerna, Giuseppe, Maria Grazia Revello, Fausto Baldanti, Elena Percivalle, and Daniele Lilleri. 2017. "The Pentameric Complex of Human Cytomegalovirus: Cell Tropism, Virus Dissemination, Immune Response and Vaccine Development." *Journal of General Virology* 98(9):2215–34. doi: 10.1099/jgv.0.000882.
- Griffiths, P. D. 2017. "Making Dollars and Sense out of a Screening Programme." *Reviews in Medical Virology* 27(2):1–2. doi: 10.1002/rmv.1925.
- Grose, Charles, and Carl P. Weiner. 1990. "Prenatal Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection: Two Decades Later." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 163(2):447–50. doi: 10.1016/0002-9378(90)91173-a.
- Halwachs-Baumann, Gabriele, Thorsten W. Orlikowsky, E. Walter, C. Brenning, and V. Schöllbauer. 2018. *Congenital Cytomegalovirus Infection*. 2th ed. edited by G. Halwachs-Baumann. Steyr: Springer International Publishing.
- Harrison, Gail J. 2015. "Current Controversies in Diagnosis, Management, and Prevention of Congenital Cytomegalovirus: Updates for the Pediatric Practitioner." *Pediatric Annals*

- 44(5):e115-125. doi: 10.3928/00904481-20150512-11.
- Hayashi, S., H. Kimura, M. Oshiro, Y. Kato, A. Yasuda, C. Suzuki, Y. Watanabe, T. Morishima, and M. Hayakawa. 2011. "Transmission of Cytomegalovirus via Breast Milk in Extremely Premature Infants." *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association* 31(6):440–45. doi: 10.1038/jp.2010.150.
- Hervé, Caroline, Béatrice Laupèze, Giuseppe Del Giudice, Arnaud M. Didierlaurent, and Fernanda Tavares Da Silva. 2019. "The How's and What's of Vaccine Reactogenicity." *Npj Vaccines* 4(1):39. doi: 10.1038/s41541-019-0132-6.
- Ho, Monto. 2008. "The History of Cytomegalovirus and Its Diseases." *Medical Microbiology and Immunology* 197(2):65–73. doi: 10.1007/s00430-007-0066-x.
- Hughes, Brenna L., Rebecca G. Clifton, Dwight J. Rouse, George R. Saade, Mara J. Dinsmoor, Uma M. Reddy, Robert Pass, Donna Allard, Gail Mallett, Lida M. Fette, Cynthia Gyamfi-Bannerman, Michael W. Varner, William H. Goodnight, Alan T. N. Tita, Maged M. Costantine, Geeta K. Swamy, Ronald S. Gibbs, Edward K. Chien, Suneet P. Chauhan, Yasser Y. El-Sayed, Brian M. Casey, Samuel Parry, Hyagriv N. Simhan, Peter G. Napolitano, George A. Macones, and Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal–Fetal Medicine Units Network. 2021. "A Trial of Hyperimmune Globulin to Prevent Congenital Cytomegalovirus Infection." *The New England Journal of Medicine* 385(5):436–44. doi: 10.1056/NEJMoa1913569.
- ICTV. 2019. "Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses The 9th Report of the ICTV (2011) - Herpesviridae." Retrieved (https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsna-viruses-2011/w/dsna_viruses/91/herpesviridae).
- INE. 2021. "Nados-Vivos (N.º) Por Local de Residência Da Mãe (NUTS - 2013) e Sexo; Mensal." Retrieved April 22, 2021 (<https://www.pordata.pt/DB/Portugal/Ambiente+de+Consulta/Tabela>).
- INSA. 2014. "Diagnóstico Laboratorial Das Infecções Do Grupo TORCHS." *INSA Forma +*. Retrieved (<http://www.insa.min-saude.pt/diagnostico-laboratorial-das-infecoes-do-grupo-torchs/>).
- James, Scott H., and David W. Kimberlin. 2016. "Advances in the Prevention and Treatment of Congenital Cytomegalovirus Infection." *Current Opinion in Pediatrics* 28(1):81–85. doi: 10.1097/MOP.0000000000000305.
