

IMPORTANȚA METODEI PCR ÎN DIAGNOSTICUL INFECȚIEI CONGENITALE CU CITOMEGALOVIRUS

Aliona Chirca, Natalia Gheciu, Anatol Vișnevschi

Catedra Diagnostic de Laborator Clinic, USMF „Nicolae Testemițanu”

Summary

The importance of the PCR method in the diagnosis of the congenital infection CMV

In this article we elucidated: studies on the prevalence of congenital CMV infection at newborns, prenatal diagnosis problems of infection with CMV, PCR method as procedure, advantages and disadvantages, we presented the results of studies with PCR method at newborns infected with CMV with PCR in developed countries, which is currently the gold standard for diagnosis of congenital CMV infection.

Rezumat

În acest articol am elucidat: studii privind prevalența infecției congenitale cu CMV la nou-născuți, problemele de diagnostic prenatal al infecției cu CMV, metoda PCR ca procedura de efectuare, avantaje și dezavantaje, am prezentat rezultatele studiilor efectuate la nou-născuți infectați cu CMV în țările dezvoltate prin metoda PCR care actualmente este standartul de aur în diagnosticul infecției congenitale cu CMV.

Introducere

Infecția cu virusul citomegalic (CMV) se caracterizează prin polimorfism clinic, condiționând forme generalizate și localizate, frecvent asimptomatice și mai rar simptomatice prin variate tablouri clinice, în dependență de starea de imunocompetență a gazdei. Este cea mai comună infecție virală congenitală în țările dezvoltate, foarte des evoluind spre retard neuropsihic și deficit de dezvoltare somatică. Alături de rubeola și toxoplasmoza este responsabilă de malformații ale nou-născutului, cu sechele definitive sau, uneori cu sfârșit letal. Agentul etiologic (CMV) are dimensiuni mari și este format din genom, nucleocapsidă, tegument și anvelopă lipidică [2]. SNC este considerat drept cea mai importantă țintă a CMV la fătul în dezvoltare, deoarece CMV are capacitatea de a infecta țesutul endotelial, se consideră că endarterita virală ar fi responsabilă de dereglarea fluxului sanguin spre creierul în dezvoltare al fătului, cu rezultarea unui deficit neurologic marcat.

Infecția congenitală se realizează prin transmiterea materno-fetală a CMV de la gravide seronegative sau seropozitive. În majoritatea cazurilor fătul este infectat în timpul viremiilor, prin pasajul transplacentar al CMV sau prin continuitate, pe cale ascendentă, prin secrețiile vaginale. Transmiterea materno-fetală a CMV se poate produce pe parcursul întregii perioade a gravidității, dar cea mai gravă este în prima perioadă a sarcinii [2]. Infecția fetală se poate manifesta prin anomalii multiple și nespecifice, care pot fi evidențiate în timpul sarcinii prin ecografie și/sau RMN fetal: retard al creșterii, oligoamnios, anisocoria, dilatația intraventriculară, calcificări intracraniene sau hidrocefalee, microcefalee, hepatospleomegalie, calcificări intrahepatice, care pot duce la moartea in utero a fătului.

Forma simptomatică la naștere, cunoscută sub numele de boala cu incluziuni citomegalice, este rară (1:10000/1:20000 de nașteri), dar și foarte severă manifestându-se prin

prematuritate și hipotrofie, hepatosplenomegalie cu/sau fără icter, purpura trombocitopenică, semen de afectare a SNC – microcefalie, hidrocefalie, convulsii, paralizii, chorioretinită ect [3]. La 80-100% din cei supraviețuiți se vor dezvolta sechele neurosenzoriale impotante : hipoacuzie neurosenzorială progresivă, retard mental, microcefalee, hepatită CMV cu/sau fără icter [2].

