

Carla Grasso Figueiredo

Detecção de Citomegalovírus humano em recém-nascidos, São Paulo, 2010 a 2018.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Vigilância em Saúde Pública

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Isabel de Oliveira

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Figueiredo, Carla Grasso

Detecção de citomegalovírus humano em recém-nascidos, São Paulo, 2010 a 2018 / Carla Grasso Figueiredo. – 2020.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Vigilância em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Maria Isabel de Oliveira.

1. Citomegalovírus. 2. Reação em cadeia da polimerase. 3. Recém-nascido.

SES/CCD/CD - 416/2020

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha tia Dra. Cristina Adelaide Figueiredo (in memoriam) por ser minha eterna inspiração.

Agradecimentos

Agradeço a Capes (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de mestrado concedida e ao Instituto Adolfo Lutz, por oferecer todas as condições necessárias para o desenvolvimento desta Dissertação.

Agradeço a minha orientadora Dra Maria Isabel de Oliveira pela confiança depositada em mim, pela paciência e pelos ensinamentos e pela amizade.

A Dra Cristina Adelaide Figueiredo (in memoriam) por ser a maior incentivadora da minha carreira, por ter sido fundamental para meu ingresso no mestrado e por ser meu maior exemplo.

Aos Colegas do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz Dra. Ana Maria Afonso Sardinha, Dra. Adriana Luchs e Dra. Maria Do Carmo Timenetsky pela participação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Edison Luiz Durigon e a Dra. Danielle Bruna Leal de Oliveira do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo pela colaboração neste trabalho.

As colegas do Núcleo de Microscopia Eletrônica Dra. Noemi Nosomi Taniwaki e Dra. Gislene Namiyama Nishina pelo apoio e pela amizade.

Aos meus pais Carlos Eduardo Figueiredo e Luciana Grasso Figueiredo e ao meu marido Rafael Fagundes Costa pelo apoio e incentivo permanente.

A equipe de trabalho do Núcleo de Doenças Respiratórias pelo carinho, convívio, colaboração e amizade e a todos os funcionários do Centro de Virologia, que de forma direta ou indireta me auxiliaram.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação que colaboraram para a minha formação científica.

Resumo

O Citomegalovírus humano (HCMV) pertence à família *Herpesviridae* é a causa mais frequente de infecção congênita, ocorrendo em todas as regiões do mundo variando de 0,7% a 6,1%. Uma característica desse vírus é a sua capacidade de permanecer latente após uma infecção onde o vírus não é eliminado do organismo podendo ocorrer reativação a qualquer momento. A infecção pelo HCMV pode ser adquirida através de contaminação com diversos líquidos biológicos e a transmissão intrauterina pode ocorrer em mães sem imunidade preexistente que adquirem infecção por HCMV pela primeira vez na gravidez (infecção primária) ou em mulheres com anticorpos preexistentes ao HCMV por reativação de uma infecção anterior ou por aquisição de uma cepa viral diferente. Cerca de 10% a 15% dos lactentes com infecção congênita podem estar em risco de sequelas como problemas neurológicos, icterícia, hepatoesplenomegalia, microcefalia, deficiência auditiva e trombocitopenia. Este estudo teve como objetivo avaliar a frequência da infecção congênita pelo HCMV em crianças de até 1 mês de idade no estado de São Paulo de 2010 a 2018. Também foi realizada a caracterização molecular de amostras positivas para HCMV. A análise dos dados foi dividida em dois períodos, sendo o primeiro de 2010 a 2016 onde foi realizada uma pesquisa retrospectiva envolvendo análise de banco de dados e o segundo período de 2017 a 2018. Um total de 275 amostras de urina foram selecionadas para análise. Os espécimens foram triados por PCR em Tempo Real e os casos positivos foram submetidos a amplificação por PCR convencional visando os genes gN, gB e UL89, seguido de sequenciamento genético visando a caracterização molecular e a pesquisa por mutações envolvidas em resistência a antivirais. Um total de 32 amostras (11.6%) apresentaram resultado positivo para HCMV apresentando Ct médio de 30,62. A idade média das crianças foi de 10,3 dias (variação: 2 dias a 30 dias) enquanto a mediana foi de 6 dias. As crianças de 0-3 semanas tiveram as maiores taxas de detecção (84.4%; 27/32). Das 32 amostras positivas, 6

(18.7%; 6/32) foram amplificadas e o gene UL89, o qual foi sequenciado com sucesso em duas amostras (IAL-230 and IAL-259), ambas confirmadas como betaherpesvírus humano 5. Não foram identificadas mutações associadas à resistência à antivirais já descritas em literatura. As PCRs para as regiões gB e gN foram negativas e nenhuma informação sobre esses genótipos pode ser obtida. O presente estudo enfatiza a necessidade da realização de uma triagem neonatal de rotina da infecção por HCMV a qual permitiria o diagnóstico precoce desses recém-nascidos, propiciando uma intervenção oportuna e mitigando as sequelas associadas à infecção congênita por HCMV.

Palavras-chave: infecção congênita por citomegalovírus, PCR em tempo real, vigilância, sequenciamento de DNA

Abstract

Human cytomegalovirus (HCMV) belongs to the *Herpesviridae* family and is the most frequent cause of congenital infection, occurring worldwide and ranging from 0.7% to 6.1%. One characteristic of this virus is its ability to remain latent after the infection where the virus is not eliminated from the body and reactivation can occur at any time. HCMV infection can be acquired through contamination with various biological fluids and intrauterine transmission can occur in mothers without pre-existing immunity who acquire HCMV infection for the first time during pregnancy (primary infection) or in women with pre-existing HCMV through reactivation of a previous infection or by acquiring a different viral strain. About 10% to 15% of infants with congenital infection may be at risk for sequel such as neurological problems, jaundice, hepatosplenomegaly, microcephaly, hearing loss and thrombocytopenia. The aim of the present study was to evaluate the frequency of HCMV congenital infections in newborns up to 1 month in the Sao Paulo State, from 2010 to 2018. The molecular characterization of HCMV-positive samples was also undertaken. The study period was divided into two: (i) from 2010 to 2016 where a retrospective survey was carried out involving the analysis of the database, and (ii) from 2017 to 2018. Urine samples from 275 potential congenital HCMV-infected patients were tested by real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR). HCMV-positive samples were amplified by conventional PCR targeting gN and gB, and UL89 genes, sequenced and searched for genotypes and mutations, respectively. A total of 32 (11.6%) positive-HCMV cases were detected (mean Ct 30.59); mean and median age of 10.3 and 6 days old, respectively. Children aged between 0-3 weeks had higher HCMV detection rates (84.4%; 27/32). UL89 gene was successfully sequenced in two samples (IAL-230 and IAL-259), both classified as the human betaherpesvirus 5. No described resistance-associated mutations were identified. PCRs for the gB and gN regions failed

and no information about HCMV genotypes could be obtained. A routine screening in newborns coupled with the genetic characterization of key viral genes is vital to decrease sequels associated with congenital HCMV infections.

Keywords: Congenital cytomegalovirus infection, real-time PCR, surveillance, DNA sequencing.

Lista de Siglas e Abreviaturas

µg - micrograma

µL - microlitro

Aids - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BHQ1 - Blackhole Quencher 1

CDC - Center for Disease Control and Prevention

CO₂ - Dióxido de Carbono

COX-2 - Ciclo-oxigenase-2

CT - Threshold Cycle

Diodo array - detector de iodo

DNA - ácido desoxirribonucleico

CMV - citomegalovirus

FAM - 6-carboxifluoresceína

g - grama

gB - glicoproteína B

gH - glicoproteína H

gN - glicoproteína N

HHV-5 - Herpes vírus Humano Tipo 5

HSV1 - Herpes vírus simples 1

HCMV – Citomegalovirus humano

IgG - imunoglobulina G

IgM - imunoglobulina M

IRL - interna repetida longa

IRS - interna repetida curta

Kb - Kilobase

mL – mililitro

MRA- analisador de resistência à mutação

MRC-5 - fibroblastos de pulmão embrionário

mRNA - RNA mensageiro

nm - Nanômetro

°C - Grau Celsius

ORFs - Open Reading Frames

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

Pb - Pares de base

qPCR - PCR quantitativo em tempo real

RNA - Ácido ribonucleico

RM – Ressonância magnética

SNC - Sistema Nervoso Central

TCID - dose infecciosa de cultura de tecido

TRL - Terminal repetida longa

TRC - Terminal repetida curta

UL - Região única Longa

US - Região única Curta

USB - Unidades Básicas de Saúde

ddNTPs-dedesoxinucleotídeos

Lista de Figuras, Quadros e Tabelas

Figura 1: Representação esquemática da partícula viral do HCMV.....	21
Figura 2: Estrutura do HCMV	22
Figura 3: Rota HCMV Mãe-filho.....	26
Figura 4: Frequência de sequelas em crianças com HCMV.congenito	28
Figura 5: Curva de Amplificação Real Time PCR.....	35
Figura 6: Positividade de amostras por ano	52
Figura 7: Distribuição dos pacientes por idade.....	52
Figura 8: Positividade das amostras por idade.....	53
Figura 9: Amplificação do HCMV em gel de agarose	54
Figura 10: Comparação de identidade e divergência	55
Figura 11: Análise filogenética da glicoproteína	56
Figura12: Mapa de mutações	57
Quadro 1: Principais sintomas e complicações do HCMV	17
Quadro 2: Classificação da infecção por Citomegalovírus humano.....	19
Quadro 3: Classificação de glicoproteínas.....	23
Tabela 1: Tabela de primers e sondas, reação de qPCR.....	43
Tabela 2. Controle endógeno do gene alvo RNase P humana.....	44
Tabela 3: Primers das regiões da gB e gN	46
Tabela 4: Primers da região conservada do gene UL89	47
Tabela 5: Sequências obtidas do <i>GenBank</i>	49

Índice

1. Introdução	15
1.1 Citomegalovírus humano	15
1.2 Virologia	19
1.3 Infecção no recém-nascido	24
1.4 Transmissão.....	25
1.5 Manifestações Clínicas	28
1.6 Diagnóstico	29
1.7 Técnicas de diagnóstico para Citomegalovírus humano.....	30
1.7.1 Cultivo	30
1.7.2 Prova de Antigenemia	31
1.7.3 Microscopia Eletrônica.....	31
1.7.4 Diagnóstico Molecular	32
1.8 Tratamento.....	35
1.9 Profilaxia	38
2. Objetivos	40
2.1 Objetivos Gerais.....	40
2.2 Objetivos específicos	40
3. Material e Métodos	41
3.1 Casuística	41
3.2 Extração DNA	42
3.3 PCR em Tempo Real.....	43

3.4 PCR convencional e caracterização das glicoproteínas gB e gN	44
3.5 PCR convencional do gene UL89 e identificação de mutações	46
3.6 Sequenciamento genético	47
3.7 Análise genética das sequências	49
3.8 Identificação de mutações de resistência ao HCMV	50
3.9 Número de acesso	50
4. Resultados	51
5. Discussão	58
6. Conclusão	62
Referência	63

Anexo I. Total das amostras estudadas

Anexo II. Parecer do CEP

Anexo III. Frequency of congenital cytomegalovirus infections in newborns in the Sao Paulo State, 2010-2018

1. Introdução

1.1- Citomegalovírus humano

O Citomegalovírus humano (HCMV) é um dos vírus mais onipresentes em humanos, também é conhecido como betaherpesvírus humano 5 (Human betaherpesvirus 5/ HHV-5). O HCMV é o mais estudado entre todos os Citomegalovírus (CMVs) e geralmente causa doenças moderadas ou subclínicas em adultos imunocompetentes, no entanto, pode levar a infecções oportunistas que afetam indivíduos cujas funções imunológicas estão comprometidas ou imaturas (Griffiths et al., 2015).

Pertencente à família *Herpesviridae* e subfamília *Betaherpesvirinae*, o mesmo apresenta características biológicas comuns entre os vírus desta subfamília, tais como o tropismo por glândulas salivares, replicação lenta em cultura celular e ser espécie-específico, tendo o homem como o único reservatório (Mocarski, 2007).

Uma característica desse vírus que é uma propriedade biológica de todos os vírus herpes é a sua capacidade de latência. Assim, após uma infecção primária, geralmente assintomática, o vírus não é eliminado do organismo e permanece de forma latente com viremia em níveis reduzidos (Dupont e Reeves, 2016).

A latência viral pode ser definida como a manutenção do genoma viral na ausência de produção de virions infecciosos, mas com a capacidade de se reativar em certas condições. Esta característica permite ao HCMV estabelecer uma infecção persistente no interior das células hematopoiéticas progenitoras e em monócitos, sem ativar o sistema imunitário. Sabe-se que o HCMV emprega uma série de estratégias para interferir na resposta imune do hospedeiro e assim impedir a depuração viral (Sinclair, 2008; Davis et al., 2017; Brune e Andoniou, 2017).

Em diferentes circunstâncias pode ocorrer à reativação do vírus como, por exemplo, em casos de gestação, AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), uso de drogas imunossupressoras utilizadas nos transplantes, ou qualquer outro fator que altere o sistema imunitário (Mocarski e Charmain, 2011).

A maioria dos adultos infectados é assintomática, embora uma pequena porcentagem (<10%) possa apresentar sintomas leves como febre e fadiga ou sintomas semelhantes à mononucleose, outro membro da família do vírus herpes (Mocarski e Charmain, 2011; Davis et al., 2017). As pessoas com maior risco de infecções por HCMV abrangem recém-nascidos infectados pelas mães antes do nascimento, bebês infectados pelo leite materno e pessoas com sistemas imunológicos debilitados, como receptores de transplante de órgãos ou pacientes imunodeficientes (Chen et al., 2020). Os principais sintomas estão apresentados no Quadro 1.

Indivíduo	Principais sintomas	Complicações
Adulto saudável	Fadiga, febre, dor de garganta, dores musculares.	Problemas com o sistema digestivo, fígado, cérebro e sistema nervoso.
Pessoas com imunidade enfraquecida	Problemas que afetam os olhos, pulmões, fígado, esôfago, estômago, intestinos, cérebro.	Perda de visão, inflamação do cólon, esôfago e fígado, encefalite, mielite e pneumonia.
Bebê	Parto prematuro, baixo peso ao nascer, icterícia, função hepática aumentada e deficiente, manchas roxas e / ou erupções cutâneas, baço aumentado, microcefalia, pneumonia, convulsões.	Perda auditiva, deficiência intelectual, problemas de visão, convulsões, falta de coordenação, fraqueza muscular.

Quadro 1: Principais sintomas e complicações do HCMV.

O HCMV é um vírus com uma distribuição mundial, estima-se que a prevalência varia entre 45% a 100% nas diversas populações, sendo diretamente proporcional à idade e inversamente proporcional ao *status* socioeconômico da população (Kenneson e Cannon, 2007; Cannon et al, 2010;). Uma pesquisa nos Estados Unidos relatou uma soroprevalência do HCMV de 50,4% (Bate et al., 2010). A prevalência aumenta com a idade, sendo que, em crianças de 1 a 5 anos pode chegar a 20,7% e em adultos

mais velhos aproxima-se de 100% nos países em desenvolvimento (Lanzieri et al., 2015).

Pode-se dizer que a taxa de soroprevalência do HCMV, a qual se refere à frequência de indivíduos em uma população que apresentam anticorpo para HCMV no soro sanguíneo, varia amplamente devido aos seguintes aspectos: localização geográfica (com taxas mais altas nos países em desenvolvimento), idade (com a taxa aumentando diretamente com o avanço da idade) e fator socioeconômico (com maior soroprevalência em populações lotadas e economicamente desafiadas) (Dioverti e Razonable, 2016).

O Citomegalovírus humano pode ser classificado como HCMV primário, secundário, congênito, perinatal e pós-natal. Estas classificações e suas definições estão apresentadas no Quadro 2.

HCMV Primário	Pessoa que é infectada pela primeira vez por HCMV. A infecção primária materna durante a gravidez apresenta maior perigo para o feto.
HCMV Secundário	Infecção recorrente ou reativação de uma infecção latente pelo HCMV. A infecção secundária por HCMV materna durante a gravidez apresenta muito menos perigo para o feto com taxas de transmissão muito mais baixas.
HCMV Congênito	HCMV que foi transmitido da mãe para o feto durante a gravidez.
HCMV Perinatal	HCMV adquirido durante o período intraparto através da exposição a secreções cervicais ou ao sangue materno durante o parto.
HCMV Pós-natal	HCMV adquirido após o parto via leite materno.

Quadro 2: Classificação da infecção por Citomegalovírus humano, adaptado de Mestas, 2016.

1.2- Virologia

O vírus foi detectado pela primeira vez em recém-nascidos durante o início do século XX, quando vários relatos descreveram células grandes na urina de crianças com uma infecção sistêmica e muitas vezes fatal referida como doença de inclusão citomegálica (Rippert, 1904). O vírus foi isolado pela primeira vez em 1957 (Craig et al., 1957).

O HCMV se replica em diferentes células incluindo células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos e células do músculo liso (Sinzger et al., 2008). Esse amplo tropismo celular facilita a disseminação sistêmica no hospedeiro, com proliferação eficiente do vírus e transmissão entre os hospedeiros (Paradowska et al., 2019).

A replicação do HCMV ocorre no núcleo e, logo após a descapsidação, parte do genoma linear do HCMV é circularizado para dar início à transcrição e replicação por círculo rolante, a partir de uma origem única, "oriLyt". Nesse modelo são gerados concatâmeros, produtos de alto peso molecular. Uma vez que o DNA é replicado no núcleo, ele é clivado e encapsidado por uma série de produtos gênicos codificados pelos genes UL51, UL52, UL56, UL77, UL 80, UL89, UL93 e UI95 (Compton, 2004, Buerger et al., 2001; Thoma et al., 2006).

O HCMV é membro da subfamília do *herpesvírus* β , que também inclui os vírus 6 e 7 do herpes humano e muitos CMVs de animais. Cada partícula de virion maduro mede em torno de 200 nm e é envolto por uma membrana externa que corresponde ao envelope fosfolipídico onde estão localizadas as glicoproteínas responsáveis pela antigenicidade viral (Compton, 2004).

O envelope delimita uma região amorfa, intermediária, chamada de tegumento a qual contém proteínas importantes para a replicação viral. Mais internamente o vírus apresenta um capsídeo de simetria icosaédrica, composto de 162 capsômeros, que contém o genoma viral (Figura 1) de DNA dupla fita, linear com de cerca de 235 kb o qual é mais longo que todos os herpesvírus humanos e um dos genomas mais longos de todos os vírus humanos em geral. Foi totalmente sequenciado, com mais de 190 Regiões

codificadoras (Open Reading Frames - ORFs) das proteínas virais (Chee et al., 1989; Rasmussen, 1999; Silva et al., 2011; Sijmons et al., 2014).

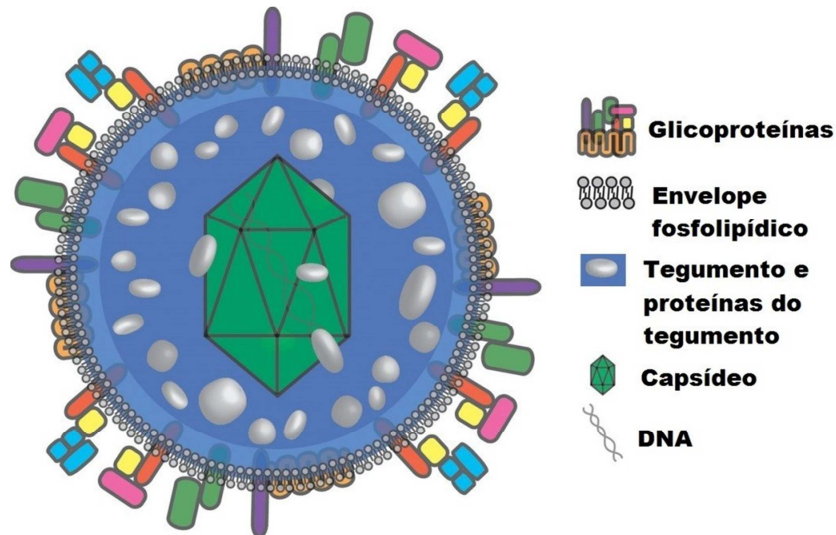


Figura 1: Representação esquemática da partícula viral do HCMV.
Fonte: adaptado de Gardner e Tortorella, 2016.

