

CAT

Critically Appraised Topic

Nut van CMV-PCR tijdens de zwangerschap: Correlatie tussen CMV viral load bepalingen in vruchtwater en afwijkingen bij de foetus/het kind

Author: Britt Van Meensel
Supervisor: Prof. Ap. K. Lagrou
Search/methodology verified by: Dr. Johan Frans
Date: 13/2/2006
Expiry date: 13/2/2008

CLINICAL BOTTOM LINE

Uit literatuurgegevens blijkt dat het uitvoeren van een vruchtwaterpunctie voor het opsporen van CMV best gebeurt vanaf 21 weken zwangerschap en minstens 6 weken na de maternale infectie. Indien de PCR positief is, kan er besloten worden dat er transmissie van het virus heeft plaatsgevonden van de moeder naar het kind, m.a.w. dat het kind een congenitale CMV-infectie zal hebben. Indien echter de PCR negatief is kan men niet volledig uitsluiten dat er geen transmissie heeft plaatsgevonden en bestaat er nog steeds een zeker risico dat het kind geïnfecteerd zal zijn. In het geval van een positieve PCR kan men aan de viral load geen prognose koppelen voor het kind. De viral load lijkt eerder gerelateerd te zijn aan de zwangerschapsduur waarop de punctie wordt uitgevoerd dan aan de ernst van de CMV-infectie bij het kind.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Cytomegalovirus (CMV)-infectie is de meest voorkomende en klinisch belangrijkste congenitale virale infectie. De prevalentie van congenitale CMV-infecties schommelt tussen de 0.2 en de 2.2 % afhankelijk van de seroprevalentie van de onderzochte populatie (8). In België bedraagt de prevalentie van een congenitale CMV-infectie 0.49 % (2).

Infectie van zwangere vrouwen gebeurt via twee belangrijke wegen (7): enerzijds via seksueel contact en anderzijds via contact met jonge kinderen, voornamelijk kinderen in kinderdagverblijven. Pass et al. stelden vast dat in kinderkribben 83 % van de kinderen tussen 13 en 24 maanden oud CMV excreteert (30). Seronegatieve kinderen worden op deze manier vaak door hun leeftijdsgenootjes besmet en deze kinderen kunnen dan het virus doorgeven aan hun seronegatieve moeder via speeksel bij het zoenen en knuffelen of via urine bij het verluieren.

Het risico op een seroconversie tijdens de zwangerschap, bedraagt ongeveer 1 à 2 %, het risico op een reactivatie circa 1-3 %, maar de diagnose van dit laatste blijft moeilijk (7).

Bij een *CMV primo-infectie* tijdens de zwangerschap bedraagt de kans dat de zwangere het virus via de placenta overdraagt op het kind ongeveer 30-50 %. Van deze geïnfecteerde kinderen is bij de geboorte ongeveer 90 % asymptomatisch doch 10-15 % van deze asymptomatische kinderen zullen op latere leeftijd symptomen vertonen zoals progressieve doofheid, visuele stoornissen, leerproblemen of een vertraagde ontwikkeling.

De overige 10 % is bij de geboorte symptomatisch, gaande van mild tot levensbedreigend met een mortaliteit van ongeveer 20 %. Het kan gaan om een veralgemeend beeld met petechiën, purpura, icterus, hepatosplenomegalie en pneumonie, ofwel om meer gelokaliseerde symptomen zoals microcefalie, periventriculaire calcificaties, ventriculaire dilatatie, hypotonie, oftalmologische symptomen, of een combinatie van systemische en gelokaliseerde symptomen. De grote meerderheid van deze symptomatische kinderen zal bovendien ernstige restletfels vertonen (zware mentale retardatie, doofheid, ...).

Ook bij een *reactivatie* van een vroegere CMV-infectie of bij een *berinfectie* bestaat er een zeker risico op transmissie, doch dit risico is veel lager dan bij een primo-infectie en schommelt rond de 2 %. De ernst en frequentie van symptomen en laboratoriumafwijkingen zou echter in dezelfde range liggen als bij de primo-infectie en ook de incidentie van sequellen zou niet verschillen (9).

Screenen naar een acute CMV-infectie tijdens de zwangerschap is momenteel zeer controversieel en is ook niet opgenomen in de huidige guidelines (1,3,4). Redenen die worden aangehaald zijn dat:

- 1) men momenteel niet kan aantonen bij welke zwangerschappen er intrauteriene transmissie heeft plaatsgevonden;
- 2) men niet kan voorspellen welke kinderen symptomatisch zullen zijn;
- 3) men de ernst van de symptomen niet kan voorspellen;
- 4) er momenteel geen vaccin of profylactische therapie bestaat en de enige optie het beëindigen van de zwangerschap is.

In praktijk ziet men echter dat veel zwangeren toch gescreend worden voor CMV tijdens de zwangerschap: 70 % van de vrouwen ondergaat de test minstens 1 maal per zwangerschap, in 19 % van de gevallen wordt deze test zelfs meer dan 3 maal herhaald (2).

Voorstanders om zwangeren toch te screenen halen volgende argumenten aan (50):

1. Men krijgt stilaan een beter inzicht in de pathogenesis.
Zo weten we dat maternelle infecties in het eerste trimester van de zwangerschap frequenter aanleiding geven tot afwijkingen van het centraal zenuwstelsel dan tijdens het verdere verloop van de zwangerschap (14).
2. Men heeft goede serologische testen.
Naast CMV IgM en IgG antistoffen, is er nu ook de CMV IgG aviditeit.
3. Men kan het screenen koppelen aan enkele interventies:
 - gedragsinterventies voor CMV-negatieve moeders; de CDC bracht een brochure uit waarin aanbevelingen worden gegeven ter preventie van CMV-infecties tijdens de zwangerschap (53);
 - monitoren van de zwangerschap met echo, KST en evt. amniocentese/cordocentese (?);
 - eventueel beëindigen van de zwangerschap;
 - monitoren van de pasgeborenen;
 - naar de toekomst toe: toedienen van CMV-hyperimmunoglobulines.