În 90-95% de cazuri, de nou-născuți infecția CMV este una asimptomatică la naștere, care inițial prezintă doar viremie, virurie, Ig M și Ig G anti-CMV cărora se vor efectua examene complementare pentru evidențierea anemiilor, trombocitopeniilor, sindromului de citoliză hepatică, anomaliilor cerebrale și oculare. Pe parcurs, 10-15% din ei vor prezenta un risc major de handicap prin retard psihomotor, surditate, leziuni ocular [2]. Infectarea perinatală se realizează în timpul nașterii prin secreții cervical sau postpartum prin intermediul laptelui matern și nu are consecințe negative asupra dezvoltării neuropsihice ulterioare a copiilor, deoarece în laptele matern se conține Ig A specific, cu excepția prematurilor. La prematuri, de rînd cu riscul semnificativ de transmitere a infecției, este posibilă și dezvoltarea formelor severe, generalizate de boală cu rata decesului de circa 30% [3]. În cazul în care seroprevalența printre mame este înaltă și alăptarea la sân este practică pe scară largă – circa 30-70% din sugari dobîndesc infecția CMV pe parcursul primului an de viață, dar aceasta nu are efect negativ asupra dezvoltării neuropsihice a copiilor [2]. Copii de vîrstă preșcolară pot achiziționa CMV unii de la alții, în special în colectivitățile de copii, iar după suportarea infecției vor elimina virusul cu saliva și/sau urina timp de mai mulți ani. Virusul este prezent în sânge, salivă, lacrimi, spermă, secreții de col uterin, urină, laptele mamelor seropozitive. CMV se transmite prin contact direct cu fluidele corporale, în timpul contactelor intime, manoperelor de îngrijire a copiilor mici, transfuziilor de sânge, transplantul de organe. Ponderea nou-născuților infectați cu CMV (0,5%-5,4%) și a crescut odată cu seroprevalența preconcepțională a femeilor [3]. În scopul aprecierii riscului infecției congenital cu CMV la făt la gravide cu infecție primară cu CMV, se recomandă a efectua diagnosticul prenatal la 21-23 de săptămâni ale sarcinii, prin detectarea CMV în lichidul amniotic prin metoda virusologică clasică sau AND-ului CMV prin PCR.

Standardul de aur pentru diagnosticul de infecție congenital cu CMV la nou-născuți rămîne izolarea virusului din urină, salivă și/sau singe în primele 2-3 săptămâni de viață (termen necesar pentru diferențiere infecțiilor cu CMV perinatală și congenital) [2].

PCR. Reacția de polimerizare în lanț

Bazîndu-se pe procesul natural al replicării AND-ului, sa elaborat metoda cu ajutorul căreia se pot obține copii ale anumitor porțiuni ale genelor în cantități nelimitate într-un tub (in vitro). Ea oferă posibilitatea de a determina rapid cu specificitate înaltă a particularităților construcției genetice a organismelor vii, identificarea AND-ului/ARN-ului și determinarea genotipului microorganismelor, așa deci genotiparea poate fi realizată cu ajutorul reacției de polimerizare în lanț. Reacția de polimerizare în lanț este un proces ciclic de sinteză a copiilor noi ale unui fagment de AND selectat care are loc sub formă de alternare a parametrilor temperaturii mediului de reacție. Mediul de reacție trebuie să conțină: AND-matriță, dezoxinucleozidtrifosfați, AND-polimeraza, amorse, la fel adaosuri suplimentare care optimizează procesul de polimerizare, MgCl₂, soluție tampon pentru Taq-polimerază [10].

La baza metodei PCR este procesul de sinteză in vitro a unui anumit segment-țintă din catena AND, sub influența enzimei AND dependent numită Taq-polimeraza care exercită consecutiv citirea și legarea nucleotidelor, complementare cu catena AND-matriță și formarea catenei noi de AND-fică. Sinteza catenei noi se inițiază în anumite puncte stabilite în lungul AND-ului numite situsuri de inițiere. Pentru inițierea sintezei alături de AND-matriță se mai folosesc două porțiuni polinucleotidice, monocatenare, de dimensiuni relativ mici complementare cu situsurile de inițiere PCR din AND-ul matriță, numite amorse (praimer). Cu cât sunt mai mari dimensiunile amorserilor, cu atît este mai înaltă specificitatea metodei.