- Jebbink, Jiska, Xin Bai, Beverly Barton Rogers, D. Brian Dawson, Richard H. Scheuermann, and Rana Domiati-Saad. 2003. "Development of Real-Time PCR Assays for the Quantitative Detection of Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus, Comparison of TaqMan Probes, and Molecular Beacons." *The Journal of Molecular Diagnostics* 5(1):15–20. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60446-1.
- Johnson, Julie, Brenna Anderson, and Robert F. Pass. 2012. "Prevention of Maternal and Congenital Cytomegalovirus Infection." *Clinical Obstetrics and Gynecology* 55(2):521–30. doi: 10.1097/GRF.0b013e3182510b7b.
- Jückstock, Julia, Markus Rothenburger, Klaus Friese, and Friederike Traunmüller. 2015. "Passive Immunization against Congenital Cytomegalovirus Infection: Current State of Knowledge." *Pharmacology* 95(5–6):209–17. doi: 10.1159/000381626.
- Kadri, Karim. 2020. "Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications." in *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen.
- Khalil, Asma, Chrissie Jones, and Yves Ville. 2017. "Congenital Cytomegalovirus Infection: Management Update." *Current Opinion in Infectious Diseases* 30(3):274–80. doi: 10.1097/QCO.0000000000000368.
- Khan, Naeem. 2007. "The Immunological Burden of Human Cytomegalovirus Infection." *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 55(5):299. doi: 10.1007/s00005-007-0037-3.
- Kimberlin, David W., Penelope M. Jester, Pablo J. Sánchez, Amina Ahmed, Ravit Arav-Boger, Marian G. Michaels, Negar Ashouri, Janet A. Englund, Benjamin Estrada, Richard F. Jacobs, José R. Romero, Sunil K. Sood, M. Suzanne Whitworth, Mark J. Abzug, Mary T. Caserta, Sandra Fowler, Jorge Lujan-Zilbermann, Gregory A. Storch, Roberta L. DeBiasi, Jin-Young Han, April Palmer, Leonard B. Weiner, Joseph A. Bocchini, Penelope H. Dennehy, Adam Finn, Paul D. Griffiths, Suzanne Luck, Kathleen Gutierrez, Natasha Halasa, James Homans, Andi L. Shane, Michael Sharland, Kari Simonsen, John A. Vanchiere, Charles R. Woods, Diane L. Sabo, Inmaculada Aban, Huichien Kuo, Scott H. James, Mark N. Prichard, Jill Griffin, Dusty Giles, Edward P. Acosta, and Richard J. Whitley. 2015. "Valganciclovir for Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Disease." *New England Journal of Medicine* 372(10):933–43. doi: 10.1056/NEJMoa1404599.
- Kimberlin, David W., Chin-Yu Lin, Pablo J. Sánchez, Gail J. Demmler, Wayne Dankner, Mark

- Shelton, Richard F. Jacobs, Wendy Vaudry, Robert F. Pass, Jan M. Kiell, Seng-jaw Soong, and Richard J. Whitley. 2003. "Effect of Ganciclovir Therapy on Hearing in Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Disease Involving the Central Nervous System: A Randomized, Controlled Trial." *The Journal of Pediatrics* 143(1):16–25. doi: 10.1016/S0022-3476(03)00192-6.
- Korndewal, Marjolein J., Marlies Weltevrede, M. Elske van den Akker-van Marle, Anne Marie Oudesluys-Murphy, Hester E. de Melker, and Ann C. T. M. Vossen. 2018. "Healthcare Costs Attributable to Congenital Cytomegalovirus Infection." *Archives of Disease in Childhood* 103(5):452–57. doi: 10.1136/archdischild-2017-312805.
- Kraft, Colleen S., Wendy S. Armstrong, and Angela M. Caliendo. 2012. "Interpreting Quantitative Cytomegalovirus DNA Testing: Understanding the Laboratory Perspective." *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 54(12):1793–97. doi: 10.1093/cid/cis212.