Het Belgisch Kenniscentrum adviseert dat een eenmalig serologisch onderzoek voor of aan het begin van de zwangerschap nuttig kan zijn als dit vrouwen kan motiveren tot het nemen van preventieve maatregelen en als relatieve geruststelling bij bestaande immuniteit (2).

De politiek die men momenteel volgt in het UZ Gasthuisberg is de volgende (52):

Indien een zwangere een CMV primo-infectie oploopt, worden de mogelijke risico's uitvoerig besproken. De zwangere kan dan van nabij worden opgevolgd met echo- en KST-onderzoeken (hersenaafwijkingen zijn echter vaak pas zichtbaar vanaf 30 weken zwangerschap). Indien hieruit

blijkt dat het kind ernstige afwijkingen zal vertonen, kan er geopteerd worden voor een laattijdige zwangerschapsonderbreking.

Bedoeling van deze CAT is na te gaan wat in deze setting de waarde is van een kwantitatieve PCR op amniosvocht.

QUESTION(S)

Patiënt: zwangeren

Intervention: kwantitatieve PCR voor detectie van CMV in amniosvocht

Comparison:

- 1) Vóór de geboorte zijn er momenteel geen andere testen die kunnen bepalen of er een transmissie van het virus naar de foetus heeft plaatsgevonden. Na de geboorte wordt de diagnose van een congenitale CMV-infectie gesteld door middel van een virale kweek op urine afgenomen vóór de derde levensweek. Indien de zwangerschap werd beëindigd, kunnen CMV-inclusies via anatomopathologisch onderzoek worden opgespoord om de infectie te bevestigen.
- 2) Om de ernst van de infectie bij het kind vóór de geboorte te voorspellen, zijn de middelen momenteel zeer beperkt. Men kan de zwangere opvolgen met behulp van echografie en KST, maar deze onderzoeken hebben een lage sensitiviteit om afwijkingen op te sporen en bovendien zijn deze afwijkingen vaak slechts zeer laat tijdens de zwangerschap zichtbaar. De ernst van de symptomen kan deels worden geëvalueerd bij de geboorte door middel van beeldvorming, labo-onderzoeken en klinisch onderzoek en zal deels moeten blijken uit de verdere follow-up van het kind.

Outcome:

- 1) Kan PCR op amniosvocht congenitale CMV-infectie aantonen?
- 2) Kan de kwantitatieve PCR op amniosvocht de ernst van de symptomen bij het kind voorspellen?

SEARCH TERMS

- 1) *MeSH Database (PubMed): MeSH term: "Cytomegalovirus"; "Cytomegalovirus Infections/Congenital"*
Other key words: group B streptococcus, GBS, Lim broth, Strep B OIA, IDI Strep B, PCR
- 2) *PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)*
- 3) *Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), National Guideline Clearinghouse (<http://www.ngc.org/>), Institute for Clinical Systems Improvement (<http://www.icsi.org/>), The National Institute for Clinical Excellence (<http://www.nice.org.uk/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>), Health Technology Assessment Database (<http://www.york.ac.uk/inst/crd/htahp.htm>)*
- 4) *Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd Edition, by Isenberg, April 2004. Published by American Society for Microbiology Press (ASM)*
- 5) *UpToDate Online version 14.2 (2005)*
- 6) *Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th edition, by Mandell, October 2004. Published by Churchill Livingstone*
- 7) *CLSI/NCCLS publications*

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1) Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)

- 2005: ICSI: Routine Prenatal Care. (1)
- 2004: Federaal kenniscentrum voor de gezondheidszorg (KCE): Nationale richtlijn prenatale zorg: een basis voor een klinisch pad voor de opvolging van zwangerschappen. (2)
- 2003: NICE: Antenatal care; routine care for the healthy pregnant woman. (3)
- 2000: ACOG: Perinatal viral and parasitic infections. (4)

2) Reviews

- Biron KK. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* 2006 Sep;71(2-3):154-63. (5)
- Mendelson E, Aboudy Y, Smetana Z, Tepperberg M, Grossman Z. Laboratory assessment and diagnosis of congenital viral infections: Rubella, cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), herpes simplex virus (HSV), parvovirus B19 and human immunodeficiency virus (HIV). *Reprod Toxicol.* 2006 May;21(4):350-82. (6)
- Collinet P, Subtil D, Houfflin-Debarge V, Kacet N, Dewilde A, Puech F. Routine CMV screening during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004 May 10;114(1):3-11. (7)
- Revello MG, Gerna G. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Clin Virol.* 2004 Feb;29(2):71-83. (8)
- Gaytant MA, Rours GI, Steegers EA, Galama JM, Semmekrot BA. Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection: case reports and review of the literature. *Eur J Pediatr.* 2003 Apr;162(4):248-53. (9)
- Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Oct;15(4):680-715. (10)

3) Original Articles

- Smets K, De Coen K, Dhooge I, Standaert L, Laroche S, Mahieu L, Logghe N, Cossey V, Boudewyns A. Selecting neonates with congenital cytomegalovirus infection for ganciclovir therapy. *Eur J Pediatr.* 2006 Dec;165(12):885-90. (11)
- Dreux S, Rousseau T, Gerber S, Col JY, Dommergues M, Muller F. Fetal serum beta2-microglobulin as a marker for fetal infectious diseases. *Prenat Diagn.* 2006 May;26(5):471-4. (12)
- Czuba B, Borowski D, Machnik G, Slawska H, Mazurek U, Wloch A, Kaminski K, Wilczok T. Risk of fetal cytomegaly virus infection depending on number of CMV genome in mother's blood and amniotic fluid. *Ginekol Pol.* 2006 Apr;77(4):269-75.[Polish, abstract]. (13)
- 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 Feb;35(2):216-20. (14)
- Revello MG, Lilleri D, Zavattoni M, Furione M, Genini E, Comolli G, Gerna G. Lymphoproliferative response in primary human cytomegalovirus (HCMV) infection is delayed in HCMV transmitter mothers. *J Infect Dis.* 2006 Jan 15;193(2):269-76. (15)
- Nye MB, Leman AR, Meyer ME, Menegus MA, Rothberg PG. Sequence diversity in the glycoprotein B gene complicates real-time PCR assays for detection and