Ciclu PCR începe cu denaturarea catenelor de AND prezente în mediul de reacție, care are loc la temperatura de aproximativ 92⁰-95⁰C, legăturile de hydrogen dintre catene se rup (etapa de denaturare), drept urmare se obțin două catene (monocatenare) liniare – catenele – matriță [10]. În următoarea etapă a ciclului temperatura se micșorează până la 45⁰-70⁰C, amorsele se cuplează cu sectoarele ei complementare de pe catenele AND (etapa de hibridizare), iar AND-polimeraza începe sinteza catenei complementare, extinzând amorsa de la extremitatea 3'. Apoi temperatura se mărește până la optimă pentru AND-polimerază (72⁰C, depinde de polimerază), cu scopul realizării maxime a activității enzimei (etapa de sinteză). Stoparea reacției de sinteză are loc la mărirea temperaturii – mai mult de 92⁰C, AND-polimeraza finisează procesul de sinteză. În urma unui ciclu PCR în mediu de reacție cantitatea de AND se dublează, pe lângă aceasta se dublează și numărul sectoarelor recunoscute de amorse.

După al doilea ciclu, în mediu de reacție sunt prezente segmente ale spiralei duble, care sunt limitate de pe o parte de prima amorsă, pe de altă parte – de segmentul de cuplare a amorsei doi, mai deprte de această extremitate dublă polimeraza nu acționează. După 30-40 de cicluri cantitatea de fragmente AND sintetizate (ampliconi) atinge câteva milioane de copii și este ușor de detectat cu ajutorul metodelor de electroforeză în gel, în prezența colorantului fluorescent, care se cuplează nespecific cu moleculele acizilor nucleici [10].

Modificările metodei PCR: multiplex PCR, PCR în cuib, PCR în regimul timpului real.

Pentru multiplicarea simultană a două și mai multe secvențe de AND-țintă, pe larg se utilizează multiplex PCR, care este un proces de coamplificare a câtorva matrițe AND într-un mediu de reacție cu utilizarea diverselor perechi specifice de amorse, ce permit determinarea concomitentă a prezenței factorilor de virulență și de rezistență la preparatele antibacteriene și antivirale [10].

Într-un studiu efectuat în anul 2011 în statul Washington pe un lot de 55 de nou-născuți testați la două centre concomitent au fost obținute 36 (66%) rezultate pozitive la centrul 1, 40 (73%) au fost pozitive la centrul 2, în 9 cazuri au fost rezultate negative la ambele centre [7,8,6]. Una din cele mai răspândite variante ale PCR este PCR în cuib ce are drept scop creșterea sensibilității PCR prin reamplificarea direct a produsului primei reacții. În prezent sunt folosite două tipuri de PCR în cuib: cu două tuburi și cu un cuib, primul tip posedă riscul de contaminare a mediului cu aerosoli în timpul transferului din primul în al doilea tub. Altă latură care complică reacția este faptul că produsul primei runde de amplificare nu poate fi inactivat și este disponibilă pentru a doua etapă [10].

Un studiu efectuat în Departamentul de Microbiologie din Leiden în perioada dintre anii 2009-2011, prin genotiparea a 39 de probe de plasmă a nou-născuților infectați cu CMV prin metoda PCR pentru glicoproteina B (GB) și glicoproteina H (GH) a demonstrat că genotipurile GB și GH au fost detectate în 33-36% din monsterele studiate cu rezultatul de 81% pentru GB și 73% pentru GH. Genotiparea a avut succes 100% cu prevalența GB 1 și GB 3, și totuși GB 3 (M60934, M85228, M60933) fiind cel mai răspândit genotip [5]. Același Departament de Microbiologie din Leiden în perioada anilor 2009-2011 au studiat genotipul urinei a 21 de nou-născuți infectați congenital cu CMV de asemenea prin metoda PCR teste pentru GB și GH. Rezultatele obținute GB 1 (48%, 10/21), GB 3 (29%,6/21) și GH 2 (62%, 13/21), o probă de urină a unui nou-născut cu CMV congenital a fost pozitivă atât pentru GB 1 și GB 2 ce indică o infecție mixtă [5].