As partículas virais do HCMV são termolábeis e possuem uma vida média de 45 minutos à 37°C (Pannuti, 1996), são sensíveis a pH baixo, solventes lipídicos e ao calor (Mocarski, 1996). Apresentam crescimento e efeito citopático lentos em cultivo celular, sendo que a célula preferencial de cultivo para o vírus é o fibroblasto humano (Griffiths, 2002).

A partícula viral é formada por quatro isômeros produzidos pela inversão de duas regiões genômicas denominadas: região única Longa (UL) e região única Curta (US). A região UL está localizada entre as sequências terminal repetida longa e interna repetida longa (TRL e IRL) e a região US localiza-se entre as sequências terminal repetida curta e interna repetida curta (TRS e IRS) (Griffiths e Grundy, 1987; Silva et al., 2011; McSharry et al., 2012).

Nessas regiões encontram-se sequências codificadoras para as proteínas do virion as quais estão distribuídas no capsídeo, tegumento e envelope e estão representadas na Figura 2 (Griffiths, 2002).

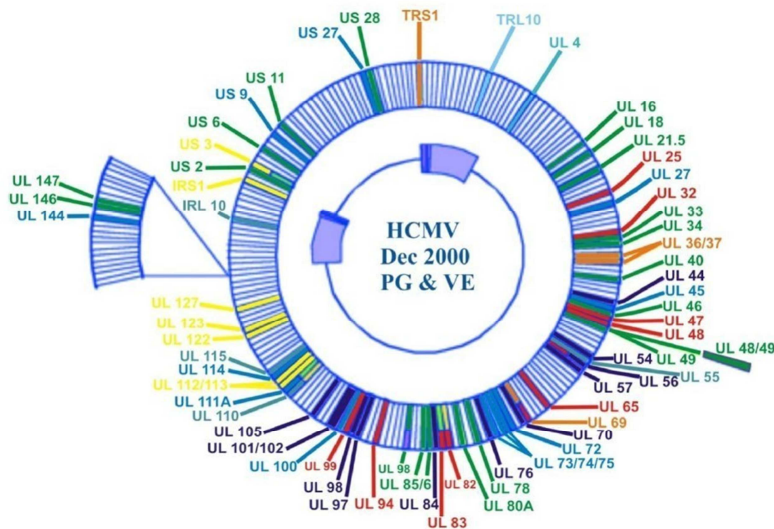


Figura 2: Estrutura do HCMV. Em verde estão representados os genes do capsídeo, em vermelho os genes do tegumento e em azul-claro e lilás, as glicoproteínas. O conjunto representa as proteínas estruturais do vírus. Fonte: Griffiths, 2002.

A principal proteína do capsídeo apresenta 1.370 aminoácidos, compõe 90% do teor proteico do tegumento viral, denominada PUL86, a qual possui algumas similaridades com a proteína VP5 do HSV1 (Herpes vírus simples tipo1). As fosfoproteínas do tegumento pp150 e pp65 fazem parte da estrutura viral, têm importância imunogênica e desempenham importante papel na regulação de genes do HCMV e na modificação do metabolismo da célula hospedeira (Britt e Boppana, 2004).

Dentre o grupo das glicoproteínas, duas são consideradas importantes por estarem envolvidas com a antigenicidade e imunogenicidade do vírus, uma é a glicoproteína B (gB) e outra a glicoproteína H (gH). A gB

também denominada de gA, gP55-116, gP58, p130/55 e gP52, e a gH é denominada de p86, também referida como gPUL75. Parte das glicoproteínas são organizadas em complexos de alto peso molecular designados gcl, gcll e gclll (Quadro 3) (Rasmussen, 1999; Pignatelli et al., 2004).

Complexo Molecular	Glicoproteínas	Outras denominações
gcl	gB	gA, gP55-116, gP58, PUL55, p130/55, gP ₅₂
gcll	gM	gPUL ₁₀₀
	gN	gPUL ₇₃
gclll	gH	P86, gPUL ₇₅
	gL	gPUL ₁₁₅
	gO	gPUL ₇₄

Quadro 3: Classificação de glicoproteínas

Fonte: Adaptado de Rasmussen (1999); Pignatelli et al. (2004).

A gB é uma das principais proteínas do envelope viral, possui 150Kb de tamanho e juntamente com a gH desempenha importante papel na penetração do vírus na célula hospedeira, na transmissão e na formação de sincícios (Navarro et al., 1993; Isaacson e Compton, 2009). Essa glicoproteína em conjunto com a gH, são alvos de anticorpos neutralizantes

contra o citomegalovírus no organismo humano e possíveis candidatas à produção de vacinas (Browne, 2009).

As glicoproteínas gM e gN em conjunto com a gB e gH são essenciais para a infectividade do vírus (Matos et al., 2011). Além dessas proteínas, a fosfolipase Pp71 da família UL82 localizada no tegumento viral, também desempenha um papel importante na replicação do vírus. Esta proteína funciona como ativador eficiente da expressão gênica viral na fase imediatamente inicial do ciclo de replicação lítica do vírus (Mocarski, 1996; Tomtishen, 2012).

1.3- Infecção nos recém-nascidos

A infecção por Citomegalovírus humano é a causa mais frequente de infecção congênita em nível global, afetando 0,7% a 6,1% dos recém-nascidos vivos (Tagarro et al., 2019). Em países industrializados, onde a soroprevalência materna é relativamente baixa, em geral, as taxas de infecção congênita por HCMV são menores (Kenneson e Cannon, 2007; Dollard et al., 2007). Já em países em desenvolvimento com populações altamente soropositivas a taxas são mais altas. (Dar et al., 2008; Mussi-Pinhata et al., 2009; Van der Sande et al., 2007).

Revisões sistemáticas indicam que, nos EUA, 38.000 bebês nascem a cada ano com citomegalovírus congênito sendo que 13% apresentam sinais de infecção ao nascer (denominados sintomáticos) e 14% não possuem sinais ao nascer (assintomáticos) e os desenvolvem durante os primeiros 5 anos de vida (Dollard et al., 2007; Wang et al., 2011).

A incidência de infecção por HCMV no útero é altamente dependente da população e paralela à soroprevalência materna, assim, taxas mais altas

de soroprevalência levam a uma maior chance de reativação dentro de um hospedeiro, de reinfecção de hospedeiros soropositivos (juntos constituem infecção não primária) ou infecção primária de hospedeiros soronegativos na população (Manicklal et al., 2013). O Citomegalovírus humano pertence ao grupo de infecção perinatal conhecido como “TORCH” com o acrônimo representando T de Toxoplasmose, O de outros, R de Rubéola, C de Citomegalovírus e H de

Herpes simplex. (Mestas, 2016). O HCMV é a principal causa viral de incapacidades no desenvolvimento neonatal, incluindo perda auditiva neurossensorial e danos ao sistema nervoso central (SNC) (Boppana et al., 2013).

Apesar de sua frequência e consequências incapacitantes, a infecção congênita por HCMV é menos conhecida da população geral do que outras condições com menor prevalência, como a síndrome de Down, síndrome alcoólica fetal e espinha bífida (Swanson e Schleiss, 2013). Recentemente com a introdução do vírus Zika no Brasil, houve o aumento significativo da percepção sobre o potencial das infecções virais intrauterinas gerarem graves danos no sistema nervoso central (Brito e Cordeiro, 2016; Coyne e Lazear, 2016; Klase et al., 2016; Krauer et al., 2017).

1.4- Transmissão

A infecção pelo HCMV pode ser adquirida através de contaminação com diversos líquidos biológicos, tais como: saliva, sêmen, secreção vaginal, urina, leite materno, também por via transplantaria, por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos (Davis et al., 2017).

As principais vias de infecção para a gestante susceptível são: adultos jovens infectados, crianças com infecção subclínica, crianças com transmissão vertical (até três anos após o nascimento) e venérea. Uma vez

adquirido o vírus, o hospedeiro o elimina cronicamente por longo período através de fluidos biológicos (Mocarski e Charmain, 2011). A transmissão vertical pode ocorrer se existir viremia materna, sendo mais provável durante as infecções primárias, podendo, no entanto, surgir nas reativações. (Davis et al, 2017). A transmissão do HCMV pode ocorrer por meio de transmissão vertical (congenita) ou perinatal. A transmissão vertical se dá via placentária, quando leucócitos maternos infectados atravessam a placenta, por meio do cordão umbilical, e instalam-se no epitélio tubular renal fetal, onde ocorre a replicação do vírus. A infecção perinatal pode se dar durante o trabalho de parto ou no pós-parto. No trabalho de parto, a infecção pode ocorrer via transfusão materno-fetal (figura 3); pelo acometimento das membranas amnióticas, cordão umbilical ou da placenta; pela aspiração de líquido amniótico contaminado, e ainda pelo contato com sangue, secreções genitais ou saliva materna. No pós-parto, o aleitamento materno é a principal forma de contaminação (Revello et al., 2006).

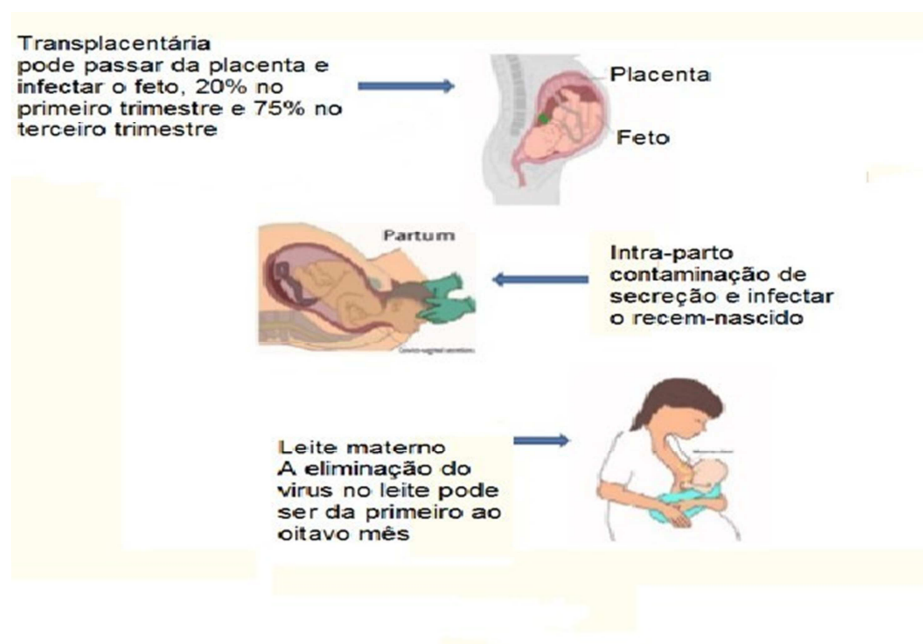


Figura 3: Rota de transmissão mãe-filho para HCMV (Bardanzellu et al., 2019).

A distinção entre infecção congênita e perinatal tem importância do ponto de vista de prognóstico e de planejamento do seguimento das crianças em longo prazo. A ausência do vírus na saliva e/ou na urina a partir do nascimento até 2 a 3 semanas de vida descarta o diagnóstico de infecção congênita. A detecção do vírus a partir da quarta até 12 a semana de vida indica infecção adquirida no período perinatal ou pós-natal precoce (Pass et al., 2006). A transmissão intrauterina de HCMV pode ocorrer em mães sem imunidade preexistente que adquirem infecção por HCMV pela primeira vez na gravidez (infecção primária) ou em mulheres com anticorpos preexistentes ao HCMV por reativação de uma infecção anterior ou por aquisição de uma cepa viral diferente (Boppana et al., 2001). Em caso de infecção primária durante a gravidez, a chance da transmissão do HCMV para o feto é de 30- 50%, entretanto, em grávidas já imunizadas, que reativam ou se infectam por outra cepa do HCMV, a chance da transmissão cai para 2% (Harvey e Dennis, 2008).

Um estudo observou que em um total de 604 recém-nascidos de mães soronegativas para HCMV antes da gravidez, 3% desenvolveram transmissão vertical, as mães tiveram primo infecção durante a gravidez, enquanto, dos 2.857 recém-nascidos de mães que já eram soropositivas para CMV, transmissão vertical ocorreu em 1% dos casos (Harvey e Dennis, 2008).

Embora o risco de sequelas por infecção congênita por HCMV seja mais alto para os filhos de mulheres que eram soronegativas ao CMV antes da gravidez, estima-se que 3/4 das infecções congênitas nos Estados Unidos ocorram entre mulheres que eram soropositivas para o CMV antes da concepção (Colugnati et al., 2007; Read et al., 2008). É provável que

essa proporção seja ainda maior em países com soroprevalências mais altas do CMV devido a grande disseminação da doença (Cannon, 2009).

A infecção congênita pode ocorrer em qualquer período da gravidez, embora as complicações clínicas para o feto sejam mais severas no 1º trimestre da gravidez, cerca de 35-45% diminuindo até 0-25% no 2º e 3º trimestres (Pass et al., 2006; Lazzarotto et al., 2010).

1.5 Manifestações clínicas

Cerca de 85 a 90% dos recém-nascidos (RN) com infecção congênita, confirmada laboratorialmente, são assintomáticos ao nascer. Cerca de 10% a 15% dos lactentes com infecção congênita podem estar em risco de sequelas como problemas neurológicos, icterícia, hepatoesplenomegalia, microcefalia, deficiência auditiva e trombocitopenia (Swanson e Schleiss, 2013; Dreher et al., 2014). Os recém-nascidos assintomáticos com infecção por HCMV ainda têm um risco aumentado de sequelas a longo prazo como se pode observar na Figura 4 (Dollard et al., 2007).



Figura 4: Frequência de sequelas em crianças com infecção congênita por HCMV. As caixas destacadas mostram crianças que desenvolvem deficiências permanentes. Os dados são de uma revisão de literatura, com

períodos de coleta variados, abrangendo vários anos. Fonte: adaptado de Dollard et al., 2007.

Entre essas sequelas estão problemas neurológicos e perda auditiva neurosensorial (Nassetta, 2009), tornando o HCMV a principal causa não hereditária de perda auditiva neurosensorial (Nance, 2006).

1.6- Diagnóstico

Atualmente, técnicas laboratoriais representam decisivo método de detecção da infecção materna pelo HCMV, já que apenas o diagnóstico clínico não denota confiabilidade plena, devido à presença de sintomas inespecíficos e leves. (Mocacarski e Charmain, 2011).

A maioria das infecções por HCMV em mulheres grávidas é assintomática, relata-se que menos de 5% das mulheres grávidas com infecção primária são sintomáticas e uma porcentagem ainda menor sofre de uma síndrome de mononucleose. Mesmo em casos raros com sintomas, as manifestações são inespecíficas e leves, como febre baixa persistente, dor muscular e aumento dos linfonodos (Pass e Boppana, 1999; Lazzarotto et al., 2008).

O diagnóstico de infecção primária por HCMV é simples se for detectada soroconversão para HCMV. No entanto, como a documentação da soroconversão do HCMV é rara, uma vez que as mulheres não são rotineiramente rastreadas quanto a anticorpos para o HCMV antes da gestação, a detecção do HCMV IgM tem sido usada como um marcador de infecção ativa ou recente pelo HCMV (Lazzarotto et al., 2008).

A infecção fetal só pode ser determinada por amniocentese, que deve ser realizada pelo menos 6 a 7 semanas após o tempo presumido de infecção materna e não antes da conclusão da 21ª semana de gravidez. Se esses critérios não forem atendidos, poderá ocorrer um resultado falso-

negativo (Hughes e Gyamfi-Bannerman, 2016; Schlesinger, 2016). Com o líquido amniótico é realizada a cultura viral ou a reação em cadeia da polimerase (PCR) e quando obtido um resultado positivo não é indicativo que o bebê apresentará sintomas, pois apenas de 10% a 15% dos recém-nascidos infectados manifestarão algum sintoma e, no caso de imagens fetais normais (ultrassonografia e ressonância magnética [RM]), é quase certo que não haverá sequelas neurológicas significativas e deficiência auditiva. Por outro lado, uma PCR negativa da amniocentese é considerada uma evidência muito forte de não transmissão e a gravidez pode ser continuada com segurança (Lipitz et al., 2013; Amir et al., 2016). O número de amniocenteses, realizadas após 21 semanas de gestação, é muito baixo, devido aos riscos do método.

O diagnóstico no recém-nascido é feito pela detecção viral em fluidos corporais via PCR, cultura ou teste de antígeno (antígeno pp65) nas primeiras 3 semanas de vida (Bhatia et al., 2010). A descoberta de anticorpos HCMV ou DNA viral após esse ponto dificulta a distinção entre infecção adquirida congênita e pós-natal. Os títulos de anticorpos não podem fazer o diagnóstico de maneira confiável, pois a IgG materna do HCMV atravessa a placenta e os neonatos apresentam respostas fracas de IgM. As amostras preferidas são saliva e urina, pois os recém-nascidos eliminam altos níveis do vírus desses fluidos (Boppana et al., 2011; Kadambari et al., 2011).

1.7 Técnicas de diagnóstico para Citomegalovírus humano

1.7.1 Cultivo

O HCMV replica eficientemente em fibroblastos humanos. As linhagens celulares mais frequentemente usadas são as células MRC-5 (fibroblastos de pulmão embrionário). O isolamento do vírus está diretamente relacionado

com a sua carga viral, e a observação do efeito citopático nas células MRC-5 pode demorar até 30 dias (Méndez, 1999). A melhor alternativa para a propagação do vírus em cultura celular é a técnica de *shell-vial* (SV), que permite um diagnóstico entre 18-48 hs. Este método utiliza centrifugação em baixa velocidade para favorecer a penetração do vírus nas células MRC-5, seguido por incubação para amplificação das proteínas virais e, finalmente, a detecção dessas proteínas é realizada por imunofluorescência com anticorpos específicos para uma proteína nuclear do HCMV (Méndez, 1999).

1.7.2 Prova de Antigenemia

O diagnóstico de HCMV por antigenemia usa anticorpos monoclonais para detectar a proteína viral do tegumento pp65, produto do gene UL83, que é um antígeno viral encontrado em grande quantidade em leucócitos de sangue periférico durante a infecção por citomegalovírus. A detecção da antigenemia permite a detecção rápida do HCMV presente no núcleo dos neutrófilos do sangue periférico que fagocitaram o vírus. A antigenemia também é utilizada para avaliação da resposta ao tratamento antiviral e apresenta sensibilidade superior a cultura e comparável a PCR quantitativa. (Méndez et al., 1999; Grefte et. al., 1992).

1.7.3 Microscopia Eletrônica

Dentre as vantagens deste método estão a rapidez de liberação de resultados positivos (entre 15 e 30 minutos) e a possibilidade de examinar materiais eventualmente contaminados por fungos ou bactérias, que não são apropriados para isolamento viral. Esta técnica é utilizada em amostras de urina de recém-nascidos com transmissão vertical ou perinatal que contêm títulos elevados (10^3 – 10^6 TCID₅₀/ml) de HCMV. Usando a microscopia eletrônica, é possível demonstrar esta viremia (Taylor, 2003).

Diversos autores relatam que a detecção da infecção ativa pelo HCMV por microscopia eletrônica em recém-nascidos infectados ocorre em aproximadamente 80% dos casos. Resultados falso-negativos são claramente atribuídos às amostras de urina que apresentem baixos títulos de HCMV (<10 ao cubo TCID₅₀/ml). Já a especificidade desta técnica foi relatada em 100%, devido ao fato de que raramente outros herpesvírus humano sejam encontrados em títulos elevados na urina dos recém-nascidos (Lazzarotto et al., 2011). Em pacientes imunossuprimidos, a técnica de microscopia eletrônica não pode ser usada por diversas razões, pois primeiramente, os títulos de CMV encontrados em amostras clínicas de adultos geralmente são mais baixos do que em recém-nascidos e em segundo lugar, a técnica de microscopia eletrônica não distingue os vários tipos de herpesvírus que frequentemente infectam pacientes imunossuprimidos. Sendo assim, esta não é considerada uma boa técnica para guiar a terapia antiviral específica para estes pacientes (Taylor, 2003).