- quantification of cytomegalovirus. *J Clin Microbiol.* 2005 Oct;43(10):4968-71. (16)
- Nigro G, Adler SP, La torre R, Best AM. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 2005 Sep 29;353(13):1350-62. (17)
 - Picone O, Costa JM, Chaix ML, Ville Y, Rouzioux C, Leruez-Ville M. Human cytomegalovirus UL144 gene polymorphisms in congenital infections. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan;43(1):25-9. (18)
 - Picone O, Costa JM, Leruez-Ville M, Ernault P, Olivi M, Ville Y. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotype and CMV DNA load in the amniotic fluid of infected fetuses. *Prenat Diagn.* 2004 Dec 15;24(12):1001-6. (19)
 - Lazzarotto T, Gabrielli L, Lanari M, Guerra B, Bellucci T, Sassi M, Landini MP. Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. *Hum Immunol.* 2004 May;65(5):410-5. (20)
 - Avidor B, Efrat G, Weinberg M, Kra-oz Z, Satinger J, Mitrani-Rosembaum S, Yaron Y, Shulman L, Tepperberg-Oikawa M, Wolf D, Berger SA, Lipitz S, Mendelson E, Giladi M. Insight into the intrinsic sensitivity of the PCR assay used to detect CMV infection in amniotic fluid specimens. *J Clin Virol.* 2004 Apr;29(4):260-70. (21)
 - De Vries LS, Gunardi H, Barth PG, Bok LA, Verboon-Macielek MA, Groenendaal F. The spectrum of cranial ultrasound and magnetic resonance imaging abnormalities in congenital cytomegalovirus infection. *Neuropediatrics.* 2004 Apr;35(2):113-9. (22)
 - Lazzarotto T, Gabrielli L, Foschini MP, Lanari M, Guerra B, Eusebi V, Landini MP. Congenital cytomegalovirus infection in twin pregnancies: viral load in the amniotic fluid and pregnancy outcome. *Pediatrics.* 2003 Aug;112(2):e153-7. (23)
 - Revello MG, Lilleri D, Zavattoni M, Furione M, Middeldorp J, Gerna G. Prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection in amniotic fluid by nucleic acid sequence-based amplification assay. *J Clin Microbiol.* 2003 Apr;41(4):1772-4. (24)
 - Gouarin S, Gault E, Vabret A, Cointe D, Rozenberg F, Grangeot-Keros L, Bariot P, Garbarg-Chenon A, Lebon P, Freymuth F. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J Clin Microbiol.* 2002 May;40(5):1767-72. (25)
 - Nedelec O, Bellagra N, Devisme L, Hober D, Watre P, Dewilde A. Congenital human cytomegalovirus infection: value of human cytomegalovirus DNA quantification in amniotic fluid. *Ann Biol Clin (Paris).* 2002 Mar-Apr;60(2):201-7. [French, abstract]. (26)
 - Enders G, Bader U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn.* 2001 May;21(5):362-77. (27)
 - Gouarin S, Palmer P, Cointe D, Rogez S, Vabret A, Rozenberg F, Denis F, Freymuth F, Lebon P, Gangreot-Keros L. Congenital HCMV infection: a collaborative and comparative study of virus detection in amniotic fluid by culture and by PCR. *J Clin Virol.* 2001 Apr;21(1):47-55. (28)
 - Azam AZ, Vial Y, Fowler CL, Zufferey J, Hohlfeld P. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol.* 2001 Mar;97(3):443-8. (29)
 - Devos T, Spitz B, Peetermans W. Het risico op congenitale cytomegalovirusinfectie bij zwangere gezondheidswerkers. *Tijdschr. Voor Geneeskunde* 57, nr 13, 2001. (30)

- Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, Lanari M, Bovicelli L, Nicolosi A, Landini MP. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 Aug;183(2):476-82. (31)
- Lazzarotto T, Varani S, Guerra B, Nicolosi A, Lanari M, Landini MP. Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 2000 Jul;137(1):90-5. (32)
- Liesnard C, Donner C, Brancart F, Gosselin F, Delforge ML, Rodesch F. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstet Gynecol.* 2000 Jun;95(6 Pt 1):881-8. (33)
- Bodeus M, Hubinont C, Bernard P, Bouckaert A, Thomas K, Goubeau P. Prenatal diagnosis of human cytomegalovirus by culture and polymerase chain reaction: 98 pregnancies leading to congenital infection. *Prenat Diagn.* 1999 Apr;19(4):314-7. (34)
- Revello MG, Zavattoni M, Sarasini A, Baldanti F, De Julio C, De-Giuli L, Nicolini U, Gerna G. Prenatal diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody response in blood of congenitally infected fetuses. *J Infect Dis.* 1999 Oct;180(4):1320-3. (35)
- Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Baldanti F, Gerna G. Quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid of mothers of congenitally infected fetuses. *J Clin Microbiol.* 1999 Oct;37(10):3350-2. (36)
- Lazzarotto T, Guerra B, Spezzacatena P, Varani S, Gabrielli L, Pradelli P, Rumpianesi F, Banzi C, Bovicelli L, Landini MP. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol.* 1998 Dec;36(12):3540-4. (37)
- Revello MG, Zavattoni M, Sarasini A, Percivalle E, Simoncini L, Gerna G. Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection: prognostic implications for pregnancy. *J Infect Dis.* 1998 May;177(5):1170-5. (38)
- 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 Sep;56(1):99-103. (39)
- Roberts TC, Buller RS, Gaudreault-Keener M, Sternhell KE, Garlock K, Singer GG, Brennan DC, Storch GA. Effects of storage temperature and time on qualitative and quantitative detection of cytomegalovirus in blood specimens by shell vial culture and PCR. *J Clin Microbiol.* 1997 Sep;35(9):2224-8. (40)
- Lipitz S, Yagel S, Shalev E, Achiron R, Mashiach S, Schiff E. Prenatal diagnosis of fetal primary cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol.* 1997 May;89(5 Pt 1):763-7. (41)
- Mulongo KN, Lamy ME, Van Lierde M. Requirements for diagnosis of prenatal cytomegalovirus infection by amniotic fluid culture. *Clin Diagn Virol.* 1995 Oct;4(3):231-8. (42)
- Donner C, Liesnard C, Brancart F, Rodesch F. Accuracy of amniotic fluid testing before 21 weeks' gestation in prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Prenat Diagn.* 1994 Nov;14(11):1055-9. (43)
- Stagno S, Pass RF, Reynolds DW, Moore MA, Nahmias AJ, Alford CA. Comparative study of diagnostic procedures for congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics.* 1980 Feb;65(2):251-7. (44)