- Lanzieri, T. M., S. C. Dollard, C. D. Josephson, D. S. Schmid, and S. R. Bialek. 2013. "Breast Milk-Acquired Cytomegalovirus Infection and Disease in VLBW and Premature Infants." *PEDIATRICS* 131(6):e1937–45. doi: 10.1542/peds.2013-0076.
- Lanzoni, Monica, Joan Morris, Ester Garne, Maria Loane, and Agnieszka Kinsner-ovaskainen. 2017. "European Monitoring of Congenital Anomalies." *JRC Technical Reports*. doi: 10.2760/955289.
- Lawrence, Robert M. 2006. "Cytomegalovirus in Human Breast Milk: Risk to the Premature Infant." *Breastfeeding Medicine: The Official Journal of the Academy of Breastfeeding Medicine* 1(2):99–107. doi: 10.1089/bfm.2006.1.99.
- Lazzarotto, Tiziana, Daniel Blázquez-Gamero, Marie-Luce Delforge, Ina Foulon, Suzanne Luck, Susanne Modrow, and Marianne Leruez-Ville. 2020. "Congenital Cytomegalovirus Infection: A Narrative Review of the Issues in Screening and Management From a Panel of European Experts." *Frontiers in Pediatrics* 8(13):1–8. doi: 10.3389/fped.2020.00013.
- Lito, David, Telma Francisco, Inês Salva, Maria das Neves Tavares, Rosa Oliveira, and Maria Teresa Neto. 2013. "Análise Das Serologias Para Infecções Do Grupo TORCH e Do Rastreo Para Streptococcus Do Grupo B Na População de Grávidas de Uma Maternidade." *Acta Medica Portuguesa* 26(5):549–54. doi: 10.20344/amp.564.
- Ljungman, Per, Arancha Bermudez, Aaron C. Logan, Mohamed A. Kharfan-Dabaja, Patrice Chevallier, Rodrigo Martino, Gerald Wulf, Dominik Selleslag, Kazuhiko Kakiyama, Amelia Langston, Dong-Gun Lee, Carlos Solano, Shinichiro Okamoto, Larry R. Smith, Michael Boeckh, John R. Wingard, Beth Cywin, Christine Fredericks, Christopher Lademacher, Xuegong Wang, James Young, and Johan Maertens. 2021. "A Randomised, Placebo-Controlled Phase 3 Study to Evaluate the Efficacy and Safety of ASP0113, a DNA-Based CMV Vaccine, in Seropositive Allogeneic Haematopoietic Cell Transplant Recipients." *EClinicalMedicine* 33:100787. doi: 10.1016/j.eclim.2021.100787.
- Loeber, J. Gerard, Dimitris Platis, Rolf H. Zetterström, Shlomo Almashanu, François Boemer, James R. Bonham, Patricia Borde, Ian Brincat, David Cheillan, Eugenie Dekkers, Dobry Dimitrov, Ralph Fingerhut, Leifur Franzson, Urh Groselj, David Hougaard, Maria Knapkova, Mirjana Kocova, Vjosa Kotori, Viktor Kozich, Anastasiia Kremezna, Riikka Kurkijärvi, Giancarlo La Marca, Ruth Mikelsaar, Tatjana Milenkovic, Vyacheslav Mitkin, Florentina Moldovanu, Uta Ceglarek, Loretta O'Grady, Mariusz Oltarzewski, Rolf D. Pettersen, Danijela Ramadza, Damilya Salimbayeva, Mira Samardzic, Markhabo Shamsiddinova, Jurgita Songailienė, Ildiko Szatmari, Nazi Tabatadze, Basak Tezel, Alma Toromanovic, Irina Tovmasyan, Natalia Usurelu, Parsla Vevere, Laura Vilarinho, Marios Vogazianos, Raquel Yahyaoui, Maximilian Zeyda, and Peter C. J. I. Schielen. 2021. "Neonatal Screening in Europe Revisited: An ISNS Perspective on the Current State and Developments Since 2010." *International Journal of Neonatal Screening* 7(15):1–21. doi: 10.3390/ijns7010015.