Metoda PCR în regimul timpului real este o metodă cantitativă a produselor PCR nemijlocit în timpul amplificării devine una din cele mai populare metode atât în diagnosticul clinic, cât și în cercetările științifice. Din cauza omiterii electroforezei se exclude total contaminarea cu produsele reacției, de asemenea această metodă oferă posibilitatea determinării cantitative a materialului inițial, și detectarea paralelă a mai multor infecții într-o singură

monstră. Metoda se bazează pe măsurarea semnalului fluorescent în fiecare ciclu de amplificare [10].

Studiu a 222 de copii în vârstă de 4 ani cu hipoacuzie neurosenzorială din statul Washington prin testare sîngelui prin metoda PCR în timp real a stabilit că la 35-65% din simptomatici, și la 7-15% din cei asimptomatici au dezvoltat în cele din urmă hipoacuzie neurosenzorială. Sa stabilit că în statul Washington una din cele mai comune cauze ale hipoacuziei neurosenzoriale în perioada copilăriei este infecția congenitală cu CMV [4,1].

Un lot de 177 de nou-născuți au fost testați pentru polimeraza salivară prin metoda PCR în timp real. Testul a avut o sensibilitate de 100% (95% ÎI, 95,8 la 100), și o specificitate de 99,9% (95% CI, 99,9 la 100). Această metodă poate fi folosită ca un test screening pentru detectarea infecției citomegalice la nou-născuți în primele două săptămâni de viață [9].

Pregătirea pacientului – nu trebuie să primească preparate chimice 10 zile înainte de recoltarea materialului biologic, să nu efectueze proceduri medicale [10]. În calitate de material biologic pentru investigațiile PCR în infecțiile cu CMV la nou-născuți se utilizează: sângele, saliva și urina nou-născutului.

Criteriile obligatorii atât pentru recoltarea materialului biologic (de orice fel) pentru analizarea prin PCR:

- utilizarea instrumentariului de unică folosință sau steril;
- marcarea sau etichetarea corespunzătoare a conținutului eprubetelor;
- recoltarea sîngelui pentru PCR se efectuează în eprubete de plastic, de uz unic, ce conțin soluție de EDTA;
- urina se recoltează dimineața, într-un vas steril și chimic curat, după centrifugare se înlătură urina de deasupra iar sedimentul se transferă în eprobeta pentru PCR, care se închide etanș și se marchează;

Păstrarea probelor:

- probele se păstrează la temperatura 4⁰-8⁰C timp de 24 ore;
- la temperatura -18⁰, -20⁰C timp de 30 zile;
- la temperatura -70⁰C se păstrează timp îndelungat (ani de zile);
- probele destinate investigării cantitative pot fi păstrate (4⁰-8⁰C) timp de 6 ore de la colectarea materialului biologic;

Transportarea materialului biologic se efectuează în containere cu elemente de răcire sau în termos cu gheață. Containerelor trebuie să fie închise etanș, impermeabile pentru lichide, ele trebuie etichetate corespunzător conținutului. Containerelor trebuie să fie produse din material rezistent la dezinfectanți, să fie autoclavabile, și este necesar să fie decontaminate după fiecare utilizare.