4) Reference Works, Handbooks and Databases

- Murray PR, ed. *Manual of Clinical Microbiology.* 8th ed. Washington, DC: ASM Press; 2003, p1304-1318: 'Human Cytomegalovirus' (45)

5) *Posters, “grey literature”, presentations*

- Conference on congenital CMV, November 2006, Orvieto Italy. Oral Poster Session C26. Brancart F, Donner C, Vincart B, Gosselin F, Delforge M-L, Marchant A, Liesnard C. Are HCMV DNA loads in urine and blood of infected pregnant women prognostic markers of congenital infection in their newborns? (46)
- Conference on congenital CMV, November 2006, Orvieto Italy. Poster C42. Pignatelli S, Lanari M, Dal Monte P, Gabrielli L, Lazzarotto T, Rossini G, Guerra B, Landini MP. HCMV gN genotypes distribution among congenitally infected newborns monitored during a one-year follow-up. (47)
- Conference on congenital CMV, November 2006, Orvieto Italy. Pereira L, Maidji E, Tabata T, McDonagh S. Congenital CMV infection, impaired placental development and compensation after immunotherapy. (48)
- Conference on congenital CMV, November 2006, Orvieto Italy. Oral Poster Session C36. Tassis B, Revello MG, Gerna G, Zavattoni M, Furione M, Nicolini U. Non-virological markers of infection and damage in human cytomegalovirus-infected fetuses. (49)
- Conference on congenital CMV, November 2006, Orvieto Italy. Adler SP. Prevention of congenital CMV infection by serologic screening of pregnant women: a rational approach. (50)
- 16th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, London, UK, 3 September 2006 to 7 September 2006. Oral Poster Sessions OP02.08. Simonazzi G, Guerra B, Banfi A, Pilu G, Lazzarotto T, Lanari M, Rizzo N. Effectiveness of ultrasound in the antenatal prediction of symptomatic congenital CMV infection. (51)
- Advies goedgekeurd door de ethische commissie KULeuven 19/04/2005: ‘Laattijdige zwangerschapsafbreking bij Cytomegalovirus’ (52)
- Brochure CDC: ‘What women should know about cytomegalovirus (CMV)’ http://www.cdc.gov/cmvr/resources/cmvr_brochure.pdf (53)
- Website Institute of Medecin: <http://www.iom.edu/> (54)

APPRAISAL

1) Analytical performance characteristics (analytical validation report)

1.1 *Preanalytical considerations (patient variables, sample stability)*

Patient variables:

Voor het uitvoeren van de vruchtwaterpunctie moeten we enerzijds rekening houden met de zwangerschapsduur en anderzijds met de tijd tussen de maternele infectie en het uitvoeren van de punctie (27,28,33,34,42,43).

Indien men te snel na de primo-infectie de punctie uitvoert, bekomt men veel vals negatieve resultaten. Onderzoek heeft uitgewezen dat het virus slechts 2 tot 3 weken na de primaire infectie in het bloed van de moeder kan gedetecteerd worden. Vervolgens duurt het 4 tot 6 weken vooraleer het virus de foetus kan besmetten, kan prolifereren in de weefsels en kan uitgescheiden worden in de urine en het amniosvocht. In verschillende studies werd dan ook aangetoond dat er minstens een interval van 6 weken moet zijn tussen de maternele primo-infectie en het uitvoeren van de amniocentesis.

Indien echter de maternele seroconversie zich voordoet in het eerste trimester van de zwangerschap, kan het langer duren vooraleer virusexcretie door de foetale nieren en dus een positief amniosvocht detecteerbaar wordt. Daarom bevelen meerdere auteurs aan om de punctie uit te stellen tot na de 21^e zwangerschapsweek.

Zelfs in de beste diagnostische omstandigheden kan echter een negatieve cultuur/PCR van het amniosvocht een foetale infectie niet volledig uitsluiten. Bodeus et al. analyseerden de gegevens van 71 vrouwen die een kind kregen met een congenitale CMV-infectie en die tijdens de zwangerschap een amniospunctie ondergingen. De algemene sensitiviteit bedroeg circa 70 % en steeg tot ongeveer 95.5 % als men enkel die vrouwen beschouwde bij wie de punctie gebeurde ten minste 6 weken na seroconversie vanaf 23 weken zwangerschap (34).

Sample stability:

Roberts et al. (40) testten de stabiliteit van CMV in bloedstalen. Op deze stalen voerde men cultuur en PCR uit op tijdstip 0, 6 uur, 24 uur, 48 uur en 72 uur na afname en dit zowel bij bewaring op kamertemperatuur als op 4°C. Men zag dat het aantal positieve stalen met cultuur reeds vanaf 6 uur significant verminderde voor beide temperaturen. Met PCR bleef het aantal positieve stalen ongewijzigd gedurende de hele testperiode en dit voor beide temperaturen. Kwantitatieve PCR toonde bovendien aan dat ook de viral load niet significant verminderde tijdens de geteste periode.

In onze search konden we geen studies terugvinden over de stabiliteit van CMV in amniosvocht. In het UZ Gasthuisberg worden de amniosvochten bewaard in de frigo tot aan de analyse.

1.2 *Analytical considerations (reproducibility, accuracy, correlation, linearity, reference range)*

Een groot probleem bij de evaluatie van de CMV PCR op amniosvocht is het gebrek aan standaardisatie.

Voor het uitvoeren van de PCR gebruikt men in het UZ Gasthuisberg een in-house ontwikkelde real-time Taqman PCR-techniek op het Applied Biosystems 7900-toestel. De extractie gebeurt manueel met de QIAamp DNA mini kit (QIAGEN).