- Lopo, S., E. Vinagre, P. Palminha, M. T. Paixao, P. Nogueira, and M. G. Freitas. 2011. "Seroprevalence to Cytomegalovirus in the Portuguese Population, 2002-2003." *Euro Surveillance : Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 16(25):2002–3. doi: 10.2807/ese.16.25.19896-en.
- Lunardi, Sara, Francesca Lorenzoni, and Paolo Ghirri. 2020. "Universal Screening for Congenital CMV Infection." Pp. 1–14 in *Update on Critical Issues on Infant and Neonatal Care*. IntechOpen.
- Mackay, Ian M., Katherine E. Arden, and Andreas Nitsche. 2002. "Real-Time PCR in Virology." *Nucleic Acids Research* 30(6):1292–1305. doi: 10.1093/nar/30.6.1292.
- Manicklal, Sheetal, Vincent C. Emery, Tiziana Lazzarotto, Suresh B. Boppana, and Ravindra K.

- Gupta. 2013. "The 'Silent' Global Burden of Congenital Cytomegalovirus." *Clinical Microbiology Reviews* 26(1):86–102. doi: 10.1128/CMR.00062-12.
- Marsico, Concetta, and David W. Kimberlin. 2017. "Congenital Cytomegalovirus Infection: Advances and Challenges in Diagnosis, Prevention and Treatment." *Italian Journal of Pediatrics* 43:1–8. doi: 10.1186/s13052-017-0358-8.
- McCarthy, Fergus P., Cheryl Jones, Shelley Rowlands, and Michelle Giles. 2009. "Primary and Secondary Cytomegalovirus in Pregnancy." *The Obstetrician & Gynaecologist* 11(2):96–100. doi: 10.1576/toag.11.2.096.27482.
- Moderna Inc. 2020. "Moderna Completes Enrollment of Cytomegalovirus (CMV) Vaccine (MRNA-1647) Phase 2 Study." Retrieved (<https://investors.modernatx.com/news-releases/news-release-details/moderna-completes-enrollment-cytomegalovirus-cmv-vaccine-mrna/>).
- Morcariski, Edward S., Thomas Shenk, Paul D. Griffiths, and Robert F. Pass. 2013. "Cytomegaloviruses." Pp. 1960–2014 in *Fields Virology*, edited by D. M. Knipe and P. M. Howley. Lippincott Williams & Wilkins.
- Mullis, K., F. Faloon, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. "Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 Pt 1:263–73. doi: 10.1101/sqb.1986.051.01.032.
- Murray, Patrick R. 2016. "Human Herpesviruses." Pp. 425–28, 441–46 in *Medical Microbiology*. Elsevier Inc.
- Newcombe, Robert G. 1998. "Interval Estimation for the Difference between Independent Proportions: Comparison of Eleven Methods." *Statistics in Medicine* 17(8):873–90. doi: 10.1002/(SICI)1097-0258(19980430)17:8<873::AID-SIM779>3.0.CO;2-I.
- Nigro, Giovanni. 2017. "Hyperimmune Globulin in Pregnancy for the Prevention of Congenital Cytomegalovirus Disease." *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 15(11):977–86. doi: 10.1080/14787210.2017.1398081.
- Nigro, Giovanni, and Stuart P. Adler. 2020. "High-Dose Cytomegalovirus (CMV) Hyperimmune Globulin and Maternal CMV DNAemia Independently Predict Infant Outcome in Pregnant Women With a Primary CMV Infection." *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 71(6):1491–98. doi: 10.1093/cid/ciz1030.
- Nigro, Giovanni, Stuart P. Adler, Renato La Torre, and Al M. Best. 2005. "Passive Immunization during Pregnancy for Congenital Cytomegalovirus Infection." *The New England Journal of Medicine* 353(13):1350–62. doi: 10.1056/NEJMoa043337.
- Onorato, Ida M., David M. Morens, William J. Martone, and Sally K. Stansfield. 1985. "Epidemiology of Cytomegaloviral Infections: Recommendations for Prevention and Control." *Reviews of Infectious Diseases* 7(4):479–97. doi: 10.1093/clinids/7.4.479.