1.7.4 Diagnóstico Molecular

O DNA do HCMV possui algumas regiões homólogas ao DNA humano que devem ser levadas em conta na hora de utilizar técnicas como a reação em cadeia de polimerase (PCR) ou sondas de hibridização (Griffiths et al., 2009). Atualmente, a PCR e a PCR em tempo real são as técnicas moleculares mais empregadas para detecção e quantificação de DNA de HCMV em amostras clínicas, já existem métodos moleculares totalmente automatizados para determinação da carga viral do HCMV.

O diagnóstico de neonatos infectados por citomegalovírus congênitos deve incluir PCR em tempo real de saliva, urina ou ambas nas primeiras 3 semanas de vida (Rawlinson et al., 2017).

Para o diagnóstico pré-natal de transmissão vertical, o método elegido é a PCR quantitativa do líquido amniótico. A amniocentese é recomendada

se houver infecção durante a gestação (soroconversão, IgM, IgG, baixa avidéz) ou se observam anomalias ecográficas, independente se a mãe teve ou não infecção primária durante a gestação, já que o HCMV pode ser transmitido congenitamente durante a reativação ou reinfecção. A presença de DNA de HCMV em líquido amniótico confirma a infecção intraútero, ao mesmo tempo em que uma carga viral elevada, > 10 a quinta cópias/ml em líquido amniótico, indica alto risco de desenvolver infecção sintomática. (Taylor, 2003; Fujii et al., 2017).

No recém-nascido, a presença de DNA de HCMV em amostras de urina ou saliva nas primeiras 3 semanas de vida, confirma o diagnóstico de transmissão vertical. A detecção de DNA de HCMV em sangue ou líquido céfalo-raquidiano também é possível, mas sensibilidade é menor (Pass et al., 2006).

O Real-Time qPCR (PCR quantitativo em tempo real) é um importante desenvolvimento da tecnologia de PCR que permite a detecção e medição de produtos gerados durante cada ciclo do processo de PCR. Tornou-se possível através da introdução de iniciadores, sondas ou produtos amplificados marcados com moléculas fluorescentes, os quais produzem mudança no sinal de fluorescência quando interagem diretamente ou quando há hibridização com o produto amplificado (Sanjay e Kramer, 1996).

A curva ideal apresenta-se de forma sigmoidal. Quando há quantidade suficiente do produto amplificado, as taxas de amplificação entram em uma fase linear, que em condições ideais a quantidade de produto amplificado aumenta a razão de 1 \log_{10} a cada 3,32 ciclos. Conforme os reagentes são consumidos a reação entra em uma fase de transição, chegando à fase de platô, onde não há aumento da emissão de fluorescência (figura 5), (Sanjay e Kramer, 1996).

Existem três métodos de detecção de produtos da PCR em tempo real, sendo: SYBR green, o qual emite fluorescência quando ligado ao DNA de fita dupla; o FRET, que se baseia no uso de sondas marcadas com corantes fluorescentes e segue o princípio de transferência de energia de ressonância fluorescente, e o mais usado que é baseado na interação de sondas fluorescentes Taqman (Sanjay e Kramer, 1996).

A sonda Taqman é uma sonda oligonucleotídica, concebida para hibridar no interior da sequência alvo. A clivagem da sonda ocorre durante a PCR por causa da atividade de nuclease 5' de Taq polimerase que pode ser utilizado para detectar a amplificação específica do produto-alvo (Tyagi e Kramer, 1996).

Seu princípio baseia-se na atividade de exonuclease 5'-3' da Taq polimerase para clivar uma sonda duplamente marcada durante a hibridação para a detecção complementar da sequência alvo e a detecção baseada no fluoróforo. Tal como em outros métodos de PCR quantitativos o sinal da fluorescência resultante permite medições quantitativas da acumulação do produto durante as fases exponencial do PCR. No entanto, a sonda TaqMan aumenta significativamente a especificidade da detecção (Tyagi e Kramer, 1996).

As sondas TaqMan hibridam dentro de uma região de DNA que é amplificado por um conjunto específico de iniciadores. Como a polimerase Taq estende o iniciador e sintetiza a cadeia simples, a partir de 3' para 5' da cadeia complementar, a atividade de 5' a 3' exonuclease da polimerase Taq degrada a sonda que tenha emparelhado com o molde. A degradação da sonda liberta o fluoróforo a partir dele e quebra a estreita proximidade com o inibidor, de modo a aliviar o efeito de extinção e permitindo a fluorescência do fluoróforo. Assim, a fluorescência detectada no termociclador de PCR quantitativa é directamente proporcional ao fluoróforo libertado e a

quantidade de DNA molde amplificada. Valores abaixo de CT 38 são considerados positivos.

A metodologia da PCR em tempo real representou significativa contribuição para o diagnóstico clínico por ser um método mais rápido e mais sensível, mas ainda é uma técnica de alto custo.

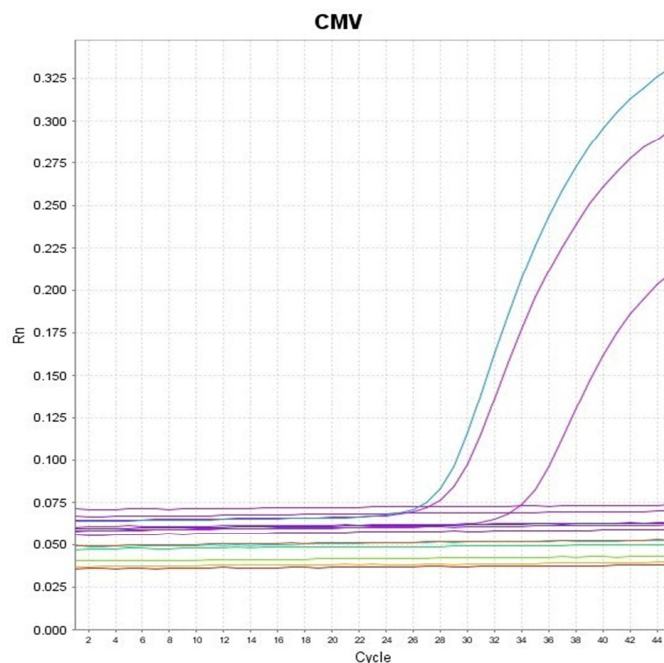


Figura 5: Curva de Amplificação do DNA do HCMV por Real Time PCR (TaqMan).

1.8- Tratamento

Embora muitos medicamentos antivirais tenham sido aprovados nos últimos 40 anos, apenas alguns foram aprovados para as infecções por citomegalovírus e esses agentes são limitados em sua utilidade terapêutica por causa de atividade antiviral modesta, baixa biodisponibilidade,

resistência a medicamentos e / ou toxicidades a medicamentos (Chen et al., 2020).

Os medicamentos atualmente disponíveis para terapia antiviral de infecções por HCMV incluem os inibidores da polimerase de DNA viral, como o ganciclovir (GCV), o cidofovir (CDV) e o foscarnet (FOS) (Krishna et al., 2019).

A terapia de escolha para infecções por HCMV é o ganciclovir que foi aprovada há 24 anos e é usada rotineiramente para tratamento, profilaxia e terapia preventiva. O GCV é um análogo de nucleosídeo que, quando fosforilado para formar trifosfato de ganciclovir, inibe preferencialmente a DNA polimerase viral UL54. (Krishna et al., 2019). Mas sua eficácia modesta e toxicidade limitadora de dose impulsionam o desenvolvimento de infecções resistentes a medicamentos, particularmente em hospedeiros imunocomprometidos (Griffiths, 2019).

As terapias secundárias para infecções por HCMV incluem o cidofovir e o foscarnet, ambos associados à nefrotoxicidade e também podem dar origem a infecções resistentes (Lurain e Chou, 2010; Piret et al., 2017) O tratamento com letermovir (LTV) é promissor e tem o potencial de melhorar significativamente os esquemas para o tratamento desse vírus e pode formar a base de uma terapia combinada altamente eficaz para esse vírus. No entanto, também serão necessários agentes adicionais para uma terapia de combinação eficaz que seja suficientemente bem tolerada para os regimes de tratamento prolongados necessários em indivíduos e infecções por HCMV, de alto risco (Piret et al., 2017).

Outro candidato inibidor atraente foi o oligonucleotídeo fosforotioato fomivirsen, que se liga especificamente a sequências complementares aos principais locais de transcrição imediato-precoce do HCMV, de modo a inibir a expressão do gene viral. No entanto, atualmente esses compostos

inibidores aguardam uma análise mais aprofundada antes de poderem ser utilizados clinicamente. (Chen et al., 2020).

Como a terapia antiviral se tornou amplamente utilizada em várias doenças, incluindo doença associada ao citomegalovírus humano, também se tornou crucial entender os mecanismos e consequências clínicas da resistência aos medicamentos antivirais que podem variar de toxicidade inerente ao uso de antivirais designados como de segunda linha nas diretrizes do tratamento, a doença grave e até morte por infecção viral progressiva quando nenhum tratamento alternativo eficaz está disponível. Enquanto os mecanismos e o impacto clínico da resistência aos medicamentos antivirais foram bem descritos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite B (HBV) e o vírus da influenza, eles foram bem menos caracterizados para HCMV mesmo com o HCMV resistente a medicamentos também sendo uma grande preocupação clínica. Mudanças espontâneas no genoma viral durante a replicação viral podem levar ao surgimento de uma população viral resistente aos medicamentos. Consequências secundárias do nucleotídeo associado à resistência ou as substituições de aminoácidos podem incluir alterações na patogenicidade viral, transmissibilidade e estabilidade genética. O desenvolvimento de resistência antiviral muitas vezes pode aumentar em frequência e significância com agentes antivirais utilizados mais amplamente (Komatsu et al., 2014).

Tentativas recentes de desenvolver novos compostos anti-HCMV concentraram-se no complexo de terminase viral envolvido na clivagem e empacotamento do DNA viral. O complexo terminase é altamente específico para HCMV e não tem equivalente em células de mamíferos, representando assim um ótimo alvo de escolha para novos antivirais. A subunidade menor do complexo terminase do HCMV complexo é codificada pela região aberta de leitura (ORF) UL89 e inúmeras mutações associadas à resistência a

medicamentos pelo HCMV foram detectadas neste sítio (Thoma et al., 2006, Buerger et al., 2001).

Novos agentes com eficácia aprimorada e que inibem novos alvos biológicos serão constituintes extremamente valiosos dessa terapia, se for necessário obter a supressão em longo prazo da replicação do vírus. Por esses motivos, é imperativo o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o HCMV com melhores perfis de segurança, eficácia e resistência.

1.9 Profilaxia

Entre as medidas de prevenção da infecção pelo HCMV, principalmente, para gestantes HCMV-soronegativas estão à adequada higiene pessoal, não beijar crianças abaixo de seis anos na boca ou bochechas, não compartilhar alimentos ou utensílios com crianças, e, se necessário realizar transfusão sanguínea em gestante susceptível, utilizar produtos HCMV-negativos, tornam-se extremamente relevantes para o controle da transmissão vertical dessa doença (Coyne e Lazear, 2016).

Apesar de sua carga substancial de doenças, duas pesquisas mostraram que menos de uma em cada cinco mulheres ouviram falar do HCMV e que, entre essas mulheres, a maioria não tem conhecimento dos resultados da doença, modos de transmissão ou medidas preventivas. Em uma pesquisa, a conscientização sobre o HCMV foi menor do que em qualquer outra condição incluída na pesquisa. (Jeon et al., 2006; Ross et al., 2008).

Vauloup-Fellous et al. (2009) reportaram que aconselhamento acerca de higiene administrado durante a gravidez reduz a taxa de soro conversão, motivando a equipe obstétrica nesse cuidado.

O desenvolvimento de vacina contra o vírus representa uma das prioridades no cenário atual dessa doença. Em 2009, foram publicados os primeiros resultados de estudo sobre vacina que contém glicoproteína B recombinante do envelope do HCMV com o adjuvante MF59. Concluíram os autores que essa vacina apresenta potencial de reduzir a incidência de casos de infecção materna e congênita pelo HCMV. Todavia, estudos futuros (em fase III) são necessários para confirmar a eficácia (Pass, 2009; Bernstein et al., 2016).

Na Itália, a triagem de mulheres grávidas para detecção de infecção primária por citomegalovírus é realizada há mais de uma década e os virologistas demonstram a viabilidade dessa abordagem (Revello et al., 1998; Guerra et al., 2007).

A infecção por HCMV no recém-nascido é um importante problema de saúde pública devido ao elevado risco de consequências adversas tardias tanto em crianças sintomáticas quanto assintomáticas ao nascer. A identificação e acompanhamento especializado do RN portador de deficiência auditiva podem propiciar intervenção precoce e evitar maior comprometimento. Considerando-se que a grande maioria dos RN portadores de infecção congênita pelo CMV é assintomática ao nascimento, somente a realização sistemática de triagem neonatal dessa infecção permitiria a identificação precoce desses RN (Ministério da Saúde, 2013). Apesar de sua importância e da disponibilidade de testes moleculares rápidos e específicos, inúmeras crianças ainda sofrem pela doença congênita causada pelo citomegalovírus e permanecem sem diagnóstico no Brasil, uma vez que o SUS não realiza triagem para o citomegalovírus de forma contínua.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência da infecção congênita pelo HCMV em crianças de até 1 mês de idade no estado de São Paulo de 2010 a 2018.

2.2 Objetivos específicos

- (A) Determinar a frequência de infecção por HCMV em amostras de urina provenientes de crianças recém-nascidas com suspeita da doença.
- (B) Analisar geneticamente as cepas de HCMV detectadas para os genótipos das glicoproteínas gB e gN, visando identificar uma possível relevância clínica.
- (C) Analisar geneticamente as cepas de HCMV detectadas para o gene UL89, visando identificar potenciais resistências a medicamentos.

3. Material e Métodos

3.1 Casuística

De 2010 a 2018, um total de 1279 amostras de urina foram recebidas no Laboratório de Doenças Respiratórias, Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz para a realização do diagnóstico de HCMV.

Deste total, 275 amostras foram selecionadas com base em: (i) crianças <1 mês que apresentavam sinais clínicos de transmissão congênita, perinatal ou pós-natal por HCMV, (ii) crianças <1 mês cuja mãe realizou exame de sorologia nas Unidades Básicas de Saúde e apresentou IgM positiva para HCMV em algum momento do período gestacional e (iii) disponibilidade da amostra clínica preservada no laboratório. Os recém-nascidos possuíam registros de sinais clínicos de transmissão congênita, perinatal e pós-natal por HCMV ou registros de que a mãe realizou o exame de sorologia nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) e obteve resultado de IgM positivo. As amostras utilizadas no presente estudo foram coletadas nas seguintes unidades parceiras: (i) Departamentos Regionais de Saúde (DRS I a XVII), (ii) Hospital das Clínicas de São Paulo, (iii) Hospital Emilio Ribas, (iv) Hospital Universitário da Universidade de São Paulo e (v) Hospital da Santa Casa de São Paulo.

Todas as urinas permaneceram estocadas em freezer -70°C até o momento da análise. Destas 275 amostras de urina selecionadas nenhuma outra amostra biológica pertencente ao mesmo paciente estava disponível para teste no laboratório. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética (Anexo II).

A seleção das amostras foi dividida em dois períodos:

Primeiro período de 2010 a 2016: foi realizada uma pesquisa retrospectiva envolvendo análise de banco de dados, onde foram selecionadas 132 amostra de urina que se enquadravam nos critérios de seleção. Neste período o diagnóstico dessas amostras era realizado utilizando a metodologia de PCR convencional, ao final do ano de 2016 ocorreu a implantação da técnica de qPCR real time no Núcleo de Doenças Respiratórias e o com intuito de validar essa nova metodologia para o diagnóstico de HCMV essas amostras foram analisadas novamente utilizando esta técnica e obtiveram seu diagnóstico anterior confirmado.

Segundo período de 2017 a 2018: foram selecionadas as amostras de urina que estavam dentro dos critérios de seleção e realizado o teste de qPCR, ao final do período um total de 143 amostras foram testadas.

3.2 Extração DNA

Os ácidos nucleicos das amostras foram extraídos utilizando o protocolo otimizado do Kit de extração de DNA QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen-Germany) para rápida e eficiente purificação de ácido nucléico viral. Utilizando micro tubo estéril de 2,0mL, foi adicionado 200µL de urina, 20µL de proteinase K e 200µL de tampão AL (incluso no Kit), seguido de incubação a 56°C por 10 min. Após o período de incubação, centrifugou-se rapidamente para remover gotas da tampa. Foi adicionado 200µL de etanol absoluto. A mistura foi agitada no vórtex e incubada por 15 segundos. Após adicionada a mistura na coluna de purificação do Kit, foi seguido de centrifugação 6.000g por 1min. A coluna foi lavada com 500µl de tampão W1 “Buffer AW1” centrifugação 6.000 x g por 1min. Após foi adicionado 500 µl de “Buffer AW2” centrifugação 6.000 x g por 1min de acordo com o protocolo

do fabricante. O ácido nucléico foi eluído com 60µl Buffer AE (água estéril livre de RNase e DNase), após incubação por 5 min à temperatura ambiente e centrifugação a 6000xg por 1 min. O material extraído foi armazenado a - 20°C até o momento do uso.

3.3 PCR em Tempo Real

O produto da extração das amostras foi submetido à técnica de PCR em Tempo Real para detecção do DNA viral. Na tabela 1, estão descritos os iniciadores utilizados e a sonda do tipo hidrólise marcada na região 5´terminal com a molécula sinalizadora 6-carboxifluorescência (FAM) e na região 3´terminal com Blackhole Quencher 1 (BHQ1). A região alvo da reação (major-immediate early - MIE gene) e o tamanho do amplicon gerado (~76 bp). No teste de qPCR para Citomegalovírus humano as amostras foram consideradas positivas quando um valor de Ct ≤39 foi obtido. Os primers para o HCMV foram descritos por Watzinger et al. 2004.

Tabela 1: Tabela do desenho dos primers e sonda do tipo hidrólise marcada na região 5´terminal com a molécula sinalizadora 6-carboxifluorescência (FAM) e na região 3´terminal com Blackhole Quencher 1 (BHQ1). Gene da região *major-immediate early*.

Primers e Sonda	Sentido	Sequência (5' para 3') Sonda (5' 3')	Posição no genoma
CMV1	Sense	AACTCAGCCTTCCCTAAGACCA	2414–2435
CMV	Antisense	GGGAGCACTGAG GCA AGTTC	2470–2489
CMV2	Sonda	CAATGGCTGCAGTCAGGCCATGG	2437–2459

Para avaliar a qualidade da extração foi realizada uma PCR em tempo real de um controle interno de primers cujo alvo foi a RNaseP humana (controle endógeno) seguindo o protocolo recomendado pelo Center for Disease and Control (CDC) Tabela 2.

Tabela 2. Desenho das sequências dos primers endógenos do gene alvo RNase P humana PCR em tempo real para controle na reação.

Primer	Sentido	Sequência (5'para 3')	Produto amplificado
RnasePS	Sense	AGATTTGGACCTGCGAGCG	65 pares de bases
RnasePA	Antisense	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	
RnaseP	Sonda	6-FAMd(TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG)BHQ-1	

A reação da PCR em Tempo Real foi realizada de acordo com o protocolo descrito Watzinger et al. (2004). Brevemente, a reação foi realizada no volume de 25µL, contendo tampão de reação (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,5µL de enzima Superscript-Taq, 0,2 µM de cada iniciador, 0,2µM de sondas marcadas (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 5µL de DNA. As amostras foram processadas em triplicata, incluindo um controle negativo. Foi utilizado o termociclador Applied Biosystems 7500 com o programa 50°C por 2 min, 95°C por 10 min e 50 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Quatro controles positivos com números de cópias conhecidos foram utilizados como padrões de quantificação.

3.4 – PCR convencional para amplificação das glicoproteínas gB e gN.

As amostras positivas na qPCR foram selecionadas para a caracterização molecular dos genótipos de HCMV. As reações de PCR convencional foram realizadas utilizando-se primers para a região variável do gene UL55 (glicoproteína gB e gN) e previamente descrito por Nahar et al, 2018.