Accuracy (bias)

De juistheid van onze resultaten werd afgeleid uit de resultaten van de EKE-programma's waaraan werd deelgenomen. Hierbij werden goede tot zeer goede resultaten bekomen, gekenmerkt door volgende karakteristieken:

- geen vals positieve resultaten;
- goede detectie en kwantificatie van 2 verschillende CMV-virusstammen;
- detectie van alle positieve stalen tot aan de detectielimiet van 500 copies/ml (=10 copies/reactie). Van de stalen met 315 copies/ml werd één wel en één niet gedetecteerd. De stalen met 80 copies/ml (1.6 copies/reactie) werden niet gedetecteerd.

De primers voor de CMV PCR werden zodanig ontworpen dat zij enkel CMV mogen detecteren. Om dit te controleren, werd er via een BLAST-search op het internet van elk van deze primers specifieke matches gezocht van deze primers met andere pathogenen of humaan DNA. Pathogenen die genetisch het meest verwant zijn met CMV, d.i. de herpesviridae, werden getest. Dit werd uitgevoerd aan de hand van iQC-materiaal van de herpesviridae. Er werd geen cross-reactie waargenomen met het herpes simplex virus type 1 en 2, het varicella zoster virus en het Epstein-Barr virus.

Reproducibility

De totale standaarddeviatie bedraagt 0.27 log en het hieruit berekende 99%-CI bedraagt $X \pm 0.7$ log. Daaruit kunnen we besluiten dat er 99 % kans bestaat dat een CMV viral load meting binnen een 1.4 log interval ligt rond het gemiddelde.

Linearity

Een goede lineariteit werd bekomen voor CMV en dit zowel voor de PCR afzonderlijk (DNA-reeks) als voor de NZ-extractie en de PCR samen (stalen-reeks). Deze lineariteit werd aangetoond voor een interval van ongeveer 500 copies/ml tot ongeveer 1×10^6 copies/ml.

1.3 Analytical range

De onderste detectielimiet bedraagt 500 copies/ml.

1.4 Turn around time (TAT)

CMV PCR gebeurt in ons laboratorium twee maal per week, met een TAT van 24 uur.

1.5 KAL (clinical tolerance limits)

De klinische acceptatielimiet (KAL) ligt vast op $3.5 \times SD = 0.94$ log.

2) Diagnostic performance

1. Diagnose van congenitale infectie bij de foetus

Indien de moeder een CMV-infectie heeft opgelopen tijdens de zwangerschap, is de eerste vraag of er een transmissie van het virus heeft plaatsgevonden naar de foetus. Over dit onderwerp zijn er reeds verschillende studies verschenen. Enerzijds keek men naar parameters in het materneel bloed, anderzijds keek men naar testen bij de foetus zelf. Deze laatste testen gebeuren op foetaal bloed, bekomen via cordocentese, en op vruchtwater, bekomen via amniocentese. Mogelijke complicaties van cordocentese zijn transiënte bloeding, transiënte foetale tachycardie (7 - 9 %), premature bevalling (<2 % - 5 %) en foetaal verlies (1.7 - 1.9 %). Mogelijke complicaties van de amniocentese (hoewel zeldzaam) zijn foetaal verlies (<1 %), lekken van amniosvocht en vaginale bloeding (10).

1.1 *Parameters bij de moeder*

Voorlopig heeft men nog geen goede markers bij de moeder gevonden die transmissie van CMV naar de foetus kunnen voorspellen.

Zo heeft men gekeken naar de aanwezigheid van CMV-DNA in urine en bloed van de moeder. Liesnard et al. (46) bestudeerden de *kwalitatieve* resultaten (aan- of afwezigheid van CMV-DNA) maar vonden geen correlatie. Wanneer ze keken naar de *kwantitatieve* resultaten, vonden ze voor urine eveneens geen correlatie tussen de viral load en het al dan niet aanwezig zijn van transmissie. Voor de viral load in bloed vonden ze wel een correlatie met hogere viral loads bij transmitter-moeders. Er kon echter geen duidelijke cut-off worden vastgelegd aangezien het om een te laag aantal patiënten ging. Revello et al. (15) zagen ook een hogere viral load bij transmitter-moeders dan bij niet-transmitter-moeders, maar dit verschil was niet significant. Revello et al. merkten wel een blijvend uitblijven van de lymfoproliferatieve respons bij de transmitter-moeders in vergelijking met de niet-transmitter-moeders. Dit verschil was significant maar aangezien er op deze regel ook uitzonderingen voorkwamen, kan ook deze parameter niet gebruikt worden om transmissie naar de foetus te voorspellen. Tot slot vonden ook Lazzarotto et al. (20) en Czuba et al. (13) geen correlatie tussen de aanwezigheid van CMV in materneel bloed en het risico op intrauteriene transmissie.

1.2 *Testen op foetaal bloed*

- Het bepalen van CMV IgM-antistoffen op foetaal bloed heeft een beperkte diagnostische waarde voor het aantonen van een foetale infectie door de beperkte sensitiviteit van deze test (20 – 75 %) (8,10).
- Voor het bepalen van CMV in foetaal bloed bemerken we zeer grote variaties in termen van sensitiviteit (8):
 - i. Viremie: sensitiviteiten van 0 %, 7 %, 30 %, 41 % en 55 %
 - ii. Antigenemie (pp65): sensitiviteiten van 16 %, 58 - 64 %
 - iii. DNA-emie: sensitiviteiten van 41 %, 66.6 %, 83 – 64 %, 92.6 %
 - iv. NASBA voor IEMRNA: sensitiviteit van 84.6 %
 - v. NASBA voor pp67 mRNA: sensitiviteit van 63.6 %

De specificiteit van deze testen bedraagt meestal 100 % met uitzondering van één studie van Lazzarotto et al. waar de DNA-emie een specificiteit had van slechts 85 %.
- Niet-specifieke parameters: Tassis et al. (49) toonden aan dat geïnfecteerde foetussen lagere bloedplaatjes en hogere levels van ALT en beta2-microglobuline vertonen in vergelijking met niet-geïnfecteerde foetussen. Ook uit een studie van Dreux et al. (12) bleek dat foetaal serum beta2-microglobuline een merker is voor foetale infectie en

dit zowel voor CMV als voor toxoplasmosis. Serum beta2-microglobuline is dus geen specifieke parameter en is mogelijk gestegen bij alle foetale infecties.