- Paixão, P., S. Almeida, P. Gouveia, L. Vilarinho, and R. Vaz Osório. 2009. "Prevalence of Human Cytomegalovirus Congenital Infection in Portuguese Newborns." *Euro Surveillance : Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 14(9):13–15.
- Paixão, Paulo, Sofia Almeida, Paula Gouveia, Sandro Binda, Simona Caroppo, and Maria Barbi. 2005. "Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection by Detection of Viral DNA in Urine Pools." *Journal of Virological Methods* 128(1–2):1–5. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.02.018.
- Paixão, Paulo, Sofia Almeida, Paula A. Videira, Dário Ligeiro, and Teresa Marques. 2012. "Screening of Congenital Cytomegalovirus Infection by Real-Time PCR in Urine Pools." *European Journal of Pediatrics* 171(1):125–29. doi: 10.1007/s00431-011-1496-4.
- Pass, Robert F., and Rae Lyn Burke. 2002. "Development of Cytomegalovirus Vaccines: Prospects for Prevention of Congenital CMV Infection." *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 13(3):196–204. doi: 10.1053/spid.2002.125863.
- Pellett, Philip E., and Bernard Roizman. 2007. "Herpesviridae." Pp. 1802–22 in *Fields Virology*, edited by D. M. Knipe and P. M. Howley. Lippincott Williams & Wilkins.
- Peres, Marco Menezes, Leonel Barbosa, Sofia Decq Motta, Ivo Moura, Ana Guimarães, and Freire. Filipe. 2016. "Infecção Congénita Por Citomegalovírus: Importante Causa de Surdez Neurossensorial Adquirida." *Revista Portuguesa de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial*, 175–79.
- Picarda, Gaëlle, and Chris A. Benedict. 2018. "Cytomegalovirus: Shape-Shifting the Immune System." *The Journal of Immunology* 200(12):3881–89. doi: 10.4049/jimmunol.1800171.
- Pignatelli, Sara, Paola Dal Monte, Giada Rossini, Tiziana Lazzarotto, Maria R. Gatto, and Maria P. Landini. 2003. "Intrauterine Cytomegalovirus Infection and Glycoprotein N (GN) Genotypes." *Journal of Clinical Virology* 28(1):38–43. doi: 10.1016/S1386-6532(02)00236-6.
- Pignatelli, Sara, Tiziana Lazzarotto, Maria R. Gatto, Paola Dal Monte, Maria P. Landini, Giacomo

- Faldella, and Marcello Lanari. 2010. "Cytomegalovirus GN Genotypes Distribution among Congenitally Infected Newborns and Their Relationship with Symptoms at Birth and Sequelae." *Clinical Infectious Diseases* 51(1):33–41. doi: 10.1086/653423.
- Public Health England. 2020. "Understanding Cycle Threshold (Ct) in SARS-CoV-2 RT-PCR: A Guide for Health Protection Teams." *Public Health England* 1–12.
- Puhakka, Laura, Sunil Pati, Maija Lappalainen, Tuula Lönnqvist, Riina Niemensivu, Päivi Lindahl, Tea Nieminen, Raija Seuri, Irmeli Nupponen, Suresh Boppana, and Harri Saxen. 2020. "Viral Shedding, and Distribution of Cytomegalovirus Glycoprotein H (UL75), Glycoprotein B (UL55), and Glycoprotein N (UL73) Genotypes in Congenital Cytomegalovirus Infection." *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 125(October 2019):104287. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104287.
- Puhakka, Laura, Marjo Renko, Merja Helminen, Ville Peltola, Tarja Heiskanen-Kosma, Maija Lappalainen, Heljä-marja Surcel, Tuula Lönnqvist, and Harri Saxen. 2017. "Primary versus Non-Primary Maternal Cytomegalovirus Infection as a Cause of Symptomatic Congenital Infection – Register-Based Study from Finland." *Infectious Diseases* 49(6):445–53. doi: 10.1080/23744235.2017.1279344.