Avantajele metodei PCR:

1. Sensibilitate înaltă, deoarece metoda este bazată pe principiul exponențial de acumulare a produsului amplificat.
2. Specificitate înaltă bazată pe identificarea secvențelor de material genetic unical pentru microorganism, ce determină particularitățile de clasă, toxicitate, etc.
3. Timp scurt de efectuare 2-6 ore de la începutul examinării în cazul în care nu trebuie să fie transportate.
4. Procedură universală de executare – este aplicabilă practic pentru toți agenții patogeni.
5. Material biologic variat – agentul patogen fiind identificat în orice lichid biologic al organismului, și nu este necesară creșterea culturii pe medii sau izolarea culturii curate de agent patogen.

6. Diagnosticul diferitor procese patologice – este posibil diagnosticul formelor acute, cronice, trenante, seronegative, diagnosticul microorganismelor cu posibilități reduse de cultivare.
7. Perioada bolii – este posibilă identificarea agentului patogen nu numai în perioada de stare sau cronică, dar și în perioada de incubare a bolii (fereastra imunologică) depistarea AND-ului. ARN-ul se depistează după o săptămână sau două de la infectare.
8. Este o metodă directă de identificare a agentului patogen, bazată pe modalitatea universală de păstrare și transmitere a informației genetice la materia vie.

Dezavantajele metodei PCR sunt legate mai mult de recoltarea, păstrarea și transportarea materialului biologic. Metoda PCR cu două tuburi prezintă dezavantaje de ordin tehnic: riscul contaminării mediului cu aerosoli, reacția complicată de faptul că produsul primei runde de amplificare nu poate fi inactivat și este disponibil pentru a doua reacție [10].

Concluzii

Infecția congenitală cu CMV este cea mai comună infecție virală congenitală în țările dezvoltate, foarte des evoluind spre retard neuropsihic și deficit de dezvoltare somatică. Reprezintă o problemă actual imperioasă a sănătății publice, puțin studiate, în Republica Moldova față de țările înalt dezvoltate unde are loc testarea pe larg a nou-născuților în primele două săptămâni de viață. Obiectivele ce țin de viitorul apropiat sunt: perfectarea diagnosticului prenatal al infecției cu CMV, optimizarea criteriilor de diagnostic al infecției congenitale cu CMV la nou-născuți și sugari.

Bibliografie

1. Aparecida Yulie Yamamoto, Marisa Marcia Mussi-Pinhata, Myriam de lima Isaac: Congenital Cytomegalovirus Infection as a Cause of Sensorineural Hearing Loss in a Highly Immune Population. *Pediatr Infect Dis J.* 2011 Dec;30(12):1043-6.
2. Gheorghe Țîbîrnă, Ion Ababii, Stanislav Groppa: Buletinul Academiei de Științe a Republicii Moldova. Științe Medicale. Nr 5, Chișinău 2010, 5-11p.
3. Gheorghe Țîbîrnă, Ion Ababii, Stanislav Groppa: Buletinul Academiei de Științe a Republicii Moldova. Științe Medicale. Nr 3, Chișinău 2007, 179-184p.
4. Jannick Verbeeck, Erwin Van Kerschaver, Elke Wollants: Detection of Perinatal Cytomegalovirus Infection and Sensorineural Hearing Loss in Belgian Infants by Measurement of Automated Auditory Brainstem Response. *J Clin Microbiol.* 2008 Nov;46(11):3564-8.
5. Jutte J. C. de Vries, Els Wessels, a Anna M. H. Korver, b Annemiek A. van der Eijk: Rapid Genotyping of Cytomegalovirus in Dried Blood Spots by Multiplex Real-Time PCR Assays Targeting the Envelope Glycoprotein gB and gH Genes. *J Clin Microbiol.* 2012 Feb;50(2):232-7.
6. Nicholas Renzette, Bornali Bhattacharjee, Jeffrey D. Jensen, Laura Gibson: Extensive Genome-Wide Variability of Human Cytomegalovirus in Congenitally Infected Infants. *PLoS Pathog.* 2011 May;7(5):e1001344.
7. Oriane Soetens, Christelle Vauloup-Fellous, Ina Foulon, Pascal Dubreuil: Evaluation of Different Cytomegalovirus (CMV) DNA PCR Protocols for Analysis of Dried Blood Spots from Consecutive Cases of Neonates with Congenital CMV Infections. *J Clin Microbiol.* 2008 Mar;46(3):943-6.
8. Shekleton P, Walker SP, Palma-Dias R, Wood EM, Cytomegalovirus in pregnancy: to screen or not to screen. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2013 Apr 18;13(1):96..
9. Suresh B. Boppana, Shannon A. Ross, Masako Shimamura, April L. Palmer: Dr.P.H., for the National Institute on Deafness and Other Communication Disorders CHIMES Study. Saliva

