



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

NOVA

MEDICAL
SCHOOL
FACULDADE
DE CIÊNCIAS
MÉDICAS

ITqb

UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

40 ANOS
FCT
FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Estudo de infeção congénita por HCMV

Rastreio Universal por PCR na saliva

Cláudia da Cunha Fernandes

Dissertação para obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Outubro de 2019



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

NOVA

MEDICAL
SCHOOL
FACULDADE
DE CIÊNCIAS
MÉDICAS



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Estudo de infeção congénita por HCMV

Rastreio Universal por PCR na saliva

Cláudia da Cunha Fernandes

Dissertação para obtenção do
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Orientadores:
Professor Doutor Paulo Paixão (NMS|FCM)
Doutora Maria de Jesus Chasqueira (NMS|FCM)

Unidade de Infeção: etiologia, patogénese e bases terapêuticas
Nova Medical School | Faculdade de Ciências Médicas

Outubro de 2019



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

NOVA

MEDICAL
SCHOOL
FACULDADE
DE CIÊNCIAS
MÉDICAS

ITqb

UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

40 ANOS
FCT
FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

«I hear and I forget. I see and I remember. I do and I understand.»

Confucius



Elementos bibliográficos resultantes da dissertação

Evaluation of saliva pools method for detection of congenital Human Cytomegalovirus infection. Julieta Silva^a, Cláudia Fernandes^a, Augusta Marques^a, Ana Teresa Maria^b, Cátia Correia^b, Madalena Lopo Tuna^b, Maria de Jesus Chasqueira^a, Paulo Paixão^a. ^a – Centro de Estudos de Doenças Crónicas (CEDOC), Faculdade de Ciências Médicas|NOVA Medical School Lisboa, Portugal ^b – Unidade de Neonatologia do Serviço de Pediatria do Hospital de S. Francisco Xavier – CHLO Lisboa, Portugal.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Paulo Paixão, pela oportunidade e confiança em mim depositada para a realização desta dissertação. Pela orientação e disponibilidade sempre que necessária para a transmissão de conhecimentos e esclarecimento de dúvidas.

Á Doutora Maria de Jesus Chasqueira, pela entrega a esta dissertação e sua co-orientação. Pela dedicação, horas de partilha de conhecimentos, conselhos e recomendações para que esta dissertação se torna-se na melhor possível.

Ao Hospital CUF Descobertas e ao Hospital Vila Franca de Xira pela participação, cooperação e apoio prestado no decorrer deste estudo.

Ao Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa por gentilmente codificar as amostras e disponibilizar o seu transporte desde os Hospitais participantes até à Faculdade de Ciências Médicas.

Á Augusta, por todo o empenho e apoio demonstrados. Por todo o auxílio no trabalho prático desenvolvido e partilha de conhecimentos da área laboratorial e, em especial, do HCMV.

Á Lúcia, pela boa disposição diária e por se demonstrar sempre disponível para ajudar.

Á Neuza, companheira de laboratório, transportes públicos e de pausas para ouvir música. Por toda a ajuda informática (e não só) no decorrer desta dissertação e disponibilidade para ler a mesma, vezes sem fim.

Á Julieta, companheira do HCMV, pela cooperação e entreaajuda.

Á Dra. Cátia Alves, por me mostrar a importância do acreditar. Pelo seu apoio e palavras sábias, importantes ferramentas que me permitiram chegar até aqui e alcançar este desejado objetivo. O meu simples agradecimento nunca será suficiente.

Á Tânia, minha companheira daquilo que foi a grande aventura do ensino superior e daquilo que será o meu futuro daqui para a frente. Por estes 6 anos de amizade, entreaajuda e partilha. Até sermos velhinhas.

Á minha família. Em especial aos meus pais, o mais profundo agradecimento, por terem acreditado sempre nas minhas capacidades e escolhas. Por todo o esforço por mim feito e apoio incondicional durante o meu percurso académico. Sem vocês não teria sido possível.

Resumo

O vírus citomegálico humano (HCMV) é o principal agente de infeção congénita no mundo. Em Portugal estima-se que a prevalência desta infeção seja 1,05%, traduzindo-se em ≈900 recém-nascidos infetados por ano. A importância do rastreio tem vindo a ser debatida, pois 10% a 15% destes recém-nascidos não apresentam sequelas ao nascimento, mas estas poderão surgir tardiamente. A não implementação do plano de rastreio deve-se sobretudo ao custo associado, mas uma metodologia de *pools* de urina desenvolvida por uma equipa portuguesa demonstrou ser promissora para a sua realização, reduzindo significativamente este custo. No entanto, a colheita de urina revela-se pouco prática para adotar em larga escala. É conhecido que o vírus é excretado em quantidades similares na saliva e sendo a sua colheita consideravelmente mais simples, foi objetivo deste estudo verificar a possibilidade da aplicação de *pools* de saliva num programa de rastreio de infeção congénita por HCMV em recém-nascidos de dois Hospitais portugueses. Pretendeu-se ainda estimar a prevalência da infeção e o custo associado a este método de rastreio. O rastreio baseou-se na utilização de *pools* de 10 amostras de saliva para a deteção de DNA viral por PCR em tempo real. O algoritmo definido implicou que as amostras de cada *pool* positiva fossem posteriormente testadas individualmente e, a cada amostra positiva, o seu resultado fosse confirmado na amostra de urina colhida entre as 2 a 3 semanas de vida da criança. Testaram-se igualmente *pools* de 20 amostras de saliva. Foram rastreados 1492 recém-nascidos em 150 *pools* tendo-se verificado 14 resultados positivos, mas apenas 10 obtiveram infeção congénita confirmada. O método demonstrou ser exequível e de baixo custo para a implementação de um rastreio universal. A prevalência da infeção congénita por HCMV nos dois Hospitais em estudo foi de 0,67%.

Palavras-chave: HCMV; infeção congénita; rastreio; PCR em tempo real; saliva



Abstract

Human cytomegalovirus (HCMV) is the leading congenital infection agent in the world. In Portugal, it is estimated that the prevalence of this infection is 1.05%, resulting in \approx 900 infected newborns per year. The importance of screening for this infection has been cause for debate, as 10% to 15% of these newborns do not show sequelae at birth, but these may appear later in life. The lack of screening implementation is mainly due to the associated monetary cost but a urine pool methodology developed by a portuguese team proved to be promising, while significantly reducing the cost. However, urine collection proves to be impractical for large-scale application. It is known that the virus is excreted in similar amounts in saliva and its collection is considerably simpler. It was the aim of this study to verify the possibility of applying saliva pools in a screening program for congenital HCMV infection in newborns from two portuguese hospitals. It was also intended to estimate the prevalence of infection and the cost associated with this screening method. The screening was based on the use of pools of 10 saliva samples for detection of viral DNA by real time PCR. The defined algorithm implied that the samples from each positive pool were subsequently tested individually and, for each positive sample, the result was confirmed in the urine sample collected between the 2 to 3 weeks of the newborn's life. Pools of 20 saliva samples were also tested. 1492 newborns were screened in 150 pools with 14 positive results, but only 10 had confirmed congenital infection. The prevalence of congenital HCMV infection in both hospitals was 0.67%. The method has been shown to be feasible and inexpensive for the implementation of universal screening.

Key-words: HCMV; congenital infection; screening; real time PCR; saliva

Índice

Elementos bibliográficos resultantes da dissertação.....	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Abreviaturas	ix
I Introdução.....	1
1.1 Breve introdução histórica.....	1
1.2 Taxonomia	2
1.3 Estrutura do vírus.....	2
1.4 Replicação viral do HCMV	3
1.5 Infecção congénita por HCMV	4
1.5.1 Epidemiologia	4
1.5.2 Caracterização da infeção.....	5
1.5.3 Manifestações clínicas.....	6
1.5.4 Prevenção da infeção	8
1.5.5 Métodos de diagnóstico	11
1.5.6 Rastreio.....	15
1.5.7 Tratamento.....	18
1.6 Técnica de PCR em tempo real.....	20
1.7 Objetivos	23
II Materiais e métodos.....	24
2.1 População em estudo.....	24
2.2 Amostras	24
2.3 Procedimento experimental.....	24
2.3.1 Processamento das amostras.....	24

2.3.2 Extração de DNA.....	25
2.3.3 Técnica de PCR em tempo real.....	26
2.3.4 Quantificação da carga viral	28
2.4 Estudo da viabilidade económica.....	29
2.5 Determinação da prevalência da infeção congénita por HCMV	29
III Resultados e Discussão	30
3.1 Rastreamento da infeção congénita recorrendo a <i>pools</i> de saliva.....	30
3.2 Análise das cargas virais de HCMV.....	35
3.3 Estudo da viabilidade económica.....	37
3.4 Prevalência da infeção congénita por HCMV	38
IV Conclusões	39
V Referências Bibliográficas	40
VI Anexos	56

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa da constituição do genoma de HCMV.....	3
Figura 2. Princípio do funcionamento das sondas TaqMan®.....	21
Figura 3. Modelo gráfico de amplificação relativo à técnica de PCR em tempo real ilustrando a nomenclatura utilizada.....	22
Figura 4. Ciclo de amplificação utilizado na reação de PCR em tempo real.....	27
Figura 5. Algoritmo utilizado no estudo para a deteção e identificação de amostras positivas para DNA de HCMV em <i>pools</i> de 10 amostras de saliva colhidas de recém-nascidos.....	28
Figura 6. Resultados relativos à prevalência da infeção congénita por HCMV nos dois Hospitais portugueses participantes no estudo e respetivo intervalo de confiança a 95%.	38

Índice de Tabelas

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> e sonda utilizados para a amplificação do gene UL83 de HCMV.....	26
Tabela 2. Resultados qualitativos da análise por PCRtr das pools de saliva e amostras individuais positivas.	31
Tabela 3. Resultados qualitativos da análise por PCRtr das amostras individuais de urina.....	32
Tabela 4. Comparação dos valores de CTs das amostras falso-positivas e das amostras com infecção congênita confirmada.....	33
Tabela 5. Resultados qualitativos da PCRtr das 14 pools de 20 amostras de saliva.	34
Tabela 6. Valores de quantificação em UI/mL para as amostras de saliva positivas e <i>pools</i> de 10 e 20 amostras correspondentes.....	35
Tabela 7. Valores de quantificação em UI/mL para as amostras de saliva positivas e amostras de urina correspondentes.....	36

Abreviaturas

μL	Microlitro
μM	Micromolar
ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CID	Doença das Inclusões Citomegálicas
CT	<i>Threshold Cycle</i>
DGS	Direção Geral de Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Aceleração da gravidade
gB	Glicoproteína B
HCMV	Vírus Citomegálico Humano
HIG	Imunoglobulina Humana
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
kb	Quilobases
kg	Quilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
°C	Grau Centígrado
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCRtr	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real, do inglês <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RPMI	<i>Meio Roswell Park Memorial Institute</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNHL	<i>Sensorineural Hearing Loss</i>
UI	Unidades Internacionais

I Introdução

1.1 Breve introdução histórica

Em 1881 Ribbert observou, em preparações de células de rim de um nado-morto na sequência de infecção materna por sífilis, células de grandes dimensões com corpos homogêneos no interior do núcleo, os quais designou de inclusões. Estes achados não foram valorizados até que, duas décadas mais tarde, Jesionek e Kiolemenoglou descreveram inclusões semelhantes a células “protozoárias” encontradas em células do fígado, rins e pulmões de um nado-morto de oito meses. No ano de 1907, Löwenstein, que fazia parte do grupo de investigação de Ribbert, voltou a encontrar este tipo de células em glândulas parótidas de quatro crianças em 30 analisadas, com idades compreendidas entre os dois meses e os dois anos (Ho, 2008).

Vários anos mais tarde, Goodpasture e Talbot constataram semelhanças entre células encontradas em lesões da pele provocadas pela varicela e as descritas por Ribbert, colocando a possibilidade de que estes efeitos se devam a um agente semelhante. Em 1921, um outro investigador chamado Lipschutz descreveu a sua observação de células provenientes de lesões de um homem infetado por *Herpes zoster* e *Herpes genitalis* (Lipschütz, 1921). VonGlahn e Pappenheimer relacionaram as observações de Lipschutz com a possibilidade das alterações celulares observadas anteriormente serem produzidas por vírus e não por protozoários, sugerindo que estas inclusões seriam originadas por um grupo específico de vírus, mais tarde designado como Herpesvirus (VonGlahn et al, 1925).

Posteriormente Farber e Wolbach, ao realizar análises *post mortem* a 183 crianças, encontraram as mesmas inclusões nucleares em glândulas salivares de 26 destas, levantando a questão sobre a frequência desta infecção (Farber et al, 1932). Nesse mesmo ano foram descritos vários casos de infecção congénita letal caracterizada por petéquias, hepatoesplenomegália e calcificações intracerebrais verificando-se que em todos os casos apresentavam também as células com inclusões intranucleares típicas. Wyatt, em conjunto com vários outros investigadores sugeriu, para estas situações, o nome de Doença Generalizada de Inclusões Citomegálicas (do inglês *Generalized Citomegalic Inclusion Disease* – CID) (Wyatt et al, 1950).

Com o desenvolvimento de novas técnicas de cultura celular e na tentativa de cultivar *Toxoplasma gondii*, um protozoário que provoca uma doença congénita letal clinicamente semelhante à CID, Weller acabou por isolar o vírus responsável por estas alterações. Em 1957 propôs o nome de *Cytomegalovirus*, atribuição associada ao efeito citopático que o vírus produzia nas células em cultura (Weller et al, 1957; Zuckerman, 2009).

1.2 Taxonomia

O vírus citomegálico humano, doravante também designado como HCMV, foi classificado ao nível da espécie como Vírus do Herpes 5 Humano pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses*. O mesmo comité instituiu, em 2009, atualizações na classificação deste vírus: a antiga família *Herpesviridae* passou a constituir uma nova ordem denominada *Herpesvirales* que acomoda 3 famílias, 3 subfamílias, 17 géneros e cerca de 90 espécies (Davinson, 2010). Assim sendo, o HCMV está inserido na ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae*, género *Cytomegalovirus*.

1.3 Estrutura do vírus

No que diz respeito à sua estrutura, o HCMV apresenta características semelhantes aos restantes membros da família *Herpesviridae*. O vírus possui uma cápside icosaédrica com aproximadamente 116 nm de diâmetro, constituída por 162 capsómeros proteicos que envolvem o material genético viral, protegendo-o (Irmiere, 1983; Griffiths, 1987). A cápside é rodeada por um revestimento proteico amorfo denominado tegumento, um compartimento de proteínas virais com funções estruturais e não estruturais. As primeiras estão incorporadas na estrutura do virião, desempenhando um papel importante na libertação do vírus durante a sua entrada na célula hospedeira. As proteínas não estruturais, por sua vez, são proteínas regulatórias associadas ao ciclo de replicação viral, através das fases imediatamente precoce (IE), precoce (E) e tardia (L) resultando no aparecimento e progressão da infeção, tendo ainda como função proteger o vírus da resposta imune do hospedeiro (Pignatelli et al, 2004; Mocarski et al, 2013). De acordo com um artigo de revisão publicado em 2009, o citomegalovírus é o vírus da família *Herpesviridae* que expressa o maior número de genes com funções associadas à alteração da imunidade do hospedeiro, tanto inata como adaptativa (Miller-Kittrell et al, 2009).

O vírus possui ainda uma camada externa que envolve a cápside, designada invólucro, de simetria esférica a pleomórfica, com cerca de 150 a 200 nm de diâmetro. O invólucro é constituído por uma bicamada lipídica, onde estão presentes várias glicoproteínas que permitem a ligação do vírus aos recetores celulares do hospedeiro, permitindo que este penetre na célula e inicie o processo de infeção (Kinzler et al, 2005). Estas moléculas são, por isso, o principal alvo dos anticorpos que neutralizam o vírus e é através destas que se determina o genótipo do vírus recorrendo, em particular, à glicoproteína B (gB) e à glicoproteína H (gH) (Vries et al, 2012). A elevada variabilidade genética entre o genoma das várias estirpes de HCMV pode explicar a possibilidade de reinfeção (Sijmons, 2015).

Este vírus apresenta o maior genoma das 8 espécies de herpesvírus humanas conhecidas (Dolan et al, 2004; Sijmons, 2015), consistindo numa molécula de DNA linear em cadeia dupla com cerca de 230kb que codifica para mais de 165 genes (Gibson, 1996).

A molécula é dividida em duas regiões ou sequências denominadas “*unique short sequence*” ou curta (*US*) e “*unique long sequence*” ou longa (*UL*). Estas regiões estão flanqueadas por zonas de repetição, *TRL* e *TRS* (do inglês - *Terminal Repeats*), que se encontram nas pontas exteriores do genoma do vírus, bem como nas zonas de interseção das duas regiões, *IRL* e *IRS* (do inglês – *Internal Repeats*). Assim sendo, o genoma do HCMV tem uma organização de *TRL-UL-IRL-IRS-US-TRS* (Figura 1). As regiões *US* e *UL* poderão inverter durante a replicação, surgindo sequências orientadas em ambos os sentidos e a possibilidade de originar 4 isómeros (Murphy et al, 2003; Pignatelli et al, 2004; Lurain et al, 2000; Mocarski et al, 2013).

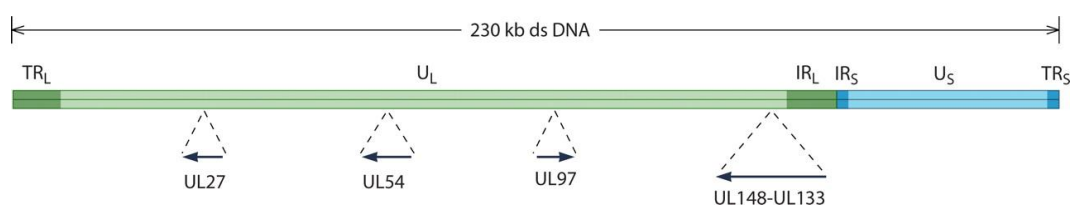


Figura 1. Mapa da constituição do genoma de HCMV.
Retirado de Lurain et al, 2010. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. Clinical microbiology reviews, p690.

Os genes são habitualmente numerados de acordo com as suas posições nos isómeros e as proteínas que por eles são codificadas designam-se por *p* no caso de “proteína”, *pp* se se tratar de uma “fosfoproteína” e *gp* para “glicoproteína”. Para a fosfoproteína 65, uma proteína abundante no tegumento viral e relevante no diagnóstico do HCMV, a designação atribuída é *ppUL83* (*pp65*) que se traduz na produção de uma fosfoproteína na posição 83 da sequência longa (Wirgart et al, 1996).

1.4 Replicação viral do HCMV

O vírus citomegálico humano possui um amplo tropismo celular, tendo a capacidade de infetar grande parte dos órgãos e tecidos no hospedeiro humano. São diversos os estudos que demonstram a capacidade de entrada deste vírus numa vasta variedade de células tais como células endoteliais, epiteliais, fibroblastos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e musculares. No entanto, *in vitro*, é nos fibroblastos que o vírus se multiplica mais facilmente, devido à acumulação de mutações quando cultivado (Sinzger et al, 1995; Mocarski et al, 2013).

O ciclo de replicação do HCMV segue habitualmente a cascata de eventos descrita para a família *Herpesviridae*, apesar do seu ciclo ser relativamente longo em comparação com os restantes membros da mesma família (Revello et al, 2004).

O HCMV vai invadir as células do hospedeiro de modo a replicar o seu genoma, produzindo novos vírus. A replicação do vírus inicia-se quando as glicoproteínas virais, nomeadamente a gB, interagem com os recetores de superfície da célula-alvo, ocorrendo a fusão do invólucro com a membrana plasmática.

Ocorre então a libertação das proteínas da nucleocápside e do tegumento no citoplasma celular, iniciando-se o processo de infeção (Tomtishen, 2012). Posteriormente, o genoma viral é libertado no núcleo da célula onde será replicado, transcrito e traduzido em 3 fases, sendo que em cada fase do ciclo replicativo do vírus as proteínas produzidas estimulam o início da fase seguinte.

Na fase imediatamente precoce (do inglês *immediatly-early* – IE) ocorre a produção de antigénios ou proteínas não estruturais essenciais à regulação da transcrição. Estas são designadas por proteínas imediatamente precoces ou α , originadas por genes com a mesma designação que irão desencadear a expressão dos genes necessários às fases seguintes. De seguida, inicia-se a fase precoce (do inglês *early* – E) onde são transcritos os genes precoces ou β , que irão dar origem a antigénios ou proteínas com o mesmo nome. Estes serão responsáveis pela origem de novos vírus, pois produzem enzimas essenciais ao ciclo de replicação do genoma viral, como por exemplo a DNA polimerase. Por último ocorre a fase tardia (do inglês *late* – L), fase na qual são sintetizadas as proteínas estruturais que irão formar a cápside e o invólucro viral, podendo também ser denominadas de proteínas tardias ou γ . Estas proteínas possuem um papel importante na montagem das partículas virais e na sua libertação (Murray, 2005; Sinclair et al, 2006; Kalejta, 2008).

Tal como vários outros membros da família *Herpesvirus*, o HCMV possui um mecanismo de manutenção de latência onde não ocorre a produção de viriões infecciosos, podendo o estado latente prolongar-se durante toda a vida do hospedeiro. No entanto, quando o hospedeiro sofre uma imunossupressão por exemplo através da transplantação, infeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou por um estímulo associado a processos inflamatórios, o vírus pode reativar. O mecanismo pelo qual o processo de latência ocorre ainda é desconhecido, mas a reativação do HCMV está relacionada com a expressão dos genes virais imediatamente precoces (Sinclair et al, 2006; Jain et al, 2011).

1.5 Infeção congénita por HCMV

1.5.1 Epidemiologia

O HCMV é um agente de infeção comum na população em geral e prevalente mundialmente (Taylor, 2003). A taxa de seropositividade na população varia de acordo com a idade materna, etnia, condições socioeconómicas, nível educacional entre outros fatores (Ross et al, 2005; Colugnati et al, 2007; Cannon et al, 2010; Tavares et al, 2011).

Em 2010, os autores de um artigo de revisão concluíram que a seroprevalência em grupos “não-caucasianos” era 20-30% superior à dos grupos caucasianos e que, entre as pessoas de menor estatuto socioeconómico, a seroprevalência seria cerca de 10-30% superior (Cannon et al, 2010).

Um estudo publicado em 2015 veio confirmar estes factos, demonstrando que os anticorpos específicos para o HCMV foram encontrados em quantidades superiores nos grupos socioeconómicos menos favorecidos, tanto de países desenvolvidos como em desenvolvimento, tendo também sido verificado um aumento proporcional dos anticorpos em relação à idade (Sanousi et al, 2016).

Como regra geral, os grupos socioeconómicos mais baixos têm maior incidência de exposição ao HCMV e os países com recursos limitados apresentam altos níveis de seroprevalência materna, com percentagens de seropositividade para imunoglobulinas da classe G (IgG) a variar entre 84%-100%, sendo a aquisição maioritariamente no início da vida (Lanzieri, 2014).

Em Portugal o 2º Inquérito Serológico Nacional estabeleceu, pela primeira vez, a prevalência de indivíduos com anticorpos específicos para o HCMV. Os resultados deste inquérito revelaram que a infeção é altamente prevalente na população portuguesa estudada, atingindo 77% de seroprevalência, afirmando ainda que a infeção ocorre sobretudo nos primeiros anos de vida. Entre as mulheres portuguesas em idade reprodutiva foram demonstradas percentagens de seropositividade de 75,5% e 81,5% para as faixas etárias entre os 20-29 anos e 30-44 anos, respetivamente (Lopo et al, 2011).