1.3 Testen op amniosvocht

Traditioneel was viruskweek op amniosvocht de referentiemethode voor het aantonen van een congenitale infectie. Deze test heeft een specificiteit van 100 % maar echter een beperkte sensitiviteit en kan leiden tot vals negatieve resultaten in zelfs 50 % van de gevallen (21). PCR kan viraal DNA detecteren in 7 - 50 % van de cultuur-negatieve amniosvochten.

Wanneer we kijken naar de verschillende studies, bemerken we grote verschillen in sensitiviteit en specificiteit (bijlage 1) (21,24,27,28,31,33,37,39). Groot probleem bij deze studies is het gebrek aan standaardisatie. Zo bemerken we verschillende (vaak in-house ontwikkelde) PCR-technieken, verschillende targetgenen, verschillende detectiesystemen en verschillende staalvoorbereidingsprocedures. Daarenboven is er een grote variatie in selectie van de stalen. Zo zijn er grote verschillen in het moment waarop de punctie werd uitgevoerd (zowel de zwangerschapsduur als het aantal weken na de maternale infectie). Ook de manier waarop de uiteindelijke diagnose van een congenitale CMV-infectie wordt gesteld, verschilt van studie tot studie: op basis van cultuur van urine, saliva of zelfs amniosvocht, APO-onderzoek of het voorkomen van CMV IgM-antistoffen bij het kind.

Mogelijke verklaringen voor vals negatieve resultaten zijn:

1. Een te lage gevoeligheid van de PCR-techniek op zich
2. Een te kort tijdsverloop tussen het begin van de maternale infectie en de vruchtwaterpunctie: dit moet minstens 6 tot 8 weken bedragen (cf. supra)
3. Het uitvoeren van een vruchtwaterpunctie vóór 21 weken zwangerschap (cf. supra)
4. Iatrogene contaminatie van de foetus tijdens uitvoeren van de punctie?
Afhankelijk van de procedure die men gebruikt, kan CMV tot maximum 6 maanden na de primo-infectie in het bloed van de moeder gedetecteerd worden. Indien CMV nog in het maternale bloed aanwezig is, bestaat er een theoretisch risico op besmetting van de foetus tijdens het uitvoeren van een vruchtwaterpunctie. Studies konden deze hypothese van iatrogene besmetting echter niet bevestigen (33,38).
5. Het is niet mogelijk om vals negatieve resultaten bij een aangetast kind te verklaren door een CMV-infectie die perinataal wordt verworven. De diagnose van een congenitale CMV-infectie wordt gesteld door het afnemen van een urinecultuur tijdens de eerste drie weken na de geboorte. Indien de CMV-infectie pas rond de geboorte wordt verworven, zal het langer duren vooraleer de viruskweek op urine positief wordt.)

Voor de specificiteit bemerken we dat de meeste studies hoge waarden bekomen met uitzondering van de groep van Lazzarotto et al.

Mogelijke verklaringen voor vals positieve resultaten zijn:

1. Contaminatie in het labo;
2. De foetus was aanvankelijk geïnfecteerd maar heeft de infectie geklaard. Deze hypothese heeft men echter nog niet kunnen bevestigen;
3. Verkeerdelijke diagnose van een niet-geïnfecteerd kind door problemen met de urinecultuur voor CMV.

Gegevens UZ Gasthuisberg:

Van november 2002 tot en met oktober 2006 werden alle amniospuncties opgezocht waarop een aanvraag was gedaan voor CMV PCR. In totaal waren er 241 stalen met een negatieve PCR en 41 stalen met een positieve PCR. Van deze positieve stalen waren er 25 extra-muros en 16 intra-muros.

Tussen de negatieve amniosvochten vonden we 36 stalen van moeders die ook effectief in GHB zijn bevallen en waarbij er van het kindje tijdens de eerste levensweken een urinestaal werd afgenomen voor opsporen van CMV.

Bij 4 van deze negatieve amniosvochten zagen we dat het kindje toch een positief urinestaal had voor CMV of m.a.w. een congenitale CMV-infectie had (tabel 1)..

Tabel 1: vals negatieve vruchtwaterpuncties

	Tijdstip punctie	Aantal weken na maternele infectie	Outcome baby
Patiënt 1	16 weken 18 weken	10 weken 12 weken	Tweeling (beide kindjes positief urinestaal); 1 baby voorlopig ok, 1 baby met neurologische afwijkingen
Patiënt 2	21 weken	10 weken	Tweeling (beide kindjes positief urinestaal); voorlopig geen problemen
Patiënt 3	21 weken	7 weken	Voorlopig geen problemen
Patiënt 4	23 weken	6 weken	Globale ontwikkelingsvertraging (fijne en grove motoriek, taal)

Wanneer we kijken naar het tijdstip van afname van het vruchtwater, zien we dat bij patiënt 1 de stalen werden afgenomen vóór 21 weken (nl. op 16 en 18 weken zwangerschap). De overige drie stalen waren op het correcte moment afgenomen in relatie tot de zwangerschapsduur en het tijdstip van de maternele infectie. Deze drie stalen werden opnieuw uit de serotheek gehaald en de PCR werd herhaald. Twee van de drie stalen waren opnieuw negatief, bij het derde staal gaf de PCR een zeer zwak signaal (<500 copies/ml). Een verklaring voor deze negatieve resultaten is er niet. Inhibitie van de PCR werd uitgesloten door het meenemen van een interne controle. Een mogelijke hypothese is dat het hier CMV-stammen betreft die niet goed door onze PCR worden opgepikt (16).

Uit bovenstaande resultaten kunnen we concluderen dat een negatieve PCR op amniosvocht een congenitale infectie niet volledig kan uitsluiten, ook al wordt het vruchtwater op het juiste tijdstip afgenomen.