Polymerase-Chain-Reaction Assay for Cytomegalovirus Screening in Newborns. N Engl J Med. 2011 Jun 2;364(22):2111-8.

10. Vladimir Nahaba: Metodele molecular genetice de cercetare (PCR) în diagnosticul de laborator al infecțiilor , Chișinău 2009 , 7-14 p.
web site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

TESTUL HPV- DETECTAREA ȘI GENOTIPAREA TULPINILOR CU RISC ONCOGEN ÎNALT / SCĂZUT

Natalia Gheciu, Aliona Chirca, Anatol Vișnevschi

Catedra Diagnostic de Laborator clinic USMF "Nicolae Testemițanu"

Summary

HPV test - detection and genotyping of the strains with high / low oncogenic risk

Human Papillomavirus (HPV) is the most common cause of cervical cancer. Cervical cancer represents the second most common cause of death after breast cancer, affecting women of different age groups; with a prevalence of over than about 20% in young sexually active women. Among different types of HPV, type HPV16-18 represents major strains causing this cancer and being sexually transmitted it had been unnoticed for decades. Elaboration and implementation of various diagnostic methods prove to be an effective way in eradicating the oncogenic potential of HPV.

Rezumat

Papilomavirus uman (HPV) este cea mai frecventă cauză a cancerului de col uterin. Cancerul cervical reprezintă a doua cauză de deces la femei după cancerul mamar care afectează femeile de diferite vârste cu o prevalență mai înaltă de aproximativ 20% la cele tinere active sexual. Printre diferite tipuri de HPV, tipul 16 -18 sunt tulpini majore care cauzează acest tip de cancer. Elaborarea și implementarea diverselor procedee de diagnosticare se dovedesc a fi o modalitate eficientă în eradicarea potențialului oncogenic de HPV.

Actualitatea

Cancerul cervical este una din cauzele de bază a mortalității femeilor, îndeosebi a celor tinere. Raportul variază peste tot în lume, dar o rată semnificativ de mare a fost stabilită în țările occidentale [11]. În urma unor analize statistice și geografice s-a demonstrat ca nivelul HPV e mai mare la femeile americane decât la cele caucaziene.[8]

Conform statisticilor a Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) sunt înregistrate aproximativ 500.000 de cazuri noi anual din care 250.000 cazuri sunt fatale. Conform celor mai recente rapoarte, femeile sunt predispuse la această infecție de două ori mai mult decât bărbații [9].

Prevalența globală a HPV în rândul femeilor indiferent de rasă constituie o rată de 17,9% în timp ce bărbații au o rată de 8%. Persoanele cu multipli parteneri sexuali sunt predispuși la un risc mai mare de infectare cu HPV de 20,1% față de persoanele care au un singur partener sexual pe întreaga durată a vieții sexuale, la care riscul de infectare cu HPV e de 7% [8].

Virusul Papiloma Uman este un virus frecvent întâlnit care cauzează leziuni celulare sau tumori la nivelul pielii; deasemenea poate determina modificări ale țesuturilor de la nivelul membrelor superioare și inferioare, corzilor vocale, gurii și organelor genitale [13].