O HCMV é o principal agente de infeção congénita mundialmente, com uma incidência a variar entre 0,2 e 2% (Stagno et al, 1982; Fowler et al, 1992; Dollard et al, 2007). A infeção congénita por HCMV possui um carácter clinicamente importante na saúde infantil, sendo as suas sequelas a longo prazo tão ou mais comuns em relação a condições clínicas mais conhecidas como Síndrome de Down, Síndrome do álcool fetal, espinha bífida entre outras (Cannon et al, 2005). Em Portugal, um estudo publicado em 2009 estabeleceu uma prevalência de 1,05% relativamente à infeção congénita (Paixão et al, 2009). Tendo em conta os cerca de 86827 nascimentos no ano de 2018, esta percentagem traduz-se em cerca de 900 crianças nascidas em Portugal com infeção congénita por HCMV.

1.5.2 Caracterização da infeção

A infeção por HCMV é endémica, sucedendo durante todo o ano e sem variações sazonais, e a sua transmissão é inter-humana (Ross et al, 2005; Malm et al, 2007). O vírus penetra nas mucosas podendo transmitir-se por contacto direto ou indireto com urina, saliva, secreções orofaríngeas, secreções endocervicais, esperma, leite materno, lágrimas, produtos sanguíneos ou órgãos transplantados.

As primeiras células a serem infetadas serão os leucócitos e as células endoteliais e, posteriormente, a propagação do vírus acontecerá por via hematogénica (Tavares et al, 2011; Mocarski et al, 2013).

A infeção primária materna é a principal responsável pela transmissão congénita deste vírus. A mulher grávida pode sofrer infeção primária durante a gravidez mas, ao contrário da maioria das infeções congénitas virais, a infeção congénita por HCMV pode ocorrer também em mulheres com imunidade pré-concepcional ainda que numa percentagem significativamente menor (Fowler et al, 2003). Nesse caso, a infeção é denominada por secundária ou recorrente, podendo ocorrer por reativação ou reinfeção por uma nova estirpe viral (Revello et al, 2002; Malm et al, 2007; Mussi-Pinhata et al, 2009).

O termo “transmissão vertical” é utilizado para indicar a transmissão do vírus da mãe para o feto, tendo lugar na fase virémica da mulher grávida e ocorrendo por via hematogénica transplacentar (Bhide et al, 2008; Tavares et al, 2011). O mesmo termo é ainda aplicado aquando da transmissão do vírus da mãe ao recém-nascido, ocorrendo durante a passagem no canal de parto devido ao contacto com as secreções cervicais, ou após, através do aleitamento, atribuindo-se nesta altura a designação de infeção perinatal (Bhide et al, 2008; Joseph et al, 2018).

A infeção congénita é caracterizada pela ocorrência de infeção durante a gravidez, em que o vírus passa a barreira placentária provocando posterior infeção no feto, que se encontra imunologicamente imaturo. É importante denotar que a infeção placentar não se traduz obrigatoriamente em infeção fetal: a taxa de transmissão vertical varia entre 30-50% relativamente às infeções primárias e 0,1-3% para as infeções recorrentes (Benoist et al, 2008; Tavares et al, 2011). Esta taxa relaciona-se ainda com a idade gestacional: 30% a 40% durante o primeiro trimestre, aumentando para cerca de 75% no terceiro trimestre de gravidez (Joseph et al, 2018). No entanto, as consequências da infeção serão mais severas quando esta ocorre nas primeiras 20 semanas de gestação. Cerca de 20-30% dos fetos infetados na primeira metade da gestação apresentam sequelas graves, sobretudo neurológicas (Pass et al, 2006). Contudo, apesar da maior probabilidade de infeção no final da gravidez, a maioria das crianças infetadas neste período apresenta-se assintomática ao nascimento (Coonrod et al, 2008).

1.5.3 Manifestações clínicas

Mais de 90% das infeções pelo vírus citomegálico humano em indivíduos adultos imunocompetentes é assintomática. No entanto, esta infeção é uma causa significativa de morbilidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos, mulheres grávidas, recém-nascidos e crianças pré-termo (Lanari et al, 2006).

1.5.3.1 Manifestações clínicas na mulher grávida

Na grávida, a manifestação de sintomas parece ter uma prevalência superior em mulheres com infecção primária, comparativamente com a infecção recorrente. Alguns estudos demonstram que 5% das mulheres com infecção primária apresentaram sintomas não específicos, consistentes com síndrome mononucleose-like, tais como febre (presente em 42,1% das infecções primárias e 17,1% das recorrentes), astenia (31,4 e 11,4%), mialgias (21,5 e 6,7%), rino-faringo-traqueo-bronquite (42,1 e 29,5%) e síndrome gripal definida pela co-existência de febre e pelo menos um dos sinais previamente citados (24,5 e 9,5%), linfocitose superior ou igual a 40% (39,2 e 5,7%) e aumento das transaminases (35,3 e 3,9%) (Nigro et al, 2003; Malm et al 2007; Naing et al, 2016).

1.5.3.2 Manifestações clínicas no feto e no recém-nascido

A infecção congênita pelo vírus citomegálico humano é a principal causa de perda auditiva sensorial não hereditária (do inglês *sensorineural hearing loss* – SNHL) e atraso do desenvolvimento neurológico em crianças (Dollard et al, 2007; Lim et al, 2017).

A detecção de anomalias no feto pode ser realizada através de ecografia, onde poderá ser visível ventriculomegália cerebral, calcificações cerebrais, microcefalia, rins hiperecogênicos, intestino hiperecogênico, hepatomegalia, ascite, cardiomegalia, hidrópsia fetal e restrição do crescimento fetal (Picone, 2014).

Entre 85 a 90% dos recém-nascidos com infecção congênita confirmada laboratorialmente serão assintomáticos à nascença ou apresentarão sintomas inespecíficos, não sendo diagnosticados. No entanto, 10 a 15% destes recém-nascidos assintomáticos poderão vir a desenvolver sequelas tardias até aos 5 anos de idade (Zuylen et al, 2014). Algumas destas sequelas são: surdez neurosensorial, diminuição da acuidade visual e alterações neurológicas progressivas (Mocarski et al, 2013). A surdez neurosensorial é a seqüela mais frequente, sendo que 7 a 15% dos recém-nascidos assintomáticos poderão vir a desenvolver esta anomalia (Fowler et al, 1997; Dahle et al, 2000; Naing et al, 2016).

Por outro lado, cerca de 10 a 15% dos recém-nascidos congenitamente infetados pelo HCMV serão sintomáticos. As manifestações clínicas usuais incluem baixo peso, icterícia, petéquias, hepatoesplenomegália, trombocitopenia e alterações neurológicas tais como microcefalia e calcificações intracranianas. Com menor frequência poderá surgir microftalmia, anomalias cardíacas, miocardite, hipotonia com sonolência, dificuldades na sucção, espasticidade, colite, hemiparesia, ou convulsões (McMullan et al, 2011; Boppana et al, 2013; Harrison et al, 2015). É possível ainda que se manifeste a forma mais grave da infecção congênita, a CID. Nesta, para além do envolvimento multissistémico, existe comprometimento do Sistema Nervoso Central (SNC).

De uma forma geral, estes recém-nascidos têm um pior prognóstico: aproximadamente 5 a 15% morre nas primeiras 6 semanas de vida, devido a coagulação intravascular disseminada, disfunção hepática e hemorragias (Dollard et al, 2007; James et al, 2009; Boppana et al, 2013; Jückstock et al, 2015). Entre 40 a 60% dos recém-nascidos sintomáticos poderão desenvolver sequelas tardias a longo prazo, nomeadamente atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, crises convulsivas, coriorretinites, atrofia do nervo ótico, perda auditiva e defeitos na dentição (Mocarski et al, 2013; Jückstock et al, 2015). O desenvolvimento de surdez neurossensorial é passível de ser encontrado em aproximadamente metade dos recém-nascidos sintomáticos, tratando-se geralmente de uma surdez bilateral e progressiva (Fowler et al, 2006). O distúrbio ocular mais comum associado à infeção congénita por HCMV é a coriorretinite. Esta pode afetar até 20% destes recém-nascidos, existindo ainda risco de desenvolver atrofia ótica e estrabismo (Harrison et al, 2015).

1.5.4 Prevenção da infeção

O conhecimento limitado dos progenitores sobre a infeção durante a gravidez é um fator preponderante para a morbidade da infeção congénita provocada pelo HCMV. Num estudo publicado em 2012, Cannon e colaboradores analisaram as respostas de um questionário realizado pela *Healthstyles* tendo concluído que apenas 13% das mulheres e 7% dos homens inquiridos tinham conhecimento da infeção por HCMV. A consciencialização entre as mulheres variou significativamente de acordo com a idade, raça/etnia, nível de escolaridade, região geográfica e rendimento familiar. No entanto, mesmo entre as mulheres com níveis de educação superior, apenas 21% possuía conhecimento sobre a infeção congénita por HCMV tendo demonstrado um maior conhecimento sobre outras condições de saúde na infância, apesar das consequências desta infeção serem mais prevalentes (Cannon et al, 2012).

Em relação aos prestadores de cuidados de saúde, são vários os estudos publicados na última década que demonstram que o conhecimento desta infeção é limitado e insuficiente (Korver et al, 2009; Cordier et al, 2012; von Gartzzen et al, 2013; Baer et al, 2014). Um inquérito realizado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) em conjunto com o *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) demonstrou que apenas 44% dos obstetras e ginecologistas associados a esta instituição terá aconselhado as suas pacientes relativamente à prevenção da infeção por HCMV, enfatizando a necessidade de formação adicional no que diz respeito a esta temática (CDC, 2008). A ausência de vacinas licenciadas e programas de tratamento recomendados faz com que, em inúmeros casos, os prestadores de cuidados de saúde não transmitam rotineiramente às grávidas ou às mulheres que tentam engravidar as medidas preventivas relativas à aquisição do vírus. No entanto, existem resultados que comprovam a eficácia de medidas simples de higiene (Hamilton et al, 2014).

A mulher deve, por isso, estar alerta para os comportamentos que reduzem o risco de adquirir a infeção no decurso da gravidez, tais como: lavar sempre as mãos depois de trocar fraldas, alimentar uma criança ou segurar em brinquedos; não partilhar utensílios utilizados nas refeições ou escovas de dentes com crianças; limpar os brinquedos ou outros utensílios que tenham estado em contacto com a saliva ou urina de crianças; não beijar crianças na boca ou perto da mesma (Cannon et al, 2005; Coll et al, 2009; Johnson et al, 2014).

Estudos demonstraram que a instrução de gestantes sobre medidas de higiene durante a gravidez resulta na diminuição da taxa de seroconversão para o HCMV. No entanto, essas medidas não são 100% eficazes na prevenção da transmissão intrauterina (Adler et al 2004; Vauloup-Fellous et al 2009). Por isso, têm vindo a ser estudadas outras medidas preventivas possivelmente eficazes: a imunização passiva, recorrendo à Imunoglobulina Humana do HCMV (HCMV-HIG), e a imunização ativa via vacinação.

A imunização passiva consiste na cedência de anticorpos (Igs) a um indivíduo não imune com o objetivo de lhe conferir imunidade imediata contra um determinado agente de infeção. Pode acontecer naturalmente, com a passagem de IgGs maternas ao feto via transplacentária e pelo aleitamento, ou pode ser adquirida recorrendo à administração de imunoglobulinas hiperimunes, sendo esta última geralmente aconselhada quando o indivíduo não imune é exposto ao agente e a imunização ativa não está disponível ou está contraindicada (Tavares et al, 2005; Baxter et al, 2007). A HCMV-HIG é preparada recorrendo a doadores com elevado título de anticorpos contra o HCMV, estimulando a imunidade humoral do recetor (Khalil et al, 2017). O seu uso e potencial benefício na mulher grávida serão justificados pelo facto de, como mencionado no capítulo **“1.5.2. Caracterização da Infeção”**, a infeção primária apresentar um maior risco de transmissão fetal do que a infeção secundária.

O primeiro estudo relativamente à administração de HCMV-HIG na gravidez foi realizado por Nigro e colaboradores, tendo a terapêutica com HIG sido associada a uma diminuição significativa do risco de infeção congénita. No entanto, resultados adversos como parto pré-termo, pré-eclampsia e restrição do crescimento intrauterino verificaram-se em maior número no grupo tratado com a HIG (Nigro et al, 2005). Em 2012 surgiu um estudo observacional que voltou a demonstrar uma tendência para a diminuição da taxa de transmissão materno-fetal após a administração de HIG (Buxmann et al, 2012). Mais tarde, um ensaio randomizado contou com uma amostragem de 124 grávidas com infeção primária. A HIG foi administrada mensalmente verificando-se uma taxa de transmissão fetal de 44% no grupo placebo e 30% no grupo que recebeu a imunoglobulina, não sendo esta diminuição significativa. À semelhança do estudo de Nigro, os resultados adversos também foram maiores no grupo sob terapêutica.

O grupo de investigadores concluiu que deveria ter sido inserido um maior número de grávidas no estudo (Revello et al, 2014).

De momento encontra-se ainda em curso um ensaio clínico com o objetivo de avaliar a eficácia da administração intravenosa da imunoglobulina hiperimune Cytogam®, desenvolvida pela CSL Behring (Spong et al, 2012, ClinicalTrials.gov NCT01376778). O resultado deste estudo poderá ajudar a clarificar no que diz respeito à eficácia e segurança da utilização de HCMV-HIG como medida de prevenção.

Uma vez que se verifica um menor número de recém-nascidos infetados em grávidas com imunidade pré-concepcional, a imunização ativa por meio de vacinação tem sido uma meta há muito desejada. O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a infeção por HCMV teve início nos anos 70, quando se tornou evidente o papel deste vírus nos fetos, recém-nascidos e pacientes submetidos a transplante. Foram testadas duas vacinas vivas baseadas em estirpes atenuadas isoladas laboratorialmente, a AD169 e a Towne, mas apenas a segunda continuou a ser estudada (Elek et al, 1974; Plotkin et al, 1976).

A vacina Towne foi desenvolvida a partir de uma estirpe de HCMV proveniente de uma criança com infeção, tendo a estirpe sido atenuada através de várias passagens em culturas celulares de fibroblastos. A sua eficácia foi analisada em mulheres seronegativas em idade fértil expostas a crianças que frequentam creches, tendo ficado demonstrado que esta não conferiu proteção a longo prazo contra a infeção (Adler et al, 1995). De forma a obter melhores resultados no que diz respeito à duração e eficácia da resposta imunitária, têm vindo a ser formuladas vacinas quiméricas recorrendo à estirpe Towne atenuada e à estirpe Toledo não-atenuada. Foram avaliadas quatro destas vacinas relativamente à sua segurança e tolerância num ensaio clínico de fase I, tendo sido conseguidos resultados otimistas em indivíduos seropositivos para HCMV (Heineman et al, 2006). O estudo das quatro vacinas foi realizado posteriormente em indivíduos seronegativos, demonstrando serem bem toleradas. No entanto, serão necessários estudos futuros de forma a determinar a sua segurança e efeito imunogénico em outros grupos de indivíduos (Adler et al, 2016).

Um passo importante na procura por uma vacina eficaz contra a infeção por HCMV foi a purificação da gB. Esta é codificada por um gene conservado do vírus com capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes e, por isso, começou a ser estudada uma vacina sub-unitária composta por esta proteína e o adjuvante MF59 (emulsão contendo esqualeno e água). Um ensaio clínico de fase I foi realizado em adultos seronegativos, tendo a vacina sido considerada segura e imunogénica. No entanto, verificou-se ser necessária uma dose adicional da vacina devido à rápida diminuição do título de anticorpos após a imunização (Pass et al, 1999). Procedeu-se ao ensaio clínico de fase II, onde a vacina foi administrada em 3 doses (0, 1 e 6 meses) a mulheres seronegativas para HCMV que tinham sido mães há menos de 1 ano.

A diminuição da taxa de infecção materna no grupo vacinado foi cerca de 50% e o título de anticorpos produzidos foi semelhante ao induzido aquando uma infecção natural (Pass et al, 2009).

Num segundo ensaio clínico de fase II, a mesma administração foi feita em adolescentes do sexo feminino. Verificou-se que a vacina possuía efeito imunogénico, apresentando resultados semelhantes ao estudo em mulheres adultas. No entanto, existiram alguns efeitos adversos locais e sistémicos (Bernstein et al, 2016). A eficácia e segurança desta vacina necessitam de ser confirmadas em ensaios clínicos de fase III.

Um estudo recente, desenvolvido em modelos animais, utilizou o Vírus da Coriomeningite Linfocítica (LCMV) como vetor associado a gB e pp65 para a produção de uma vacina. Os resultados demonstraram uma diminuição na virémia materna e nos efeitos adversos da infecção na gravidez, mostrando que a utilização do LCMV como vetor poderá ser um caminho para uma vacina recombinante contra a infecção por HCMV (Schleiss et al, 2017).

O Institute of Medicine (National Academy of Medicine, EUA) definiu, no ano 2000, que a prevenção da infecção congénita por HCMV seria uma prioridade para o século XXI (Lawrence et al, 2000). No entanto, apesar dos estudos citados e investimento na área, ainda não está disponível uma vacina eficaz contra esta infecção.

1.5.5 Métodos de diagnóstico

1.5.5.1 Diagnóstico na mulher grávida

Como já referido, a percentagem de mulheres grávidas que adquire infecção primária sintomática por HCMV durante a gravidez é inferior a 5% e os sintomas presentes são geralmente inespecíficos, pelo que a infecção materna é difícil de estabelecer sem a realização de um teste de rastreio à mulher grávida (Pass et al, 2006; Coll et al, 2009).

A serologia é o método correntemente utilizado para o diagnóstico da infecção materna. Os testes serológicos incluem ensaios imunoenzimáticos e quimioluminescentes que detetam a presença da imunoglobulina M (IgM) e da imunoglobulina G (IgG) e respetiva avidéz. O método ideal para identificar a infecção primária na mulher grávida é através da observação da seroconversão das IgGs durante a gravidez, utilizando as IgGs negativas obtidas em análise pré-natal como padrão de referência e fazendo a comparação com os resultados positivos obtidos posteriormente. No entanto, na maioria dos casos, o acompanhamento pré-natal não é realizado, não existindo seronegatividade basal para comparação (Malm et al, 2007; Lazzarotto et al, 2008; Naing et al, 2016).

A detecção apenas de IgMs não pode ser utilizada para diagnóstico definitivo, uma vez que estas podem permanecer elevadas durante vários meses após infecção primária, mas poderão surgir também em consequência da reativação do vírus ou devido a uma reinfeção. Além disso, poderão surgir em consequência de infecção pelo vírus Epstein-Barr, pertencente à mesma família do HCMV, parvovirus B19, ou devido a doenças autoimunes, dando origem a falsos positivos (Revello et al, 2002; Lazzarotto et al, 2011). Assim, a detecção de IgM e IgG simultaneamente poderá indicar uma infecção recente, mas não permite distinguir entre uma infecção primária e uma infecção recorrente ou reativação. Nesse caso, será necessário realizar um teste de avidéz para as IgGs: se a avidéz for baixa indicará uma infecção recente, se esta for alta indica uma infecção com mais de 3 meses (Macé et al, 2004; Joseph et al, 2018).

Vários artigos mencionam a possível utilização de testes de antigenémia ou detecção de DNA de HCMV através da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para o diagnóstico da infecção primária materna. No entanto, os resultados obtidos revelam que estes métodos não permitem datar o curso da infecção nem estimar o risco de transmissão ao feto e gravidade da infecção congênita, não sendo suficientes para diagnosticar a infecção primária materna (Revello et al, 1998; Lazzarotto et al, 2004; Lazzarotto et al, 2008).

1.5.5.2 Diagnóstico no feto e no recém-nascido

Após a confirmação da infecção materna por HCMV durante a gravidez, é de extrema importância considerar a possibilidade de infecção do feto. Para isso poderão ser utilizadas técnicas não invasivas, tais como a ecografia fetal e a ressonância nuclear magnética, ou técnicas invasivas, como a amniocentese e a cordocentese (Lazzarotto et al, 2011).

O primeiro método que deve ser utilizado é a ecografia fetal, a partir da qual poderá ser possível observar lesões ecográficas classicamente associadas à infecção por HCMV. Duas das alterações que sugerem infecção, e que poderão ser visíveis na ecografia, é o aumento da espessura da placenta, por vezes com calcificações, e a restrição do crescimento intrauterino. Outros sinais típicos são as lesões cerebrais como por exemplo a microcefalia, calcificações intracranianas e ventriculomegália, ascite, oligohidrâmnios, intestino hiperecogénico, hidrópia fetal e derrame pleural (Malingier et al, 2010; Picone et al, 2014; Hughes et al, 2016; Saldan et al, 2017). A ecografia fetal deve ser realizada a cada 2 a 4 semanas, de forma a monitorizar o aparecimento de alterações morfológicas ao longo da gravidez e auxiliar o prognóstico da infecção congênita (Bonalumi et al, 2011). No entanto, a sensibilidade deste método é reduzida: apenas cerca de 20% dos fetos infetados são identificados, o que significa que a ausência de alterações morfológicas não exclui a possibilidade de infecção congênita (Guerra et al, 2008).

A ressonância nuclear magnética (RNM) poderá ser utilizada como método complementar à ecografia quando são detetadas anomalias, facultando informações mais detalhadas principalmente a nível do SNC (Picone et al, 2008). A inclusão da RNM como exame complementar deve ser realizada durante o terceiro trimestre e irá aumentar o valor preditivo positivo do diagnóstico de alterações cerebrais em fetos infetados, permitindo estabelecer o prognóstico da infeção fetal pela presença das respetivas alterações morfológicas (Bonalmi et al, 2011; Cannie et al, 2016).

Para o diagnóstico definitivo da infeção fetal é necessário o isolamento do vírus através de cultura ou a amplificação do seu genoma a partir do líquido amniótico, obtido por amniocentese. O vírus irá infetar o rim do feto, atingindo o líquido amniótico através da excreção do vírus pela urina fetal seis a oito semanas após a seroconversão. Assim sendo, a amniocentese deverá ser realizada após as 20 semanas de gestação, altura em que a diurese do feto se encontra bem estabelecida, de forma a diminuir o risco de falsos negativos (Lazarotto et al, 2014; Hughes et al, 2016; Khalil et al, 2017).

O isolamento do vírus através do método de cultura tradicional apresenta uma excelente especificidade ($\approx 100\%$) com uma sensibilidade a variar entre 50-80% mas, no entanto, demora cerca de 14 dias a obter-se o resultado (Benoist et al, 2008).

Surgiram então métodos de cultura rápidos, como o método *shell vial*. Este método combina a cultura celular, utilizando células MRC5 permissivas à infeção, com técnicas imunológicas de modo a detetar antígenos nucleares do HCMV. Após 16h a 36h de incubação realiza-se uma reação de imunofluorescência em que os anticorpos anti-CMV conjugados com fluoresceína reagem com uma das glicoproteínas do HCMV, usualmente a pp65. Os resultados serão obtidos através de observação microscópica da emissão de fluorescência de cor verde, mantendo os valores de sensibilidade e especificidade do método tradicional num menor tempo de resposta (Gleaves et al, 1985; Ross et al, 2005).

Apesar de apresentarem valores de especificidade e sensibilidade desejáveis, os métodos de cultura têm vindo a ser substituídos pelos métodos moleculares, nomeadamente pelo método de PCR em tempo real. Esta técnica permite detetar a presença de DNA de HCMV na amostra em apenas poucas horas, com valores de especificidade entre 67% a 100% e de sensibilidade entre os 50% e os 100% (Benoist et al, 2008). Vários estudos sugerem que os valores de sensibilidade aumentam para 90% a 100% com valores preditivos positivos de cerca de 100% quando a amniocentese é realizada a partir da 20ª ou 21ª semana de gestação e 6 semanas após o primeiro teste serológico materno positivo, pelas razões descritas anteriormente (Revello et al, 1999; Revello et al, 2008; Ross et al, 2011; Saldan et al, 2015).

Falsos negativos poderão surgir quando estas condições não são aplicadas mas também poderão ser explicados por uma transmissão tardia do vírus, após a realização dos testes pré-natais. Apesar de a probabilidade de um falso negativo ser reduzida, deverão ser realizados testes confirmatórios após o nascimento (Khalil et al, 2017).