Het resultaat van de positieve amniosvochten varieerde van <500 copies/ml tot 6.8×10^7 copies/ml. Eén amniosvocht was zwak positief met een waarde van <500 copies/ml. Deze punctie werd uitgevoerd op 21 weken zwangerschap, ongeveer 10-12 weken na de maternele infectie. Ondanks deze lage waarde was urine van het kindje positief voor CMV en betrof het dus wel degelijk een congenitale CMV-infectie.

Bij drie pasgeborenen was (minstens) één urinestaal negatief voor CMV virale kweek (tabel 2).

Tabel 2: vals negatieve urinestalen

	Resultaat amniospunctie	Resultaten baby	Urine
Patiënt 1 (=pat. 2 tabel 4)	1.03 x 10 ⁶ copies /mL	Urine: negatief	Extramuros, getest in UZ GHB
Patiënt 2 (=pat. 9 tabel 4)	7.10 x 10 ⁴ copies/mL	Urine 1: negatief Urine 2: positief	Extramuros, getest in UZ GHB
Patiënt 3 (=pat. 15 tabel 4)	3.11 x 10 ⁵ copies/mL	Urine: negatief CMV IgM: pos	Extramuros, getest in UZ GHB

Bij patiënt 2 werd er op dezelfde dag nog een tweede urinestaal afgenomen dat wel positief was voor CMV. De baby werd geboren met unilaterale doofheid. Bij patiënt 3 had de baby positieve IgM antistoffen bij de geboorte. De baby is voorlopig asymptomatisch. Het betrof dus in beide gevallen een vals negatief urinestaal.

Van de eerste patiënt hebben we nog niet alle gegevens ontvangen.

Diagnose van een congenitale CMV-infectie wordt bevestigd door virale kweek op een urinestaal (of saliva-staal) afgenomen vóór de derde levensweek. Bij een positieve cultuur na de derde levensweek kan men niet meer uitmaken of het een congenitale, perinatale of postnatale infectie betreft. Bij congenitale CMV is het virus vaak in zeer hoge titers in het urinestaal aanwezig.

De klassieke cultuur is in veel laboratoria vervangen door de shell-vial assay die een gelijkaardige performantie vertoont als de klassieke cultuur. Bij de shell-vial assay worden geïnfecteerde cellen gedetecteerd met behulp van monoclonale antistoffen gericht tegen 'early antigens' die door het virus gesynthetiseerd worden kort na infectie van de cellen. Er moet niet meer gewacht worden op het verschijnen van het cytopathogeen effect waardoor deze test veel sneller kan gebeuren dan de klassieke cultuur. Ook in het UZ GHB gebruikt men momenteel de shell-vial assay.

Mogelijke verklaringen voor vals negatieve urineculturen zijn de volgende:

- Slechte bewaring of transport van het staal.
CMV is een labiel virus en moet bewaard/getransporteerd worden bij 4 - 8 °C. Bij bewaring op -20 °C zal de virusactiviteit volledig verdwijnen. Stagno et al. vergeleken bewaring op 4 °C versus kamertemperatuur (44). Na 1 week zagen zij dat de opbrengst op kamertemperatuur gedaald was tot 62 %, bij bewaren op 4 °C was nog 93 % van de stalen positief. Algemeen stelt men dat stalen liefst binnen een paar uur na afname moeten worden geënt. Indien dit niet mogelijk is (omwille van transport), kan men stellen dat de infectiviteit behoorlijk goed bewaard zal worden gedurende minstens 48 uur, op voorwaarde dat het staal gekoeld blijft (45).
- Een bijkomende vraag is of virusexcretie bij neonaten intermitterend zou kunnen zijn. Hierover konden echter geen literatuurgegevens worden teruggevonden. Liesnard vermeldde op het congres over congenitale CMV in Orvieto (november 2006) dat zij in hun ziekenhuis telkens 3 urinestalen ontvangen. Af en toe vinden zij een negatief staal tussen 2 positieve stalen en dit zowel met de cultuur als met de PCR (die ook dood virus kan detecteren).

Conclusie:

In de literatuur wordt algemeen aanvaard dat amniocentese momenteel de beste techniek is om een congenitale infectie van de foetus aan te tonen en dat cordocentese geen extra meerwaarde biedt (29, 35, 41). De amniocentese moet worden uitgevoerd vanaf 21 weken zwangerschap en minstens 6 weken na het begin van de maternale infectie. Gegevens aangaande sensitiviteit en specificiteit toonde grote variaties wegens de grote verschillen in studieopzet en gebruikte technieken. Uit onze eigen gegevens blijkt dat de specificiteit van de CMV PCR op vruchtwater rond de 100 % ligt, de sensitiviteit is echter lager zodat niet alle gevallen worden gedetecteerd, ook al wordt de punctie op het juiste tijdstip uitgevoerd.

2. Prognostische merkers voor CMV-ziekte bij de pasgeborene

2.1 Testen op maternale bloed

Lazzarotto et al. besloten dat de hoeveelheid virus in maternale bloed bepaald door middel van antigenemie, PCR en qPCR *niet* correleert met de ernst van de CMV-infectie bij de foetus/pasgeborene (20).