As reações foram realizadas em um volume final de 90 µL contendo volume final 90ul da mistura para cada amostra, contendo água pura 50,5uL (livre de DNA e RNA); 10X tampão PCR 10,0uL; MgCl (50mM) 3,0uL; DNTP 10uM(2Ucada) 16,0uL; primer F (20mM) 5,0uL; primer R (20mM)0,5uL; 2,5U

de Taq Polymerase 0,5uL; 200 µM de dNTPs 0,5UL (Reagentes Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e adicionado 10uL amostra Extraída do paciente (DNA).

A PCR utilizando os primers gB e gN foi realizada nas condições: 94°C por 10 min., seguido por 35 ciclos: 96°C por 2 min, 96°C por 30 seg., 60°C por 30 seg, 72°C por 40 seg finalizando 1 ciclo de 72°C por 5 min . A PCR com os primers gB1 e gB2 foi realizada nas condições: 96°C por 2min; 35 Ciclos: 94°C por 5 min, 94°C 45 seg, 62°C por 1 min, 72°C por 45 seg e finalizando 1 ciclo de 72°C por 5 minutos.

As amostras amplificadas foram aplicadas em gel de agarose 2% utilizando 10uL de Gel Red para cada 100 mL de agarose. Foi utilizado 10uL de cada amostra acrescidas de 1ul de azul de bromofenol, também foi utilizado 10uL de padrão de Peso molecular de 100pb (Reagentes Invitrogen).

As amostras foram visualizadas no gel através do software de análise e captura de imagem de eletroforese em gel de DNA L-PIX IMAGE (Loccus Biotecnologia), onde as amostras amplificadas com os primers, gB1 e gB2 geraram um produto de 618pb e as amostras amplificadas com os primers gN1 e gN2 geraram um produto de 518pb (Tabela 3).

Tabela 3: Desenho das sequências dos primers para a região variável do gene UL55 das glicoproteínas gB1-2 e gN1-2 do HCMV, posição dos primers e tamanho do produto amplificado (PCR convencional).

Primer	Sentido	Sequência (5' para 3')	Nº de acesso	Tamanho do fragmento
gB1	Sense	TCTGGGAAGCCTCGCAAACG	GenBank	618pb
gB2	Antisense	GAGTAGCAGCGTCCTGGCGA	M6092444	
gN1	Sense	GGCGGTGGTGTGATGGAGTG	GenBank	518pb
gN2	Antisense	AATAGCCTTTGGTGGTTGC	KY490087	

3.5 PCR convencional do gene UL89.

As reações de PCR convencional foram realizadas utilizando-se primers para a região conservada do gene UL89 (glicoproteína gBs-a) previamente descrito por Chmielewicz et al, 2001. As amostras amplificadas foram selecionadas para a caracterização molecular.

As reações foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo da mistura para cada amostra, contendo água pura qsp. (livre de DNA e RNA); 10X tampão PCR 2,5ul; MgCl (50mM) 1,0ul; DNTP 10uM(2Ucada) 1,0ul; primer s(10mM) 1,0ul; primer a (10mM)1,0uL; Taq Polymerase (5U) 0,30uL; (Reagentes Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e adicionado 5ul amostra Extraída do paciente (DNA).

A PCR utilizando os primers gB UL89 foi realizada nas condições: 96°C por 1 min., 1 ciclo seguido por 25 ciclos: 96°C por 1min, 25 ciclos de 96°C por 15 seg., 50°C por 15 seg, 60°C por 4 min. finalizando 1 ciclo de 72°C por 5 min.

As amostras foram visualizadas no gel através do software de análise e captura de imagem de eletroforese em gel de DNA L-PIX IMAGE (Loccus Biotecnologia), onde as amostras amplificadas com os primers gBs e gBa geraram um produto de 519pb (Tabela 4).

Tabela 4: Desenho das sequencias dos primers para a região conservada do gene UL89 das glicoproteínas (gB sense e antisense) do HCMV, posição dos primers e tamanho do produto amplificado (PCR convencional).

Primer	Sentido	Sequência (5'para 3')	Número de acesso	Tamanho do fragmento
gBa	Antisense	ACAGCCACGCCNGTICCI	GU179290	519pb
gBs	Sense	TTGTGGACGAGRSIMAYT		

3.6 – Sequenciamento genético

Os produtos da PCR convencional utilizado os primers para a região conservada do gene UL89 foram submetidos à purificação através do Kit ExoSAP-IT™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que trata produtos de PCR com tamanhos que variam de menos de 100 pb a mais de 20 kb, sem perda de amostra, removendo os primers e nucleotídeos não utilizados.

Foram utilizados 5 µL de cada produto da PCR convencional região UL89 e adicionado a 2 µL de reagente ExoSAPIT™ para obter um volume de reação combinado de 7 µL. Essa mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos

para degradar os primers e nucleotídeos restantes. Posteriormente foi incubada a 80°C por 15 minutos para desativar o reagente ExoSAP-IT™.

Foi utilizada a técnica de sequenciamento Sanger (Sanger et al. 1977), utilizando-se dedesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os mesmos *primers* usados na reação de PCR (convencional) (tabela 4).

Para cada amostra foram feitas duas reações distintas cada uma com o seu respectivo primer do gene UL89 sense e antisense: 2uL de primer gB senso, 2 uL do primer gB anti-senso, 7uL de água, 4uL de BigDye, 5uL de Tampão 5x e 2uL de DNA da amostra, assim atingindo um volume final de 20uL por reação. As amostras foram submetidas a PCR para sequenciamento, onde ocorreu incorporação dos didesoxinucleotídeos marcados, em termociclador, seguindo o programa: 1 Ciclo (96°C- 2 min.) 25 Ciclos (96°C- 45seg; 55°C- 30seg; 60°C- 4 min.).

O produto de sequenciamento foi purificado utilizando colunas de centrifugação *Centri-Sep™ spin columns* (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante e aplicados no analisador automático de DNA (sequenciador automático) modelo ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Inc., EUA) utilizando o polímero POP7 (Applied Biosystems, Inc., EUA).

3.7 - Análise genética das sequências

Os cromatogramas obtidos do gene UL89 que identifica mutações de resistência a medicamentos contra HCMV, com amplificação de 519pb, através da análise do sequenciador automático foram editados manualmente a fim de se obterem sequências consenso (*contigs*), usando o software *Sequencher*TM 4.7 (Gene Codes Corporation, Michigan, EUA). O site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) foi utilizado como ferramenta para a comparação das sequências consenso obtidas para a identificação dos genótipos, Tabela 5.

Tabela 5: Sequências obtidas do *GenBank* pertencentes ao HCMV e comparadas com duas amostras do nosso estudo, as duas últimas são relacionadas ao HHV6 e HHV7.

GenBank	Amostra clínica	País	Ano
GU179290	Urina	Reino Unido	2003
JX512204	Urina	Alemanha	2007
KP745719	Urina	Bélgica	2010
KT726954	Urina	Reino Unido	2012
KT634296	Fluído amniótico	Austrália	2013
KU550090	Urina	França	2013
KJ361968	Líquido amniótico	Itália	2015
KY123652	Biopsia renal	Alemanha	2016
KX544840	Urina	Estados Unidos	2016
KR534212	Líquido amniótico	Reino Unido	2016
MF084224	Urina	Grécia	2016
KY490087	Sangue transplantado	Reino Unido	2017
MF871618	Medula óssea	Alemanha	2017
*AF 037218	(Células TCD4) Cepa HHV7	Estados Unidos	2009
**KY315553	Cepa (JHPT-B12) HHV6	Estados Unidos	2018

*Cepa HHV7 ** Cepa do vírus HHV6

As sequências consenso geradas por edição manual e o conjunto de sequências cognatas de HCMV, disponíveis e retiradas da base de dados *GenBank*, foram alinhadas utilizando o programa *Clustal W* (Thompson et al 1994). Ajustes manuais foram feitos para melhorar o alinhamento utilizando o software *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA), incluindo a adequação dos *frames* de tradução (1, 2 e 3). O cálculo da matriz de identidade de nucleotídeos (distância genética) e de aminoácidos foi determinado utilizando os softwares *Megalign* (DNASTar, Inc., Madison, Wisconsin EUA) e *BioEdit* (Ibis Therapeutics, EUA). As distâncias genéticas foram estimadas pelo Método de Correção de Poisson. As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando os softwares MEGA versão 6.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura et al 2013). As árvores genealógicas foram construídas com base no modelo evolutivo Kimura 2- parameter, utilizando o algoritmo de distância Neighbor-Joining (NJ). O valor de *bootstrap* foi calculado com 1000 repetições.

3.8- Identificação de mutações de resistência a medicamentos contra HCMV

A presença de possíveis mutações associadas à resistência a drogas antivirais contra HCMV no gene UL89 foi identificada utilizando a ferramenta pública de Web “*MRA-mutation resistance analyzer*” disponível no site <https://www.informatik.uni-ulm.de/ni/staff/HKestler/hcmv>”.

3.9- Número de Acesso

As sequências de nucleotídeos determinadas neste estudo foram depositadas no GenBank sob os números de acesso: MT345567 e MT447555.

4- Resultados

No período em análise, foram selecionadas 275 amostras de urina de crianças de até 1 mês de idade, do estado de São Paulo encaminhadas para o Instituto Adolfo Lutz para a realização do diagnóstico de HCMV.

Das 275 amostras de urina que foram submetidas a rastreio de HCMV através de PCR em tempo real, 32 amostras (11,6%) apresentaram resultado positivo com valor de Ct variando entre 23,0 e 36,0 (Anexo I) sendo o Ct médio de 30,59 e 243 (88,4%) foram negativas. Das 132 amostras selecionadas no banco de dados entre os anos de 2010 e 2016 (primeiro período), 24 espécimes foram positivos para HCMV (18,2%) por qPCR e 128 negativos (81,8%). Das 143 amostras de urinas testadas nos anos de 2017 e 2018 (segundo período), um total de 8 espécimes positivos (5,6%) e 135 negativos (94,4%) para HCMV foram obtidos, respectivamente (Figura 6).

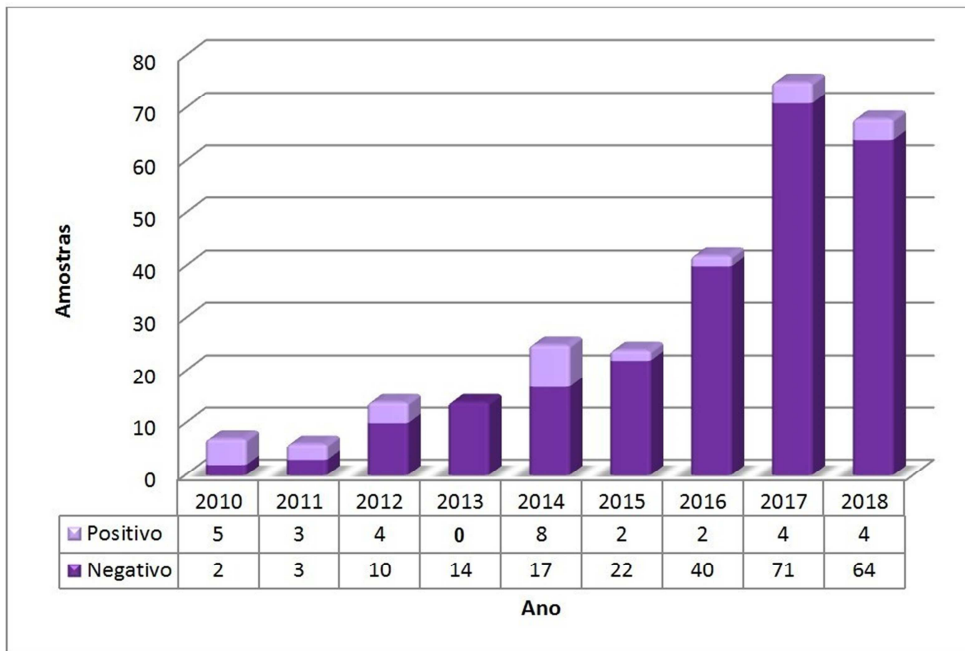


Figura 6: Positividade de amostras distribuídas por ano, resultado obtido através do teste de qPCR.

Na Figura 7 está representada a distribuição dos pacientes por idade, onde observa-se 217 (79%) pacientes possuem menos de 15 dias de vida e que 58 (21%) possuem 15 dias de vida ou mais.

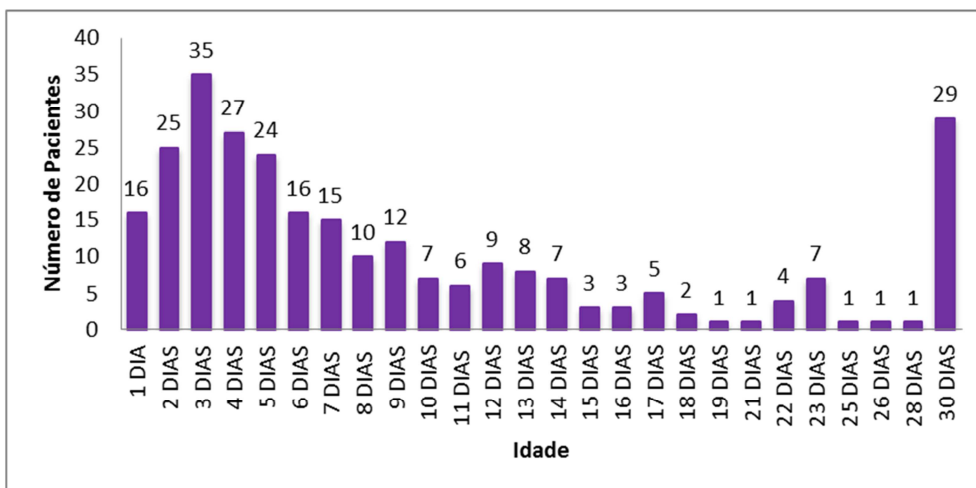


Figura 7: Distribuição dos pacientes por idade.

Crianças com idade entre 0 e 3 semanas apresentaram maiores taxas de detecção de HCMV (84,4%; 27/32; Ct médio = 30,62) do que crianças na faixa etária de > 3 semanas (15,6%; 5/32; Ct médio = 30,40) (Figura 8). A idade média foi de 10,3 dias (variação: 2 dias a 30 dias) enquanto a mediana das idades foi de 6 dias. Não foram observadas diferenças significativas entre a carga viral de HCMV (valores de Ct) e a idade das crianças.

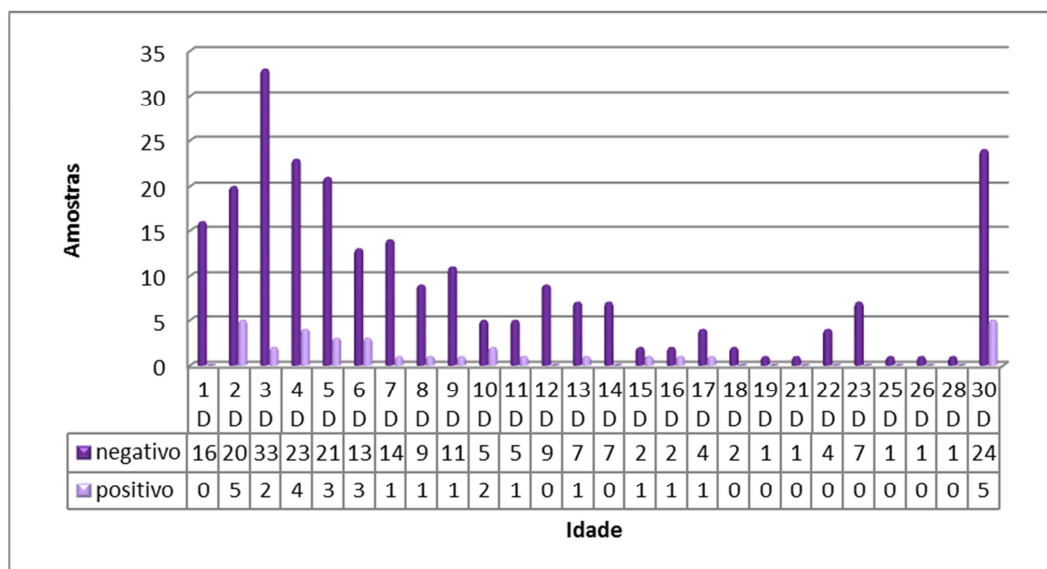


Figura 8: Distribuição de positividade das amostras por idade em dias.

Das 32 amostras positivas para HCMV detectadas por qPCR, apenas 6 amostras referentes aos pacientes 169, 190, 220, 229, 230 e 259 (Anexo I) foram amplificadas com sucesso por PCR convencional utilizando primers gBs e gBa (gene UL89) e visualizadas em gel de agarose 2% apresentado bandas em torno de 519pb como pode-se observar na figura 9. Ainda nesta figura, observamos bandas inespecíficas, as quais não possuem interesse para o nosso estudo.

Sendo o produto esperado para a nossa análise refere-se a 519pb.

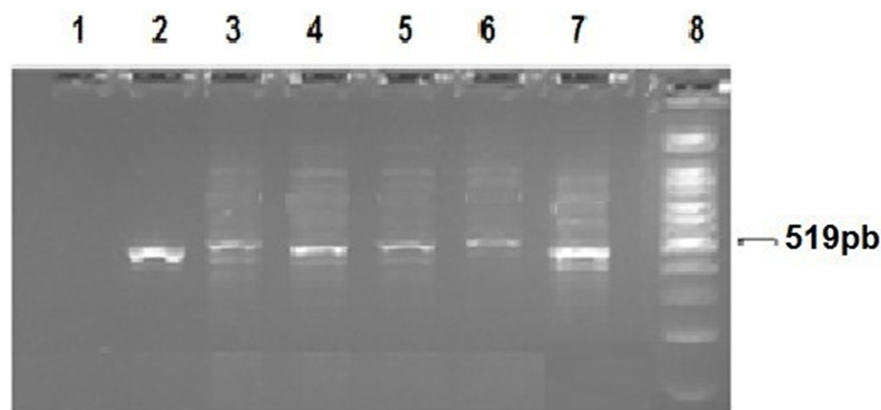


Figura 9: Amplificação do gene UL89 do HCMV em gel de agarose 2%, apresentando bandas em torno de 519pb. Na coluna 1 foi utilizada água ultrapura, nas colunas 2(230), 3(169), 4(190), 5(220), 6(229), 7(259) amostras positivas e na coluna 8 o padrão de peso molecular.

Embora várias tentativas tenham sido feitas para obter a amplificação das glicoproteínas gB e gN, todas foram mal sucedidas. Assim, não foram obtidos dados que pudessem identificar os genótipos de HCMV detectados no presente estudo. 519pb.

As 6 amostras amplificadas para o gene UL89 foram submetidas à reação de sequenciamento e 2 cepas (amostras IAL-230 e IAL-259) foram sequenciadas com sucesso. A verificação do genótipo e a análise filogenética foram realizadas com fragmento de 510pb correspondente a *DNA packaging terminase subunit 1* do gene UL89. A árvore genética inclui as cepas sequenciadas neste estudo (destacadas em negrito), juntamente com as sequências protótipos obtidas no GenBank. O número de acesso, isolados, país e ano de cada cepa estão indicados na Tabela 5. A escala indica o número de resíduos de nucleotídeos divergentes. Os valores de inicialização são mostrados como porcentagens nos nós da ramificação. As amostras IAL-230 e IAL-259 foram classificadas como betaherpesvírus

humano 5 (HHV-5), formando um grupo monofilético bem suportado. Sequências referência HHV-6 e HHV-7 foram utilizadas como grupos externos (*outgroups*). As sequências entre os 2 isolados brasileiros apresentaram identidade máxima de 100% (100% aa). Valores elevados de similaridade nucleotídica (94,3% nt, 93,9–100% aa) também observados após a comparação com outras cepas de HHV-5 identificadas mundialmente (Figura 10 e 11).

Porcentagem de identidade

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
D	1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1	230
i	2	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	2	259
v	3	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	3	GU178280
e	4	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	4	JX312204
r	5	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	5	KJ361908
g	6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	6	KPF45719
ê	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	7	KR634212
n	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	8	KT634206
c	9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	9	KT726954
i	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	10	KU850090
a	11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	11	KX944040
	12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	12	KY123652
	13	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	13	KY400087
	14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	14	MF084224
	15	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15	MF071518
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	

Figura 10: Porcentagem de identidade e divergência entre as amostras de HCMV através do programa DNASTAR (Biotechnology, academic and Government Organizations worldwide, USA), comparadas com amostra obtidas do Banco de Gene. Amostras 230 e 259, são as amostras deste estudo.