Alguns autores sugerem que a carga viral no líquido amniótico poderá prever a severidade da infecção nos recém-nascidos (Guerra et al, 2000; Gouarin et al, 2002; Lazzarotto et al, 2003). No entanto, esta questão permanece controversa por existirem estudos que apresentam resultados contraditórios, levantando a hipótese de que o aumento da carga viral poderá estar relacionado com a idade gestacional (Revello et al, 1999; Nedelec et al, 2002; Picone et al, 2004; Goegebuer et al, 2009).

A cordocentese, por seu lado, consiste na colheita de sangue fetal pelo cordão umbilical. Por ser uma técnica invasiva está associada a um risco de perda fetal em 0,5% a 1% dos casos, sendo indicada apenas quando há suspeita de infecção congénita severa, de forma a confirmar a disseminação da infecção e estabelecer o prognóstico (Malm et al, 2007; Benoist et al, 2008; Coll et al, 2009). Além disso, a sensibilidade da técnica de PCR recorrendo a sangue do cordão umbilical é inferior à sensibilidade obtida com líquido amniótico (Revello et al, 2002; Lazzarotto et al, 2011).

Recém-nascidos infetados congenitamente por este vírus excretam o mesmo de forma intensa e prolongada, tanto na saliva como na urina pelo que, após o nascimento, deverão ser realizados testes confirmatórios da infecção (Waters et al, 2014; Fowler et al, 2018).

O método *gold standard* para o diagnóstico da infecção congénita tem sido o isolamento viral através de cultura utilizando urina ou saliva colhida até às 2 ou 3 semanas de vida pois, após esse período, poderá tratar-se de uma infecção pós-natal uma vez que se estima que o período de incubação do vírus varie entre 3 a 12 semanas (Benoist et al, 2008). Contudo, este método contém limitações tais como o facto de ser dispendioso, moroso, sujeito a contaminações e perda de viabilidade das células entre outras, fatores que diminuem a sensibilidade da técnica (Revello et al, 2002; Lazzarotto et al, 2011; Ross et al, 2014; Fowler et al, 2018). Por isso, esta tem vindo a ser substituída pela técnica de PCR em tempo real, que realiza a pesquisa do genoma viral nas mesmas amostras biológicas colhidas durante o intervalo de tempo mencionado, com a vantagem de ser mais sensível e rápida (Boppana et al, 2011; Ross et al, 2014). Apesar de a saliva apresentar sensibilidade semelhante à urina e a sua colheita ser bastante mais acessível, é necessário ter em conta a possibilidade de ocorrência de resultados falsos positivos como consequência da amamentação e da presença do vírus no leite materno (Hamprecht et al, 2001; Koyano et al, 2013; Azenkot et al, 2019). Os resultados positivos obtidos na saliva deverão, por isso, ser confirmados pelo mesmo método utilizando urina como amostra (Luck et al, 2017).

Caso a suspeita de infecção congênita surja após as 3 semanas de vida da criança, será necessário realizar o diagnóstico recorrendo à análise do DNA de HCMV em amostras de sangue colhidas em *Guthrie cards*, também conhecido como teste do pezinho. Como esta amostra é colhida por rotina a todos os recém-nascidos nos primeiros dias de vida, se o resultado for positivo para DNA de HCMV permite-nos concluir que se trata de uma infecção congênita e não pós-natal (Barbi et al, 2006; Scanga et al, 2006).

1.5.6 Rastreio

O rastreio é uma medida de saúde pública que consiste na aplicação sistemática de um teste ou exame por profissionais de saúde em indivíduos assintomáticos quando existe risco ou suspeita de uma infecção ou doença específica. O objetivo do rastreio é a realização de um diagnóstico precoce, de forma a limitar as possíveis consequências. Deste modo, o rastreio não é um diagnóstico, apenas permite identificar quais os indivíduos que devem realizar testes de diagnóstico confirmatórios (Groose et al, 2008). Para o desenvolvimento de programas de rastreio eficazes é necessária uma avaliação da importância da infecção ou doença como problema de saúde pública tendo em consideração a sua frequência, gravidade, história natural, existência de testes de rastreio e diagnóstico fiáveis e de baixo custo, assim como a disponibilidade de tratamentos eficazes. A comparação entre os benefícios esperados, os custos do rastreio e possível tratamento e ainda a possibilidade dos indivíduos rastreados sofrerem danos psicológicos, devem também ser fatores tidos em conta para a decisão de implementar um programa de rastreio (Barbi et al, 2006).

1.5.6.1 Rastreio na mulher grávida

O rastreio para a infecção congênita por HCMV tem vindo a ser debatido ao longo de vários anos, devido aos problemas de saúde que a infecção congênita acarreta e subsequentes gastos económicos (Cannon et al, 2014). De momento, o rastreio durante a gravidez não está aconselhado por várias razões sendo elas: (1) os programas de tratamento e aconselhamento ainda não provaram ser efetivos, (2) os dados epidemiológicos existentes estão incompletos, particularmente em relação à taxa de infecção materna recorrente e suas consequências, (3) o difícil prognóstico da infecção congênita e (4) a possibilidade dos efeitos adversos do rastreio (ansiedade, aborto precoce voluntário, uso abusivo de amniocentese, etc.) serem mais frequentes do que as consequências relacionadas com a infecção (Vauloup-Fellous et al, 2009; Cannon et al, 2014). No entanto, com os recentes desenvolvimentos relativamente aos métodos de diagnóstico e possíveis tratamentos desta infecção, vários países, nomeadamente na Europa, têm vindo a implementar programas de rastreio para a maioria das mulheres grávidas (Adler et al, 2011).

Vários são os grupos que têm vindo a defender a implementação do rastreio de infeção por HCMV na gravidez para que, principalmente a infeção primária, associada ao maior risco de transmissão ao feto, possa ser diagnosticada e a infeção congénita e potenciais sequelas evitadas. Algumas hipóteses foram apresentadas para o rastreio na mulher grávida: a primeira abordagem tinha por base o rastreio universal a todas as mulheres ou grávidas recentes; a segunda englobava apenas o rastreio a mulheres com maior risco de adquirirem infeção primária (mulheres cujo contacto com crianças com idade inferior a 3 anos é frequente ou prolongado: filhos pequenos ou que trabalhem em creches ou infantários); a última hipótese envolvia realizar o rastreio e respetivo teste de avididade a grávidas com aproximadamente 20 semanas de gravidez, uma vez que o risco de infeção é superior neste período. Para além destas hipóteses, se fossem encontradas anomalias ecográficas consistentes com infeção por HCMV seria ainda possível realizar uma serologia durante a gravidez (Walker et al, 2013). Todas as estratégias mencionadas apresentam, no entanto, benefícios e limitações. Um estudo publicado em 2009 analisou o custo-eficácia das 3 abordagens, concluindo que o rastreio materno universal apresenta a melhor opção quando complementado com a administração da imunoglobulina hiperimune do HCMV (Cahill et al, 2009). No entanto, assumiu a eficácia da imunoglobulina apesar de esta não estar comprovada.

O CDC e a ACOG não recomendam atualmente um rastreio universal na gravidez. Em Portugal, embora a Norma nº37/2011 da Direção Geral de Saúde (DGS) atualizada em 2013 não contemple o rastreio da infeção pelo HCMV quando a gravidez é de baixo risco, este é aconselhado desde 2006 na Circular Normativa nº2/DSMIA como componente dos cuidados pré-concepcionais, reforçando a importância do estudo do perfil imunitário relativo ao HCMV da futura grávida (DGS 2006; DGS 2013).

1.5.6.2 Rastreio no recém-nascido

A maioria das crianças infetadas pelo vírus em questão não apresenta sintomas aquando do nascimento, mas estão sujeitas ao risco de desenvolver sequelas: a surdez neurosensorial relacionada com a infeção por HCMV tem aparecimento tardio em cerca de metade dos casos. Como o rastreio neonatal para esta infeção não se encontra atualmente implementado, um elevado número de casos de infeção congénita por HCMV não será detetado com os procedimentos atuais. Assim sendo, a única forma de detetar todos os casos de infeção congénita por este vírus seria realizar rotineiramente o rastreio a todos os recém-nascidos. A implementação desse procedimento iria possibilitar a monitorização das crianças portadoras de infeção assintomática ao nascimento, estando comprovado o benefício de uma intervenção precoce, que irá favorecer a qualidade de vida das crianças ao permitir-lhes desenvolver e melhorar as suas capacidades de comunicação e linguagem (Barbi et al, 2006; Paixão et al, 2012). No entanto, uma das condicionantes da implementação do rastreio neonatal por rotina é o custo associado, pois torna-se incomportável realizar um teste de diagnóstico a cada recém-nascido.

Como referido no capítulo “**1.5.5.2. Diagnóstico no feto e no recém-nascido**”, recém-nascidos infetados congenitamente por HCMV excretam o vírus em grande quantidade pela saliva e urina. Assim sendo, qualquer um destes produtos biológicos seria adequado para efetuar testes de rastreio.

Atualmente, quando se suspeita de uma infeção congénita o diagnóstico é efetuado recorrendo a amostras de urina. De modo a contornar a questão do elevado custo do rastreio foi desenvolvida, em 2005, por uma equipa portuguesa, uma metodologia utilizando *pools* de urina: o princípio baseia-se no facto de a carga viral na urina de recém-nascidos infetados ser elevada, pelo que é possível detetá-la por PCR em tempo real, mesmo que se encontre diluída em 19 urinas negativas. Este método, que revelou ter uma sensibilidade e especificidade semelhantes às da cultura celular (método de referência), permite uma redução significativa no custo dos reagentes e no tempo de execução, tornando-se por isso uma possibilidade a adotar para a realização do rastreio da infeção congénita por HCMV (Paixão et al, 2012). Apesar da sua elevada virúria, a colheita de urina através de saco coletor pediátrico apresenta várias desvantagens tais como irritação da pele devido à cola utilizada para sustentar o saco, irritação do períneo, colheita demorada devido a diurese inadequada ou *stress* da criança, perda de amostra devido a vazamento, a necessidade da troca do saco coletor de 30 em 30 minutos e ainda a possibilidade de contaminação por bactérias fecais (Al-Orifi et al, 2000; DGS, 2012; Waters et al, 2014; Ross et al, 2015). Este método de colheita provoca, portanto, um grande desconforto à criança e consequentemente aos pais, não constituindo uma hipótese para aplicação num rastreio neonatal universal.

Nos últimos anos tem vindo a ser estudada a possibilidade de implementar o rastreio recorrendo a amostras de saliva, uma vez que a sua colheita é bastante mais simples (Yammamoto et al, 2006; Boppana et al, 2011; Barkai et al, 2014; Fowler et al, 2018). Um estudo recente comprovou que a técnica de PCR em tempo real utilizando amostras de saliva apresenta elevada sensibilidade (>97%) e especificidade (99,9%) e poderia facilmente ser adaptada a estudos em larga escala, possibilitando a identificação da maioria dos recém-nascidos com infeção congénita por HCMV (Boppana et al, 2011).

Um estudo publicado em 2015 teve como objetivo estudar os custos associados ao rastreio e tratamento de recém-nascidos assintomáticos com suspeita de infeção no Reino Unido, comparando o custo da utilização da técnica de PCR em amostras de saliva e testes auditivos com o custo de outras estratégias de rastreio já implementadas. O estudo demonstrou que o custo associado ao rastreio utilizando os métodos acima referidos e posterior tratamento dos recém-nascidos era semelhante a qualquer uma das estratégias de rastreio actuais (Williams et al, 2015). Em concordância, um outro estudo concluiu que o rastreio de recém-nascidos para a infeção por HCMV está associado a uma poupança de custos, relativamente às suas possíveis consequências.

Estes resultados, aliados à inexistência de uma vacina eficaz e à taxa de consentimento por parte dos pais, fazem com que o rastreio neonatal universal seja atualmente discutido como medida a implementar (Gantt et al, 2016).

1.5.7 Tratamento

Em indivíduos imunocompetentes a infecção é usualmente assintomática e tende a resolver-se naturalmente, não sendo necessária terapêutica específica (Lurain et al, 2010). A terapêutica antiviral é, por isso, recomendada sobretudo para prevenção e tratamento de indivíduos imunocomprometidos.

Atualmente, as moléculas com potencial antiviral contra o HCMV utilizadas durante a gravidez são o aciclovir e o seu derivado, valaciclovir. Segundo o INFARMED e a FDA (*Food and Drug Administration*), o aciclovir apenas deve ser administrado quando o benefício supera o risco, enquanto a utilização de valaciclovir é tida como aceitável (Caramona et al, 2012).

Apesar da baixa eficácia destes fármacos vários estudos permitem concluir que, quando são administrados durante a gravidez, os efeitos adversos ocorrem em baixas percentagens (Ratanajamit et al, 2003; Stone et al, 2004). Jacquemard e colaboradores demonstraram a eficácia da administração de 8g/dia de valaciclovir oral na mulher grávida com infecção primária por HCMV e com infecção fetal por HCMV confirmada por PCR no líquido amniótico. Os investigadores observaram que tanto no compartimento materno como no fetal existiam concentrações terapêuticas do fármaco, tendo ocorrido diminuição da carga viral fetal após 1 a 12 semanas de tratamento. No entanto, o estudo não permitiu tirar conclusões no que diz respeito às consequências da infecção no feto (Jacquemard et al, 2007).

Os resultados de um estudo realizado com cerca de 1800 grávidas indicaram que a administração oral de valaciclovir no primeiro trimestre de gravidez não está associada a um aumento do risco de anomalias congénitas, concluindo que este antiviral não possui efeito teratogénico (Pasternak et al, 2010). Apesar da existência de vários estudos e das suas evidências, tanto o aciclovir como o valaciclovir pertenciam à categoria C de fármacos da FDA, por não existir um considerável número de estudos considerados adequados e bem controlados relativamente à sua administração a mulheres grávidas (Caramona et al, 2012). Assim sendo, estes não devem ser recomendados por rotina devido ao baixo número de evidências relativamente à sua eficácia e segurança durante a gravidez (Rawlinson et al, 2017). Em 2014 a FDA eliminou as categorias de risco, uma vez que a maior parte dos estudos eram feitos em modelos animais, exigindo agora que a bula do medicamento inclua informações específicas relativamente às possíveis consequências da sua toma (FDA, 2014).

Relativamente ao recém-nascido, o tratamento não está recomendado para recém-nascidos assintomáticos com rastreio auditivo normal ou levemente sintomáticos sem doença do SNC (Harrinson et al, 2015; Lim et al, 2017). Devem ser consideradas para tratamento crianças com menos de 21 dias de idade, que apresentem infeção congénita sintomática com PCR positivo para o DNA de HCMV e doença de órgão em particular ou doença do SNC. Para o tratamento destes recém-nascidos é recomendado ganciclovir intravenoso ou valganciclovir oral. Ambos atuam provocando a inibição da polimerase, interrompendo a síntese do DNA viral e, conseqüentemente, o ciclo de replicação do HCMV. Estudos farmacocinéticos demonstraram que ambos possuem eficácias semelhantes e melhores resultados quando administrados no primeiro mês de vida, sendo que o valganciclovir oral possui menos efeitos secundários a curto prazo (Kimberlin et al, 2008; Harrison et al, 2015; Mareri et al, 2015).

O ganciclovir, análogo da desoxiguanosina, foi o primeiro fármaco a ser aprovado pela FDA para o tratamento de adultos com infeção por HCMV em 1988, permanecendo como antiviral de primeira linha para o tratamento em pacientes imunocomprometidos (Gilbert et al, 2005). A sua administração ocorre por via intravenosa, dado que apresenta uma baixa biodisponibilidade quando administrado por via oral. Para o tratamento da infeção congénita sintomática por HCMV são administradas 12mg/kg/dia, duas vezes ao dia durante 6 semanas (Schleiss et al, 2004; Whitley, 2012).

Devido à sua baixa biodisponibilidade, alta toxicidade e ao facto de, aquando da sua toma prolongada, suscitar o aparecimento de resistências, foi desenvolvido o seu pró-fármaco designado valganciclovir. Este possui, após administração oral, uma biodisponibilidade cerca de 10 vezes superior à do ganciclovir, sendo por isso o fármaco maioritariamente utilizado no tratamento em recém-nascidos (Schleiss et al, 2004; Lurain et al, 2010; Whitley, 2012). Um estudo que avaliou a sua farmacocinética e farmacodinâmica estabeleceu uma dose de 16mg/kg por via oral, o equivalente a 6mg/kg de ganciclovir (Kimberlin et al, 2008). No entanto, a dosagem deve ser ajustada de acordo com a idade e função renal do doente (Whitley, 2012). Em 2015, um estudo comparou os resultados de um tratamento com valganciclovir durante 6 semanas com o mesmo tratamento ao longo de 6 meses.

O tratamento prolongado não apresentou progressos relativamente à audição durante os 6 meses mas teve melhorias significativas na audição e desenvolvimento neurológico a longo prazo, nomeadamente na linguagem e comunicação, comparativamente com o tratamento durante apenas 6 semanas (Kimberlin et al, 2015). A toxicidade deste antiviral ainda não foi devidamente avaliada, pensando-se ser semelhante à do ganciclovir (Whitley, 2012).

A administração de ambos os antivirais a recém-nascidos não foi ainda aprovada pela FDA, uma vez que a segurança e eficácia para uso pediátrico não se encontram bem estabelecidas (Whitley, 2012; FDA, 2017).

Quando utilizados para tratamento é importante ter em consideração os riscos relativos ao mesmo, e as famílias devem ser devidamente esclarecidas quanto à potencial toxicidade associada. Poderá ser necessário pôr fim ao tratamento e, por isso, é necessária monitorização durante todo o decorrer deste. Em relação à toxicidade a longo prazo ainda não existem evidências claras em humanos, mas têm sido levantadas questões sobre a possível carcinogenicidade e efeitos na fertilidade, consequências verificadas em alguns modelos animais (Kimberlin et al, 2003). Além disso, a imaturidade do sistema imunitário do recém-nascido poderá contribuir para a seleção de estirpes mutantes, sendo por isso importante a realização de estudos relativos ao aparecimento de resistências.

As mutações associadas com a resistência ao ganciclovir e ao valganciclovir localizam-se normalmente na região UL97 (Campanini et al, 2012). Caso existam, são recomendados dois antivirais considerados de segunda linha para tratamento: o foscarnet e o cidofovir (Drew et al, 2001; Kotton et al, 2013).

1.6 Técnica de PCR em tempo real

A técnica de PCR foi desenvolvida em 1986 por Kary Mullis e colaboradores, consistindo na utilização da capacidade da enzima DNA polimerase para sintetizar uma cadeia de DNA complementar à cadeia utilizada como molde, tornando assim possível a amplificação de milhões de cópias idênticas a partir de uma pequena quantidade de DNA inicial (Mullis et al, 1986).

Depressa a inovadora técnica começou a despertar interesse na comunidade científica, sendo agora utilizada para o diagnóstico laboratorial de várias infeções, substituindo muitas das técnicas clássicas (Yan et al, 2002; Mackay, 2004). Atualmente existem várias técnicas comerciais e *in house* (desenvolvidas por cada laboratório), sendo que as principais diferenças entre ambas poderão estar na sequência de DNA alvo a amplificar, reagentes e respetivas concentrações, equipamentos ou ainda nos parâmetros da amplificação (Razonable et al, 2002). A PCR demonstrou ser muito sensível, mas a visualização dos resultados obrigava à posterior manipulação dos produtos amplificados elevando o risco de contaminação. A principal desvantagem seria, no entanto, a morosidade desta técnica (Heid et al, 1996; Arya et al, 2005).

Poucos anos mais tarde, em 1993, Higuchi e colaboradores descreveram pela primeira vez a técnica de PCR em tempo real, combinando a tecnologia de amplificação por PCR convencional com a deteção do produto através da emissão de fluorescência. Esta técnica permite visualizar a amplificação ciclo a ciclo e ainda quantificar a quantidade de produto amplificado através de uma curva padrão (Higuchi et al, 1993; Arya et al, 2005).

A utilização de sondas de hidrólise, como as TaqMan®, permite a detecção dos produtos de amplificação com elevada especificidade. Estas sondas são desenhadas especificamente para a sequência alvo, contendo um fluoróforo ligado ao terminal 5' (*reporter*) e um recetor de fluorescência ligado ao terminal 3' (*quencher*). A sonda irá hibridar na região específica da cadeia molde sendo que o *quencher*, ao captar a energia emitida pelo *reporter*, dissipa-a sob a forma de calor (Livak et al, 1995; Heid et al, 1996; Arya et al, 2005). Este fenómeno denomina-se FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) e ocorre em consequência de o espectro de emissão do *reporter* coincidir com o espectro de absorção do *quencher* (Didenko, 2001).

A Taq polimerase inicia a síntese da nova cadeia a partir do local de hibridação dos *primers* com a sequência alvo. Como a enzima possui atividade exonucleotídica de 5' para 3', ao encontrar a sonda irá clivá-la, interrompendo a transferência de energia entre o *reporter* e o *quencher* e permitindo assim detetar a emissão de fluorescência pelo *reporter* (Figura 2) (Livak et al, 1995; Gibson et al, 1996; Heid et al, 1996). A quantidade de fluorescência emitida é proporcional à quantidade de DNA a ser amplificado (Arya et al, 2005).

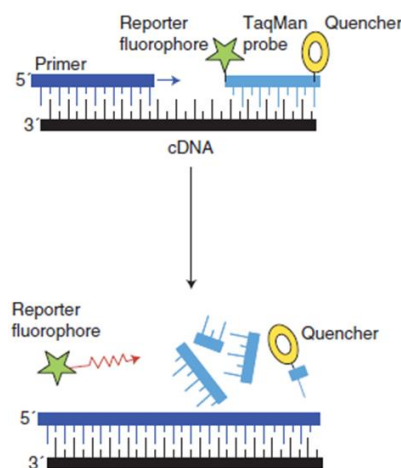


Figura 2. Princípio do funcionamento das sondas TaqMan®.

Adaptado de Arya et al, 2005, Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert review of molecular diagnostics, p211.

O sinal de fluorescência será identificado por um detetor associado a um computador com um *software* que traduz a emissão de fluorescência graficamente, sob a forma de curva, em tempo real durante a amplificação (Arya et al, 2005).

No final da reação é traçada uma linha designada *threshold*, que permite separar a fluorescência de “background” daquilo que é a fluorescência correspondente à amplificação da amostra. O número do ciclo em que a fluorescência emitida ultrapassa essa linha é designado como *threshold cycle* (CT) sendo que quanto maior a concentração de DNA alvo na amostra, menos ciclos serão necessários para que a fluorescência ultrapasse o limiar de *threshold* (Figura 3) (Heid et al, 1996; Mackay et al, 2004; Kubista et al, 2006). Este ponto (CT) irá ser utilizado para a quantificação do DNA presente na amostra, quando se realiza uma reação de PCR quantitativa (Gibson et al, 1996).

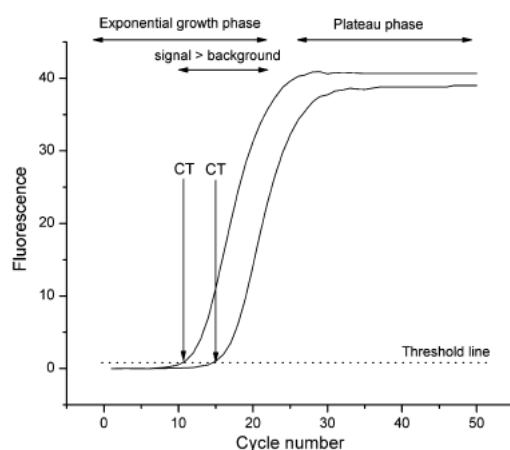


Figura 3. Modelo gráfico de amplificação relativo à técnica de PCR em tempo real ilustrando a nomenclatura utilizada. Retirado de Kubista et al, 2006. The real-time polymerase chain reaction. Molecular aspects of medicine, p99.