- Qiagen. 2013. "What Is the Threshold Cycle or CT Value? (FAQ ID - 2682)." *Qiagenn*. Retrieved (<https://www.qiagen.com/us/resources/faq?id=783d4566-9ad9-4fab-9936-182beda65617&lang=en>).
- Retzler, Jenny, Nick Hex, Chris Bartlett, Anne Webb, Sharon Wood, Caroline Star, Paul Griffiths, and Christine E. Jones. 2019. "Economic Cost of Congenital CMV in the UK." *Archives of Disease in Childhood* 104(6):559–63. doi: 10.1136/archdischild-2018-316010.
- Revello, Maria Grazia, and Giuseppe Gerna. 2002. "Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus, and Newborn Infant." *Clinical Microbiology Reviews* 15(4):680–715. doi: 10.1128/cmr.15.4.680-715.2002.
- Revello, Maria Grazia, and Giuseppe Gerna. 2004. "Pathogenesis and Prenatal Diagnosis of Human Cytomegalovirus Infection." *Journal of Clinical Virology* 29(2):71–83. doi: 10.1016/j.jcv.2003.09.012.
- Revello, Maria Grazia, Tiziana Lazzarotto, Brunella Guerra, Arsenio Spinillo, Enrico Ferrazzi, Alessandra Kustermann, Secondo Guaschino, Patrizia Vergani, Tullia Todros, Tiziana Frusca, Alessia Arossa, Milena Furione, Vanina Rognoni, Nicola Rizzo, Liliana Gabrielli, Catherine Klersy, Giuseppe Gerna, and CHIP Study Group. 2014. "A Randomized Trial of Hyperimmune Globulin to Prevent Congenital Cytomegalovirus." *The New England Journal of Medicine* 370(14):1316–26. doi: 10.1056/NEJMoa1310214.
- Revello, Maria Grazia, Cecilia Tibaldi, Giulia Masuelli, Valentina Frisina, Alessandra Sacchi, Milena Furione, Alessia Arossa, Arsenio Spinillo, Catherine Klersy, Manuela Ceccarelli, Giuseppe Gerna, and Tullia Todros. 2015. "Prevention of Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy." *EBioMedicine* 2(9):1205–10. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.08.003.
- Riley, H. D. 1997. "History of the Cytomegalovirus." *Southern Medical Journal* 90(2):184–90. doi: 10.1097/00007611-199702000-00004.
- Roche Diagnostics. 2016. "Roche Applied Science - Technical Note No. LC 18/2004 - Assay Formats for Use in Real-Time PCR." Pp. 1–17 in. Roche Diagnostics GmbH.
- Ronchi, Andrea, Masako Shimamura, Prashant S. Malhotra, and Pablo J. Sánchez. 2017. "Encouraging Postnatal Cytomegalovirus (CMV) Screening: The Time Is NOW for Universal Screening!" *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 15(5):417–19. doi: 10.1080/14787210.2017.1303377.
- La Rosa, Corinna, and Don J. Diamond. 2012. "The Immune Response to Human CMV." *Future Virology* 7(3):279–93. doi: 10.2217/fvl.12.8.
- Rossini, Giada, Sara Pignatelli, Paola Dal Monte, Daria Camozzi, Tiziana Lazzarotto, Liliana Gabrielli, Maria R. Gatto, and Maria P. Landini. 2005. "Monitoring for Human Cytomegalovirus Infection in Solid Organ Transplant Recipients through Antigenemia and Glycoprotein N (GN) Variants: Evidence of Correlation and Potential Prognostic Value of GN Genotypes." *Microbes and Infection* 7(5–6):890–96. doi: 10.1016/j.micinf.2005.01.016.
- Rowe, Wallace P., Janet W. Hartley, Samuel Waterman, Horace C. Turner, and Robert J. Huebner. 1956. "Cytopathogenic Agent Resembling Human Salivary Gland Virus Recovered from Tissue Cultures of Human Adenoids." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 92(2):418–24. doi: 10.3181/00379727-92-22497.