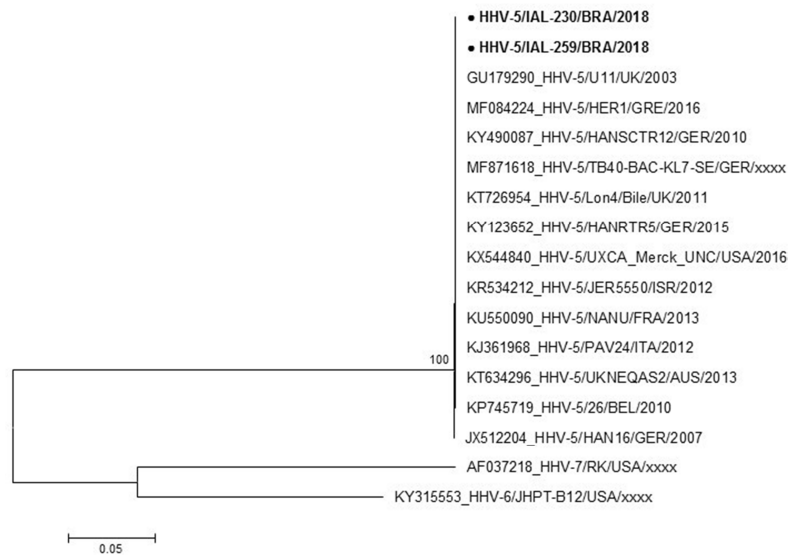


Figura 11: Análise de similaridade baseada em sequência de nucleotídeos do betaherpesvírus humano brasileiro 5 (HHV-5) (UL89) (indicado em negrito) para outras cepas de HCMV selecionadas, utilizando o modelo evolutivo Kimura 2- parameter e o algoritmo de distância Neighbor-Joining.

Nenhuma mutação associada à resistência descrita no gene UL89 foi identificada nas cepas IAL-230 e IAL-259 utilizando a ferramenta de *Web MRA-mutation resistance analyzer*. No entanto, diversas mutações de significado clínico ainda desconhecido foram encontradas (Figura 12).

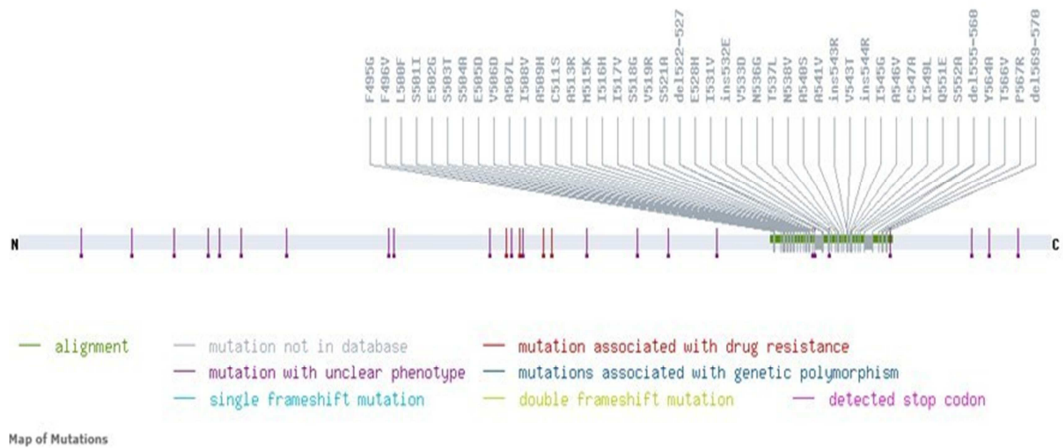


Figura 12: Mapa das mutações (substituições, inserções e deleções) identificadas nas sequências parciais do gene ORF da subunidade 1 da terminase 1 (UL89) das cepas brasileiras betaherpesvírus humano 5 (HHV-5) IAL-230 e IAL-259 usando o analisador de resistência à mutação MRA (<https://www.informatik.uni-ulm.de/ni/staff/HKestler/hcmv>)

5- Discussão

A frequência de infecções congênitas pelo HCMV detectadas neste estudo (11.6%) foi semelhante à observada em outro estudo realizado no Japão (10%) utilizando PCR convencional em amostras de urina (Oda et al., 1995). No entanto, a taxa de infecção foi maior em comparação com Portugal (0,4%) e Bélgica (0,5%) onde foi realizado o isolamento viral em cultura de células a partir de amostras de urina (Almeida et al., 2010; Foulon et al., 2008); em comparação aos EUA (0,5%) usando qPCR em amostras de saliva direcionada à glicoproteína B (gB) e região 2 (IE-2) do exon 5 (Boppana et al., 2011); em comparação a Israel (0,7%) usando PCR convencional direcionada em amostras de urina direcionada a região antigênica gp64 (Schlesinger et al., 2003); e em comparação a África Subsaariana (3,8%) usando qPCR em amostras de saliva, soro e urina direcionadas à fosfoproteína pp65 (UL83) (Mwaanza et al., 2014).

Em alguns estudos anteriores realizados no Brasil também foi relatada uma prevalência mais baixa quando comparada com obtida aqui: São Paulo (1%) (1980-1982), utilizando isolamento viral em cultura de células a partir de amostras de urina e imunofluorescência específica anti- HCMV IgM do soro do cordão umbilical (Pannuti et al., 1985), Belo Horizonte (6,8 %) (1995-1998) e Porto Alegre (0,8%) (2003) utilizando PCR convencional em amostras de urina (Santos et al., 2000; Miura et al., 2006); Ribeirão Preto (1%) (2003-2009) e Ilhéus (1,2%) (2010-2012) usando PCR convencional em amostras de urina e/ou saliva (Mussi-Pinhata et al., 2009; Marin et al., 2016).

As discrepâncias observadas em relação às diferentes frequências relatadas nos distintos estudos podem estar principalmente associadas a diferenças nos métodos diagnóstico, na região alvo das metodologias

moleculares, assim como na escolha das amostras clínicas investigadas (Marin et al., 2016; Almeida et al., 2010).

É importante observar que o qPCR in-house não é uma metodologia padronizada e diferentes iniciadores, genes-alvo e ciclos de amplificação são utilizados para a detecção do HCMV (Boppana et al., 2011; Watzinger et al., 2004; Mwaanza et al., 2014), tornando a comparação entre os estudos bastante complexa. As divergências de prevalência também podem estar relacionadas ao desenho do estudo, critérios de recrutamento, configurações, número de amostras testadas e status socioeconômico da população (Marin et al., 2016; Almeida et al., 2010). Uma investigação realizada por Pannuti e colaboradores, sugeriu que em populações com condições socioeconômicas desfavoráveis, a infecção congênita pelo HCMV tende a ser mais prevalente. É sabido que a idade materna baixa, estado civil solteira, classes socioeconômicas desfavorecidas, atividade sexual com múltiplos parceiros, multi-paridade e confinamento populacional aumentam o risco de infecção congênita por HCMV (Murph et al., 1998). Também existem evidências de que abordagens preventivas baseadas em higiene podem reduzir drasticamente a taxa das infecções primárias por HCMV materno durante a gravidez (Bardanzellu, 2019). Este estudo retrospectivo de 9 anos de vigilância realizado pelo Núcleo de Doenças Respiratórias do Instituto Adolfo Lutz ajudou a esclarecer o impacto do HCMV na infecção congênita no Estado de São Paulo.

Recém-nascidos com até 3 semanas de vida apresentaram maior taxa de positividade (15,6%) quando comparado a crianças >3 semanas de idade, destacando a importância da coleta precoce de amostras para um diagnóstico mais acurado, permitindo uma intervenção rápida e assim evitando maior comprometimento do paciente (Ebrahimi-Rad et al., 2017). Após esse período, a identificação da origem da infecção viral é prejudicada, uma vez que o contágio pode ocorrer ao longo do canal de parto, pela saliva

ou pelo leite materno, tornando-se mais difícil a distinção entre infecção congênita por HCMV, perinatal e pós-parto (Marin et al., 2016).

A diferenciação entre infecção congênita e perinatal tem importância para o prognóstico e acompanhamento das crianças em longo prazo (Ministério da Saúde, 2013). Estudos que mostram que o uso da saliva como amostra clínica de preferência seria mais prático, associado a um menor custo e tão eficaz quanto o uso de urina. No entanto, pode haver vírus na cavidade bucal, sejam provenientes da cérvix ou do leite materno, resultando em diagnóstico positivo para HCMV em recém-nascidos sem infecção. Dessa forma, sugere-se o uso da saliva para testes de rastreamento e, nos casos positivos, a confirmação do resultado em amostras de urinas (Balcarek et al., 1993).

Não foram observadas diferenças significativas entre as variações no valor de Ct e as idades dos recém-nascidos. O valor de Ct é inversamente proporcional à quantidade de vírus presente na amostra, portanto, quanto menor o valor de Ct, maior a carga viral (Phillips et al 2009). Estudos futuros avaliando a carga viral em urina em diferentes faixas etárias podem ajudar a na compreensão da dinâmica da infecção por HCMV. As infecções por HCMV foram detectadas durante todo o período do estudo (2010 a 2018), com exceção em 2013, sugerindo que as amostras de urina congeladas a - 70°C são estáveis em armazenamento a longo prazo. É de conhecimento que os vírus podem ser preservados a temperaturas baixas e ultra baixas, mantendo sua infectiosidade por períodos de tempo extensos (Gould, 1999).

Das 32 amostras positivas para HCMV obtidas por qPCR, 6 puderam ser amplificadas e apenas 2 sequenciadas com sucesso, exclusivamente para o gene UL89. Todas as tentativas para obtenção de sequências das glicoproteínas gB e gN falharam. O qPCR é uma metodologia reconhecidamente mais sensível de triagem, permitindo um diagnóstico

rápido e aumentando a sensibilidade de detecção do HCMV (Watzinger et al., 2014). No entanto, a caracterização molecular depende principalmente da PCR convencional e do sequenciamento Sanger, o que claramente prejudicou nossa capacidade de identificar todas as amostras positivas para HCMV.

Embora a importância da infecção congênita por HCMV seja evidente, a grande maioria das infecções maternas e fetais não é identificada, mesmo em países desenvolvidos. A combinação da detecção precoce da infecção por HCMV por triagem neonatal combinada com terapia antiviral pode contribuir significativamente com o prognóstico dos bebês diagnosticados com infecção congênita por HCMV sintomática (Tanimura e Yamada, 2019). Recentemente, o desenvolvimento de novas drogas contra o HCMV concentrou-se na região do complexo terminase envolvido na clivagem e empacotamento do DNA viral. O complexo terminase é altamente específico para o HCMV, sem contrapartida em células de mamíferos, representando, portanto, um alvo de escolha para novos antivirais (Ligat et al., 2018). A subunidade menor do complexo da terminase do HCMV é codificada pela ORF UL89 (Thoma et al., 2006) e diversas mutações foram detectadas nessa ORF em isolados de HCMV resistentes a medicamentos (Buerger et al., 2001). Nenhuma mutação associada à resistência descrita no gene UL89 foi identificada nas amostras IAL-230 e IAL-259 detectadas no presente estudo, porém várias mutações de significado clínico ainda desconhecido foram encontradas. Um grande número de mutações com implicação médica ainda indeterminada é identificado e descrito em isolados clínicos do mundo todo (Komatsu et al., 2014). Seus impactos no tratamento da infecção causada por HCMV ainda precisa ser avaliado.

A importância da infecção congênita pelo HCMV é reconhecida, mas ainda amplamente negligenciada no Brasil. Avanços significativos nas técnicas de diagnóstico ocorreram nos últimos anos. A qPCR é altamente

sensível e aplicável em larga escala. A implementação de uma política de triagem de rotina em recém-nascidos associada à caracterização molecular de genes virais chave é uma estratégia importante para a diminuição do número de sequelas associado a infecção congênita causada pelo HCMV. A maior dificuldade para a implementação de tal política é o custo associado aos testes, que ainda é alto, mas que deixa de ser quando comparado ao grande prejuízo social causado pelas sequelas neurológicas e auditivas associadas a doença, as quais poderiam ser amenizadas. O diagnóstico precoce do HCMV possibilitaria a orientação dos familiares, o acompanhamento multidisciplinar dos bebês sintomáticos, o rastreamento e diagnóstico precoce das complicações nos bebês assintomáticos e a realização de novos estudos em relação aos tratamentos, trazendo mais esperança quanto ao prognóstico e qualidade de vida destas crianças.

6. Conclusão

- A infecção congênita causada pelo citomegalovírus ainda é uma síndrome amplamente negligenciada no Brasil;
- A PCR em tempo real é altamente sensível e pode ser aplicável em larga escala no monitoramento da infecção congênita causada pelo citomegalovírus;
- A implementação da política de monitoramento de rotina em recém-nascidos é uma estratégia importante para a diminuição de sequelas associadas a infecções congênicas pelo citomegalovírus.

Referências

Almeida S, Gouveia P, Jorge A, Mendes A, Duarte C, Faria N, et al. Infecção congénita por Citomegalovirus. Prevalência numa população da Beira Interior. *Acta Pediatr Port* 2010;41(4):162-5.

Amir J, Atias J, Linder N, Pardo J. Follow-up of infants with congenital cytomegalovirus and normal fetal imaging. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 2016; 101: 428- 432.

Anderson BL, Gonik B. Perinatal infections. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh MC, eds. *Fanaroff & Martin's Neonatal-Perinatal Medicine: Diseases of the Fetus and Infant*. 9th ed. St. Louis, MO: El Sevier-Mosby; 2011:300–418.

Balcarek KB, Warren W, Smith RJ, Lyon MD, Pass RF. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection by detection of virus in saliva. *J Infect Dis* 1993; 167:1433-6.

Bardanzellu F, Fanos V, Reali A. Human Breast Milk-acquired Cytomegalovirus Infection: Certainties, Doubts and Perspectives. *Curr Pediatr Rev*. 2019;15(1):30-41.

Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988–2004. *Clin Infect Dis*. 2010; 50:1439–1447.

Bernstein DI, Munoz FM, Callahan ST, Rupp R, Wootton SH, Edwards KM, et al. Safety and efficacy of a cytomegalovirus glycoprotein B (gB)

vaccine in adolescent girls: A randomized clinical trial. *Vaccine* 2016; 34(3): 313-9.

Bhatia P, Narang A, Minz RW. Neonatal cytomegalovirus infection: Diagnostic modalities available for early disease detection. *Indian J Pediatr.* 2010; 77 (1): 77-79.

Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med.* 2001; 344:1366–71.

Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital cytomegalovirus infection: Clinical outcome. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57: S178–S181.

Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels MG, et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med.* 2011; 364 (22): 2111-2118.

Brito CA, Cordeiro MT. One year after the Zika virus outbreak in Brazil: from hypotheses to evidence. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016; 49: 537– 543.

Britt WJ, Boppana S. Human cytomegalovirus virion proteins. *Human Immunology.* 2004; 65: 395-402.

Browne HM. The role of glycoprotein h in herpesvirus membrane fusion. *Protein & Peptide Letters* 2009; 16: 760-65.

Brune W, Andoniou CE. Die Another Day: Inhibition of Cell Death Pathways by Cytomegalovirus. *Viruses* 2017; 9: 249.

Buerger I, Reefschlaeger J, Bender W, Eckenberg P, Popp A, Weber O, et al. A novel nonnucleoside inhibitor specifically targets cytomegalovirus

DNA maturation via the UL89 and UL56 gene products. *J Virol.* 2001;75(19):9077-86.

Buonsenso D, Serranti D, Gargiullo L, Ceccarelli M, Ranno O, Valentini P. Congenital Cytomegalovirus Infection: Current Strategies and Future Perspectives. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012; 16(7): 919-35.

Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of Cytomegalovirus Seroprevalence and Demographic Characteristics Associated with Infection. *Rev Med Virol.* 2010; 20(4): 202-13.

Cannon MJ. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *Journal of Clinical Virology* 2009; 46(4): S6-S10.

Chee M, Rudolph SA, Plachter B, Barrel B, Jahn G. Identification of the major capsid protein gene of human Cytomegalovirus. *Journal of Virology* 1989; 63(3): 1345-1353.

Chen SJ, Wang SC, Chen YC. Antiviral Agents as Therapeutic Strategies Against Cytomegalovirus Infections. *Viruses* 2020; 12: 21.

Colugnati FA, Staras SA, Dollard SC, Cannon MJ. Incidence of cytomegalovirus infection among the general population and pregnant women in the United States. *BMC Infect Dis.* 2007; 7: 71.

Compton T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends in Cell Biology* 2004; 14(1): 5-8.

Coyne CB, Lazear HM. Zika virus- reigniting the TORCH. *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14: 707–715.

Craig JM, Macauley JC, Weller TH, Wirth P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Sov Exp Biol Med.* 1957; 94(1): 4-12.

Dar L, Pati SK, Patro AR, Deorari AK, Rai S, Kant S, et al. Congenital cytomegalovirus infection in a highly seropositive semi-urban population in India. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2008; 27: 841–843.

Davis NL, King CC, Kourtis AP. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Birth Defects Research* 2017; 109: 336-346.

Dioverti M, Razonable R. Cytomegalovirus. *Microbiolspec* 2016; 4(4)

Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev. Med. Virol.* 2007; 17: 355–363.

Dreher AM, Arora N, Fowler KB, Novak Z, Britt WJ, Boppana SB, et al. Spectrum of disease and outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J. Pediatrics* 2014; 164: 855–859.

Dupont L, Reeves MB. Cytomegalovirus latency and reactivation: recent insights into an age old problem. *Rev. Med. Virol.* 2016; 26: 75– 89.

Ebrahimi-Rad M, Shirvani F, Sharokhi K, Sharokhi N. Prevalence of congenital cytomegalovirus infection in symptomatic newborns under 3 weeks in Tehran, Iran. *Infect Dis.* 2017; 17(1): 688.

Foulon I, Naessens A, Foulon W, Casteels A, Gordts F. A 10-year prospective study of sensorineural hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 2008;153(1):84-8.

Fujii T, Oka A, Morioka I, Moriuchi H, Koyano S, Yamada H, et al. Newborn Congenital Cytomegalovirus Screening based on Clinical Manifestations and Evaluation of DNA-based Assays for In Vitro Diagnostics. *Pediatr Infect Dis J.* 2017; 36(10): 942-946.

Gardner TJ, Tortorella D. Virion glycoprotein-mediated immune evasion by human cytomegalovirus: a sticky virus makes a slick getaway. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016; 80: 663-667.

Gindes L, Teperberg-Oikawa M, Sherman D, Pardo J, Rahav G. Congenital cytomegalovirus infection following primary maternal infection in the third trimester. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2008; 115(7): 830-5.

Gould EA. Methods for long-term virus preservation. *Mol Biotechnol.* 1999;13(1):57-66.

Grefte JMM, van der Gun BTF, Schmolke S, van der Giessen M, van Son WJ, Plachter B, et al. The Cytomegalovirus Antigenemia Assay: Identification of the Viral Antigen as the Lower Matrix Protein PP65, *The Journal of Infectious Diseases* 1992; 166(3): 683–684.

Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J. Pathol.* 2015; 235: 288-297.

Griffiths P. New vaccines and antiviral drugs for cytomegalovirus. *J. Clin Virol.* 2019; 116: 58–61.

Griffiths PD, Grundy JE. Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *Biochem J.* 1987; 241: 313-324.

Griffiths PD. Burden of disease associated with human cytomegalovirus and prospects for elimination by universal immunization. *Lancet Infect D.* 2012; 12(10): 790-798.

Griffiths PD. Strategies to prevent CMV infection in the neonate. *Seminars in Neonatology* 2002; 7(4): 293-299.

Guerra B, Simonazzi G, Banfi A, Lazzarotto T, Farina A, Lanari M, et al. Impact of diagnostic and confirmatory tests and prenatal counseling on the rate of pregnancy termination among women with positive cytomegalovirus immunoglobulin M antibody titers. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2007; 196(3): 221.e1-221.e6.

Harvey J, Dennis CL. Hygiene interventions for prevention of cytomegalovirus infection among childbearing women: systematic review. *J Adv Nurs.* 2008; 63(5): 440-50.