A técnica de PCR em tempo real possui várias vantagens relativamente à PCR convencional. A maioria dos resultados obtidos por PCR convencional são qualitativos: a quantidade de DNA apenas pode ser estimada comparando o resultado da corrida eletroforética da amostra com o de um padrão de peso molecular conhecido (Mackay et al, 2004). Em adição, a abordagem convencional possui um elevado risco de contaminação, principalmente no caso da *nested-PCR*, em que é necessário realizar duas amplificações consecutivas e manipular o produto da primeira amplificação. Para além de colmatar estas desvantagens, a técnica de PCR em tempo real permitiu a automatização e o aumento do rendimento das reações, diminuindo o risco de erro humano e o tempo de resposta dos ensaios (Espy et al, 2006). A utilização de sondas possibilita ainda um aumento da especificidade da reação, pois é necessário que ocorra hibridação específica dos *primers* e da sonda com a sequência alvo para que ocorra amplificação e, conseqüentemente, emissão de fluorescência (Arya et al, 2005).

1.7 Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi verificar a aplicação prática de *pools* de saliva num programa de rastreio de infeção congénita por HCMV em dois Hospitais com um elevado número de nascimentos anual. Neste programa foram rastreados recém-nascidos até duas semanas de idade, nascidos no Hospital CUF Descobertas e no Hospital de Vila Franca de Xira, durante um período de 7 meses. O rastreio baseou-se no diagnóstico da infeção congénita através de *pools* de amostras de saliva, seguido de análise quantitativa de DNA viral por PCR em tempo real.

Como objetivos secundários pretendeu comparar-se a carga viral obtida na amostra de saliva com a carga obtida na amostra de urina correspondente, estudar o custo associado ao rastreio recorrendo à metodologia de *pools* de saliva e estimar-se a prevalência da infeção congénita em ambos os Hospitais.

II Materiais e métodos

2.1 População em estudo

A população deste estudo incluiu 1492 recém-nascidos com idades compreendidas entre 1 dia a duas semanas, dos quais 748 nascidos no Hospital CUF Descobertas e 744 nascidos no Hospital Vila Franca de Xira. O estudo decorreu durante 7 meses, tendo as amostras sido colhidas entre 18 de Outubro de 2018 e 31 de Maio de 2019. A realização deste estudo foi autorizada pelas Comissões de Ética da Faculdade de Ciências Médicas (NMS|FCM) e de cada um dos Hospitais participantes, e todos os pais dos recém-nascidos incluídos no estudo leram e assinaram um consentimento informado (Anexos I,II,III, IV).

2.2 Amostras

As amostras de saliva foram colhidas utilizando zaragoas tipo rayon com haste quebrável. A zaragatoa (FLmedical, Torreglia, Itália) foi acondicionada num tubo de 3mL com 500 µL de meio RPMI (Life Technologies, Paisley, UK). Os tubos foram armazenados a 4°C até serem processados.

Foram solicitadas amostras de urina para confirmação de infeção congénita, nos casos em que se obteve um resultado positivo na amostra de saliva. Estas foram colhidas utilizando sacos coletores pediátricos de urina, posteriormente colocadas em frascos de 50mL e armazenadas a 4°C até ao seu processamento.

As amostras de ambos os Hospitais foram encaminhadas para o Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa para serem codificadas através de um número aleatório e, posteriormente, transportadas para o Laboratório da UC de Infeção: Etiologia, Patogénese e Bases Terapêuticas da NMS|FCM acompanhadas de um termo de responsabilidade (Anexo V).

2.3 Procedimento experimental

2.3.1 Processamento das amostras

Na NMS|FCM as amostras foram centrifugadas a 948 x g (Hettich Rotina 380 R) durante 5 minutos e transferidas, em câmara de segurança biológica, para tubos de congelação devidamente identificados. Durante este processo foram realizados procedimentos de desinfeção entre cada uma das amostras e a cada 5 amostras a área de trabalho e respetivo material era esterilizado através de radiação UV.

Preparação de *pools* de 10 amostras

As amostras individuais de saliva foram agrupadas em séries de 10, por ordem de chegada ao Laboratório e de acordo com a idade do recém-nascido, sendo atribuído à *pool* um número sequencial. As *pools* foram preparadas pipetando 20µL de cada uma das 10 amostras individuais de saliva para um tubo eppendorf de 1,5mL, perfazendo os 200µL necessários para a realização da extração.

Todas as amostras individuais de saliva foram congeladas a -20°C para confirmação do resultado da *pool*. Perante um resultado positivo, foi necessário determinar qual ou quais as amostras individuais de saliva positivas.

2.3.2 Extração de DNA

Para realizar o processo de extração de DNA em amostras de saliva, individuais ou agrupadas em *pools*, foi utilizado o PureLink® Genomic DNA Minikit (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante com ligeiras adaptações. O mesmo protocolo foi utilizado para extrair o DNA das amostras de urina.

Para extrair DNA genómico seguiram-se 3 passos fundamentais: lise celular, purificação do DNA e eluição.

Lise celular

- Adicionar 20 µl de proteinase K à amostra. Agitar no vórtex.
- Adicionar 200 µl de Tampão de Lise. Agitar novamente no vórtex.
- Incubar a 55°C, durante 10 minutos. Fazer spin (Eppendorf Minispin).

Purificação do DNA

- Adicionar 200 µl de etanol 96-100%. Agitar bem no vórtex. Fazer spin (Eppendorf Minispin).
- Transferir toda a mistura (~650 µL) para uma coluna fornecida pelo kit.
- Centrifugar a coluna à temperatura ambiente a 10.000 x g (Hettich Mikro 22 B), durante 2 minutos.
- Descartar o tubo coletor e passar a coluna para um novo tubo coletor, fornecido pelo kit.
- Pipetar 450 µL de tampão de lavagem 1 para a coluna.
- Centrifugar a coluna à temperatura ambiente a 10.000 x g (Hettich Mikro 22 B) durante 2 minutos.
- Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um novo tubo coletor, fornecido pelo kit.
- Adicionar à coluna 450 µl de tampão de lavagem 2.
- Centrifugar a coluna à velocidade máxima (17.000 x g, Hettich Mikro 22 B) durante 3 minutos, à temperatura ambiente.
- Descartar o tubo coletor e colocar a coluna num tubo eppendorf estéril de 1,5ml.

Eluição do DNA

- Adicionar à coluna 50 µl de tampão de eluição.
- Incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Centrifugar a coluna à velocidade máxima (17000 x g, Hettich Mikro 22 B) durante 3 minutos à temperatura ambiente.
- Remover e descartar a coluna. Armazenar o DNA purificado a -20°C ou efetuar a técnica de PCR em tempo real.

2.3.3 Técnica de PCR em tempo real

A pesquisa de DNA de HCMV foi efetuada recorrendo a uma técnica de PCR em tempo real (PCRtr) *in house*. Foram utilizados *primers* e uma sonda Taqman® específicos para o gene UL83, que codifica a fosfoproteína pp65 do HCMV (Tabela 1) (Paixão et al, 2012). O procedimento descrito foi efetuado nas *pools* de saliva e nas amostras individuais de saliva e urina.

Tabela 1. Sequência dos *primers* e sonda utilizados para a amplificação do gene UL83 de HCMV

Primer Forward - CMVF	5' CCCTCCGGCAAGCTCTTT 3'
Primer Reverse - CMVR	5' CAGGTCCTCTCCACGTCAGA 3'
Sonda	FAM 5'TGCACGTCACGCTGG 3' MGB

A reação de PCR foi realizada numa placa de 96 poços utilizando a seguinte mistura de reação:

- a) 1x Luna® Universal Probe qPCR Master Mix
- b) 4µM de *primers*
- c) 0,3µM de sonda
- d) Água ultrapura livre de DNases e RNases para perfazer o volume de 20µL
- e) 5µL de DNA extraído

Todas as amostras foram testadas em duplicado. Para excluir a existência de inibidores foi realizado um controlo interno (CI) para cada amostra, adicionando ao poço 5µL de DNA da amostra em estudo e 2µL de DNA extraído do sobrenadante de uma cultura pura da estirpe AD169 do HCMV com uma concentração de 69000 cópias/mL (diluição C). Para validar o resultado da amostra o CI deverá apresentar sempre um resultado positivo, não diferindo 2 CTs em relação ao controlo do controlo interno (CCI), excluindo dessa forma a presença de inibidores de reação e rejeitando a possibilidade de resultados falso negativos. Caso a diferença entre os CTs seja superior a 2, será necessário diluir a amostra e voltar a testa-la.

Em cada série de PCRtr foram utilizados os seguintes controlos:

- Controlo negativo (CN) (5µL de água ultrapura livre de DNAses e RNAses)
- Controlo positivo (CP) (5µL de DNA extraído do sobrenadante de uma cultura pura da estirpe AD169 do HCMV com concentração de 6900 cópias/mL)
- Controlo do controlo interno (CCI) (2µL de DNA da diluição C + 5µL de água ultrapura livre de DNAses e RNAses)

Após a conclusão de todas as pipetagens, a placa foi selada com película própria para o efeito e centrifugada a 1481 x g (Hettich Rotina 380 R) durante 5 minutos.

O sistema de deteção utilizado para a realização da técnica de PCRtr foi o ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). O ciclo de amplificação foi constituído por uma desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e hibridação a 60°C durante 1 minuto, fase em que se efetuou a leitura da fluorescência (Figura 4).

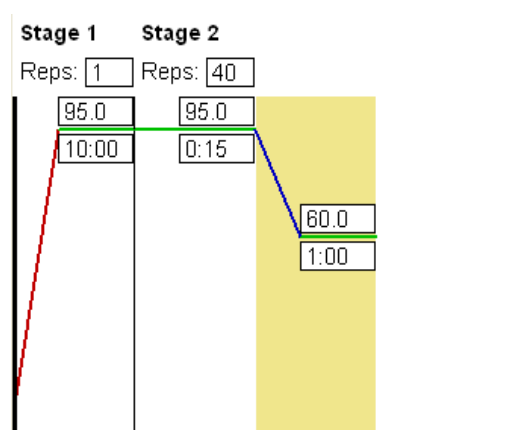


Figura 4. Ciclo de amplificação utilizado na reação de PCR em tempo real

Foram tidos em consideração os seguintes critérios para validação dos resultados:

- Os duplicados do CN obterem resultado negativo
- Os duplicados do CP e do CCI obterem resultado positivo
- A diferença entre duplicados não ser superior a 2 CTs
- Todas as reações cujo CT foi superior a 15 e inferior a 39 foram consideradas positivas
- Reações cujo CT foi igual ou superior a 39 foram consideradas negativas

2.3.3.1 Análise dos Resultados da PCRtr

O resultado das *pools* foi analisado de acordo com o algoritmo descrito na Figura 5. Quando uma *pool* obtinha um resultado positivo, as 10 amostras de saliva que a compunham eram extraídas individualmente e testadas utilizando o protocolo acima mencionado. Após a identificação da(s) amostra(s) positiva(s), de forma a efetuar a confirmação da infecção congênita por HCMV, era solicitada uma amostra de urina tendo sido também testada pelas técnicas anteriormente descritas.

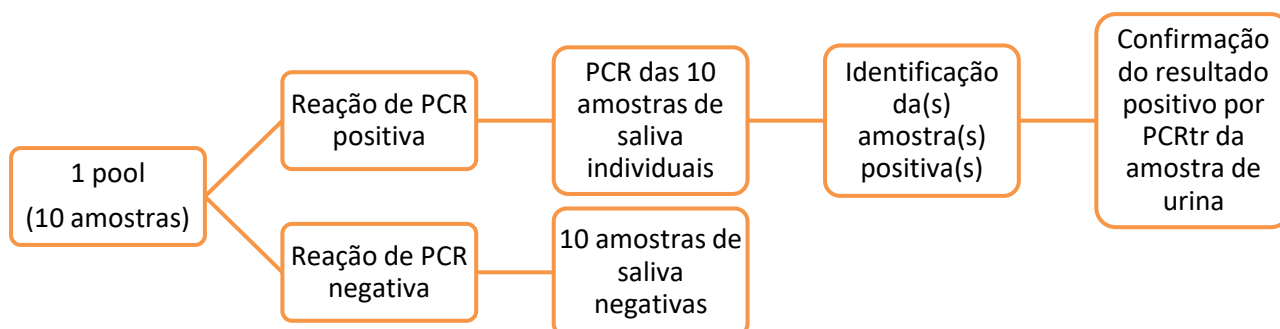


Figura 5. Algoritmo utilizado no estudo para a detecção e identificação de amostras positivas para DNA de HCMV em *pools* de 10 amostras de saliva colhidas de recém-nascidos.

2.3.4 Quantificação da carga viral

A análise quantitativa das *pools* e amostras individuais de saliva e urina positivas foi realizada através da técnica de PCRtr previamente descrita, recorrendo a uma curva de calibração efetuada utilizando quatro diluições seriadas de 1:10 do 1º Padrão Internacional da Organização Mundial de Saúde (OMS), NIBSC 09/162, para técnicas de amplificação de ácidos nucleicos de HCMV, com concentração inicial de 5×10^6 Unidades Internacionais por mililitro (UI/mL). As quantificações das *pools* e amostras individuais foram obtidas por extrapolação dos CT na curva de calibração e os resultados obtidos foram expressos em UI/mL.

A sensibilidade analítica desta técnica foi testada previamente no presente Laboratório, onde foi descrita como sendo de 150 UI/mL (Silva et al, no prelo).

2.3.4.1 Análise das cargas virais de HCMV

Foram analisados os valores das cargas virais obtidas nas *pools* de saliva, amostras de saliva individuais e amostras de urina.

2.4 Estudo dos custos associados à deteção de DNA de HCMV através da utilização da metodologia de *pools* versus a análise de amostras individuais

Os custos económicos inerentes à pesquisa de DNA de HCMV recorrendo à metodologia de *pools* de saliva, em comparação com amostras individuais, foram calculados de forma a estudar a viabilidade da implementação da metodologia em estudo num programa de rastreio universal.

2.5 Determinação da prevalência da infeção congénita por HCMV

A determinação da prevalência da infeção congénita por HCMV nos dois Hospitais em estudo e respetivo intervalo e confiança a 95% (IC95%) foi realizada através da opção “*Confidence limits for a proportion*” da ferramenta **Epitools** *Epidemiological Calculators* disponível em: <https://epitools.ausvet.io/ciproportion>.

III Resultados e Discussão

3.1 Rastreamento da infecção congênita recorrendo a *pools* de saliva

Neste trabalho foi estudada a possibilidade de aplicar *pools* de amostras de saliva em programas de rastreio para a infecção congênita por HCMV em dois Hospitais com um elevado número de nascimentos anual.

Numa fase inicial do trabalho, a preparação das *pools* foi realizada na mesma câmara de segurança biológica onde posteriormente era efetuada a extração do DNA. Este procedimento teve de ser revisto devido à ocorrência de algumas contaminações. A preparação das *pools* passou a ser realizada numa câmara de segurança biológica diferente, em sala separada, utilizando material específico para este procedimento. Reforçaram-se os cuidados desinfetando as luvas com lixívia entre cada amostra. A cada processamento de 5 amostras a câmara de segurança biológica e micropipetas foram desinfetadas com álcool a 70% e radiação UV durante 20 minutos. Com esta prática, não se voltaram a constatar contaminações.

O processo de extração do DNA foi sempre realizado na mesma câmara de segurança biológica, numa sala exclusiva para este fim, sempre com o mesmo kit de extração, utilizando micropipetas específicas corretamente desinfetadas com álcool a 70% a cada utilização e material plástico estéril de uso único, de forma a diminuir a possibilidade de contaminação do produto biológico.

A escolha do PCR em tempo real como método de deteção de DNA de HCMV para o desenvolvimento deste rastreio deveu-se a vários fatores: esta técnica de PCR possui tempo de resposta curto, alta sensibilidade e um menor risco de contaminação quando comparada com outras técnicas de PCR (Arya et al, 2005). Além disso, foi utilizado um protocolo *in house* que recorre a sondas TaqMan® específicas para HCMV que nos permitem aumentar a especificidade da reação.

O objetivo proposto inicialmente para este estudo foi testar a metodologia de *pools* de 20 amostras previamente descrita no presente laboratório, utilizando saliva como produto biológico ao invés de urina (Paixão et al, 2012). No entanto, verificou-se no início do estudo que o fluxo de entrada de amostras diariamente no laboratório não nos permitia avançar com esse objetivo, pois caso alguma amostra obtivesse resultado positivo, a urina teria de ser colhida até às 3 semanas de vida da criança. Assim, foi tomada a decisão de realizar o rastreio através de *pools* de 10 amostras de saliva. Durante a realização do rastreio foram analisadas 1492 amostras de saliva inseridas num total de 150 *pools* de 10 amostras, tendo sido necessário utilizar água ultrapura livre de DNAsés e RNAsés para perfazer o volume em 2 destas *pools*.

Deste rastreio resultaram 140 *pools* negativas e 10 *pools* positivas (Tabela 2). Os resultados de todas as 1492 amostras analisadas neste estudo estão presentes no Anexo VI. Amostras com nomenclatura CMVXA são oriundas do Hospital CUF Descobertas enquanto as restantes foram provenientes do Hospital Vila Franca de Xira.

Tabela 2. Resultados qualitativos da análise por PCRtr das *pools* de saliva e amostras individuais positivas. O valor de CT apresentado representa o valor médio dos duplicados.

<i>Pool 10</i>		Amostras de saliva positivas	
Nº	CT	Nº	CT
POOL 1 A 6	Neg.	-	-
POOL 7	32,5	CMV12A	30,5
		CMV21A	37,1
POOL 8 A 12	Neg.	-	-
POOL 13	22,9	CMV82	20,0
POOL 14	Neg.	-	-
POOL 15	20,3	CMV57A	17,7
		CMV58A	32,9
POOL 16 A 20	Neg.	-	-
POOL 21	31,0	CMV103A	28,1
POOL 22 A 50	Neg.	-	-
POOL 51	24,4	CMV253	24,0
POOL 52 A 56	Neg.	-	-
POOL 57	26,4	CMV305A	27,4
		CMV307A	22,8
POOL 58 A 77	Neg.	-	-
POOL 78	31,6	CMV420A	38,2
		CMV422A	27,0
POOL 79 A 89	Neg.	-	-
POOL 90	33,7	CMV481A	30,7
POOL 91 A 105	Neg.	-	-
POOL 106	28,1	CMV566A	24,2
POOL 107 A 130	Neg.	-	-
POOL 131	30,8	CMV633	28,5
POOL 132 A 150	Neg.	-	-

Para a obtenção dos resultados apresentados na Tabela 2 foi utilizado o algoritmo apresentado na **Figura 5** em “2.3.3.1. Análise dos Resultados da PCRtr”. Foram obtidas 10 *pools* com resultado positivo, com um total de 14 amostras individuais de saliva positivas obtidas no rastreio, tendo-se obtido 4 *pools* com duas amostras positivas simultaneamente. As *pools* e amostras positivas encontram-se sombreadas a cinzento. Das 14 amostras positivas na saliva, 11 correspondem a recém-nascidos nascidos no Hospital CUF Descobertas, sendo as restantes amostras relativas ao Hospital de Vila Franca de Xira.

Para verificar a concordância entre a metodologia utilizada para a realização deste rastreio e os respetivos resultados, foram testadas individualmente amostras provenientes de 10 *pools* com resultado negativo tendo obtido resultados concordantes em todas as amostras analisadas.

Para realizar a confirmação de infeção congénita por HCMV nas 14 amostras cujo resultado da amostra de saliva foi positivo foram analisadas as amostras de urina correspondentes (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados qualitativos da análise por PCRtr das amostras individuais de urina. O valor de CT apresentado representa o valor médio dos duplicados. *Amostras com resultado positivo testadas por um laboratório diferente.

Amostras de saliva positivas	Urina
Nº	CT
CMV21A	Neg.
CMV58A	Neg.
CMV420A	Neg.
CMV481A	Neg.
CMV12A	Pos.*
CMV103A	Pos.*
CMV253	Pos.*
CMV307A	Pos.*
CMV566A	Pos.*
CMV633	Pos.*
CMV82	22,4
CMV422A	24,7
CMV57A	25,1
CMV305A	25,2

Através da análise dos resultados apresentados na Tabela 3 verifica-se que, das 14 amostras de saliva positivas, apenas 10 obtiveram infeção congénita confirmada pela análise da urina (destacadas na tabela), tratando-se as outras 4 amostras de resultados falso-positivos. Seis amostras de urina não foram enviadas para confirmação da infeção no nosso laboratório, tendo a análise sido realizada pelo laboratório do Hospital de origem. Dos 10 recém-nascidos com infeção congénita confirmada, 7 nasceram no Hospital CUF Descobertas, enquanto os restantes 3 tiveram o seu nascimento no Hospital de Vila Franca de Xira.

Quando estamos perante uma infeção congénita a carga viral na saliva e na urina é elevada, o que se traduz num valor de CT relativamente baixo (Nijman et al, 2012; Waters et al, 2014; Fowler et al, 2018). Na Tabela 4 apresentam-se os valores de CT obtidos nas 14 salivas positivas e os valores obtidos nas amostras de urina correspondentes.

Tabela 4. Comparação dos valores de CTs das amostras falso-positivas e das amostras com infecção congénita confirmada. O valor de CT apresentado representa o valor médio dos duplicados. *Amostras com resultado positivo testadas por um laboratório diferente.

Amostra	Saliva	Urina
Nº	CT	CT
CMV57A	17,7	25,1
CMV82	20,0	22,4
CMV307A	22,8	Pos.*
CMV253	24,0	Pos.*
CMV566A	24,2	Pos.*
CMV422A	27,0	24,7
CMV305A	27,4	25,2
CMV103A	28,1	Pos.*
CMV633	28,5	Pos.*
CMV12A	30,5	Pos.*
CMV481A	30,7	Neg.
CMV58A	32,9	Neg.
CMV21A	37,1	Neg.
CMV420A	38,2	Neg.

Quando comparamos o valor de CT obtido nas **4 amostras falsamente positivas** com as restantes 10 amostras verificamos que as primeiras apresentam um valor de CT relativamente alto, sendo que duas destas amostras (CMV21A e CMV 420A) apresentam valores de CT perto do ciclo final de amplificação (CT=40). De salientar ainda que, à exceção da amostra CMV481A, as outras 3 amostras falso-positivas se encontravam inseridas em *pools* com uma amostra de infecção congénita confirmada. Isto sugere que, caso não existissem outras amostras positivas na mesma *pool*, estes 3 resultados falso-positivos poderiam não ser detetados pelo método em estudo (*pools* 10) o que seria um ponto a favor desta metodologia. Não foi possível realizar esta confirmação por não existir amostra suficiente disponível no laboratório, tendo estas amostras sido testadas em *pools* de 20.

A deteção de baixas cargas de HCMV nestas amostras de saliva pode ser explicada pela possibilidade de transmissão do vírus durante a amamentação. Vários artigos relatam a excreção deste vírus no leite materno de mulheres saudáveis, sendo por vezes a causa de infecção pós-natal em crianças pré-termo (Hamprecht et al, 2001; Koyano et al, 2013; Azenkot et al, 2019). Uma forma de evitar a ocorrência destes resultados falsos positivos durante o rastreio seria instruir os profissionais de saúde a realizar a colheita da amostra de saliva antes da primeira amamentação.

Tendo obtido um elevado número de amostras no presente estudo, avançou-se com o objetivo inicialmente proposto, testando o mesmo método utilizando *pools* de 20 amostras de saliva. Esta metodologia tinha sido testada anteriormente no presente laboratório recorrendo a amostras de urina (Paixão et al, 2005). Assim, foram preparadas 13 *pools* de 20 amostras. Cada *pool* foi constituída por uma das amostras de saliva positivas e 19 amostras de saliva negativas (Tabela 5). Uma das amostras falso-positivas (CMV58A) não foi testada em *pool* de 20 devido a amostra insuficiente. Todas as amostras utilizadas foram resultantes do rastreio realizado.

Tabela 5. Resultados qualitativos da PCRtr das 13 *pools* de 20 amostras de saliva. O valor de CT apresentado representa o valor médio dos duplicados.