- Rustandi, Richard R., John W. Loughney, Liang Shang, Shiyi Wang, Cindy J. Pauley, Sianny Christanti, Adam Kristopeit, and Timothy D. Culp. 2021. "Characterization of GH/GL/PUL128-

- 131 Pentameric Complex, GH/GL/GO Trimeric Complex, GB and GM/GN Glycoproteins in a Human Cytomegalovirus Using Automated Capillary Western Blots." *Vaccine* 39(33):4705–15. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.06.033.
- Saldan, Alda, Gabriella Forner, Carlo Mengoli, Nadia Gussetti, Giorgio Palù, and Davide Abate. 2017. "Testing for Cytomegalovirus in Pregnancy" edited by C. S. Kraft. *Journal of Clinical Microbiology* 55(3):693–702. doi: 10.1128/JCM.01868-16.
- Schleiss, Mark R., Sallie R. Permar, and Stanley A. Plotkin. 2017. "Progress toward Development of a Vaccine against Congenital Cytomegalovirus Infection" edited by C. J. Papasian. *Clinical and Vaccine Immunology* 24(12):1–20. doi: 10.1128/CVI.00268-17.
- Shahar-Nissan, Keren, Joseph Pardo, Orit Peled, Irit Krause, Efraim Bilavsky, Arnon Wiznitzer, Eran Hadar, and Jacob Amir. 2020. "Valaciclovir to Prevent Vertical Transmission of Cytomegalovirus after Maternal Primary Infection during Pregnancy: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *The Lancet* 396(10253):779–85. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31868-7.
- Shenk, Thomas, E. Murphy, C. Sinzger, M. Digel, G. Jahn, M. K. Isaacson, L. K. Juckem, T. Compton, and R. F. Kalejta. 2008. *Human Cytomegalovirus*. Vol. 325. Shenk, Tho. edited by T. E. Shenk and M. F. Stinski. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Shipley, Gregory L. 2006. "An Introduction to Real-Time PCR." Pp. 1–38 in *Real-time PCR*, edited by M. T. Dorak. Taylor & Francis.
- Silva, Julieta, Cláudia Fernandes, Augusta Marques, Ana Teresa Maria, Cátia Correia, Madalena Lopo Tuna, Maria Jesus Chasqueira, and Paulo Paixão. 2020. "Evaluation of Saliva Pools Method for Detection of Congenital Human Cytomegalovirus Infection." *Journal of Virological Methods* 275:1–3. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.113759.
- Sinclair, John, and Patrick Sissons. 2006. "Latency and Reactivation of Human Cytomegalovirus." *Journal of General Virology* 87(7):1763–79. doi: 10.1099/vir.0.81891-0.
- Smith, M. G. 1956. "Propagation in Tissue Cultures of a Cytopathogenic Virus from Human Salivary Gland Virus (SGV) Disease." *Experimental Biology and Medicine* 92(2):424–30. doi: 10.3181/00379727-92-22498.
- Straschewski, Sarah, Marco Patrone, Paul Walther, Andrea Gallina, Thomas Mertens, and Giada Frascaroli. 2011. "Protein PUL128 of Human Cytomegalovirus Is Necessary for Monocyte Infection and Blocking of Migration." *Journal of Virology* 85(10):5150–58. doi: 10.1128/JVI.02100-10.
- Strauss, James H., and Ellen G. Strauss. 2008. "Family Herpesviridae." Pp. 276–78 in *Viruses and Human Disease*, edited by J. Strauss and E. Strauss. Pasadena: Elsevier.
- Tavares, Eduardo C., José Geraldo Ribeiro, and Lorenza A. Oliveira. 2005. "Imunização Ativa e Passiva No Prematuro Extremo." *Jornal de Pediatria* 81(1):89–94. doi: 10.1590/S0021-75572005000200011.
- ThermoFisher. 2014. *Real-Time PCR Handbook*. Thermo Fisher Scientific Inc, Applied Biosystems.