Hughes BL, Gyamfi-Bannerman C. Diagnosis and antenatal management of congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2016; 214(6): B5-B11.

Isaacson MK, Compton T. Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *J. Virol.* 2009; 83: 3891–3903.

Jacquemard F, Yamamoto M, Costa JM, Romand S, Jaqz-Aigrain E, Dejean A, et al. Maternal administration of valaciclovir in symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2007; 114(9): 1113-21.

Jeon J, Victor M, Adler SP, Arwady A, Demmler G, Fowler K, et al. Knowledge and awareness of congenital cytomegalovirus among women. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2006; 2006: 1-7.

Kadambari S, Williams EJ, Luck S, Griffiths PD, Sharland M. Evidence based management guidelines for the detection and treatment of congenital CMV. *Early Human Development* 2011; 87(11): 723-728.

Kenneson A, Cannon MJ. Review and Meta-Analysis of the Epidemiology of Congenital Cytomegalovirus (CMV) Infection. *Rev Med Virol.* 2007; 17(4): 253-76.

Klase ZA, Khakhina S, Schneider ADB, Callahan MV, Glasspool-Malone J, Malone R. Zika fetal neuropathogenesis: etiology of a viral syndrome. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(8): e0004877.

Komatsu TE, Pikis A, Naeger LK, Harrington PR. Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: a comprehensive review of putative resistance pathways. *Antiviral Res.* 2014; 101:12-25.

Krauer F, Riesen M, Reveiz L, Oladapo OT, Martinez-Vega R, Porgo TV, et al. Zika virus infection as a cause of congenital brain abnormalities and Guillain-Barre syndrome: systematic review. *PLoS Med.* 2017; 14: e1002203.

Krishna BA, Wills MR, Sinclair JH. Advances in the treatment of cytomegalovirus. *British Medical Bulletin* 2019; 131(1): 5-17.

Lanzieri TM, Kruszon-Moran D, Amin MM, Bialek SR, Cannon MJ, Carroll MD, et al. Seroprevalence of cytomegalovirus among children 1 to 5 years of age in the United States from the National Health and Nutrition

Examination Survey of 2011 to 2012. *Clin Vaccine Immunol.* 2015; 22: 245–247.

Lazzarotto T, Guerra B, Gabrielli L, Lanari M, Landini MP. Update on the 2008; 41(3): 192-197.

Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J. Clin. Virol. Clin Microbiol.* 2010; 23: 689–712.

Ligat G, Cazal R, Hantz S, Alain S. The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view. *FEMS Microbiol Rev.* 2018;42(2):137-45.

Lipitz S, Yinon Y, Malinge G, Yagel S, Levit L, Hoffman C, et al. Risk of cytomegalovirus-associated sequelae in relation to time of infection and findings on prenatal imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41: 508-514.

Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17(9): 1285-93.

Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The “Silent” Global Burden of Congenital Cytomegalovirus. *Clinical Microbiology Reviews* 2013; 26(1): 86-102.

Marin LI, Santos de Carvalho Cardoso E, Bispo Souza SM, Debortoli de Carvalho L, Marques Filho MF, Raiol MR, et al. Prevalence and clinical aspects of CMV congenital infection in a low-income population. *Virology J.* 2016; 13:148.

Matos SB, Meyer R, Lima MFW. Citomegalovírus: uma revisão da patogenia, epidemiologia e diagnóstico da infecção. *Revista Saúde.com* 2011; 7(1): 44-57.

McSharry B, Avdic S, Slobedman, B. Human cytomegalovirus encoded homologs of cytokines, chemokines and their receptors: roles in immunomodulation. *Viruses* 2012; 4(11): 2448-2470.

Mendez JC, Sia IG. Human cytomegalovirus. In: Lennette EH, Smith TF, editors. *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. 3rd ed. New York Basel: Marcel Dekker Inc., 1999.p.361-72.

Mestas E. Congenital Cytomegalovirus. *Advances in Neonatal Care* 2016; 16(1): 60–65.

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. *Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde*. 2ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2013.

Miura CS, Miura E, Mombach AB, Chesky M. The prevalence of congenital cytomegalovirus infection in newborn infants at an intensive care unit in a public hospital. *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82(1):46-50.

Mocarski ES, Charmain TC. Cytomegaloviruses and Their Replication. D.M. Knipe, P.M. Howley (Eds.), *Fields virology*, vol. 1, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 2127-2501.

Mocarski ES, Shenk T, Pass RF. Cytomegalovirus. In Bernard N Fields; David M Knipe; Peter M Howley; et (Ed.), *Fields of virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2006 p. 2702– 2772.

Mocarski ES. Cytomegaloviruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE D. M.; HOWLEY, P. M. *Fields Virology*. New York: Lippincott-Raven, 1996. cap. 76, p. 2447-2492.

Mocarski Jr. E. Betaherpes viral genes and their functions. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. cap. 15.

Mofenson LM. Advances in the prevention of vertical transmission of human immunodeficiency virus. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 2003; 14(4) 295–308.

Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Moura Brito RM, de Lima Isaac M, de Carvalho e Oliveira PF, Boppana S, et al. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49: 522–528.

Murph JR, Souza LE, Dawson JD, Benson P, Petheram SJ, Pfab D, et al. Epidemiology of congenital cytomegalovirus infection: maternal risk factors and molecular analysis of cytomegalovirus strains. *Am J Epidemiol.* 1998; 147:940-7.

Mwaanza N, Chilukutu L, Tembo J, Kabwe M, Musonda K, Kapasa M, et al. High rates of congenital cytomegalovirus infection linked with maternal HIV infection among neonatal admissions at a large referral center in sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis.* 2014;58(5):728-35.

Nahar S, Hokama A, Iraha A, Ohira T, Kinjo T, Hirata T, Kinjo T, Parrott LG, Fujita J. Distribution of cytomegalovirus genotypes among ulcerative colitis patients in Okinawa, Japan. *Intest Res* 2018; 16(1): 90-98.

Nance WE, Lim BG, Dodson KM. Importance of congenital cytomegalovirus infections as a cause for pre-lingual hearing loss. *J. Clin. Virol.* 2006; 35: 221–225.

Nassetta L, Kimberlin D, Whitley R. Treatment of congenital cytomegalovirus infection: Implications for future therapeutic strategies. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 63: 862–867.

Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glicoprotein B of human Cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* 1993; 197(1): 143-158.

Oda K, Oki S, Tsumura N, Nakao M, Motohiro T, Kato H. Detection of cytomegalovirus DNA in urine from newborns in NICU using a polymerase chain reaction. *Kurume Med J.* 1995;42(1):39-44.

Oliver SE, Cloud GA, Sánchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, et al. Neurodevelopmental outcomes following ganciclovir therapy in symptomatic congenital cytomegalovirus infections involving the central nervous system. *J Clin Virol.* 2009; 46(4): S22-6.

Ornoy A, Diav-Citrin O. Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reprod Toxicol.* 2006; 21: 399–409.

Pannuti CS. Citomegalia In: Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de Infectologia.* São Paulo: Atheneu, 1996. cap. 11, p. 187-194.

Pannuti CS, Vilas-Boas LS, Angelo MJ, Carvalho RP, Segre CM. Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in two

socioeconomically distinct populations of developing country. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1985;27(2):105-7.

Paradowska E, Jabłońska A, Studzińska M, Kasztelewicz B, Wiśniewska-Ligier M, Dzierżanowska-Fangrat K, et al. Distribution of the CMV glycoprotein gH/gL/gO and gH/gL/pUL128/pUL130/pUL131A complex variants and associated clinical manifestations in infants infected congenitally or postnatally. *Sci Rep*. 2019; 9: 16352.

Pass RF, Boppana SB. Cytomegalovirus. *Viral infection in obstetrics and gynaecology* 1999; 35-36.

Pass RF, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Stagno S. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcome. *J. Clin. Virol*. 2006; 35: 216–220.

Pass RF, Zhang C, Evans A, Simpson T, Andrews W, Huang ML, et al. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med*. 2009; 360(12): 1191-9.

Pignatelli S, Monte PD, Rossini G, Landini MP. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Reviews Medical Virology* 2004; 14(6): 383-410.

Piret J, Goyette N, Boivin G. Drug susceptibility and replicative capacity of multidrug-resistant recombinant human cytomegalovirus harboring mutations in UL56 and UL54 genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(11): e01044-1761.

Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998; 14(9): 817–818.

Rasmussen L. Immune response to human Cytomegalovirus infection. *Current Topics Microbiology and Immunology* 1990; 154: 221-254.

Rasmussen L. Molecular pathogenesis of human Cytomegalovirus infection. *Transplant Infectious Diseases* 1999; 1(2): 127-134.

Rawlinson WD, Boppana SB, Fowler KB, Kimberlin DW, Lazzarotto T, Alain S, et al. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *Lancet Infect. Dis.* 2017; 17: e177-e188.

Read JS, Cannon MJ, Stanberry LR, Schuval S. Prevention of mother-to-child transmission of viral infections. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2008; 38(9): 274-297.

Revello MG, Sarasini A, Zavattoni M, Baldanti F, Gerna G. Improved prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection by a modified nested polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 1998; 56: 99- 103.

Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Fabbri E, Gerna G. Preconceptional primary human cytomegalovirus infection and risk of congenital infection. *J Infect Dis.* 2006; 193(6): 783–787.

Rippert H. Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zentralbl Allg Pathol.* 1904; 15: 945–948.

Ross DS, Victor M, Sumartojo E, Cannon MJ. Women's knowledge of congenital cytomegalovirus: results from the 2005 HealthStyles survey. *J Womens Health (Larchmt.)* 2008; 17(5): 849-858.

Sanger F., Air G.M.; Barrell, B.G.; Brown, N.L.; Coulson, A.R.; Fiddes, C.A.; Hutchison, C.A.; Slocombe, P.M.; Smith, M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **1977**, 265, 687–695.

Sanjay T e Kramer FR. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nature Biotechnology* 1996; 14: 303-308.

Santos DV, Souza MM, Gonçalves SH, Cotta AC, Melo LA, Andrade GM, et al. Congenital cytomegalovirus infection in a neonatal intensive care unit in Brazil evaluated by PCR and association with perinatal aspects. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2000;42(3):129-32.

Schlesinger Y. Editorial Commentary: Amniocentesis for Detection of Congenital Cytomegalovirus Infection: What Is the Point? *Clinical Infectious Diseases* 2016; 63(1): 39–40.

Schlesinger Y, Halle AI, Eidelman D, Reich D, Dayan D, Rudesnsky B, et al. Urine polymerase chain reaction as a screening tool for the detection of congenital cytomegalovirus infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003; 88(5): F371-F374.

Shannon AR, Amina A, April LP, Marian GM, Pablo JS, David IB, Robert WT Jr, Zdenek N, Nazma C, Karen BF, Suresh BB. Detection of Congenital Cytomegalovirus Infection by Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Saliva or Urine Specimens. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014;210:1415–8.

Shenks T, Griffiths P, Pass R. Cytomegaloviruses. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology*. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1960-2014.

Sijmons S, Van Ranst M, Maes P. Genomic and functional characteristics of human cytomegalovirus revealed by next-generation sequencing. *Viruses* 2014; 6(3): 1049-1072.

Silva MCC, Figueiredo EG, Correa C, Cabrera HN, Schimdt M, Teixeira MJ. Papel do citomegalovírus humano (HCMV) na oncomodulação de tumores cerebrais. *Jornal Brasileiro de Neurocirurgia* 2011; 22(1): 66-71.

Sinclair J. Human cytomegalovirus: latency and reactivation in the myeloid lineage. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 2008; 41: 180-185.

Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Marin LJ, Brito RM, Oliveira PF, Coelho TB. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? *J Clin Virol.* 2006; 36:228–30.

Sinzger C, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus Cell Tropism in Human Cytomegalovirus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2008, 325: 63–83.

Swanson EC, Schleiss MR. Congenital Cytomegalovirus Infection New Prospects for Prevention and Therapy. *Pediatric Clinics Elsevier* 2013; 60(2): 335-349.

Tagarro A, Del Valle R, Dominguez-Rodríguez S, Baquero-Artigao F, Noguera-Julian A, Vives-Oñós I, et al. Growth Patterns in Children With Congenital Cytomegalovirus Infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2019; 38(12): 1230–1235.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, Molecular Biology and Evolution 2013; 30(12): 2725–2729.

Tanimura K. and Yamada, H. Maternal and neonatal screening methods for congenital cytomegalovirus infection. J. Obstet. Gynaecol. Res. 2019; 45: 514-521.

Taylor GH. Cytomegalovirus. American Family Physician 2003; 67(3): 519–24.

Thoma C, Borst E, Messerle M, Rieger M, Hwang JS, Bogner E. Identification of the interaction domain of the small terminase subunit pUL89 with the large subunit pUL56 of human cytomegalovirus. Biochemistry. 2006;45(29):8855-63.

Thompson JD, Desmond HG, Toby GJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 1994; 22(22): 4673–4680.

Tomtishen JP. Human cytomegalovirus tegument proteins. Virology Journal 2012; 9(22): 1-8.

Tyagi S, Kramer F. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. Nat Biotechnol. 1996; 14: 303–308.

van der Sande MA, Kaye S, Miles DJ, Waight P, Jeffries DJ, Ojuola OO, et al. Risk factors for and clinical outcome of congenital cytomegalovirus infection in a peri-urban West-African birth cohort. PLoS One 2007; 2: e492.

Vauloup-Fellous C, Picone O, Cordier AG, Parent-du-Châtelet I, Senat MV, Frydman R, et al. 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. *J Clin Virol.* 2009; 46(4): S49-53.

Walker SP, Palma-Dias R, Wood EM, et al. : Citomegalovírus na gravidez: rastrear ou não rastrear. *BMC Gravidez Parto.* 2013; 13 : 96. 10.1186 / 1471-2393-13-96 .

Wang C, Zhang X, Bialek S, Cannon MJ. Attribution of congenital cytomegalovirus infection to primary versus non-primary maternal infection. *Clin Infect Dis.* 2011; 52: 11–3.

Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(11): 5189-98.

ANEXO I

Pacien- te	Idade (Dias)	Metodologia	Material Biológico	Data da liberação	Resulta- do
1	9	PCR em Tempo Real	Urina	30/06/2010	Negativo
2	15	PCR em Tempo Real	Urina	30/06/2010	Positivo ct30
3	6	PCR em Tempo Real	Urina	26/07/2010	Negativo
4	2	PCR em Tempo Real	Urina	10/08/2010	Positivo Ct32
5	8	PCR em Tempo Real	Urina	10/08/2010	Positivo Ct31
6	16	PCR em Tempo Real	Urina	23/08/2010	Positivo Ct31
7	5	PCR em Tempo Real	Urina	04/10/2010	Positivo Ct34
8	11	PCR em Tempo Real	Urina	05/01/2011	Positivo Ct35
9	30	PCR em Tempo Real	Urina	18/01/2011	Negativo
10	13	PCR em Tempo Real	Urina	14/03/2011	Positivo Ct33
11	30	PCR em Tempo Real	Urina	29/03/2011	Negativo
12	30	PCR em Tempo Real	Urina	15/08/2011	Positivo Ct28
13	23	PCR em Tempo Real	Urina	15/08/2011	Negativo
14	10	PCR em Tempo Real	Urina	06/03/2012	Negativo
15	4	PCR em Tempo Real	Urina	13/03/2012	Negativo
16	30	PCR em Tempo Real	Urina	13/03/2012	Negativo
17	2	PCR em Tempo Real	Urina	05/04/2012	Negativo
18	11	PCR em Tempo Real	Urina	11/04/2012	Negativo
19	30	PCR em Tempo Real	Urina	20/04/2012	Positivo Ct29
20	17	PCR em Tempo Real	Urina	27/04/2012	Negativo
21	7	PCR em Tempo Real	Urina	25/06/2012	Positivo Ct29
22	3	PCR em Tempo Real	Urina	26/07/2012	Negativo

23	7	PCR em Tempo Real	Urina	26/07/2012	Negativo
24	5	PCR em Tempo Real	Urina	26/07/2012	Negativo
25	23	PCR em Tempo Real	Urina	26/10/2012	Negativo
26	4	PCR em Tempo Real	Urina	01/11/2012	Positivo Ct30
27	2	PCR em Tempo Real	Urina	21/12/2012	Positivo Ct30
28	30	PCR em Tempo Real	Urina	08/02/2013	Negativo
29	30	PCR em Tempo Real	Urina	08/02/2013	Negativo
30	17	PCR em Tempo Real	Urina	21/02/2013	Negativo
31	18	PCR em Tempo Real	Urina	18/03/2013	Negativo
32	2	PCR em Tempo Real	Urina	17/05/2013	Negativo
33	8	PCR em Tempo Real	Urina	27/05/2013	Negativo
34	8	PCR em Tempo Real	Urina	23/08/2013	Negativo
35	12	PCR em Tempo Real	Urina	23/08/2013	Negativo
36	9	PCR em Tempo Real	Urina	23/08/2013	Negativo
37	9	PCR em Tempo Real	Urina	19/11/2013	Negativo
38	1	PCR em Tempo Real	Urina	26/12/2013	Negativo
39	9	PCR em Tempo Real	Urina	27/12/2013	Negativo
40	28	PCR em Tempo Real	Urina	27/12/2013	Negativo
41	30	PCR em Tempo Real	Urina	27/12/2013	Negativo
42	3	PCR em Tempo Real	Urina	13/01/2014	Negativo
43	4	PCR em Tempo Real	Urina	04/02/2014	Negativo
44	3	PCR em Tempo Real	Urina	20/06/2014	Negativo
45	17	PCR em Tempo Real	Urina	30/07/2014	Positivo Ct26
46	30	PCR em Tempo Real	Urina	31/07/2014	Positivo Ct26
47	5	PCR em Tempo Real	Urina	31/07/2014	Positivo

		Real				Ct28
48	5	PCR em Tempo Real	Urina	31/07/2014		Positivo Ct29
49	10	PCR em Tempo Real	Urina	31/07/2014		Positivo Ct30
50	3	PCR em Tempo Real	Urina	31/07/2014		Positivo Ct32
51	7	PCR em Tempo Real	Urina	31/07/2014		Negativo
52	30	PCR em Tempo Real	Urina	11/08/2014		Negativo
53	10	PCR em Tempo Real	Urina	26/08/2014		Negativo
54	9	PCR em Tempo Real	Urina	26/08/2014		Positivo Ct32
55	3	PCR em Tempo Real	Urina	26/08/2014		Negativo
56	9	PCR em Tempo Real	Urina	11/09/2014		Negativo
57	1	PCR em Tempo Real	Urina	11/09/2014		Negativo
58	7	PCR em Tempo Real	Urina	06/10/2014		Negativo
59	6	PCR em Tempo Real	Urina	30/10/2014		Negativo
60	13	PCR em Tempo Real	Urina	03/11/2014		Negativo
61	3	PCR em Tempo Real	Urina	03/11/2014		Negativo
62	3	PCR em Tempo Real	Urina	03/12/2014		Negativo
63	13	PCR em Tempo Real	Urina	03/12/2014		Negativo
64	16	PCR em Tempo Real	Urina	03/12/2014		Negativo
65	30	PCR em Tempo Real	Urina	03/12/2014		Negativo
66	4	PCR em Tempo Real	Urina	12/12/2014		Positivo Ct23
67	30	PCR em Tempo Real	Urina	27/01/2015		Positivo Ct34
68	9	PCR em Tempo Real	Urina	06/02/2015		Negativo
69	13	PCR em Tempo Real	Urina	06/02/2015		Negativo
70	30	PCR em Tempo Real	Urina	11/03/2015		Negativo
71	30	PCR em Tempo Real	Urina	11/03/2015		Negativo