Amostras de saliva positivas		Pool 20	
Nº	CT	Nº	CT
CMV57A	17,7	POOL D	20,3
CMV82	20,0	POOL C	22,6
CMV307A	22,8	POOL I	27,1
CMV253	24,0	POOL G	26,1
CMV566A	24,2	POOL M	24,5
CMV422A	27,0	POOL K	29,5
CMV305A	27,4	POOL H	30,1
CMV103A	28,1	POOL F	32,0
CMV633	28,5	POOL N	31,9
CMV12A	30,5	POOL A	34,4
CMV481A	30,7	POOL L	34,3
CMV21A	37,1	POOL B	Neg.
CMV420A	38,2	POOL J	Neg.

Através dos resultados apresentados na Tabela 5 verificamos que as 10 amostras de saliva positivas com infeção congénita confirmada permaneceram todas com resultado positivo quando diluídas em 19 amostras negativas. Por outro lado, apenas 1 (**CMV 481A**) das 3 amostras falso-positivas testadas permaneceu positiva enquanto, as restantes duas (**CMV21A e CMV420A**) obtiveram resultado negativo. Estes resultados permitem-nos afirmar que a metodologia de *pools* de 20 amostras poderá ser aplicada em larga escala num programa de rastreio. Não obstante, os resultados para o diagnóstico da infeção congénita devem ser sempre confirmados através da análise de uma amostra de urina (método de referência).

No estudo realizado com a metodologia de *pools* de urina, não se obtiveram quaisquer resultados falso-positivos (Paixão et al, 2005). No entanto, a colheita de amostra de saliva é mais simples e rápida, sendo menos desconfortável para os recém-nascidos e, por isso, será mais adequada para um programa de rastreio universal.

3.2 Análise das cargas virais de HCMV

Neste ponto pretendeu-se comparar as cargas virais obtidas nas amostras de saliva individuais positivas com as cargas das *pools* de 10 amostras e *pools* de 20 amostras. A quantificação das cargas virais em UI/mL foi realizada através da mesma técnica de PCRtr utilizada para o rastreio, recorrendo a uma curva de calibração que utilizava o padrão internacional NIBSC. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.

Como se pode observar na Tabela 2, verificaram-se *pools* de 10 com mais do que uma amostra de saliva positiva. Para que os resultados da quantificação das cargas virais pudessem ser comparáveis, foram realizadas novas *pools* de 10 com apenas 1 amostra de saliva positiva + 9 amostras negativas. Para realizar a comparação entre as cargas nas amostras de saliva, as *pools* de 10 e as *pools* de 20 apenas foram consideradas as cargas virais resultantes de amostras com infeção congénita confirmada (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de quantificação em UI/mL para as amostras de saliva positivas e *pools* de 10 e 20 amostras correspondentes. O valor da carga viral apresentado representa o valor médio dos duplicados. Os resultados encontram-se apresentados por ordem decrescente da carga viral obtida na amostra de saliva.

Nº amostra	Saliva UI/mL	Pool 10 UI/mL	Pool 20 UI/mL
CMV57A	8,2x10 ⁷	2,8x10 ⁶	1,2x10 ⁷
CMV82	1,5x10 ⁷	1,8x10 ⁶	2,3x10 ⁶
CMV307A	2,0x10 ⁶	4,5x10 ⁴	8,1x10 ⁴
CMV253	8,4x10 ⁵	6,0x10 ⁵	1,7x10 ⁵
CMV566A	6,9x10 ⁵	4,4x10 ⁴	5,3x10 ⁵
CMV422A	8,8x10 ⁴	3,9x10 ⁴	1,3x10 ⁴
CMV305A	6,1x10 ⁴	2,5x10 ³	7,8x10 ³
CMV103A	4,2x10 ⁴	5,2x10 ³	2,5x10 ³
CMV633	3,1x10 ⁴	6,8x10 ³	2,6x10 ³
CMV12A	7,4x10 ³	5,4x10 ²	4,4x10 ²

Através dos dados apresentados na Tabela 6 é possível afirmar que a carga viral é superior quando a amostra é analisada individualmente. A diferença entre a carga viral na amostra individual e a carga em ambas as *pools* na maior parte dos casos foi 10x superior, à exceção da amostra CMV307A, onde a diferença foi 100x superior, e das amostras **CMV 253** e **CMV422**, que se manteve constante.

A carga nas *pools* de 20 nunca foi superior à carga obtida na amostra, mas em 2 casos (**CMV57A**, **CMV566A**) foi 10x superior à carga da *pool* de 10. Embora se trate de uma explicação algo especulativa, é possível que eventuais inibidores possam estar presentes nestas amostras de saliva e que, conseqüentemente, o seu efeito diminua quando se efetua uma diluição maior, como é o caso da diluição 1/20.

Os resultados apresentados demonstram que realizar *pools* de 10 ou *pools* de 20 amostras não altera significativamente a sensibilidade da metodologia em estudo. Estes resultados foram já submetidos para publicação, encontrando-se neste momento a aguardar a decisão do editor (Silva et al, no prelo).

Pretendeu ainda comparar-se a carga obtida nas amostras de saliva positivas com as amostras de urina correspondentes. Para realizar esta comparação foram consideradas todas as amostras de saliva com resultado positivo, incluindo por isso as amostras negativas na urina (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de quantificação em UI/mL para as amostras de saliva positivas e amostras de urina correspondentes. O valor da carga viral apresentado representa o valor médio dos duplicados. Os resultados encontram-se apresentados por ordem decrescente da carga viral obtida na amostra de saliva. *Amostras com resultado positivo testadas por um laboratório diferente.

Nº amostra	Saliva UI/mL	Urina UI/mL
CMV57A	8,2x10 ⁷	9,3x10 ⁵
CMV82	1,5x10 ⁷	5,3x10 ⁶
CMV307A	2,0x10 ⁶	Pos. *
CMV253	8,4x10 ⁵	Pos. *
CMV566A	6,9x10 ⁵	Pos. *
CMV422A	8,8x10 ⁴	7,2x10 ⁵
CMV305A	6,1x10 ⁴	1,2x10 ⁶
CMV103A	4,2x10 ⁴	Pos. *
CMV633	3,1x10 ⁴	Pos. *
CMV12A	7,4x10 ³	Pos. *
CMV481A	6,9x10 ³	Neg.
CMV58A	1,3x10 ³	Neg.
CMV21A	7,4x10 ¹	Neg.
CMV420A	1,8x10 ¹	Neg.

Todas as amostras de saliva positivas foram quantificadas neste estudo mas apenas 4 amostras de urina foram quantificadas. As restantes amostras de urina foram enviadas pelos Hospitais de origem para outros laboratórios, apenas nos tendo sido comunicado o resultado qualitativo.

Observando as cargas virais obtidas na quantificação das amostras **CMV57A e CMV82** verificamos que a carga foi superior nas amostras de saliva, respetivamente 100x e 10x. Por outro lado, nas restantes duas amostras que foi possível quantificar, **CMV422A e CMV305A**, obteve-se a situação inversa: a carga viral foi superior nas amostras de urina, respetivamente 10x e 100x. Dado o baixo número de amostras quantificadas, não é possível retirar conclusões desta comparação e não se encontrou na literatura um estudo de comparação das cargas virais nestes produtos biológicos.

No entanto, num artigo publicado em 2014, Ross e colaboradores sugerem que a probabilidade de detecção do DNA de HCMV em amostra de saliva por PCRtr é igual ou superior à mesma probabilidade numa amostra de urina (Ross et al, 2014).

Podemos ainda observar na Tabela 7 que em todas as amostras de saliva positivas com carga viral igual ou superior a $7,4 \times 10^3$ UI/mL (amostra CMV12A) se confirmou a infeção congénita através da análise na urina. No entanto, a amostra CMV481A, cuja carga viral obtida foi $6,9 \times 10^3$ UI/mL, não teve infeção congénita confirmada. Isto sugere que valores de carga viral de DNA de HCMV na saliva inferiores ou iguais a $6,9 \times 10^3$ UI/mL não serão indicadores de infeção congénita. Teria sido necessária uma maior amostragem e várias amostras com cargas virais baixas para podermos fundamentar esta afirmação.

3.3 Estudo dos custos associados à detecção de DNA de HCMV através da utilização da metodologia de *pools* versus a análise de amostras individuais

Após a realização de todos os cálculos, descritos pormenorizadamente no Anexo VII, concluiu-se que o custo associado à realização da técnica de detecção de DNA de HCMV, no nosso laboratório, para uma amostra individual de saliva seria 8,45€. Neste estudo foram rastreados 1492 recém-nascidos o que significa que, caso o rastreio tivesse sido realizado testando cada amostra individualmente, o custo associado teria sido 12608€, um valor incomportável para ser aplicado num programa de rastreio universal.

Ao utilizar a metodologia de *pools* de 10 amostras para o rastreio, o custo associado a cada *pool* foi de 13,10€ ficando cada amostra individual a 1,31€. Isto representa uma redução de custo de 85% em relação ao processamento individual. Ao rastrear 1492 recém-nascidos através do método de *pools* de 10 amostras neste estudo houve um gasto de apenas 1955€.

Se a metodologia utilizada fosse a de *pools* 20 amostras, cada uma teria um custo associado de 18,31€ e cada amostra desta *pool* custaria apenas 0,92€, reduzindo o custo associado ao rastreio em 89%. Se tivessem sido adotadas *pools* de 20 amostras para este estudo, o custo associado teria sido cerca de 1373€.

De notar que nestes cálculos não estão incluídos os valores associados ao processamento das amostras de urina.

3.4 Prevalência da infeção congénita por HCMV

A prevalência da infeção congénita por HCMV foi estudada recorrendo à ferramenta *Epitools* tendo obtido um valor de 0,67% com intervalo de confiança a 95% entre 0,36% e 1,23% em recém-nascidos nascidos nos Hospitais CUF Descobertas e Vila Franca de Xira no período entre Outubro de 2018 e Maio de 2019. A grande amplitude do intervalo de confiança deve-se ao tamanho reduzido da amostra. Os resultados estão representados na Figura 6.

	Number positive	Sample size	Proportion/Prevalence	Lower 95% CL	Upper 95% CL
Wilson	10	1492	0.0067	0.0036	0.0123

Figura 6. Resultados relativos à prevalência da infeção congénita por HCMV nos dois Hospitais portugueses participantes no estudo e respetivo intervalo de confiança a 95%.

O valor observado para a prevalência desta infeção encontra-se dentro dos intervalos descritos na literatura para os países desenvolvidos, que se situa em média entre 0,6% e 0,7% (Dollard et al, 2007; Cannon et al, 2014). No entanto, devido à reduzida amostragem deste estudo e o fato de esta ser limitada a dois Hospitais de Lisboa, é de salientar que esta percentagem não pode ser considerada como representativa da prevalência da infeção congénita por HCMV em Portugal.

IV Conclusões

O rastreio para a infeção por HCMV na gravidez não é aconselhado por várias razões tais como a ausência de profilaxia, programas de tratamento efetivos e o difícil prognóstico no que diz respeito às sequelas desta infeção. Assim, apenas através de um programa de rastreio universal para a infeção congénita por HCMV em recém-nascidos será possível diagnosticar todos os casos de infeção, em especial os casos assintomáticos. A implementação deste procedimento por rotina iria possibilitar a monitorização precoce das crianças portadoras de infeção assintomática ao nascimento, nomeadamente no que se refere ao risco de desenvolvimento de sequelas tardias como SNHL e alterações neurológicas progressivas. O benefício desta intervenção precoce na qualidade de vida destas crianças está comprovado mas o custo associado à aplicação de um programa de rastreio em larga escala tem limitado a sua implementação.

Neste estudo foi realizado um rastreio para a infeção congénita por HCMV, nos Hospitais CUF Descobertas e Vila Franca de Xira, através de *pools* de 10 amostras de saliva utilizando PCR em tempo real, tendo sido possível diagnosticar 10 casos de infeção congénita. A metodologia utilizada foi previamente descrita para amostras de urina mas o fato da colheita desta amostra ter vários inconvenientes para o recém-nascido, faz com que muitos pais recusem a realização da análise. Neste estudo confirmou-se que a saliva apresenta uma sensibilidade semelhante à da urina e que é possível aplicar a metodologia de *pools* recorrendo a este produto biológico. O nosso estudo alertou para a necessidade de, caso a metodologia de *pools* de saliva venha a ser implementada, será necessário que a colheita da amostra se realize antes da amamentação, de forma a evitar resultados falso-positivos. Todos os resultados positivos deverão ser confirmados pelo método de referência, a análise de uma amostra de urina colhida nas primeiras 2 a 3 semanas de vida da criança.

Os dados deste estudo permitiram estimar uma redução do custo em 85% e 89%, respetivamente, para a metodologia de *pools* de 10 amostras e de *pools* de 20 amostras, quando comparado com o custo de uma análise individual.

A prevalência da infeção nos 2 Hospitais participantes no presente rastreio foi de 0,67%, um valor mais baixo do que o esperado tendo em conta o estudo realizado anteriormente em Portugal, mas dentro dos intervalos descritos para os países desenvolvidos. A amostragem estudada não representa, no entanto, o panorama do país e, por isso, a equipa tem como objetivo futuro continuar o estudo numa maior população.

A metodologia de *pools* de saliva demonstrou ser promissora para a implementação de um rastreio em larga escala a custo reduzido, permitindo detetar todos os casos de infeção congénita por HCMV e intervir precocemente no desenvolvimento das crianças afetadas, melhorando a sua qualidade de vida.

V Referências Bibliográficas

A Ross, S., Novak, Z., Pati, S., & B Boppana, S. (2011). Overview of the Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 11(5), 466-474.

Adler, S. P., Starr, S. E., Plotkin, S. A., Hempfling, S. H., Buis, J., Manning, M. L., & Best, A. M. (1995). Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *Journal of Infectious Diseases*, 171(1), 26-32.

Adler, S. P., Finney, J. W., Manganello, A. M., & Best, A. M. (2004). Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus among pregnant women. *The Journal of pediatrics*, 145(4), 485-491.

Adler, S. P. (2011). Screening for cytomegalovirus during pregnancy. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*.

Adler, S. P., Manganello, A. M., Lee, R., McVoy, M. A., Nixon, D. E., Plotkin, S., & Murray, S. E. (2016). A Phase 1 Study of 4 Live, Recombinant Human Cytomegalovirus Towne/Toledo Chimera Vaccines in Cytomegalovirus–Seronegative Men. *The Journal of infectious diseases*, 214(9), 1341-1348.

Al-Orifi, F., McGillivray, D., Tange, S., & Kramer, M. S. (2000). Urine culture from bag specimens in young children: are the risks too high?. *The Journal of pediatrics*, 137(2), 221-226.

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 5(2), 209-219.

Azenkot, T., Zaniello, B., Green, M. L., Selke, S., Huang, M. L., Magaret, A. & Johnston, C. (2019). Cytomegalovirus shedding from breastmilk and mucosal sites in healthy postpartum women: A pilot study. *Journal of medical virology*, 91(5), 894-898.

Baer, H. R., McBride, H. E., Caviness, A. C., & Demmler-Harrison, G. J. (2014). Survey of congenital cytomegalovirus (cCMV) knowledge among medical students. *Journal of Clinical Virology*, 60(3), 222-242.

Barbi, M., Binda, S., & Caroppo, S. (2006). Diagnosis of congenital CMV infection via dried blood spots. *Reviews in medical virology*, 16(6), 385-392.

Barkai, G., Roth, D. A. E., Barzilai, A., Tepperberg-Oikawa, M., Mendelson, E., Hildesheimer, M., & Kuint, J. (2014). Universal neonatal cytomegalovirus screening using saliva—report of clinical experience. *Journal of Clinical Virology*, 60(4), 361-366.

- Baxter, D. (2007). Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational Medicine*, 57(8), 552-556.
- Benoist, G., Jacquemard, F., Leruez-Ville, M., & Ville, Y. (2008). Cytomegalovirus (CMV) congenital infection. *Gynecologie, obstetrique & fertilité*, 36(3), 248-260.
- Bernstein, D. I., Munoz, F. M., Callahan, S. T., Rupp, R., Wootton, S. H., Edwards, K. M. & Pichon, S. (2016). Safety and efficacy of a cytomegalovirus glycoprotein B (gB) vaccine in adolescent girls: A randomized clinical trial. *Vaccine*, 34(3), 313-319.
- Bhide, A., & Papageorghiou, A. T. (2008). Managing primary CMV infection in pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 115(7), 805-807.
- Bonalumi, S., Trapanese, A., Santamaria, A., D'Emidio, L., & Mobili, L. (2011). Cytomegalovirus infection in pregnancy: review of the literature. *Journal of prenatal medicine*, 5(1), 1.
- Boppana, S. B., Ross, S. A., Shimamura, M., Palmer, A. L., Ahmed, A., Michaels, M. G., & Chowdhury, N. (2011). Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *New England Journal of Medicine*, 364(22), 2111-2118.
- Boppana, S. B., Ross, S. A., & Fowler, K. B. (2013). Congenital cytomegalovirus infection: clinical outcome. *Clinical infectious diseases*, 57(suppl_4), S178-S181.
- Buxmann, H., Stackelberg, O. M., Schlößer, R. L., Enders, G., Gonser, M., Meyer-Wittkopf, M. & Enders, M. (2012). Use of cytomegalovirus hyperimmunoglobulin for prevention of congenital cytomegalovirus disease: a retrospective analysis.
- Campanini, G., Zavattoni, M., Cristina, E., Gazzolo, D., Stronati, M., & Baldanti, F. (2012). Multiple ganciclovir-resistant strains in a newborn with symptomatic congenital human cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Virology*, 54(1), 86-88.
- Cannie, M. M., Devlieger, R., Leyder, M., Claus, F., Leus, A., De Catte, L. & Bernaert, A. (2016). Congenital cytomegalovirus infection: contribution and best timing of prenatal MR imaging. *European radiology*, 26(10), 3760-3769.
- Cannon, M. J., & Davis, K. F. (2005). Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC public health*, 5(1), 70.

- Cannon, M. J., Schmid, D. S., & Hyde, T. B. (2010). Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in medical virology*, 20(4), 202-213.
- Cannon, M. J., Westbrook, K., Levis, D., Schleiss, M. R., Thackeray, R., & Pass, R. F. (2012). Awareness of and behaviors related to child-to-mother transmission of cytomegalovirus. *Preventive medicine*, 54(5), 351-357.
- Cannon, M. J., Griffiths, P. D., Aston, V., & Rawlinson, W. D. (2014). Universal newborn screening for congenital CMV infection: what is the evidence of potential benefit?. *Reviews in medical virology*, 24(5), 291-307.
- Caramona, M., Osswald, W., Esteves, A., Gonçalves, J., Macedo, T., Mendonça, J. & Teixeira, A. (2012). INFARMED, *Prontuário Terapêutico*.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2008). Knowledge and practices of obstetricians and gynecologists regarding cytomegalovirus infection during pregnancy. *Morbidity and mortality weekly report*, 57(3), 65.
- Coll, O., Benoist, G., Ville, Y., Weisman, L. E., Botet, F., Greenough, A. & Carbonell-Estrany, X. (2009). Guidelines on CMV congenital infection. *Journal of perinatal medicine*, 37(5), 433-445.
- Colugnati, F. A., Staras, S. A., Dollard, S. C., & Cannon, M. J. (2007). Incidence of cytomegalovirus infection among the general population and pregnant women in the United States. *BMC infectious diseases*, 7(1), 71.
- Coonrod, D. V., Jack, B. W., Stubblefield, P. G., Hollier, L. M., Boggess, K. A., Cefalo, R. & Lu, M. C. (2008). The clinical content of preconception care: infectious diseases in preconception care. *American journal of obstetrics and gynecology*, 199(6), S296-S309.
- Cordier, A. G., Guitton, S., Vauloup-Fellous, C., Grangeot-Keros, L., Benachi, A., & Picone, O. (2012). Awareness and knowledge of congenital cytomegalovirus infection among health care providers in France. *Journal of Clinical Virology*, 55(2), 158-163.
- Dahle, A. J., Fowler, K. B., Wright, J. D., Boppana, S. B., Britt, W. J., & Pass, R. F. (2000). Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus. *Journal of the American Academy of Audiology*, 11(5).
- Davison, A. J. (2010). Herpesvirus systematics. *Veterinary microbiology*, 143(1), 52-69.

de Vries, J. J., Wessels, E., Korver, A. M., van der Eijk, A. A., Rusman, L. G., Kroes, A. C., & Vossen, A. C. (2012). Rapid genotyping of cytomegalovirus in dried blood spots by multiplex real-time PCR assays targeting the envelope glycoprotein gB and gH genes. *Journal of clinical microbiology*, 50(2), 232-237.

Didenko, V. V. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques*, 31(5), 1106-1121.

Direção Geral de Saúde (DGS). Circular Normativa Nº: 02/Dsmia - Prestação De Cuidados PréConcepcionais (16 Janeiro 2006).

Direção Geral de Saúde (DGS). Norma 037/2011 - Exames Laboratoriais Na Gravidez De Baixo Risco (30 de Setembro 2013).

Direção Geral de Saúde (DGS). Norma 008/2012 - Diagnóstico e Tratamento da Infecção do Trato Urinário em Idade Pediátrica (16 de Dezembro de 2012).

Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R. D., Hassan-Walker, A. F., Lee, L., Addison, C. & Griffiths, P. D. (2004). Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *Journal of General Virology*, 85(5), 1301-1312.

Dollard, S. C., Grosse, S. D., & Ross, D. S. (2007). New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in medical virology*, 17(5), 355-363.

Drew, W. L., Paya, C. V., & Emery, V. (2001). Cytomegalovirus (CMV) resistance to antivirals. *American Journal of Transplantation*, 1(4), 307-312.

El Sanousi, S. M., Osman, Z. A., Mohamed, A. B. S., & Al Awfi, M. S. H. (2016). Cytomegalovirus infection in a cohort of pregnant women. *American journal of infection control*, 44(4), e41-e43.

Elek, S. D., & Stern, H. (1974). Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *The Lancet*, 303(7845), 1-5.

Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A. & Smith, T. F. (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical microbiology reviews*, 19(1), 165-256.

Farber, S., & Wolbach, S. B. (1932). Intranuclear and cytoplasmic inclusions ("protozoan-like bodies") in the salivary glands and other organs of infants. *The American journal of pathology*, 8(2), 123.

Food and Drug Administration, HHS. (2014). Content and format of labeling for human prescription drug and biological products; requirements for pregnancy and lactation labeling. Final rule. Federal Register, 79(233), 72063.

Fowler, K. B., & Boppana, S. B. (2006). Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *Journal of Clinical Virology*, 35(2), 226-231.

Fowler, K. B., & Boppana, S. B. (2018). Congenital cytomegalovirus infection. In *Seminars in perinatology* (Vol. 42, No. 3, pp. 149-154). WB Saunders.

Fowler, K. B., Stagno, S., Pass, R. F., Britt, W. J., Boll, T. J., & Alford, C. A. (1992). The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *New England Journal of Medicine*, 326(10), 663-667.

Fowler, K. B., McCollister, F. P., Dahle, A. J., Boppana, S., Britt, W. J., & Pass, R. F. (1997). Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of pediatrics*, 130(4), 624-630.

Fowler, K. B., Stagno, S., & Pass, R. F. (2003). Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *Jama*, 289(8), 1008-1011.

Gantt, S., Dionne, F., Kozak, F. K., Goshen, O., Goldfarb, D. M., Park, A. H. & Fowler, K. (2016). Cost-effectiveness of universal and targeted newborn screening for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA pediatrics*, 170(12), 1173-1180.

Gibson, W. (1996). Structure and assembly of the virion. *Intervirology*, 39(5-6), 389-400.

Gilbert, C., & Boivin, G. (2005). Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3), 873-883.

Gleaves, C. A., Smith, T. F., Shuster, E. A., & Pearson, G. R. (1985). Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 21(2), 217-221.

Goegebuer, T., Van Meensel, B., Beuselinck, K., Cossey, V., Van Ranst, M., Hanssens, M., & Lagrou, K. (2009). Clinical predictive value of real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples. *Journal of clinical microbiology*, 47(3), 660-665.