- Vauloup-Fellous, Christelle, Olivier Picone, Anne-Gaëlle Cordier, Isabelle Parent-du-Châtelet, Marie-Victoire Senat, René Frydman, and Liliane Grangeot-Keros. 2009. "Does Hygiene Counseling Have an Impact on the Rate of CMV Primary Infection during Pregnancy? Results of a 3-Year Prospective Study in a French Hospital." *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 46 Suppl 4(SUPPL. 4):S49-53. doi: 10.1016/j.jcv.2009.09.003.
- ViralZone. 2017. "Herpesviridae." *Swiss Institute of Bioinformatics*. Retrieved (https://viralzone.expasy.org/176?outline=all_by_species).
- Vonglahn, W. C., and A. M. Pappenheimer. 1925. "Intranuclear Inclusions in Visceral Disease." *The American Journal of Pathology* 1(5):445-466.3.
- Weimer, Kristin E. D., and Sallie R. Permar. 2019. "Section A: Infectious Disease - When and How To Treat Neonatal CMV Infection." Pp. 27–36 in *Infectious Disease and Pharmacology*, edited by W. E. Benitz and P. B. Smith. Elsevier.
- Weller, T. H., J. C. MacAuley, J. M. Craig, and P. Wirth. 1957. "Isolation of Intranuclear Inclusion Producing Agents from Infants with Illnesses Resembling Cytomegalic Inclusion Disease." *Experimental Biology and Medicine* 94(1):4–12. doi: 10.3181/00379727-94-22841.
- Weller, Thomas H. 1970. "Review. Cytomegaloviruses: The Difficult Years." *The Journal of Infectious Diseases* 122(6):532–39. doi: 10.1093/infdis/122.6.532.
- Yamamoto, Aparecida Yulie, Marisa M. Mussi-Pinhata, and Luiz Tadeu Moraes Figueiredo. 1999. "Infecção Congênita e Perinatal Por Citomegalovirus: Aspectos Clínicos, Epidemiologia Diagnóstico e Tratamento." *Medicina (Ribeirão Preto. Online)* 32(1):49–56. doi: 10.11606/issn.2176-7262.v32i1p49-56.

- Yamamoto, Aparecida Yulie, Marisa Marcia Mussi-Pinhata, Lauro Juliano Marin, Rosangela Moura Brito, Patricia Frizzo Carvalho Oliveira, and Thalita Bonadio Coelho. 2006. "Is Saliva as Reliable as Urine for Detection of Cytomegalovirus DNA for Neonatal Screening of Congenital CMV Infection?" *Journal of Clinical Virology* 36(3):228–30. doi: 10.1016/j.jcv.2006.03.011.
- Yan, S. Stev., and Daniel P. Fedorko. 2002. "Recent Advances in Laboratory Diagnosis of Human Cytomegalovirus Infection." *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2(3):155–67. doi: 10.1016/S1529-1049(02)00045-4.
- Ylmaz, Muhittin, Cem Ozic, and Lhami Gok. 2012. "Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis." Pp. 33–41 in *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, edited by S. Magdeldin. InTech.
- Zammarchi, L., T. Lazzarotto, M. Andreoni, I. Campolmi, L. Pasquini, M. Di Tommaso, G. Simonazzi, L. R. Tomasoni, F. Castelli, L. Galli, B. Borch, P. Clerici, A. Bartoloni, M. Tavio, and M. Trotta. 2020. "Management of Cytomegalovirus Infection in Pregnancy: Is It Time for Valacyclovir?" *Clinical Microbiology and Infection* 26(9):1151–54. doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.006.
- Zasada, Aleksandra Anna, Katarzyna Zacharczuk, Katarzyna Woźnica, Małgorzata Główna, Robert Ziółkowski, and Elżbieta Malinowska. 2020. "The Influence of a Swab Type on the Results of Point-of-Care Tests." *AMB Express* 10(1):46. doi: 10.1186/s13568-020-00978-9.



2021

Catarina Fernandez Serrano

Rastreo da Infecção Congénita por HCMV: Estudo Multicêntrico Nacional