72	13	PCR em Tempo Real	Urina	11/03/2015	Negativo
73	5	PCR em Tempo Real	Urina	18/03/2015	Negativo
74	7	PCR em Tempo Real	Urina	18/03/2015	Negativo
75	4	PCR em Tempo Real	Urina	30/03/2015	Negativo
76	3	PCR em Tempo Real	Urina	02/04/2015	Negativo
77	1	PCR em Tempo Real	Urina	02/04/2015	Negativo
78	1	PCR em Tempo Real	Urina	02/04/2015	Negativo
79	10	PCR em Tempo Real	Urina	29/05/2015	Positivo Ct33
80	2	PCR em Tempo Real	Urina	29/05/2015	Negativo
81	17	PCR em Tempo Real	Urina	17/06/2015	Negativo
82	4	PCR em Tempo Real	Urina	14/07/2015	Negativo
83	13	PCR em Tempo Real	Urina	30/07/2015	Negativo
84	1	PCR em Tempo Real	Urina	30/07/2015	Negativo
85	8	PCR em Tempo Real	Urina	30/07/2015	Negativo
86	12	PCR em Tempo Real	Urina	30/07/2015	Negativo
87	21	PCR em Tempo Real	Urina	24/09/2015	Negativo
88	11	PCR em Tempo Real	Urina	24/09/2015	Negativo
89	25	PCR em Tempo Real	Urina	24/09/2015	Negativo
90	8	PCR em Tempo Real	Urina	24/09/2015	Negativo
91	10	PCR em Tempo Real	Urina	15/01/2016	Negativo
92	5	PCR em Tempo Real	Urina	01/06/2016	Negativo
93	2	PCR em Tempo Real	Urina	08/06/2016	Negativo
94	30	PCR em Tempo Real	Urina	08/06/2016	Negativo
95	3	PCR em Tempo Real	Urina	08/06/2016	Negativo
96	23	PCR em Tempo Real	Urina	13/06/2016	Negativo

Real					
97	13	PCR em Tempo Real	Urina	27/06/2016	Negativo
98	3	PCR em Tempo Real	Urina	08/07/2016	Negativo
99	30	PCR em Tempo Real	Urina	08/07/2016	Positivo Ct35
100	9	PCR em Tempo Real	Urina	08/07/2016	Negativo
101	12	PCR em Tempo Real	Urina	08/07/2016	Negativo
102	26	PCR em Tempo Real	Urina	08/07/2016	Negativo
103	7	PCR em Tempo Real	Urina	08/07/2016	Negativo
104	22	PCR em Tempo Real	Urina	17/08/2016	Negativo
105	8	PCR em Tempo Real	Urina	17/08/2016	Negativo
106	10	PCR em Tempo Real	Urina	17/08/2016	Negativo
107	8	PCR em Tempo Real	Urina	23/08/2016	Negativo
108	30	PCR em Tempo Real	Urina	23/08/2016	Negativo
109	4	PCR em Tempo Real	Urina	02/09/2016	Negativo
110	6	PCR em Tempo Real	Urina	02/09/2016	Negativo
111	2	PCR em Tempo Real	Urina	02/09/2016	Negativo
112	22	PCR em Tempo Real	Urina	02/09/2016	Negativo
1113	12	PCR em Tempo Real	Urina	29/09/2016	Negativo
114	2	PCR em Tempo Real	Urina	19/10/2016	Negativo
115	22	PCR em Tempo Real	Urina	19/10/2016	Negativo
116	7	PCR em Tempo Real	Urina	25/10/2016	Negativo
117	5	PCR em Tempo Real	Urina	27/10/2016	Negativo
118	30	PCR em Tempo Real	Urina	07/11/2016	Negativo
119	14	PCR em Tempo Real	Urina	07/11/2016	Negativo
120	3	PCR em Tempo Real	Urina	18/11/2016	Negativo

121	7	PCR em Tempo Real	Urina	18/11/2016	Negativo
122	4	PCR em Tempo Real	Urina	18/11/2016	Negativo
123	5	PCR em Tempo Real	Urina	24/11/2016	Negativo
124	2	PCR em Tempo Real	Urina	24/11/2016	Negativo
125	4	PCR em Tempo Real	Urina	02/12/2016	Negativo
126	30	PCR em Tempo Real	Urina	02/12/2016	Negativo
127	4	PCR em Tempo Real	Urina	05/12/2016	Negativo
128	3	PCR em Tempo Real	Urina	15/12/2016	Negativo
129	1	PCR em Tempo Real	Urina	22/12/2016	Negativo
130	3	PCR em Tempo Real	Urina	22/12/2016	Positivo Ct36
131	30	PCR em Tempo Real	Urina	22/12/2016	Negativo
132	14	PCR em Tempo Real	Urina	22/12/2016	Negativo
133	22	PCR em Tempo Real	Urina	02/01/2017	Negativo
134	6	PCR em Tempo Real	Urina	02/01/2017	Negativo
135	5	PCR em Tempo Real	Urina	27/01/2017	Negativo
136	30	PCR em Tempo Real	Urina	13/02/2017	Negativo
137	23	PCR em Tempo Real	Urina	23/02/2017	Negativo
138	30	PCR em Tempo Real	Urina	13/03/2017	Negativo
139	11	PCR em Tempo Real	Urina	13/03/2017	Negativo
140	9	PCR em Tempo Real	Urina	13/03/2017	Negativo
141	12	PCR em Tempo Real	Urina	17/03/2017	Negativo
142	1	PCR em Tempo Real	Urina	31/03/2017	Negativo
143	5	PCR em Tempo Real	Urina	07/04/2017	Negativo
144	15	PCR em Tempo Real	Urina	19/04/2017	Negativo
145	16	PCR em Tempo Real	Urina	02/05/2017	Negativo

Real					
146	3	PCR em Tempo Real	Urina	09/05/2017	Negativo
147	5	PCR em Tempo Real	Urina	26/05/2017	Negativo
148	4	PCR em Tempo Real	Urina	01/06/2017	Negativo
149	4	PCR em Tempo Real	Urina	01/06/2017	Negativo
150	6	PCR em Tempo Real	Urina	06/06/2017	Negativo
151	3	PCR em Tempo Real	Urina	23/06/2017	Negativo
152	5	PCR em Tempo Real	Urina	23/06/2017	Negativo
153	3	PCR em Tempo Real	Urina	23/06/2017	Negativo
154	5	PCR em Tempo Real	Urina	23/06/2017	Negativo
155	14	PCR em Tempo Real	Urina	17/07/2017	Negativo
156	8	PCR em Tempo Real	Urina	17/07/2017	Negativo
157	6	PCR em Tempo Real	Urina	17/07/2017	Negativo
158	5	PCR em Tempo Real	Urina	17/07/2017	Negativo
159	4	PCR em Tempo Real	Urina	18/07/2017	Negativo
160	8	PCR em Tempo Real	Urina	18/07/2017	Negativo
161	6	PCR em Tempo Real	Urina	18/07/2017	Negativo
162	14	PCR em Tempo Real	Urina	18/07/2017	Negativo
163	5	PCR em Tempo Real	Urina	18/07/2017	Negativo
164	4	PCR em Tempo Real	Urina	18/07/2017	Negativo
165	2	PCR em Tempo Real	Urina	25/07/2017	Positivo 35
166	14	PCR em Tempo Real	Urina	04/08/2017	Negativo
167	14	PCR em Tempo Real	Urina	04/08/2017	Negativo
168	5	PCR em Tempo Real	Urina	07/08/2017	Negativo
169	2	PCR em Tempo Real	Urina	07/08/2017	Positivo Ct25

170	4	PCR em Tempo Real	Urina	14/08/2017	Negativo
171	3	PCR em Tempo Real	Urina	14/08/2017	Negativo
172	23	PCR em Tempo Real	Urina	14/08/2017	Negativo
173	2	PCR em Tempo Real	Urina	14/08/2017	Negativo
174	6	PCR em Tempo Real	Urina	14/08/2017	Negativo
175	3	PCR em Tempo Real	Urina	14/08/2017	Negativo
176	4	PCR em Tempo Real	Urina	14/08/2017	Negativo
177	23	PCR em Tempo Real	Urina	14/08/2017	Negativo
178	2	PCR em Tempo Real	Urina	14/08/2017	Negativo
179	6	PCR em Tempo Real	Urina	14/08/2017	Negativo
180	2	PCR em Tempo Real	Urina	25/08/2017	Negativo
181	6	PCR em Tempo Real	Urina	25/08/2017	Negativo
182	6	PCR em Tempo Real	Urina	25/08/2017	Negativo
183	7	PCR em Tempo Real	Urina	25/08/2017	Negativo
184	3	PCR em Tempo Real	Urina	25/08/2017	Negativo
185	19	PCR em Tempo Real	Urina	25/08/2017	Negativo
186	7	PCR em Tempo Real	Urina	25/08/2017	Negativo
187	7	PCR em Tempo Real	Urina	25/08/2017	Negativo
188	4	PCR em Tempo Real	Urina	25/08/2017	Positivo Ct35
189	6	PCR em Tempo Real	Urina	25/08/2017	Negativo
190	4	PCR em Tempo Real	Urina	25/08/2017	Positivo Ct34
191	30	PCR em Tempo Real	Urina	18/09/2017	Negativo
192	30	PCR em Tempo Real	Urina	18/09/2017	Negativo
193	30	PCR em Tempo Real	Urina	21/09/2017	Negativo
194	1	PCR em Tempo	Urina	21/09/2017	Negativo

Real					
195	7	PCR em Tempo Real	Urina	11/10/2017	Negativo
196	9	PCR em Tempo Real	Urina	11/10/2017	Negativo
197	5	PCR em Tempo Real	Urina	11/10/2017	Negativo
198	11	PCR em Tempo Real	Urina	11/10/2017	Negativo
199	4	PCR em Tempo Real	Urina	11/10/2017	Negativo
200	12	PCR em Tempo Real	Urina	20/10/2017	Negativo
201	9	PCR em Tempo Real	Urina	20/10/2017	Negativo
202	2	PCR em Tempo Real	Urina	30/10/2017	Negativo
203	1	PCR em Tempo Real	Urina	31/10/2017	Negativo
204	3	PCR em Tempo Real	Urina	22/11/2017	Negativo
205	7	PCR em Tempo Real	Urina	05/12/2017	Negativo
206	3	PCR em Tempo Real	Urina	18/12/2017	Negativo
207	30	PCR em Tempo Real	Urina	26/12/2017	Negativo
208	30	PCR em Tempo Real	Urina	05/01/2018	Negativo
209	30	PCR em Tempo Real	Urina	22/01/2018	Negativo
210	2	PCR em Tempo Real	Urina	22/01/2018	Negativo
211	3	PCR em Tempo Real	Urina	22/01/2018	Negativo
212	30	PCR em Tempo Real	Urina	22/01/2018	Negativo
213	2	PCR em Tempo Real	Urina	22/01/2018	Negativo
214	18	PCR em Tempo Real	Urina	12/02/2018	Negativo
215	4	PCR em Tempo Real	Urina	09/03/2018	Negativo
216	2	PCR em Tempo Real	Urina	09/03/2018	Negativo
217	5	PCR em Tempo Real	Urina	09/03/2018	Negativo
218	5	PCR em Tempo Real	Urina	19/03/2018	Negativo

219	4	PCR em Tempo Real	Urina	19/03/2018	Negativo
220	6	PCR em Tempo Real	Urina	20/04/2018	Positivo Ct32
221	12	PCR em Tempo Real	Urina	24/04/2018	Negativo
222	3	PCR em Tempo Real	Urina	30/04/2018	Negativo
223	3	PCR em Tempo Real	Urina	30/04/2018	Negativo
224	7	PCR em Tempo Real	Urina	30/04/2018	Negativo
225	13	PCR em Tempo Real	Urina	30/04/2018	Negativo
226	3	PCR em Tempo Real	Urina	22/05/2018	Negativo
227	1	PCR em Tempo Real	Urina	30/05/2018	Negativo
228	14	PCR em Tempo Real	Urina	30/05/2018	Negativo
229	6	PCR em Tempo Real	Urina	08/06/2018	Positivo Ct34
230	6	PCR em Tempo Real	Urina	08/06/2018	Positivo Ct23
231	4	PCR em Tempo Real	Urina	23/06/2018	Negativo
232	12	PCR em Tempo Real	Urina	23/06/2018	Negativo
233	2	PCR em Tempo Real	Urina	29/06/2018	Negativo
234	12	PCR em Tempo Real	Urina	29/06/2018	Negativo
235	2	PCR em Tempo Real	Urina	18/07/2018	Negativo
236	3	PCR em Tempo Real	Urina	18/07/2018	Negativo
237	9	PCR em Tempo Real	Urina	18/07/2018	Negativo
238	10	PCR em Tempo Real	Urina	18/07/2018	Negativo
239	17	PCR em Tempo Real	Urina	18/07/2018	Negativo
240	4	PCR em Tempo Real	Urina	31/07/2018	Negativo
241	3	PCR em Tempo Real	Urina	17/08/2018	Negativo
242	3	PCR em Tempo Real	Urina	17/08/2018	Negativo
243	4	PCR em Tempo Real	Urina	17/08/2018	Negativo

Real					
244	5	PCR em Tempo Real	Urina	17/08/2018	Negativo
245	1	PCR em Tempo Real	Urina	24/08/2018	Negativo
246	3	PCR em Tempo Real	Urina	24/08/2018	Negativo
247	1	PCR em Tempo Real	Urina	31/08/2018	Negativo
248	1	PCR em Tempo Real	Urina	07/09/2018	Negativo
249	2	PCR em Tempo Real	Urina	07/09/2018	Negativo
250	5	PCR em Tempo Real	Urina	07/09/2018	Negativo
251	1	PCR em Tempo Real	Urina	18/09/2018	Negativo
252	8	PCR em Tempo Real	Urina	18/09/2018	Negativo
253	2	PCR em Tempo Real	Urina	24/09/2018	Negativo
254	1	PCR em Tempo Real	Urina	03/10/2018	Negativo
255	1	PCR em Tempo Real	Urina	11/10/2018	Negativo
256	3	PCR em Tempo Real	Urina	24/10/2018	Negativo
257	4	PCR em Tempo Real	Urina	24/10/2018	Negativo
258	23	PCR em Tempo Real	Urina	24/10/2018	Negativo
259	2	PCR em Tempo Real	Urina	31/10/2018	Positivo Ct25
260	2	PCR em Tempo Real	Urina	31/10/2018	Negativo
261	3	PCR em Tempo Real	Urina	31/10/2018	Negativo
262	3	PCR em Tempo Real	Urina	31/10/2018	Negativo
263	3	PCR em Tempo Real	Urina	31/10/2018	Negativo
264	5	PCR em Tempo Real	Urina	31/10/2018	Negativo
265	6	PCR em Tempo Real	Urina	31/10/2018	Negativo
266	2	PCR em Tempo Real	Urina	07/11/2018	Negativo
267	4	PCR em Tempo Real	Urina	07/11/2018	Negativo

268	5	PCR em Tempo Real	Urina	27/11/2018	Negativo
269	5	PCR em Tempo Real	Urina	27/11/2018	Negativo
270	3	PCR em Tempo Real	Urina	11/12/2018	Negativo
271	3	PCR em Tempo Real	Urina	11/12/2018	Negativo
272	4	PCR em Tempo Real	Urina	11/12/2018	Negativo
273	11	PCR em Tempo Real	Urina	11/12/2018	Negativo
274	15	PCR em Tempo Real	Urina	11/12/2018	Negativo
275	7	PCR em Tempo Real	Urina	18/12/2018	Negativo

Anexoll

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES 

Continuação do Parecer: 2.984.740

na resposta à pendência.

A pesquisadora reviu o texto de justificativa de dispensa do TCLE ficando na forma em que se encontra adequado e aceito.

Anexou o termo de autorização de utilização das amostras assinado pela diretora do Centro de Virologia do IAL, Profa. Dra. Maria do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky.

Anexou a Portaria DG/IAL-16, de 22 de dezembro de 2010 sobre Normas de temporalidade das amostras biológicas e dos produtos armazenados no IAL.

Recomendações:

Atender as normas éticas, como manter a confidencialidade das informações e dados dos participantes da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora responsável atendeu satisfatoriamente à pendência e complementou o protocolo com os documentos necessários.

O protocolo de pesquisa está aprovado do ponto de vista ético e em conformidade com as diretrizes institucionais.

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL com base nas deliberações da reunião ordinária de 18 de outubro de 2018.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

IX - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

- a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa;
- b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3085-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.984.740

- c) desenvolver o projeto conforme delineado;
- d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
- g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEP/IAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	PORTARIA_Temporalidade_IAL_16_22_1210.PDF	26/10/2018 16:11:30	Maria de Fátima Costa Pires	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1196423.pdf	18/10/2018 10:09:14		Aceito
Outros	autorizacao.pdf	18/10/2018 10:08:12	MARIA ISABEL DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	18/10/2018 09:59:51	MARIA ISABEL DE OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	24/08/2018 13:52:05	MARIA ISABEL DE OLIVEIRA	Aceito
Orçamento	planejamentoorcamentario.pdf	22/08/2018 14:36:55	MARIA ISABEL DE OLIVEIRA	Aceito
Brochura Pesquisa	AprovadoCTC.pdf	22/08/2018 12:21:09	MARIA ISABEL DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCMV.doc	22/08/2018 12:20:49	MARIA ISABEL DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termoresponsabilidadeesigilo.pdf	22/08/2018 12:16:10	MARIA ISABEL DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico /	Biorrepositorio.pdf	22/08/2018 12:15:33	MARIA ISABEL DE OLIVEIRA	Aceito

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
 Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3068-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.984.740

Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	22/08/2018 12:15:33	MARIA ISABEL DE OLIVEIRA	Aceito
Cronograma	ctccronograma.doc	22/08/2018 12:15:09	MARIA ISABEL DE OLIVEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 26 de Outubro de 2018

Assinado por:

Maria de Fátima Costa Pires
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3088-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Anexo III

BRIEF COMMUNICATION

<http://doi.org/10.1590/S1678-9946202062054>

Frequency of congenital cytomegalovirus infections in newborns in the Sao Paulo State, 2010-2018

Carla Grasso Figueiredo¹, Adriana Luchs¹, Edison Luiz Durigon², Danielle Bruna Leal de Oliveira², Vanessa Barbosa da Silva², Ralyria Melyria Mello², Ana Maria Sardinha Afonso¹, Maria Isabel de Oliveira¹

¹Instituto Adolfo Lutz, Centro de Virologia, São Paulo, São Paulo, Brazil

²Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas II, São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence to: Maria Isabel de Oliveira

Instituto Adolfo Lutz, Centro de Virologia, Núcleo de Doenças Respiratórias, Av. Dr. Arnaldo 355, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brazil

Tel: +55 11 3068 2906

E-mail: olive40@uol.com.br, maria.isabel@ial.sp.gov.br

Received: 13 May 2020

Accepted: 14 July 2020

ABSTRACT

Human cytomegalovirus (HCMV) infections remain a neglected public health issue. The aim of the present study was to evaluate the frequency of HCMV congenital infections in newborns up to 1 month in the Sao Paulo State, from 2010 to 2018. The molecular characterization of HCMV-positive samples was also undertaken. Urine samples from 275 potential congenital HCMV-infected patients were tested by real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR). HCMV-positive samples were amplified by conventional PCR targeting the UL89 gene, sequenced and searched for mutations. A total of 32 (11.6%) positive- HCMV cases were detected (mean Ct 30.59); mean and median age of 10.3 and 6 days old, respectively. Children aged between 0-3 weeks had higher HCMV detection rates (84.4%; 27/32). UL89 gene was successfully sequenced in two samples, both classified as the human betaherpesvirus 5. No described resistance-associated mutations were identified. A routine screening in newborns coupled with the genetic characterization of key viral genes is vital to decrease sequels associated with congenital HCMV infections.

KEYWORDS: Congenital cytomegalovirus infection. Real-time PCR. Surveillance. DNA sequencing.

INTRODUCTION

Human Cytomegalovirus (HCMV) is a ubiquitous human-specific DNA virus, belonging to the Herpesviridae family¹. A key characteristic of HCMV is its latency capacity, and after the primary infection HCMV can exit latency and re-enter the lytic lifecycle any time during the host life². HCMV infection can be acquired through contamination with different biological fluids, and intrauterine transmission can occur in pregnant women without pre-existing immunity who acquire the primary infection HCMV infection in pregnancy or in women with pre-existing antibodies to HCMV through the reactivation of the primary infection or by acquiring a different HCMV strain³. HCMV seroprevalence in adults ranges between 60% in developed countries and 100% in developing countries⁴. HCMV seropositivity in the Brazilian population range from 70% to 97%⁵⁻⁸. Congenital HCMV infection is the most common congenital infection worldwide, affecting 0.2% to 6.1% of live newborns¹. The prevalence of congenital HCMV infection in Brazil is 1-8%^{9,10}.