Gouarin, S., Gault, E., Vabret, A., Cointe, D., Rozenberg, F., Grangeot-Keros, L. & Freymuth, F. (2002). Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *Journal of clinical microbiology*, 40(5), 1767-1772.

Griffiths, P. D., & Grundy, J. E. (1987). Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *Biochemical Journal*, 241(2), 313-324.

Grosse, S. D., Ross, D. S., & Dollard, S. C. (2008). Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a quantitative assessment. *Journal of Clinical Virology*, 41(2), 57-62.

Guerra, B., Lazzarotto, T., Quarta, S., Lanari, M., Bovicelli, L., Nicolosi, A., & Landini, M. P. (2000). Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *American journal of obstetrics and gynecology*, 183(2), 476-482.

Guerra, B., Simonazzi, G., Puccetti, C., Lanari, M., Farina, A., Lazzarotto, T., & Rizzo, N. (2008). Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *American journal of obstetrics and gynecology*, 198(4), 380-e1.

Hamilton, S. T., van Zuylen, W., Shand, A., Scott, G. M., Naing, Z., Hall, B. & Rawlinson, W. D. (2014). Prevention of congenital cytomegalovirus complications by maternal and neonatal treatments: a systematic review. *Reviews in medical virology*, 24(6), 420-433.

Hamprecht, K., Maschmann, J., Vochem, M., Dietz, K., Speer, C. P., & Jahn, G. (2001). Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *The Lancet*, 357(9255), 513-518.

Harrison, G. J. (2015). Current controversies in diagnosis, management, and prevention of congenital cytomegalovirus: updates for the pediatric practitioner. *Pediatric annals*, 44(5), e115-e125.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986-994.

Heineman, T. C., Schleiss, M., Bernstein, D. I., Spaete, R. R., Yan, L., Duke, G. & Klein, N. (2006). A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *The Journal of infectious diseases*, 193(10), 1350-1360.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*, 11(9), 1026.

- Ho M. (2008). The history of cytomegalovirus and its diseases. *Medical Microbiology and Immunology* 197(2): 65-73
- Hughes, B. L., Gyamfi-Bannerman, C., & Society for Maternal-Fetal Medicine. (2016). Diagnosis and antenatal management of congenital cytomegalovirus infection. *American journal of obstetrics and gynecology*, 214(6), B5-B11.
- Irmiere, A., & Gibson, W. (1983). Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*, 130(1), 118-133.
- Jacquemard, F., Yamamoto, M., Costa, J. M., Romand, S., Jaqz-Aigrain, E., Dejean, A. & Ville, Y. (2007). Maternal administration of valaciclovir in symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 114(9), 1113-1121.
- Jain, M., Duggal, S., & Chugh, T. D. (2011). Cytomegalovirus infection in non-immunosuppressed critically ill patients. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 5(08), 571-579.
- James, S. H., Kimberlin, D. W., & Whitley, R. J. (2009). Antiviral therapy for herpesvirus central nervous system infections: neonatal herpes simplex virus infection, herpes simplex encephalitis, and congenital cytomegalovirus infection. *Antiviral research*, 83(3), 207-213.
- Johnson, J., & Anderson, B. (2014). Screening, prevention, and treatment of congenital cytomegalovirus. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, 41(4), 593-599.
- Joseph, A., Mahida, N., Clark, G., Irving, W., & Soo, S. (2018). Congenital cytomegalovirus infection. *Paediatrics and Child Health*, 28(6), 277-281.
- Jückstock, J., Rothenburger, M., Friese, K., & Traunmüller, F. (2015). Passive immunization against congenital cytomegalovirus infection: current state of knowledge. *Pharmacology*, 95(5-6), 209-217.
- Kalejta, R. F. (2008). Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 72(2), 249-265.
- Khalil, A., Jones, C., & Ville, Y. (2017). Congenital cytomegalovirus infection: management update. *Current opinion in infectious diseases*, 30(3), 274-280.
- Kimberlin, D. W., Acosta, E. P., Sánchez, P. J., Sood, S., Agrawal, V., Homans, J. & Cloud, G. A. (2008). Pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment of oral valganciclovir in the treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *The Journal of infectious diseases*, 197(6), 836-845.

- Kimberlin, D. W., Lin, C. Y., Sánchez, P. J., Demmler, G. J., Dankner, W., Shelton, M. & Soong, S. J. (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.
- Kimberlin, D. W., Jester, P. M., Sánchez, P. J., Ahmed, A., Arav-Boger, R., Michaels, M. G., & Romero, J. R. (2015). Valganciclovir for symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *New England Journal of Medicine*, 372(10), 933-943.
- Kinzler, E. R., & Compton, T. (2005). Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *Journal of virology*, 79(12), 7827-7837.
- Korver, A. M. H., De Vries, J. J. C., De Jong, J. W., Dekker, F. W., Vossen, A. C. T. M., & Oudesluys-Murphy, A. M. (2009). Awareness of congenital cytomegalovirus among doctors in the Netherlands. *Journal of Clinical Virology*, 46, S11-S15.
- Kotton, C. N., Kumar, D., Caliendo, A. M., Åsberg, A., Chou, S., Danziger-Isakov, L. & Transplantation Society International CMV Consensus Group. (2013). Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation*, 96(4), 333-360.
- Koyano, S., Inoue, N., Nagamori, T., Moriuchi, H., & Azuma, H. (2013). Newborn screening of congenital cytomegalovirus infection using saliva can be influenced by breast feeding. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 98(2), F182-F182.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K. & Ståhlberg, A. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 95-125.
- Lanari, M., Lazzarotto, T., Venturi, V., Papa, I., Gabrielli, L., Guerra, B. & Faldella, G. (2006). Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics*, 117(1), e76-e83.
- Lanzieri, T. M., Dollard, S. C., Bialek, S. R., & Grosse, S. D. (2014). Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries. *International Journal of Infectious Diseases*, 22, 44-48.
- Lawrence, R. S., Durch, J. S., & Stratton, K. R. (Eds.). (2000). *Vaccines for the 21st century: a tool for decisionmaking*. National Academies Press.

Lazarotto, T., Gabrielli, L., Foschini, M. P., Lanari, M., Guerra, B., Eusebi, V., & Landini, M. P. (2003). Congenital cytomegalovirus infection in twin pregnancies: viral load in the amniotic fluid and pregnancy outcome. *Pediatrics*, 112(2), e153-e157.

Lazarotto, T., Gabrielli, L., Lanari, M., Guerra, B., Bellucci, T., Sassi, M., & Landini, M. P. (2004). Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. *Human immunology*, 65(5), 410-415.

Lazarotto, T., Guerra, B., Lanari, M., Gabrielli, L., & Landini, M. P. (2008). New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Virology*, 41(3), 192-197.

Lazarotto, T., Guerra, B., Gabrielli, L., Lanari, M., & Landini, M. P. (2011). Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(9), 1285-1293.

Lazarotto, T., Gabrielli, L., Guerra, B., Cervi, F., Piccirilli, G., Simonazzi, G. & Landini, M. P. (2014). Diagnosis and prognosis of congenital CMV infection: a case report and review of the literature. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 74(sup244), 34-40.

Lim, Y., & Lyall, H. (2017). Congenital cytomegalovirus—who, when, what-with and why to treat?. *Journal of Infection*, 74, S89-S94.

Lipschütz, B. (1921). Untersuchungen über die Ätiologie der Krankheiten der Herpesgruppe (Herpes zoster, Herpes genitalis, Herpes febrilis). *Archives of Dermatological Research*, 136(3), 428-482.

Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., & Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*, 4(6), 357-362.

Lopo, S., Vinagre, E., Palminha, P., Paixão, M. T., Nogueira, P., & Freitas, M. G. (2011). Seroprevalence to cytomegalovirus in the Portuguese population, 2002-2003. *Eurosurveillance*, 16(25).

Luck, S. E., Wieringa, J. W., Blázquez-Gamero, D., Henneke, P., Schuster, K., Butler, K. & Heath, P. (2017). Congenital Cytomegalovirus: a European expert consensus statement on diagnosis and management. *The Pediatric infectious disease journal*, 36(12), 1205-1213.

Lurain, N. S., & Chou, S. (2010). Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clinical microbiology reviews*, 23(4), 689-712.

- Mace, M., Sissoeff, L., Rudent, A., & Grangeot-Keros, L. (2004). A serological testing algorithm for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *Prenatal diagnosis*, 24(11), 861-863.
- Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical microbiology and infection*, 10(3), 190-212.
- Malinger, G., Lev, D., & Lerman-Sagie, T. (2011). Imaging of fetal cytomegalovirus infection. *Fetal diagnosis and therapy*, 29(2), 117-126.
- Malm, G., & Engman, M. L. (2007). Congenital cytomegalovirus infections. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* (Vol. 12, No. 3, pp. 154-159). WB Saunders.
- Mareri, A., Lasorella, S., Iapadre, G., Maresca, M., Tambucci, R., & Nigro, G. (2016). Anti-viral therapy for congenital cytomegalovirus infection: pharmacokinetics, efficacy and side effects. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 29(10), 1657-1664.
- McMullan, B. J., Palasanthiran, P., Jones, C. A., Hall, B. M., Robertson, P. W., Howard, J., & Rawlinson, W. D. (2011). Congenital cytomegalovirus—time to diagnosis, management and clinical sequelae in Australia: opportunities for earlier identification. *Medical Journal of Australia*, 194(12), 625-629.
- Miller-Kittrell, M., & Sparer, T. E. (2009). Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. *Virology journal*, 6(1), 4.
- Mocarski, E. S., Shenk, T., Griffiths, P., & Pass, R. F. (2013). Cytomegaloviruses. *Fields 549 Virology*, 1960-2014.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 51, pp. 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Murphy, E., Yu, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Dickson, M., Jarvis, M. A. & Shenk, T. E. (2003). Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 14976-14981.
- Murray PR. *Medical microbiology*, 5th Edition. (2005). Philadelphia, Elsevier/Mosby.
- Mussi-Pinhata, M. M., Yamamoto, A. Y., Brito, R. M. M., Isaac, M. D. L., de Carvalhoe Oliveira, P. F., Boppana, S., & Britt, W. J. (2009). Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clinical infectious diseases*, 49(4), 522-528.

- Naing, Z. W., Scott, G. M., Shand, A., Hamilton, S. T., van Zuylen, W. J., Basha, J. & Rawlinson, W. D. (2016). Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy: a review of prevalence, clinical features, diagnosis and prevention. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 56(1), 9-18.
- Nedelec, O., Bellagra, N., Devisme, L., Hober, D., Wattre, P., & Dewilde, A. (2002). Congenital human cytomegalovirus infection: value of human cytomegalovirus DNA quantification in amniotic fluid. In *Annales de biologie clinique* (Vol. 60, No. 2, pp. 201-7).
- Nigro, G., Adler, S. P., La Torre, R., & Best, A. M. (2005). Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *New England Journal of Medicine*, 353(13), 1350-1362.
- Nigro, G., Anceschi, M. M., Cosmi, E. V., Congenital Cytomegalic Disease Collaborating Group, & collaborators. (2003). Clinical manifestations and abnormal laboratory findings in pregnant women with primary cytomegalovirus infection. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 110(6), 572-577.
- Paixão, P., Almeida, S., Gouveia, P., Binda, S., Caroppo, S., & Barbi, M. (2005). Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in urine pools. *Journal of virological methods*, 128(1-2), 1-5.
- Paixão, P., Almeida, S., Gouveia, P., Vilarinho, L., & Osório, R. V. (2009). Prevalence of human cytomegalovirus congenital infection in Portuguese newborns. *Eurosurveillance*, 14(9), 19135.
- Paixão, P., Almeida, S., Videira, P. A., Ligeiro, D., & Marques, T. (2012). Screening of congenital cytomegalovirus infection by real-time PCR in urine pools. *European journal of pediatrics*, 171(1), 125-129.
- Pass, R. F., Duliege, A. M., Boppana, S., Sekulovich, R., Percell, S., Britt, W., & Burke, R. L. (1999). A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant. *The Journal of infectious diseases*, 180(4), 970-975.
- Pass, R. F., Fowler, K. B., Boppana, S. B., Britt, W. J., & Stagno, S. (2006). Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *Journal of Clinical Virology*, 35(2), 216-220.
- Pass, R. F., Zhang, C., Evans, A., Simpson, T., Andrews, W., Huang, M. L. & Cloud, G. (2009). Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *New England Journal of Medicine*, 360(12), 1191-1199.

- Pasternak, B., & Hviid, A. (2010). Use of acyclovir, valacyclovir, and famciclovir in the first trimester of pregnancy and the risk of birth defects. *Jama*, 304(8), 859-866.
- Picone, O., Costa, J. M., Leruez-Ville, M., Ernault, P., Olivi, M., & Ville, Y. (2004). Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotype and CMV DNA load in the amniotic fluid of infected fetuses. *Prenatal Diagnosis: Published in Affiliation With the International Society for Prenatal Diagnosis*, 24(12), 1001-1006.
- Picone, O., Simon, I., Benachi, A., Brunelle, F., & Sonigo, P. (2008). Comparison between ultrasound and magnetic resonance imaging in assessment of fetal cytomegalovirus infection. *Prenatal diagnosis*, 28(8), 753-758.
- Picone, O., Teissier, N., Cordier, A. G., Vauloup-Fellous, C., Adle-Biassette, H., Martinovic, J. & Benachi, A. (2014). Detailed in utero ultrasound description of 30 cases of congenital cytomegalovirus infection. *Prenatal diagnosis*, 34(6), 518-524.
- Pignatelli, S., Monte, P. D., Rossini, G., & Landini, M. P. (2004). Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Reviews in medical virology*, 14(6), 383-410.
- Plotkin, S. A., Farquhar, J., & Hornberger, E. (1976). Clinical trials of immunization with the Towne 125 strain of human cytomegalovirus. *Journal of Infectious Diseases*, 134(5), 470-475.
- Ratanajamit, C., Skriver, M. V., Jepsen, P., Chongsuvivatwong, V., Olsen, J., & Sørensen, H. T. (2003). Adverse pregnancy outcome in women exposed to acyclovir during pregnancy: a population-based observational study. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 35(4), 255-259.
- Rawlinson, W. D., Boppana, S. B., Fowler, K. B., Kimberlin, D. W., Lazzarotto, T., Alain, S. & Greenlee, J. (2017). Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(6), e177-e188.
- Razonable, R. R., Paya, C. V., & Smith, T. F. (2002). Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *Journal of clinical microbiology*, 40(3), 746-752.
- Revello, M. G., & Gerna, G. (2002). Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clinical microbiology reviews*, 15(4), 680-715.
- Revello, M. G., & Gerna, G. (2004). Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Virology*, 29(2), 71-83.

- Revello, M. G., Furione, M., Zavattoni, M., Tassis, B., Nicolini, U., Fabbri, E., & Gerna, G. (2008). Human cytomegalovirus (HCMV) DNAemia in the mother at amniocentesis as a risk factor for iatrogenic HCMV infection of the fetus. *The Journal of infectious diseases*, 197(4), 593-596.
- Revello, M. G., Sarasini, A., Zavattoni, M., Baldanti, F., & Gerna, G. (1998). Improved prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection by a modified nested polymerase chain reaction. *Journal of medical virology*, 56(1), 99-103.
- Revello, M. G., Zavattoni, M., Furione, M., Baldanti, F., & Gerna, G. (1999). Quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid of mothers of congenitally infected fetuses. *Journal of clinical microbiology*, 37(10), 3350-3352.
- Revello, M. G., Lazzarotto, T., Guerra, B., Spinillo, A., Ferrazzi, E., Kustermann, A. & Arossa, A. (2014). A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus. *New England Journal of Medicine*, 370(14), 1316-1326.
- Ross, S. A., & Boppana, S. B. (2005). Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis. In *Seminars in pediatric infectious diseases* (Vol. 16, No. 1, pp. 44-49).
- Ross, S. A., Ahmed, A., Palmer, A. L., Michaels, M. G., Sánchez, P. J., Bernstein, D. I., & Boppana, S. B. (2014). Detection of congenital cytomegalovirus infection by real-time polymerase chain reaction analysis of saliva or urine specimens. *The Journal of infectious diseases*, 210(9), 1415-1418.
- Ross, S. A., Ahmed, A., Palmer, A. L., Michaels, M. G., Sánchez, P. J., Stewart, A. & Boppana, S. B. (2015). Urine collection method for the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *The Pediatric infectious disease journal*, 34(8), 903.
- Saldan, A., Forner, G., Mengoli, C., Gussetti, N., Palù, G., & Abate, D. (2017). Testing for cytomegalovirus in pregnancy. *Journal of clinical microbiology*, 55(3), 693-702.
- Scanga, L., Chaing, S., Powell, C., Aylsworth, A. S., Harrell, L. J., Henshaw, N. G. & Gulley, M. L. (2006). Diagnosis of human congenital cytomegalovirus infection by amplification of viral DNA from dried blood spots on perinatal cards. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 8(2), 240-245.
- Schleiss, M. R., & McVoy, M. A. (2004). Overview of congenitally and perinatally acquired cytomegalovirus infections: recent advances in antiviral therapy. *Expert review of anti-infective therapy*, 2(3), 389-403.

- Schleiss, M. R., Berka, U., Watson, E., Aistleithner, M., Kiefmann, B., Mangeat, B. & Zabeli, J. C. (2017). Additive protection against congenital cytomegalovirus conferred by combined glycoprotein B/pp65 vaccination using a lymphocytic choriomeningitis virus vector. *Clin. Vaccine Immunol.*, 24(1), e00300-16.
- Sijmons, S., Thys, K., Ngwese, M. M., Van Damme, E., Dvorak, J., Van Loock, M. & Van Ranst, M. (2015). High-throughput analysis of human cytomegalovirus genome diversity highlights the widespread occurrence of gene-disrupting mutations and pervasive recombination. *Journal of virology*, 89(15), 7673-7695.
- Silva, J., Fernandes, C., Marques, A., Maria, A.T., Correia, C., Tuna, M., Chasqueira M. J., Paixão P. (2020). Evaluation of saliva pools method for detection of congenital Human Cytomegalovirus infection. *Journal of Virologic Methods*.
- Sinclair, J., & Sissons, P. (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology*, 87(7), 1763-1779.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A. S., & Jahn, G. (1995). Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *Journal of General Virology*, 76(4), 741-750.
- Spong, C. Y., & Thom, E. (2012). A randomized trial to prevent congenital cytomegalovirus (CMV). NIH Clinical trials. (Clinicaltrials.gov Identifier NCT01376778) [<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01376778>, acedido a 4 de Março 2019]
- Stagno, S., Pass, R. F., Dworsky, M. E., & Alford, C. A. (1982). Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. *Clinical obstetrics and gynecology*, 25(3), 563-576.
- Stone, K. M., Reiff-Eldridge, R., White, A. D., Cordero, J. F., Brown, Z., Alexander, E. R., & Andrews, E. B. (2004). Pregnancy outcomes following systemic prenatal acyclovir exposure: conclusions from the international acyclovir pregnancy registry, 1984–1999. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 70(4), 201-207.
- Tavares, E. C., Ribeiro, J. G., & Oliveira, L. A. (2005). Imunização ativa e passiva no prematuro extremo. *J Pediatr (Rio J)*, 81(1 Supl), S89-94.
- Tavares, M. V., Domingues, A. P., Tavares, M., Malheiro, E., Tavares, F., & Moura, P. (2011). Citomegalovirus existe lugar para o rastreio durante a gravidez. *Acta Med Port*, 24(supl 4), 1003-8.

Taylor, G. H. (2003). Cytomegalovirus. *American Family Physician*, 67(3), 519-524.

Tomtishen III, J. P. (2012). Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology journal*, 9(1), 22.

U.S. Food and Drug Administration. (2017). Ganciclovir Injection Prescribing Information. Reference ID: 4057706 [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209347lbl.pdf], acedido a 15 de Abril de 2019]

U.S. Food and Drug Administration. (2017). Valganciclovir Prescribing Information. Reference ID: 4115064 [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/021304s012,022257s007lbl.pdf], acedido a 15 de Abril de 2019]

van Zuylen, W. J., Hamilton, S. T., Naing, Z., Hall, B., Shand, A., & Rawlinson, W. D. (2014). Congenital cytomegalovirus infection: Clinical presentation, epidemiology, diagnosis and prevention. *Obstetric medicine*, 7(4), 140-146.

Vauloup-Fellous, C., Picone, O., Cordier, A. G., Parent-du-Châtelet, I., Senat, M. V., Frydman, R., & Grangeot-Keros, L. (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*, 46, S49-S53.

von Gartzen, A., & Martin, C. J. H. (2013). An email survey of midwives knowledge about CytoMegalovirus (CMV) in Hannover and a skeletal framework for a proposed teaching program. *Nurse education in practice*, 13(5), 481-486.

Vonglahn, W. C., & Pappenheimer, A. M. (1925). Intranuclear Inclusions in Visceral Disease. *The American journal of pathology*, 1(5), 445-466.3.

Walker, S. P., Palma-Dias, R., Wood, E. M., Shekleton, P., & Giles, M. L. (2013). Cytomegalovirus in pregnancy: to screen or not to screen. *BMC pregnancy and childbirth*, 13(1), 96.

Waters, A., Jennings, K., Fitzpatrick, E., Coughlan, S., Molloy, E. J., De Gascun, C. F. & Knowles, S. J. (2014). Incidence of congenital cytomegalovirus infection in Ireland: implications for screening and diagnosis. *Journal of Clinical Virology*, 59(3), 156-160.

- Weller, T. H., Macauley, J. C., Craig, J. M., & Wirth, P. (1957). Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 94(1), 4-12.
- Whitley, R. J. (2012). The use of antiviral drugs during the neonatal period. *Clinics in perinatology*, 39(1), 69-81.
- Williams, E. J., Gray, J., Luck, S., Atkinson, C., Embleton, N. D., Kadambari, S. & Clark, J. E. (2015). First estimates of the potential cost and cost saving of protecting childhood hearing from damage caused by congenital CMV infection. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 100(6), F501-F506.
- Wirgart, B. Z., Claesson, K., Eriksson, B. M., Brundin, M., Tufveson, G., Tötterman, T., & Grillner, L. (1996). Cytomegalovirus (CMV) DNA amplification from plasma compared with CMV pp65 antigen (ppUL83) detection in leukocytes for early diagnosis of symptomatic CMV infection in kidney transplant patients. *Clinical and diagnostic virology*, 7(2), 99-110.
- Wyatt, J. P., Saxton, J., Lee, R. S., & Pinkerton, H. (1950). Generalized cytomegalic inclusion disease. *Journal of Pediatrics*, 36(3), 271-94.
- Yamamoto, A. Y., Mussi-Pinhata, M. M., Marin, L. J., Brito, R. M., Oliveira, P. F. C., & Coelho, T. B. (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), 228-230.
- Yan, S. S., & Fedorko, D. P. (2002). Recent advances in laboratory diagnosis of human cytomegalovirus infection. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 2(3), 155-167.

VI Anexos

Anexo I – Autorização da Comissão de Ética da Faculdade de Ciências Médicas | *Nova Medical School* (CEFCM) para a realização do estudo



Decisão final sobre o projecto " Rastreo da infeção congénita por CMV recorrendo a pools de saliva "

A Comissão de Ética da NMS|FCM-UNL (CEFCM) decidiu, por unanimidade, aprovar, do ponto de vista ético, o projecto de investigação intitulado " *Rastreo da infeção congénita por CMV recorrendo a pools de saliva*"(nº18/2019/CEFCM), submetido por Prof. Doutor Paulo Paixão.

Lisboa, 26 de Julho de 2019

O Presidente da Comissão de Ética,

(Prof. Doutor Diogo Pais)

TO WHOM IT MAY CONCERN

The Ethics Research Committee NMS|FCM-UNL (CEFCM) has unanimously, approved the Project entitled " *Rastreo da infeção congénita por CMV recorrendo a pools de saliva* " (nr.18/2019/CEFCM), submitted by Paulo Paixão, MD, PhD.