The diagnosis of the congenital HCMV infection should be conducted before the 3rd week of life. After this, it is difficult to distinguish congenital infection from infection acquired in the postnatal period¹¹. Traditionally, the virus isolation from urine or saliva samples in cell cultures has been the standard method for diagnosing the congenital HCMV infection. Recently, molecular techniques, as the polymerase chain reaction (PCR) and the real-time polymerase chain reaction (qPCR) has led to important advances in the congenital HCMV diagnosis¹². The early diagnosis of congenital HCMV infection and the clinical follow-up are essential to detect and manage the disease and prevent sequels¹³. Despite its importance and the availability of rapid and specific molecular tests, numerous newborns suffering from congenital HCMV infection remain undiagnosed in Brazil as the public health system do not perform the screening of HCMV in regular bases¹⁰.

The purpose of the present study was to evaluate the frequency of HCMV congenital infections in newborns up to 1 month of age in the Sao Paulo State from 2010 to 2018. The qPCR technique was used to screen urine samples aiming to apply this approach in future screening programs for HCMV congenital infections in the Brazilian Health System (SUS). In addition, molecular characterization of HCMV positive samples was also undertaken.

METHODS

This is a retrospective and descriptive study conducted with urine samples collected from newborns (< 1 month old). Urine samples were obtained from potential congenital HCMV-infected patients at Brazilian Unified Health System (SUS) units following medical request, and sent to the Respiratory Diseases Laboratory of Adolfo Lutz Institute, a reference center for HCMV surveillance in the Sao Paulo State. The present investigation was funded between collaborating institutes involved in public or non- public HCMV surveillance programs: (i) Regional Health Departments (DRS I to XVII), (ii) Clinical Hospital of Sao Paulo, (iii) Emilio Ribas Hospital, (iv) University Hospital of Sao Paulo and (v) Santa Casa Hospital of Sao Paulo. The routine of diagnostic tests conducted for HCMV at the Respiratory Diseases Laboratory includes more complex methodologies, such as viral isolation in cell cultures, conventional polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR (qPCR), and eventually, DNA sequencing. Serological tests to detect IgM and/or IgG are conducted at the requesting units. From 2010 to 2018, a total of 1,279 urine samples were received at the Respiratory Diseases Laboratory and the original urine samples were preserved at -70 °C. A total of 275 samples were randomly selected based on IgM-positive results and radiological exams suggestive of HCMV infection according to data retrieved from the medical records; and preserved specimen's availability. All the 275 urine samples were tested for the presence of HCMV exclusively by qPCR methodology as no other biological specimens belonging to the same selected patient were available for testing.

Viral DNA was extracted using the QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. The qPCR for the major- immediate early (MIE) gene was performed according to a previously described protocol¹⁴, generating amplicons of 76 bp. As a control to rule out the presence of PCR inhibitors, and to monitor the nucleic acid extraction efficiency, each sample was tested by qRT-PCR for the presence of the human ribonuclease (RNase) P gene following the protocol described by Emery et al.¹⁵. The threshold cycle (Ct) value from this qPCR was used as a proxy measure of the HCMV load. The Ct value is inversely proportional to the amount of virus present in the sample, so the lower the Ct value the higher the viral load¹⁶. Samples were considered positive when a Ct value ≤ 39 was obtained¹⁴. HCMV-positive samples were subsequently targeted for amplification by a conventional PCR with HCMV-specific primers 707s and 707as, amplifying a 519-nucleotide (nt) portion of the DNA packaging terminase subunit 1 (UL89), as described elsewhere^{17,18}. PCR amplicons were subjected to purification using the ExoSAP-IT™ Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and sequenced using the BigDye™ Kit v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the same primer pairs used for PCR¹⁸. Dye-labeled products were sequenced using an ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems, Inc., Foster city, CA, USA), following purification using Centri- Sep™ spin columns (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Sequencing chromatograms were edited manually using the Sequencher 4.7 software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA). Sequences were screened on the NCBI website using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) to assign the types of the studied strains. The typing verification was conducted using the MEGA software version 6.0 (NCBI, Bethesda, MD, USA). Prototype HCMV sequences, available in GenBank were aligned together with the sequences generated here using the BioEdit software, version 7.0.5.2 (Ibis Therapeutics, USA). Neighbor Joining (NJ) trees were constructed based on a Kimura 2-parameter model determined by MEGA 6.0 with 1000 bootstrap replicates¹⁹. Nucleotide sequences determined in this study were deposited in GenBank under the accession N° MT345567 and MT447555. The publically available web-based search tool MRA-mutation resistance analyzer²⁰ was used to identify possible mutations associated with drug resistance.

The ethical approval was granted by Adolfo Lutz Institute (CEP-IAL 2.984.740, CAAE 96782618.5.0000.0059). This was an anonymous unlinked study and informed consent was not required according to the Resolution N° 466/12 concerning research involving human beings (Conselho Nacional de Saude (CNS)/Ministerio da Saude (MS), Brasilia, 2012).

RESULTS AND DISCUSSION

Of the 275 urine samples tested, 32 specimens (11.6%) were positive for HCMV by qPCR targeting the MIE gene (mean Ct value of 30.59). The mean age of the newborns was 10.3 days (range: 2 days to 30 days), while the median age was 6 days old. Newborns aged between 0 and 3 weeks had higher detection rates of HCMV (84.4%; 27/32; mean Ct = 30.62) than infants in the age group older than 3 weeks (15.6%; 5/32; mean Ct = 30.40), emphasizing the importance of the early specimen collection (under 3 weeks of life) for the accurate diagnosis²¹. After this period, the assessment of the viral infection origin is impaired as the contagion could have occurred throughout the birth canal, saliva or breast milk¹⁰. No significant differences were observed between HCMV Ct levels and the newborns age. HCMV infections were detected throughout the study period (from 2010 to 2018), suggesting that urine samples frozen at -70 °C were stable for a long-term storage (around 10 years) after collection. It is well known that viruses can be stored and preserved at low or ultra-low temperatures as an infectious material for long periods of time²².

The frequency of congenital HCMV infections detected here (11.6%) was similar to the one observed in other study carried out in Japan (10%) using conventional PCR in urine samples²³. However, the infection rate was higher in comparison with Portugal (0.4%) and Belgium (0.5%) using viral isolation in cell cultures from urine samples^{24,25}; the USA (0.5%) using qPCR in saliva specimens targeting the glycoprotein B (gB) and the immediate early gene 2 (IE-2) exon 5 region¹²; and with the sub-Saharan Africa (3.8%) using qPCR in saliva, serum and urine samples targeting the phosphoprotein pp65 (UL83)²⁶. Lower prevalences have also been reported in previous studies

conducted in Brazil: Sao Paulo (1%) (1980-1982) using viral isolation in cell culture from urine samples and specific immunofluorescence anti-HCMV IgM in umbilical-cord serum²⁷, Belo Horizonte (6.8%) (1995-1998) and Porto Alegre (0.8%) (2003) using conventional PCR in urine samples^{28,29}; Ribeirao Preto (1%) (2003-2009) and Ilheus (1.2%) (2010-2012) using conventional PCR in urine and/ or saliva samples^{9,10}. This observed disagreement may be mostly associated with differences in the diagnostic methods and clinical samples^{10,24}. It is important to note that in-house qPCR is not a standardized methodology and different primers, target genes and amplification cycles can be used for HCMV detection^{12,14,26}, making comparison between studies rather complex. Divergence in prevalence rates might also be linked to the study design, recruitment criteria, settings, the number of specimens tested, and the socioeconomic status of the population^{10,24}. An investigation conducted by Pannuti et al.²⁷ suggested that in populations with unfavorable socioeconomically conditions, congenital HCMV infection tends to be more prevalent. This 9-year retrospective study helped to clarify the HCMV burden in congenital infections in the Sao Paulo State.

Regarding the 32 HCMV-positive samples, the UL89 gene could be amplified in six samples (18.7%; 6/32), but only two were successfully sequenced (2/6 or 33.3%). It is well known that qPCR provide a rapid diagnosis with increased sensitivity for the HCMV detection¹⁴. However, the molecular characterization depends mainly on conventional PCR followed by Sanger sequencing, which clearly impaired our capacity in identifying all the HCMV-positive samples. The typing verification and the phylogenetic analysis was performed with the 510 bp DNA packaging terminase subunit 1 (UL89) fragment. The genetic trees include the strains sequenced in this study (highlighted in bold) along with prototype sequences obtained from GenBank. Both samples (IAL-230 and IAL-259) were classified as Human betaherpesvirus 5 (HHV-5), forming a well-supported monophyletic group (Figure 1). The comparison of nucleotide sequences between the two Brazilian isolates showed a maximum identity of 100 % (100% aa), with similar high values also observed following the comparison with other HHV-5 strains (94.3% nt, 93.9-100% aa) identified worldwide. Recent attempts to develop new anti-HCMV compounds have focused on the viral terminase complex involved in the viral DNA cleavage/packaging. The terminase complex is highly HCMV-specific, with no counterpart in mammalian cells, thus representing a target of choice for new antivirals³⁰. The small subunit of the HCMV terminase complex is encoded by the Open Reading Frame - ORF UL8931, and multiple mutations have been detected in this ORF of drug-resistant isolates³². No described resistance-associated mutations within the UL89 gene were identified by the MRA-mutation resistance analyzer web tool in the Brazilian HCMV samples. Nevertheless, several mutations of yet unknown clinical significance were found (Figure 2). A large number of new mutations of undetermined medical implication has been identified in either clinical or laboratory isolates³³; however their impact on the HCMV treatment remain to be evaluated. Despite the recognized importance of the congenital

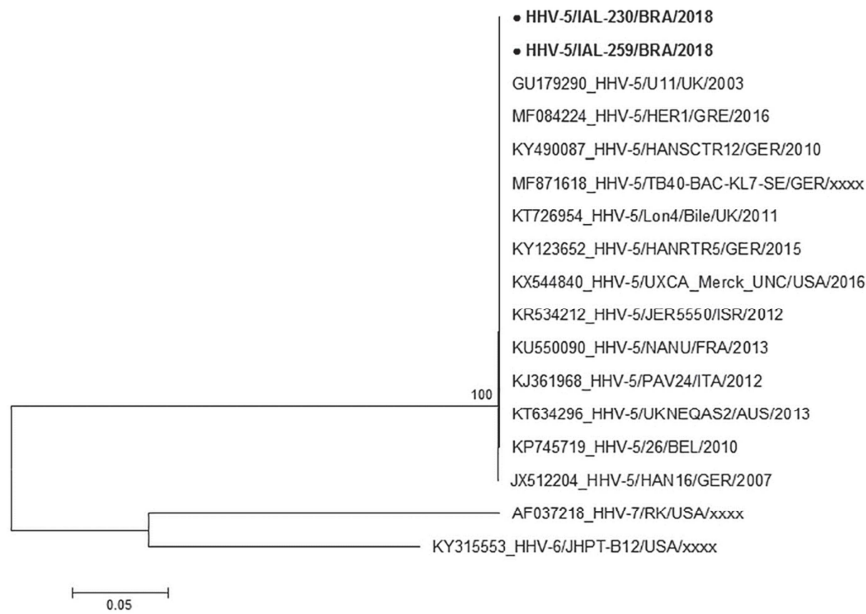


Figure 1 - Nucleotide sequence-based similarity analysis of the Brazilian Human betaherpesvirus 5 (HHV-5) DNA packaging terminase subunit 1 (UL89) (indicated in bold) with other selected HCMV strains. A neighbor-joining tree of partial UL89 ORF sequences was generated using the MEGA 6.0 software. Reference HHV-5 to -7 strains were obtained from the GenBank database. The accession number, isolates, country and year of each strain are indicated. The scale indicates the number of divergent nucleotide residues. Bootstrap values are shown as percentages at the branch nodes.

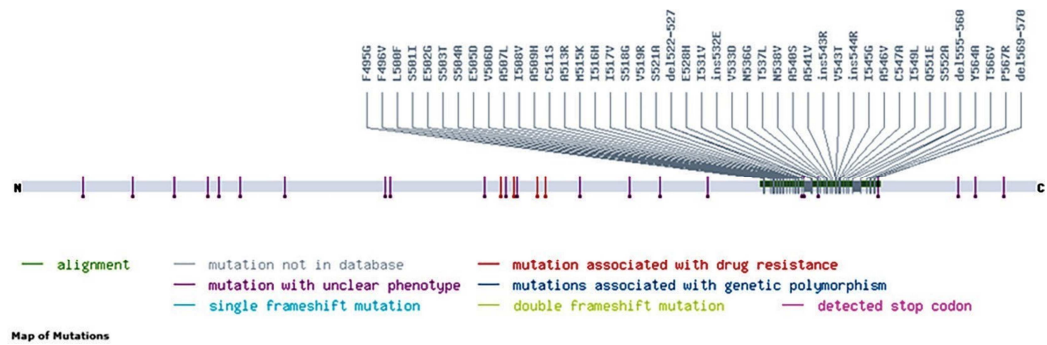


Figure 2 - Map of mutations (substitutions, insertions and deletions) identified in DNA packaging terminase subunit 1 (UL89) partial ORF gene sequences of the Brazilian Human betaherpesvirus 5 (HHV-5) IAL-230 and IAL-259 strains using the MRA-mutation resistance analyzer web tool20.

HCMV infection, it is still a wide neglected syndrome in Brazil. Significant advances in diagnostic techniques have occurred in the last years. Real time PCR is highly sensitive and could be applied in large scale. The implementation of a routine screening policy in newborns coupled with the genetic characterization of key viral genes is an important strategy focusing on decreasing the sequels associated with congenital HCMV infections.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

MIO conceived the study; ELD, DBLO, AMSA and MIO designed the study protocol.; CGF, AL, VBS, RMM and MIO participated in the conduct of the study; CGF and MIO acquired the data and performed the PCR assays; CGF, AL and MIO conducted the sequencing assays; CGF, AL, ELD, DBLO, VBS, RMM and MIO analyzed and interpreted the data; AL and MIO drafted the manuscript; CGF, ELD, DBLO, AMSA, VBS and RMM critically revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final version. MIO is guarantors of the paper.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have no conflict of interests to disclose.

FUNDING

This study was partially supported by Graduate Program in Science, Coordinator for Disease Control; Ministry of Health-PPG-CCD-SES/SP. Carla Grasso Figueiredo was supported by a fellowship of the Association for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

REFERENCES

1. Marsico C, Kimberlin DW. Congenital Cytomegalovirus infection: advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Ital J Pediatr.* 2017;43:38.
2. Dupont L, Reeves MB. Cytomegalovirus latency and reactivation: recent insights into an age old problem. *Rev Med Virol.* 2016;26:75-89.
3. Davis NL, King CC, Kourtis AP. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Birth Defects Res.* 2017;109:336-46.
4. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol.* 2015;235:288-97.
5. Suassuna JH, Leite LL, Villela LH. Prevalence of cytomegalovirus infection in different patient groups of an urban university in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1995;28:105-8.
6. Amaral RP, Amaral RP, Saidneuy AE, Ribeiro WL, Andrade J. Serological profile of potential solid organ donors in Santa Catarina, Brazil. *Transplant Proc.* 2008;40:665-7.
7. Guerra AB, Siravenha LQ, Laurentino RV, Feitosa RN, Azevedo VN, Vallinoto AC, et al. Seroprevalence of HIV, HTLV, CMV, HBV and rubella virus infections in pregnant adolescents who received care in the city of Belém, Pará, Northern Brazil. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2018;18:169.
8. Tiguman GM, Poll LB, Alves CE, Pontes GS, Silva MT, Galvao TF. Seroprevalence of cytomegalovirus and its coinfection with Epstein-Barr virus in adult residents from Manaus: a population-based study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:e20190363.
9. Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY, Moura Brito RM, Lima Isaac M, Carvalho e Oliveira PF, Boppana S, et al. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. *Clin Infect Dis.* 2009;49:522-8.
10. Marin LJ, Santos de Carvalho Cardoso E, Bispo Sousa SM, Debortoli de Carvalho L, Marques Filho MF, Raiol MR, et al. Prevalence and clinical aspects of CMV congenital infection in a low-income population. *Virol J.* 2016;13:148.
11. Fowler KB, Ross SA. Congenital viral infections continue to affect neonates. *Lancet Infect Dis.* 2020;20:152-3.
12. Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels MG, et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med.* 2011;364:2111-8.
13. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Marin LJ, Brito RM, Oliveira PF, Coelho TB. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV

infection? *J Clin Virol.* 2006;36:228-30.

14. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5189-98.
15. Emery SL, Erdman DD, Bowen MD, Newton BR, Winchell JM, Meyer RF, et al. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:311-6.
16. Phillips G, Lopman B, Tam CC, Iturriza-Gomara M, Brown D, Gray J. Diagnosing norovirus-associated infectious intestinal disease using viral load. *BMC Infect Dis.* 2009;9:63.
17. Chmielewicz B, Goltz M, Ehlers B. Detection and multigenic characterization of a novel gammaherpesvirus in goats. *Virus Res.* 2001;75:87-94.
18. Hargis AM, Ginn PE, Mansell JE, Garber RL. Ulcerative facial and nasal dermatitis and stomatitis in cats associated with feline herpesvirus 1. *Vet Dermatol.* 1999;10:267-74.
19. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30:2725-9.
20. Kestler HA. HCMV drug resistance mutations. [cited 2020 Jul 16]. Available from: <https://www.informatik.uni-ulm.de/ni/staff/HKestler/hcmv/>
21. Ebrahimi-Rad M, Shakeri TS, Shirvani F, Shahrokhi K, Shahrokhi N. Prevalence of congenital cytomegalovirus infection in symptomatic newborns under 3 weeks in Tehran, Iran. *BMC Infect Dis.* 2017;17:688.
22. Gould EA. Methods for long-term virus preservation. *Mol Biotechnol.* 1999;13:57-66.
23. Oda K, Oki S, Tsumura N, Nakao M, Motohiro T, Kato H. Detection of cytomegalovirus DNA in urine from newborns in NICU using a polymerase chain reaction. *Kurume Med J.* 1995;42:39-44.
24. Almeida S, Gouveia P, Jorge A, Mendes A, Duarte C, Faria N, et al. Infecção congénita por Citomegalovirus. Prevalência numa população da Beira Interior. *Acta Pediatr Port.* 2010;41:162-5.
25. Foulon I, Naessens A, Foulon W, Casteels A, Gordts F. A 10-year prospective study of sensorineural hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 2008;153:84-8.
26. Mwaanza N, Chilukutu L, Tembo J, Kabwe M, Musonda K, Kapasa M, et al. High rates of congenital cytomegalovirus infection linked with maternal HIV infection among neonatal admissions at a large referral center in sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis.* 2014;58:728-35.
27. Pannuti CS, Vilas-Boas LS, Angelo MJ, Carvalho RP, Segre CM. Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in two socioeconomically distinct populations of developing country. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1985;27:105-7.
28. Santos DV, Souza MM, Gonçalves SH, Cotta AC, Melo LA, Andrade GM, et al. Congenital cytomegalovirus infection in a neonatal intensive care unit in Brazil evaluated by PCR and association with perinatal aspects. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000;42:129-32.
29. Miura CS, Miura E, Mombach AB, Chesky M. The prevalence of congenital cytomegalovirus infection in newborn infants at an intensive care unit in a public hospital. *J Pediatr (Rio J).* 2006;82:46-50.
30. Ligat G, Cazal R, Hantz S, Alain S. The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view. *FEMS Microbiol Rev.* 2018;42:137-45.
31. Thoma C, Borst E, Messerle M, Rieger M, Hwang JS, Bogner E. Identification of the interaction domain of the small terminase subunit pUL89 with the large subunit pUL56 of human cytomegalovirus. *Biochemistry.* 2006;45:8855-63.
32. Buerger I, Reefschlaeger J, Bender W, Eckenberg P, Popp A, Weber O, et al. A novel nonnucleoside inhibitor specifically targets cytomegalovirus DNA maturation via the UL89 and UL56 gene products. *J Virol.* 2001;75:9077-86.
33. Komatsu TE, Pikis A, Naeger LK, Harrington PR. Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: a comprehensive review of putative resistance pathways. *Antiviral Res.* 2014;101:12-25.