Lisbon, July 26th, 2019

The Chairman of the Ethics Research Committee,

(Diogo Pais, MD, PhD)

Anexo II – Autorização da Comissão de Ética do Hospital CUF Descobertas para a realização do estudo



PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA DO HOSPITAL CUF DESCOBERTAS

A Comissão de Ética do Hospital Cuf Descobertas analisou o pedido para a realização do estudo prospetivo “Infeção congénita CMV-rastreio universal por PCR na saliva” a decorrer no Serviço de Neonatologia do Hospital Cuf Descobertas, sob a responsabilidade da Dra Mónica Braz, e nada tem a opor à realização do mesmo.

Lisboa, 11, de Março, de 2019

A Presidente da Comissão de Ética,

(Maria Teresa Aires Pereira)



Hospital CUF Descobertas, S.A.
Morada: Parque das Nações - Rua Mário Botas • 1998-018 Lisboa
Tel.: 21 00 25 200 • Fax: 21 00 25 220 • www.cufdescobertas.pt
Sede: Av. do Forte, n.º 3 - Edif. Suécia III, Piso 2 • 2790-073 Carnaxide
Capital Social 5.850.000 € • NIPC e Matricula na C. R. C. de Cascais nº 504 872 982

uma unidade da:



JOSÉ DE MELLO-SAÚDE

Anexo III – Autorização da Comissão de Ética do Hospital de Vila Franca de Xira para a realização do estudo



PARECER

PARA: PRESIDENTE DA COMISSÃO EXECUTIVA
C/C: DIRECTOR CLÍNICO
DE: PRESIDENTE DA CES
ASSUNTO: PARECER SOBRE UM ESTUDO INTITULADO “ESTUDO DE INFEÇÃO CONGÉNITA A CMV – RASTREIO UNIVERASLA POR PCR NA SALIVA”
DATA: 2018-08-24

1. A CES recebeu um pedido de parecer sobre um projeto de estudo, intitulado “Estudo de infeção congénita a CMV – rastreio universal por PCR na saliva” para decorrer no Serviço de Pediatria;
2. O investigador principal é o Prof Dr Paulo Jorge Cruz Paixão da Nova Medical School/Faculdade Nova de Lisboa e no Hospital de Vila Franca de Xira o Dr David Mourão Marques Lito do Serviço de Pediatria. As amostras serão processadas no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa;
3. Tem como objetivo principal verificar se a colheita de amostras de PCR para Citomegalovirus (CMV) na saliva com posterior utilização laboratorial de *pools* de saliva é uma abordagem prática e que pode ser implementada em hospitais com grande número de nascimentos, como rastreio universal;
4. A colheita universal de amostras de saliva decorrerá entre Setembro de 2018 e Maio de 2019 (ou até se atingirem cerca de 2000 amostras) a todos os recém nascidos das maternidades do Hospital da CUF Descobertas e do Hospital de Vila Franca de Xira;
5. O estudo não acarreta quaisquer riscos para o recém nascido e não tem custos para os pais;
6. Todos os pais/responsáveis serão devidamente informados acerca do âmbito do estudo, dos benefícios na participação e darão o seu consentimento por escrito.
7. Os dados recolhidos terão que ser anonimizados;
8. A colheita da amostra de saliva e ou urina apenas poderá ser usada para este fim;
9. O estudo tem a concordância do responsável do Serviço de Pediatria;

A CES reunida no dia 24/08/2018, após avaliação do projeto de estudo, decide dar parecer favorável, uma vez que estão assegurados os princípios éticos.

Vila Franca de Xira, 24-08-2018

A Presidente da CES

Filomena Esteves

Anexo IV – Consentimento Informado entregue a todos os pais de recém-nascidos participantes no estudo



CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Estudo de infeção congénita CMV – rastreio universal por PCR na saliva

O citomegalovírus humano é o agente mais comum de infeção congénita, atingindo cerca de 1% de recém-nascidos em todo o mundo. Aproximadamente 13% destas crianças nascerão com sintomas, mas a sua grande maioria não, pelo que é importante realizar rastreio dos recém-nascidos para conhecimento desta infeção, visto que pode ser oferecido tratamento para prevenção de sequelas neurológicas e de outras complicações, como a surdez.

O método de referência para o diagnóstico desta infeção é a urina, mas esta tem vindo a ser substituída pela saliva, pela sua facilidade de colheita e pelo facto de ter uma sensibilidade equivalente à da urina. Este estudo pretende verificar se a colheita de amostras de saliva é uma abordagem prática e que pode ser implementada em hospitais com grande número de nascimentos.

Entre Setembro de 2018 e Agosto de 2019 irá ser realizado um estudo de investigação sobre a infeção congénita a CMV, através de uma colheita de zaragatoa na cavidade oral. Este procedimento não terá qualquer risco para o seu filho recém-nascido. O produto será enviado para laboratório. Este exame não tem custos adicionais. Os resultados positivos serão comunicados e confirmados por análise de urina. Esta investigação tem a aprovação da comissão de ética dos hospitais envolvidos.

Pela equipa de investigação,

Declaro ter lido e compreendido este documento, bem como as informações verbais que me foram fornecidas. Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste estudo sem qualquer tipo de consequências. Desta forma, aceito participar e permito a utilização dos dados que forneço, de forma voluntária, assim como consulta do processo clínico, confiando em que apenas serão utilizados para esta investigação e nas garantias de confidencialidade e anonimato que me são dadas pelo/a investigador/a e pela regulamentação geral de proteção de dados.

Nome: _____

Grau de parentesco (quando aplicável) _____

Assinatura: _____

Data: _____

Anexo V – Termo de Responsabilidade

Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa, SA

Rua Cupertino de Miranda, nº 9 Lt 8, Polo Tecnológico de Lisboa
1600-513 Lisboa

Tel. 213561066

Fax. 213157701



Data: 2018 / 10 / 19

Termo de Responsabilidade

Ao Laboratório **FACULDADE CIÊNCIAS MÉDICAS**, requisita-se a determinação dos parâmetros indicados.

Nº Amostra: HV90685	Nome: CMV 1	Idade: Recém nasc Feminino
Produto: Saliva		
Tempo: 0min.		
--- FCM - Rastreio CMV - Estudo na saliva		

**Anexo VI – Resultados do rastreio realizado a 1492 recém-nascidos nos Hospitais portugueses
CUF Descobertas e Vila Franca de Xira**

Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual
CMV1	1	Negativo	Neg.	CMV35	5	Negativo	Neg.	CMV61	9	Negativo	Neg.
CMV2			Neg.	CMV1A			Neg.	CMV16A			Neg.
CMV3			Neg.	CMV2A			Neg.	CMV17A			Neg.
CMV4			Neg.	CMV3A			Neg.	CMV19A			Neg.
CMV5			Neg.	CMV4A			Neg.	CMV62			Neg.
CMV6			Neg.	CMV5A			Neg.	CMV63			Neg.
CMV7			Neg.	CMV6A			Neg.	CMV64			Neg.
CMV8			Neg.	CMV7A			Neg.	CMV22A			Neg.
CMV9			Neg.	CMV8A			Neg.	CMV65			Neg.
CMV10			Neg.	CMV40			Neg.	CMV66			Neg.
CMV11	2	Negativo	Neg.	CMV41	6	Negativo	Neg.	CMV67	10	Negativo	Neg.
CMV12			Neg.	CMV42			Neg.	CMV68			Neg.
CMV13			Neg.	CMV43			Neg.	CMV23A			Neg.
CMV14			Neg.	CMV44			Neg.	CMV24A			Neg.
CMV15			Neg.	CMV45			Neg.	CMV25A			Neg.
CMV16			Neg.	CMV46			Neg.	CMV26A			Neg.
CMV17			Neg.	CMV47			Neg.	CMV27A			Neg.
CMV18			Neg.	CMV50			Neg.	CMV28A			Neg.
CMV20			Neg.	CMV49			Neg.	CMV69			Neg.
CMV21			Neg.	CMV48			Neg.	CMV70			Neg.
CMV22	3	Negativo	Neg.	CMV21A	7	Positivo	Pos.	CMV71	11	Negativo	Neg.
CMV23			Neg.	CMV9A			Neg.	CMV72			Neg.
CMV24			Neg.	CMV10A			Neg.	CMV73			Neg.
CMV25			Neg.	CMV11A			Neg.	CMV74			Neg.
CMV19			Neg.	CMV12A			Pos.	CMV75			Neg.
CMV26			Neg.	CMV20A			Neg.	CMV77			Neg.
CMV27			Neg.	CMV13A			Neg.	CMV78			Neg.
CMV28			Neg.	CMV14A			Neg.	CMV76			Neg.
ÁGUA			Neg.	CMV15A			Neg.	CMV31A			Neg.
ÁGUA			Neg.	CMV18A			Neg.	CMV32A			Neg.
CMV29	4	Negativo	Neg.	CMV51	8	Negativo	Neg.	CMV29A	12	Negativo	Neg.
CMV30			Neg.	CMV52			Neg.	CMV30A			Neg.
CMV31			Neg.	CMV53			Neg.	CMV33A			Neg.
CMV32			Neg.	CMV54			Neg.	CMV34A			Neg.
CMV33			Neg.	CMV55			Neg.	CMV35A			Neg.
CMV34			Neg.	CMV56			Neg.	CMV36A			Neg.
CMV36			Neg.	CMV57			Neg.	CMV37A			Neg.
CMV37			Neg.	CMV58			Neg.	CMV38A			Neg.
CMV38			Neg.	CMV59			Neg.	CMV39A			Neg.
CMV39			Neg.	CMV60			Neg.	CMV40A			Neg.

Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual
CMV41A	13	Positivo	Neg.	CMV59A	17	Negativo	Neg.	CMV109	21	Positivo	Neg.
CMV42A			Neg.	CMV60A			Neg.	CMV110			Neg.
CMV43A			Neg.	CMV61A			Neg.	CMV111			Neg.
CMV79			Neg.	CMV62A			Neg.	CMV112			Neg.
CMV80			Neg.	CMV65A			Neg.	CMV105			Neg.
CMV81			Neg.	CMV67A			Neg.	CMV113			Neg.
CMV82			Pos.	CMV69A			Neg.	CMV94A			Neg.
CMV86			Neg.	CMV71A			Neg.	CMV96A			Neg.
CMV83			Neg.	CMV96			Neg.	CMV102A			Neg.
CMV84			Neg.	CMV72A			Neg.	CMV103A			Pos.
CMV85			14	Negativo			Neg.	CMV73A			18
CMV44A	Neg.	CMV74A			Neg.	CMV93A	Neg.				
CMV45A	Neg.	CMV75A			Neg.	CMV95A	Neg.				
CMV46A	Neg.	CMV76A			Neg.	CMV97A	Neg.				
CMV47A	Neg.	CMV97			Neg.	CMV98A	Neg.				
CMV48A	Neg.	CMV98			Neg.	CMV99A	Neg.				
CMV49A	Neg.	CMV99			Neg.	CMV100A	Neg.				
CMV50A	Neg.	CMV100			Neg.	CMV101A	Neg.				
CMV51A	Neg.	CMV101			Neg.	CMV114	Neg.				
CMV52A	Neg.	CMV102			Neg.	CMV115	Neg.				
CMV87	15	Positivo	Neg.	CMV103	19	Negativo	Neg.	CMV116	23	Negativo	Neg.
CMV88			Neg.	CMV77A			Neg.	CMV117			Neg.
CMV89			Neg.	CMV78A			Neg.	CMV118			Neg.
CMV90			Neg.	CMV79A			Neg.	CMV105A			Neg.
CMV91			Neg.	CMV80A			Neg.	CMV106A			Neg.
CMV54A			Neg.	CMV81A			Neg.	CMV107A			Neg.
CMV55A			Neg.	CMV82A			Neg.	CMV108A			Neg.
CMV56A			Neg.	CMV83A			Neg.	CMV109A			Neg.
CMV57A			Pos.	CMV104			Neg.	CMV110A			Neg.
CMV58A			Pos.	CMV90A			Neg.	CMV111A			Neg.
CMV53A	16	Negativo	Neg.	CMV84A	20	Negativo	Neg.	CMV112A	24	Negativo	Neg.
CMV92			Neg.	CMV85A			Neg.	CMV113A			Neg.
CMV93			Neg.	CMV86A			Neg.	CMV114A			Neg.
CMV94			Neg.	CMV87A			Neg.	CMV115A			Neg.
CMV95			Neg.	CMV88A			Neg.	CMV119			Neg.
CMV63A			Neg.	CMV89A			Neg.	CMV120			Neg.
CMV66A			Neg.	CMV91A			Neg.	CMV121			Neg.
CMV64A			Neg.	CMV106			Neg.	CMV122			Neg.
CMV68A			Neg.	CMV107			Neg.	CMV123			Neg.
CMV70A			Neg.	CMV108			Neg.	CMV121A			Neg.

Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual
CMV138	25	Negativo	Neg.	CMV127A	29	Negativo	Neg.	CMV153A	33	Negativo	Neg.
CMV139			Neg.	CMV130A			Neg.	CMV168			Neg.
CMV130			Neg.	CMV133A			Neg.	CMV169			Neg.
CMV136			Neg.	CMV134A			Neg.	CMV170			Neg.
CMV137			Neg.	CMV136A			Neg.	CMV171			Neg.
CMV140			Neg.	CMV138A			Neg.	CMV172			Neg.
CMV131			Neg.	CMV141A			Neg.	CMV156A			Neg.
CMV132			Neg.	CMV128A			Neg.	CMV158A			Neg.
CMV117A			Neg.	CMV131A			Neg.	CMV159A			Neg.
CMV118A			Neg.	CMV132A			Neg.	CMV162A			Neg.
CMV119A	26	Negativo	Neg.	CMV135A	30	Negativo	Neg.	CMV155A	34	Negativo	Neg.
CMV120A			Neg.	CMV137A			Neg.	CMV157A			Neg.
CMV122A			Neg.	CMV139A			Neg.	CMV160A			Neg.
CMV123A			Neg.	CMV153			Neg.	CMV161A			Neg.
CMV124A			Neg.	CMV154			Neg.	CMV173			Neg.
CMV124A			Neg.	CMV155			Neg.	CMV174			Neg.
CMV125			Neg.	CMV156			Neg.	CMV163A			Neg.
CMV126			Neg.	CMV157			Neg.	CMV164A			Neg.
CMV127			Neg.	CMV158			Neg.	CMV165A			Neg.
CMV128			Neg.	CMV159			Neg.	CMV167A			Neg.
CMV129	27	Negativo	Neg.	CMV160	31	Negativo	Neg.	CMV168A	35	Negativo	Neg.
CMV133			Neg.	CMV142A			Neg.	CMV175			Neg.
CMV134			Neg.	CMV143A			Neg.	CMV176			Neg.
CMV135			Neg.	CMV161			Neg.	CMV177			Neg.
CMV125A			Neg.	CMV162			Neg.	CMV178			Neg.
CMV141			Neg.	CMV163			Neg.	CMV179			Neg.
CMV142			Neg.	CMV164			Neg.	CMV180			Neg.
CMV143			Neg.	CMV165			Neg.	CMV169A			Neg.
CMV144			Neg.	CMV166			Neg.	CMV170A			Neg.
CMV145			Neg.	CMV167			Neg.	CMV171A			Neg.
CMV146	28	Negativo	Neg.	CMV144A	32	Negativo	Neg.	CMV172A	36	Negativo	Neg.
CMV147			Neg.	CMV145A			Neg.	CMV173A			Neg.
CMV148			Neg.	CMV146A			Neg.	CMV174A			Neg.
CMV149			Neg.	CMV147A			Neg.	CMV175A			Neg.
CMV150			Neg.	CMV148A			Neg.	CMV176A			Neg.
CMV151			Neg.	CMV149A			Neg.	CMV177A			Neg.
CMV152			Neg.	CMV150A			Neg.	CMV178A			Neg.
CMV129A			Neg.	CMV151A			Neg.	CMV181			Neg.
CMV140A			Neg.	CMV152A			Neg.	CMV182			Neg.
CMV126A			Neg.	CMV154A			Neg.	CMV183			Neg.

Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual
CMV179A	37	Negativo	Neg.	CMV200	41	Negativo	Neg.	CMV227A	45	Negativo	Neg.
CMV184			Neg.	CMV203			Neg.	CMV228A			Neg.
CMV185			Neg.	CMV205A			Neg.	CMV229A			Neg.
CMV186			Neg.	CMV208A			Neg.	CMV217			Neg.
CMV187			Neg.	CMV206A			Neg.	CMV218			Neg.
CMV180A			Neg.	CMV207A			Neg.	CMV219			Neg.
CMV181A			Neg.	CMV198			Neg.	CMV220			Neg.
CMV182A			Neg.	CMV201			Neg.	CMV222			Neg.
CMV183A			Neg.	CMV202			Neg.	CMV223			Neg.
CMV184A			Neg.	CMV204			Neg.	CMV224A			Neg.
CMV185A			38	Negativo			Neg.	CMV205			42
CMV186A	Neg.	CMV206			Neg.	CMV234A	Neg.				
CMV188	Neg.	CMV207			Neg.	CMV235A	Neg.				
CMV189	Neg.	CMV208			Neg.	CMV238A	Neg.				
CMV190	Neg.	CMV209			Neg.	CMV240A	Neg.				
CMV187A	Neg.	CMV210			Neg.	CMV242A	Neg.				
CMV188A	Neg.	CMV212			Neg.	CMV243A	Neg.				
CMV189A	Neg.	CMV214			Neg.	CMV236A	Neg.				
CMV190A	Neg.	CMV215			Neg.	CMV237A	Neg.				
CMV191A	Neg.	CMV213			Neg.	CMV230A	Neg.				
CMV192A	39	Negativo	Neg.	CMV211A	43	Negativo	Pos.	CMV231A	47	Negativo	Neg.
CMV193A			Neg.	CMV212A			Neg.	CMV239A			Neg.
CMV194A			Neg.	CMV213A			Neg.	CMV241A			Neg.
CMV195A			Neg.	CMV216A			Neg.	CMV224			Neg.
CMV196A			Neg.	CMV219A			Neg.	CMV225			Neg.
CMV197A			Neg.	CMV209A			Neg.	CMV226			Neg.
CMV191			Neg.	CMV244A			Neg.	CMV227			Neg.
CMV192			Neg.	CMV214A			Neg.	CMV228			Neg.
CMV193			Neg.	CMV215A			Neg.	CMV229			Neg.
CMV194			Neg.	CMV217A			Neg.	CMV230			Neg.
CMV195	40	Negativo	Neg.	CMV218A	44	Negativo	Neg.	CMV245A	48	Negativo	Neg.
CMV196			Neg.	CMV204A			Neg.	CMV231			Neg.
CMV197			Neg.	CMV220A			Neg.	CMV246A			Neg.
CMV198A			Neg.	CMV226A			Neg.	CMV247A			Neg.
CMV199A			Neg.	CMV221			Neg.	CMV248A			Neg.
CMV200A			Neg.	CMV221A			Neg.	CMV249A			Neg.
CMV201A			Neg.	CMV222A			Neg.	CMV250A			Neg.
CMV202A			Neg.	CMV223A			Neg.	CMV251A			Neg.
CMV203A			Neg.	CMV232A			Neg.	CMV252A			Neg.
CMV199			Neg.	CMV225A			Neg.	CMV253A			Neg.

Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual
CMV254A	49	Negativo	Neg.	CMV272A	53	Negativo	Neg.	CMV302A	57	Positivo	Neg.
CMV255A			Neg.	CMV273A			Neg.	CMV305A			Pos.
CMV256A			Neg.	CMV274A			Neg.	CMV306A			Neg.
CMV257A			Neg.	CMV255			Neg.	CMV307A			Pos.
CMV258A			Neg.	CMV256			Neg.	CMV308A			Neg.
CMV259A			Neg.	CMV257			Neg.	CMV309A			Neg.
CMV260A			Neg.	CMV258			Neg.	CMV310A			Neg.
CMV261A			Neg.	CMV259			Neg.	CMV311A			Neg.
CMV263A			Neg.	CMV260			Neg.	CMV312A			Neg.
CMV265A			Neg.	CMV254			Neg.	CMV274			Neg.
CMV262A	50	Negativo	Neg.	CMV276A	54	Negativo	Neg.	CMV265	58	Negativo	Neg.
CMV264A			Neg.	CMV277A			Neg.	CMV266			Neg.
CMV266A			Neg.	CMV278A			Neg.	CMV267			Neg.
CMV234			Neg.	CMV279A			Neg.	CMV268			Neg.
CMV235			Neg.	CMV280A			Neg.	CMV269			Neg.
CMV236			Neg.	CMV281A			Neg.	CMV270			Neg.
CMV237			Neg.	CMV282A			Neg.	CMV271			Neg.
CMV238			Neg.	CMV283A			Neg.	CMV272			Neg.
CMV239			Neg.	CMV284A			Neg.	CMV273			Neg.
CMV240			Neg.	CMV287A			Neg.	CMV296A			Neg.
CMV241	51	Positivo	Neg.	CMV285A	55	Negativo	Pos.	CMV303A	59	Negativo	Neg.
CMV248			Neg.	CMV286A			Neg.	CMV313A			Neg.
CMV250			Neg.	CMV261			Neg.	CMV314A			Neg.
CMV251			Neg.	CMV262			Neg.	CMV315A			Neg.
CMV252			Neg.	CMV263			Neg.	CMV316A			Neg.
CMV253			Pos.	CMV264			Neg.	CMV317A			Neg.
CMV242			Neg.	CMV288A			Neg.	CMV318A			Neg.
CMV247			Neg.	CMV289A			Neg.	CMV275			Neg.
CMV246			Neg.	CMV290			Neg.	CMV276			Neg.
CMV244			Neg.	CMV291A			Neg.	CMV277			Neg.
CMV245	52	Negativo	Neg.	CMV292A	56	Negativo	Neg.	CMV278	60	Negativo	Neg.
CMV243			Neg.	CMV293A			Neg.	CMV279			Neg.
CMV232			Neg.	CMV294A			Neg.	CMV280			Neg.
CMV233			Neg.	CMV295A			Neg.	CMV281			Neg.
CMV267A			Neg.	CMV297A			Neg.	CMV282			Neg.
CMV268A			Neg.	CMV298A			Neg.	CMV283			Neg.
CMV269A			Neg.	CMV299A			Neg.	CMV284			Neg.
CMV270A			Neg.	CMV300A			Neg.	CMV285			Neg.
CMV271A			Neg.	CMV301A			Neg.	CMV286			Neg.
CMV275A			Neg.	CMV304A			Neg.	CMV319A			Neg.

Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual
CMV320A	61	Negativo	Neg.	CMV336A	65	Negativo	Neg.	CMV361A	69	Negativo	Neg.
CMV321A			Neg.	CMV337A			Neg.	CMV362A			Neg.
CMV322A			Neg.	CMV311			Neg.	CMV335			Neg.
CMV323A			Neg.	CMV312			Neg.	CMV328			Neg.
CMV324A			Neg.	CMV313			Neg.	CMV329			Neg.
CMV325A			Neg.	CMV316			Neg.	CMV330			Neg.
CMV326A			Neg.	CMV317			Neg.	CMV331			Neg.
CMV287			Neg.	CMV318			Neg.	CMV332			Neg.
CMV288			Neg.	CMV319			Neg.	CMV333			Neg.
CMV289			Neg.	CMV320			Neg.	CMV334			Neg.
CMV290			62	Negativo			Neg.	CMV321			66
CMV291	Neg.	CMV322			Neg.	CMV364A	Neg.				
CMV292	Neg.	CMV338A			Neg.	CMV365A	Neg.				
CMV293	Neg.	CMV339A			Neg.	CMV366A	Neg.				
CMV294	Neg.	CMV340A			Neg.	CMV367A	Neg.				
CMV295	Neg.	CMV341A			Neg.	CMV368A	Neg.				
CMV296	Neg.	CMV342A			Neg.	CMV369A	Neg.				
CMV297	Neg.	CMV343A			Neg.	CMV370A	Neg.				
CMV298	Neg.	CMV344A			Neg.	CMV371A	Neg.				
CMV299	Neg.	CMV345A			Neg.	CMV372A	Neg.				
CMV300	63	Negativo	Neg.	CMV346A	67	Negativo	Pos.	CMV373A	71	Negativo	Neg.
CMV301			Neg.	CMV347A			Neg.	CMV374A			Neg.
CMV302			Neg.	CMV348A			Neg.	CMV375A			Neg.
CMV303			Neg.	CMV349A			Neg.	CMV376A			Neg.
CMV304			Neg.	CMV350A			Neg.	CMV377A			Neg.
CMV305			Neg.	CMV351A			Neg.	CMV378A			Neg.
CMV306			Neg.	CMV352A			Neg.	CMV379A			Neg.
CMV307			Neg.	CMV353A			Neg.	CMV380A			Neg.
CMV308			Neg.	CMV354A			Neg.	CMV381A			Neg.
CMV309			Neg.	CMV323			Neg.	CMV382A			Neg.
CMV310	64	Negativo	Neg.	CMV324	68	Negativo	Neg.	CMV383A	72	Negativo	Neg.
CMV327A			Neg.	CMV325			Neg.	CMV384A			Neg.
CMV328A			Neg.	CMV326			Neg.	CMV385A			Neg.
CMV329A			Neg.	CMV327			Neg.	CMV386A			Neg.
CMV330A			Neg.	CMV355A			Neg.	CMV336			Neg.
CMV331A			Neg.	CMV356A			Neg.	CMV337			Neg.
CMV332A			Neg.	CMV357A			Neg.	CMV338			Neg.
CMV333A			Neg.	CMV358A			Neg.	CMV339			Neg.
CMV334A			Neg.	CMV359A			Neg.	CMV340			Neg.
CMV335A			Neg.	CMV360A			Neg.	CMV341			Neg.

Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual
CMV342	73	Negativo	Neg.	CMV411A	77	Negativo	Neg.	CMV385	81	Negativo	Neg.
CMV343			Neg.	CMV412A			Neg.	CMV386			Neg.
CMV344			Neg.	CMV413A			Neg.	CMV387			Neg.
CMV345			Neg.	CMV358			Neg.	CMV388			Neg.
CMV387A			Neg.	CMV359			Neg.	CMV390			Neg.
CMV388A			Neg.	CMV360			Neg.	CMV391			Neg.
CMV389A			Neg.	CMV361			Neg.	CMV392			Neg.
CMV390A			Neg.	CMV362			Neg.	CMV423A			Neg.
CMV391A			Neg.	CMV414A			Neg.	CMV424A			Neg.
CMV392A			Neg.	CMV419A			Neg.	CMV425A			Neg.
CMV393A	74	Negativo	Neg.	CMV415A	78	Positivo	Neg.	CMV427A	82	Negativo	Neg.
CMV394A			Neg.	CMV416A			Neg.	CMV428A			Neg.
CMV395A			Neg.	CMV417A			Neg.	CMV431A			Neg.
CMV346			Neg.	CMV418A			Neg.	CMV437A			Neg.
CMV347			Neg.	CMV420A			Pos.	CMV438A			Neg.
CMV348			Neg.	CMV421A			Neg.	CMV393			Neg.
CMV349			Neg.	CMV422A			Pos.	CMV394			Neg.
CMV350			Neg.	CMV366			Neg.	CMV395			Neg.
CMV351			Neg.	CMV367			Neg.	CMV396			Neg.
CMV352			Neg.	CMV368			Neg.	CMV397			Neg.
CMV353	75	Negativo	Neg.	CMV369	79	Negativo	Pos.	CMV426A	83	Negativo	Neg.
CMV354			Neg.	CMV370			Neg.	CMV429A			Neg.
CMV396A			Neg.	CMV371			Neg.	CMV432A			Neg.
CMV397A			Neg.	CMV372			Neg.	CMV430A			Neg.
CMV398A			Neg.	CMV373			Neg.	CMV434A			Neg.
CMV399A			Neg.	CMV374			Neg.	CMV343A			Neg.
CMV355			Neg.	CMV375			Neg.	CMV436A			Neg.
CMV356			Neg.	CMV376			Neg.	CMV435A			Neg.
CMV357			Neg.	CMV377			Neg.	CMV440A			Neg.
CMV400A			Neg.	CMV378			Neg.	CMV442A			Neg.
CMV401A	76	Negativo	Neg.	CMV379	80	Negativo	Neg.	CMV439A	84	Negativo	Neg.
CMV402A			Neg.	CMV380			Neg.	CMV441A			Neg.
CMV403A			Neg.	CMV381			Neg.	CMV443A			Neg.
CMV404A			Neg.	CMV382			Neg.	CMV444A			Neg.
CMV405A			Neg.	CMV383			Neg.	CMV445A			Neg.
CMV406A			Neg.	CMV384			Neg.	CMV446A			Neg.
CMV407A			Neg.	CMV389			Neg.	CMV447A			Neg.
CMV408A			Neg.	CMV363			Neg.	CMV398			Neg.
CMV409A			Neg.	CMV364			Neg.	CMV399			Neg.
CMV410A			Neg.	CMV365			Neg.	CMV400			Neg.

Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual
CMV401	85	Negativo	Neg.	CMV475A	89	Negativo	Neg.	CMV490A	93	Negativo	Neg.
CMV402			Neg.	CMV476A			Neg.	CMV491A			Neg.
CMV403			Neg.	CMV477A			Neg.	CMV492A			Neg.
CMV404			Neg.	CMV414			Neg.	CMV495A			Neg.
CMV405			Neg.	CMV415			Neg.	CMV499A			Neg.
CMV406			Neg.	CMV416			Neg.	CMV501A			Neg.
CMV407			Neg.	CMV417			Neg.	CMV437			Neg.
CMV408			Neg.	CMV418			Neg.	CMV438			Neg.
CMV409			Neg.	CMV419			Neg.	CMV439			Neg.
CMV410			Neg.	CMV420			Neg.	CMV440			Neg.
CMV411			86	Negativo			Neg.	CMV478A			90
CMV412	Neg.	CMV479A			Neg.	CMV442	Neg.				
CMV413	Neg.	CMV480A			Neg.	CMV443	Neg.				
CMV448A	Neg.	CMV481A			Pos.	CMV444	Neg.				
CMV449A	Neg.	CMV482A			Neg.	CMV445	Neg.				
CMV450A	Neg.	CMV483A			Neg.	CMV446	Neg.				
CMV451A	Neg.	CMV484A			Neg.	CMV447	Neg.				
CMV452A	Neg.	CMV485A			Neg.	CMV448	Neg.				
CMV453A	Neg.	CMV421			Neg.	CMV449	Neg.				
CMV454A	Neg.	CMV422			Neg.	CMV452	Neg.				
CMV455A	87	Negativo	Neg.	CMV423	91	Negativo	Neg.	CMV497A	95	Negativo	Neg.
CMV456A			Neg.	CMV424			Neg.	CMV498A			Neg.
CMV457A			Neg.	CMV425			Neg.	CMV500A			Neg.
CMV458A			Neg.	CMV426			Neg.	CMV450			Neg.
CMV459A			Neg.	CMV427			Neg.	CMV502A			Neg.
CMV460A			Neg.	CMV428			Neg.	CMV503A			Neg.
CMV461A			Neg.	CMV429			Neg.	CMV504A			Neg.
CMV462A			Neg.	CMV434			Neg.	CMV505A			Neg.
CMV463A			Neg.	CMV431			Neg.	CMV506A			Neg.
CMV464A			Neg.	CMV435			Neg.	CMV507A			Neg.
CMV465A	88	Negativo	Neg.	CMV430	92	Negativo	Neg.	CMV508A	96	Negativo	Neg.
CMV466A			Neg.	CMV432			Neg.	CMV509A			Neg.
CMV467A			Neg.	CMV433			Neg.	CMV510A			Neg.
CMV468A			Neg.	CMV486A			Neg.	CMV511A			Neg.
CMV469A			Neg.	CMV487A			Neg.	CMV512A			Neg.
CMV470A			Neg.	CMV488A			Neg.	CMV513A			Neg.
CMV471A			Neg.	CMV489A			Neg.	CMV441			Neg.
CMV472A			Neg.	CMV493A			Neg.	CMV451			Neg.
CMV473A			Neg.	CMV494A			Neg.	CMV453			Neg.
CMV474A			Neg.	CMV496A			Neg.	CMV454			Neg.

Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual
CMV455	97	Negativo	Neg.	CMV538A	101	Negativo	Neg.	CMV486	105	Negativo	Neg.
CMV456			Neg.	CMV539A			Neg.	CMV487			Neg.
CMV457			Neg.	CMV470			Neg.	CMV488			Neg.
CMV458			Neg.	CMV471			Neg.	CMV489			Neg.
CMV459			Neg.	CMV472			Neg.	CMV492			Neg.
CMV514A			Neg.	CMV473			Neg.	CMV493			Neg.
CMV515A			Neg.	CMV541A			Neg.	CMV494			Neg.
CMV516A			Neg.	CMV474			Neg.	CMV495			Neg.
CMV517A			Neg.	CMV475			Neg.	CMV496			Neg.
CMV518A			Neg.	CMV476			Neg.	CMV497			Neg.
CMV519A	98	Negativo	Neg.	CMV542A	102	Negativo	Neg.	CMV498	106	Positivo	Neg.
CMV520A			Neg.	CMV543A			Neg.	CMV563A			Neg.
CMV521A			Neg.	CMV544A			Neg.	CMV564A			Neg.
CMV522A			Neg.	CMV477			Neg.	CMV565A			Neg.
CMV523A			Neg.	CMV478			Neg.	CMV566A			Pos.
CMV524A			Neg.	CMV479			Neg.	CMV567A			Neg.
CMV525A			Neg.	CMV480			Neg.	CMV568A			Neg.
CMV526A			Neg.	CMV481			Neg.	CMV569A			Neg.
CMV527A			Neg.	CMV482			Neg.	CMV499			Neg.
CMV460			Neg.	CMV545A			Neg.	CMV500			Neg.
CMV461	99	Negativo	Neg.	CMV546A	103	Negativo	Neg.	CMV501	107	Negativo	Neg.
CMV462			Neg.	CMV547A			Neg.	CMV502			Neg.
CMV463			Neg.	CMV548A			Neg.	CMV503			Neg.
CMV464			Neg.	CMV549A			Neg.	CMV570A			Neg.
CMV528A			Neg.	CMV550A			Neg.	CMV571A			Neg.
CMV529A			Neg.	CMV551A			Neg.	CMV572A			Neg.
CMV530A			Neg.	CMV552A			Neg.	CMV573A			Neg.
CMV465			Neg.	CMV553A			Neg.	CMV574A			Neg.
CMV466			Neg.	CMV483			Neg.	CMV575A			Neg.
CMV467			Neg.	CMV484			Neg.	CMV576A			Neg.
CMV468	100	Negativo	Neg.	CMV485	104	Negativo	Neg.	CMV577A	108	Negativo	Neg.
CMV469			Neg.	CMV554A			Neg.	CMV504			Neg.
CMV531A			Neg.	CMV555A			Neg.	CMV505			Neg.
CMV532A			Neg.	CMV556A			Neg.	CMV506			Neg.
CMV533A			Neg.	CMV557A			Neg.	CMV578A			Neg.
CMV534A			Neg.	CMV558A			Neg.	CMV579A			Neg.
CMV535A			Neg.	CMV559A			Neg.	CMV580A			Neg.
CMV536A			Neg.	CMV560A			Neg.	CMV581A			Neg.
CMV537A			Neg.	CMV561A			Neg.	CMV508			Neg.
CMV540A			Neg.	CMV562A			Neg.	CMV509			Neg.

Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual
CMV507	109	Negativo	Neg.	CMV591A	113	Negativo	Neg.	CMV555	117	Negativo	Neg.
CMV510			Neg.	CMV596A			Neg.	CMV556			Neg.
CMV511			Neg.	CMV597A			Neg.	CMV557			Neg.
CMV582A			Neg.	CMV537			Neg.	CMV558			Neg.
CMV583A			Neg.	CMV538			Neg.	CMV559			Neg.
CMV584A			Neg.	CMV598A			Neg.	CMV564			Neg.
CMV585A			Neg.	CMV539			Neg.	CMV565			Neg.
CMV586A			Neg.	CMV540			Neg.	CMV566			Neg.
CMV587A			Neg.	CMV541			Neg.	CMV567			Neg.
CMV588A			Neg.	CMV542			Neg.	CMV568			Neg.
CMV589A	110	Negativo	Neg.	CMV599A	114	Negativo	Neg.	CMV560	118	Negativo	Neg.
CMV512			Neg.	CMV600A			Neg.	CMV561			Neg.
CMV513			Neg.	CMV601A			Neg.	CMV562			Neg.
CMV514			Neg.	CMV543			Neg.	CMV563			Neg.
CMV515			Neg.	CMV544			Neg.	CMV569			Neg.
CMV516			Neg.	CMV545			Neg.	CMV570			Neg.
CMV518			Neg.	CMV546			Neg.	CMV571			Neg.
CMV519			Neg.	CMV602A			Neg.	CMV572			Neg.
CMV520			Neg.	CMV547			Neg.	CMV573			Neg.
CMV521			Neg.	CMV548			Neg.	CMV574			Neg.
CMV522	111	Negativo	Neg.	CMV549	115	Negativo	Neg.	CMV617A	119	Negativo	Neg.
CMV523			Neg.	CMV603A			Neg.	CMV618A			Neg.
CMV524			Neg.	CMV604A			Neg.	CMV619A			Neg.
CMV525			Neg.	CMV605A			Neg.	CMV620A			Neg.
CMV526			Neg.	CMV606A			Neg.	CMV621A			Neg.
CMV527			Neg.	CMV607A			Neg.	CMV622A			Neg.
CMV528			Neg.	CMV608A			Neg.	CMV623A			Neg.
CMV529			Neg.	CMV609A			Neg.	CMV624A			Neg.
CMV530			Neg.	CMV610A			Neg.	CMV625A			Neg.
CMV531			Neg.	CMV611A			Neg.	CMV575			Neg.
CMV590A	112	Negativo	Neg.	CMV612A	116	Negativo	Neg.	CMV577	120	Negativo	Neg.
CMV592A			Neg.	CMV613A			Neg.	CMV578			Neg.
CMV593A			Neg.	CMV614A			Neg.	CMV579			Neg.
CMV594A			Neg.	CMV615A			Neg.	CMV626A			Neg.
CMV595A			Neg.	CMV616A			Neg.	CMV627A			Neg.
CMV532			Neg.	CMV550			Neg.	CMV628A			Neg.
CMV533			Neg.	CMV551			Neg.	CMV576			Neg.
CMV534			Neg.	CMV552			Neg.	CMV581			Neg.
CMV535			Neg.	CMV553			Neg.	CMV582			Neg.
CMV536			Neg.	CMV554			Neg.	CMV580			Neg.

Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual
CMV583	121	Negativo	Neg.	CMV646A	125	Negativo	Neg.	CMV664A	129	Negativo	Neg.
CMV584			Neg.	CMV647A			Neg.	CMV665A			Neg.
CMV585			Neg.	CMV648A			Neg.	CMV666A			Neg.
CMV586			Neg.	CMV607			Neg.	CMV667A			Neg.
CMV629A			Neg.	CMV608			Neg.	CMV668A			Neg.
CMV630A			Neg.	CMV609			Neg.	CMV670A			Neg.
CMV587			Neg.	CMV610			Neg.	CMV671A			Neg.
CMV588			Neg.	CMV611			Neg.	CMV672A			Neg.
CMV589			Neg.	CMV612			Neg.	CMV673A			Neg.
CMV590			Neg.	CMV613			Neg.	CMV674A			Neg.
CMV592			122	Negativo			Neg.	CMV614			126
CMV593	Neg.	CMV615			Neg.	CMV675A	Neg.				
CMV594	Neg.	CMV616			Neg.	CMV676A	Neg.				
CMV595	Neg.	CMV617			Neg.	CMV629	Neg.				
CMV596	Neg.	CMV618			Neg.	CMV631	Neg.				
CMV597	Neg.	CMV619			Neg.	CMV632	Neg.				
CMV631A	Neg.	CMV620			Neg.	CMV634	Neg.				
CMV632A	Neg.	CMV606			Neg.	CMV637	Neg.				
CMV634A	Neg.	CMV649A			Neg.	CMV638	Neg.				
CMV601	Neg.	CMV650A			Neg.	CMV639	Neg.				
CMV633A	123	Negativo	Neg.	CMV651A	127	Negativo	Neg.	CMV628	131	Positivo	Neg.
CMV598			Neg.	CMV652A			Neg.	CMV630			Neg.
CMV599			Neg.	CMV653A			Neg.	CMV635			Neg.
CMV600			Neg.	CMV654A			Neg.	CMV636			Neg.
CMV635A			Neg.	CMV655A			Neg.	CMV633			Pos.
CMV636A			Neg.	CMV621			Neg.	CMV640			Neg.
CMV591			Neg.	CMV622			Neg.	CMV641			Neg.
CMV602			Neg.	CMV623			Neg.	CMV642			Neg.
CMV603			Neg.	CMV624			Neg.	CMV644			Neg.
CMV604			Neg.	CMV625			Neg.	CMV677A			Neg.
CMV605	124	Negativo	Neg.	CMV656A	128	Negativo	Neg.	CMV678A	132	Negativo	Neg.
CMV637A			Neg.	CMV626			Neg.	CMV679A			Neg.
CMV638A			Neg.	CMV627			Neg.	CMV680A			Neg.
CMV639A			Neg.	CMV657A			Neg.	CMV681A			Neg.
CMV640A			Neg.	CMV658A			Neg.	CMV682A			Neg.
CMV641A			Neg.	CMV659A			Neg.	CMV683A			Neg.
CMV642A			Neg.	CMV660A			Neg.	CMV684A			Neg.
CMV643A			Neg.	CMV661A			Neg.	CMV685A			Neg.
CMV644A			Neg.	CMV662A			Neg.	CMV686A			Neg.
CMV645A			Neg.	CMV663A			Neg.	CMV687A			Neg.

Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual
CMV688A	133	Negativo	Neg.	CMV700A	137	Negativo	Neg.	CMV692	141	Negativo	Neg.
CMV643			Neg.	CMV701A			Neg.	CMV693			Neg.
CMV645			Neg.	CMV667			Neg.	CMV694			Neg.
CMV646			Neg.	CMV668			Neg.	CMV695			Neg.
CMV647			Neg.	CMV669			Neg.	CMV696			Neg.
CMV648			Neg.	CMV670			Neg.	CMV697			Neg.
CMV649			Neg.	CMV671			Neg.	CMV698			Neg.
CMV650			Neg.	CMV673			Neg.	CMV699			Neg.
CMV651			Neg.	CMV674			Neg.	CMV700			Neg.
CMV652			Neg.	CMV675			Neg.	CMV701			Neg.
CMV653			134	Negativo			Neg.	CMV676			138
CMV654	Neg.	CMV677			Neg.	CMV703	Neg.				
CMV655	Neg.	CMV678			Neg.	CMV704	Neg.				
CMV656	Neg.	CMV679			Neg.	CMV705	Neg.				
CMV657	Neg.	CMV680			Neg.	CMV706	Neg.				
CMV658	Neg.	CMV681			Neg.	CMV707	Neg.				
CMV659	Neg.	CMV682			Neg.	CMV721A	Neg.				
CMV689A	Neg.	CMV707A			Neg.	CMV722A	Neg.				
CMV690A	Neg.	CMV708A			Neg.	CMV723A	Neg.				
CMV691A	Neg.	CMV709A			Neg.	CMV724A	Neg.				
CMV692A	135	Negativo			Neg.	CMV710A	139	Negativo	Neg.	CMV725A	
CMV693A			Neg.	CMV711A	Neg.	CMV726A			Neg.		
CMV660			Neg.	CMV712A	Neg.	CMV727A			Neg.		
CMV661			Neg.	CMV713A	Neg.	CMV728A			Neg.		
CMV662			Neg.	CMV714A	Neg.	CMV729A			Neg.		
CMV663			Neg.	CMV715A	Neg.	CMV708			Neg.		
CMV664			Neg.	CMV716A	Neg.	CMV709			Neg.		
CMV665			Neg.	CMV717A	Neg.	CMV710			Neg.		
CMV666			Neg.	CMV718A	Neg.	CMV711			Neg.		
CMV694A			Neg.	CMV719A	Neg.	CMV735A			Neg.		
CMV695A			136	Negativo	Neg.	CMV720A			140	Negativo	Neg.
CMV696A	Neg.	CMV683			Neg.	CMV731A	Neg.				
CMV697A	Neg.	CMV684			Neg.	CMV732A	Neg.				
CMV698A	Neg.	CMV685			Neg.	CMV733A	Neg.				
CMV699A	Neg.	CMV686			Neg.	CMV734A	Neg.				
CMV702A	Neg.	CMV687			Neg.	CMV736A	Neg.				
CMV703A	Neg.	CMV688			Neg.	CMV712	Neg.				
CMV704A	Neg.	CMV689			Neg.	CMV713	Neg.				
CMV705A	Neg.	CMV690			Neg.	CMV714	Neg.				
CMV706A	Neg.	CMV691			Neg.	CMV715	Neg.				

Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual	Nº Amostra	Nº Pool	Resultado PCR Pool	Resultado PCR individual
CMV716	145	Negativo	Neg.	CMV746	149	Negativo	Neg.
CMV717			Neg.	CMV747			Neg.
CMV718			Neg.	CMV748			Neg.
CMV719			Neg.	CMV749			Neg.
CMV720			Neg.	CMV750			Neg.
CMV721			Neg.	CMV751			Neg.
CMV722			Neg.	CMV752			Neg.
CMV723			Neg.	CMV753			Neg.
CMV726			Neg.	CMV747A			Neg.
CMV727			Neg.	CMV752A			Neg.
CMV728			146	Negativo			Neg.
CMV729	Neg.	CMV749A			Neg.		
CMV730	Neg.	CMV750A			Neg.		
CMV731	Neg.	CMV751A			Neg.		
CMV732	Neg.	ÁGUA			Neg.		
CMV733	Neg.	ÁGUA			Neg.		
CMV724	Neg.	ÁGUA			Neg.		
CMV725	Neg.	ÁGUA			Neg.		
CMV737A	Neg.	ÁGUA			Neg.		
CMV735	Neg.	ÁGUA			Neg.		
CMV734	147	Negativo	Neg.				
CMV736			Neg.				
CMV737			Neg.				
CMV738			Neg.				
CMV739			Neg.				
CMV738A			Neg.				
CMV739A			Neg.				
CMV740A			Neg.				
CMV741A			Neg.				
CMV742A			Neg.				
CMV743A	148	Negativo	Neg.				
CMV744A			Neg.				
CMV745S			Neg.				
CMV746A			Neg.				
CMV740			Neg.				
CMV741			Neg.				
CMV742			Neg.				
CMV743			Neg.				
CMV744			Neg.				
CMV745	Neg.						

Anexo VII – Custos associados à utilização de *pools* de 20 amostras de saliva e *pools* de 10 amostras *versus* amostra individual para o rastreio de infeção congénita por HCMV

	Amostra Individual	Pool 10	Pool 20
Processamento	0,56€	5,21€	10,42€
Extração de DNA	4,25€	4,25€	4,25€
PCR	3,64€	3,64€	3,64€
Total	8,45€	13,10€	18,31€
Total por amostra	8,45€	1,31€	0,92€

O custo associado ao **processamento** das amostras inclui: tubo de transporte, zaragatoa, meio de transporte, tubo de congelação, pipetas de Pasteur, *ependorfs* de 1,5mL e pontas para micropipetas.

O custo associado à realização da **extração de DNA** inclui: o valor dos reagentes do kit utilizado calculado para 1 extração, *ependorfs* de 1,5mL e pontas para micropipetas.

O custo associado à técnica de **PCR** inclui: placa de PCR, película transparente, *primers* F e R, sonda, água ultrapura, LUNA, *ependorfs* de 1,5mL (específicos para o PCR, livre de DNAsés e RNAsés) e pontas para micropipetas.