2.2 Testen op foetaal bloed

- Revello et al. vergeleken foetussen met afwijkende echo en/of afwijkende biochemie met foetussen met normale bevindingen (35). Zij vergeleken bij deze twee groepen antigenemie, viremie en DNA-emie. Zij zagen bij de groep met afwijkingen hogere waarden dan bij de groep zonder afwijkingen doch enkel voor de antigenemie was dit verschil significant. Ook voor CMV IgM antistoffen vonden zij significant hogere waarden bij de groep met afwijkingen dan bij die zonder afwijkingen en dat onafhankelijk van het tijdstip van maternale infectie, het interval tussen maternale infectie en het moment van de cordocentese, en de zwangerschapsleeftijd waarop de cordocentese werd uitgevoerd. Enders et al. stelden symptomatische ziekte vast bij 29 op 31 foetussen met specifieke IgM en bij 3 op 6 foetussen zonder detecteerbaar IgM (27).
- Tassis et al. (49) bestudeerden niet-virologische parameters en zij bemerkten een significant verschil voor bloedplaatjes, ALT en beta2-microglobuline wanneer ze geïnfecteerde foetussen met een normale follow-up vergeleken met die met klinische tekens.
- Er werd ook al onderzoek verricht naar de relatie tussen een bepaald genotype en de aanwezigheid van symptomen bij het kind. Picone et al. bekeken dit voor de 4 groepen van glycoproteïne B maar vonden geen correlatie (19). Verder keken deze auteurs ook naar de bepaling van UL 144 polymorfismen maar ook hier vonden ze geen correlatie (18). Pignatelli et al. analyseerden de distributie van de gN genotypes en hun mogelijke pathogeniciteit bij congenitale CMV (47). Hun voorlopige conclusies werden voorgesteld op het congres in Orvieto en waren a) dat gN-1 minder frequent resulteert in symptomatische infecties dan gN-4a en gN-3a; b) dat gN-4b frequenter geassocieerd is met sequellen dan gN-1 en c) dat infectie door gN-4 zou resulteren in hogere waarden van viral load zowel in vruchtwater als in urine van de pasgeborene in vergelijking met infectie door gN-1.

2.3 Testen op amniosvocht: prognostische waarde van de kwantitatieve PCR

Er zijn een aantal studies gepubliceerd over de correlatie tussen de viral load en de outcome bij de baby (bijlage 2; 19,23,25,26,31,32,36). Ook bij deze studies zien we weer een grote variatie in opzet van de studie, patiëntenpopulatie (tijdstip punctie, tijd tussen maternale infectie en punctie, definitie van congenitale infectie, definitie van (a)symptomatisch), gebruikte technieken,... en stellen we ook tegenstrijdige resultaten vast.

Een eerste groep studies zijn deze van de groep van Lazzarotto, Guerra et al. (23,31,32). Een eerste conclusie die deze auteurs maken is dat een viral load van minstens 10^3 copies/ml met 100 % zekerheid voorspelt dat het kind ook geïnfecteerd zal zijn. Zij hadden immers een heel aantal amniosvochten met lage viral load waarbij de baby's achteraf niet geïnfecteerd bleken te zijn. De diagnose van CMV-infectie bij het kind werd gesteld op basis van positieve viruskweek op urine of saliva tijdens de eerste levensweek. Mogelijke verklaringen voor deze 'vals positieve' amniosvochten zijn problemen met de virale kweken of contaminatie in het labo. De auteurs zelf stellen dat de foetus de infectie mogelijk zelf geklaard heeft maar deze hypothese heeft men tot nog toe niet kunnen bewijzen in de literatuur.

Een tweede conclusie was dat een viral load van minstens 10^5 met 100 % zekerheid voorspelt dat de foetus symptomatisch zal zijn. Deze symptomen variëren dan van licht tot zeer ernstig. Zo was er bv. één punctie met 3.7×10^5 copies/ml. Echo toonde een borderline cerebrale ventriculomegalie die zich nog in utero herstelde. Het kindje werd geboren met slechts een milde hepatitis. Ook foetussen zonder afwijkingen op echo maar met CMV-inclusies op anatomopathologisch onderzoek (na het beëindigen van de zwangerschap) werden als *symptomatisch* beschouwd terwijl we niet kunnen weten of deze foetussen ooit symptomen ontwikkeld zouden hebben.

Tot slot concludeerden ze dat een resultaat $<10^5$ copies/ml met een vrij grote zekerheid (doch geen 100 %) voorspelt dat het kind asymptomatisch zal zijn.

We moeten bij deze studies nog de bemerking maken dat het hier telkens gaat over kleine populaties (respectievelijk 16, 12 en 6 geïnfecteerde foetussen in de drie studies) en dat er mogelijk nog een overlapping bestaat tussen de bestudeerde patiënten. Deze groep auteurs is wel de enige groep die strikte inclusiecriteria heeft gehanteerd waarbij de punctie enkel gebeurde op 21-23 weken zwangerschap.

De groep van Gouarin et al. (25) vergeleek de resultaten van 13 zwangerschappen met afwijkingen op echografie die allen onderbroken werden, met de resultaten van 13 zwangerschappen zonder afwijkingen op echo en waarbij de baby asymptomatisch was bij de geboorte. Zij concludeerden dat de gemiddelde viral load in aangetaste foetussen significant hoger ligt dan die bij niet aangetaste foetussen, doch zij zagen ook hogere viral loads bij kindjes die asymptomatisch waren bij de geboorte en lagere viral loads bij kindjes met ernstige afwijkingen.

Bemerkingen die we bij deze studie kunnen maken, is dat het begrip '(a)symptomatisch' niet duidelijk werd gedefinieerd en dat er ook geen verdere follow-up gebeurde van de asymptomatische pasgeborenen.

De groep van Revello et al. (36) vergeleek eveneens twee groepen. Bij de eerste groep, bestaande uit 7 zwangerschappen, werden er afwijkingen op echo gevisualiseerd of werden de kindjes symptomatisch geboren. De tweede groep bestond uit 14 zwangerschappen met een normale echo. Drie van deze zwangerschappen werden onderbroken, bij de overigen was het kind asymptomatisch bij de geboorte. Zij concludeerden dat de gemiddelde viral load in de

symptomatische groep hoger lag dan bij de asymptomatische groep doch dit verschil was niet significant.

Ook bij deze studie wordt het begrip '(a)symptomatisch' niet exact gedefinieerd en is er geen verdere follow-up van de asymptomatische pasgeborenen. Verder maken we de bemerking dat zwangerschappen met een normale echo die beëindigd werden hier bij de *asymptomatische* groep worden gerekend.

Een vierde groep is die van Picone et al. (19). Zij deelden de geïnfecteerde foetussen op in een ernstige en een niet-ernstige groep. De ernstige groep bestond uit 29 foetussen met abnormale echo van de hersenen of met minstens 2 extra-cerebrale afwijkingen op echo of met gestoorde neurologische ontwikkeling na de geboorte. De niet-ernstige groep bestond uit de overige 13 foetussen. Zij concludeerden dat de gemiddelde viral load in de ernstige groep hoger lag dan deze van de niet-ernstige groep doch dit verschil was niet significant.

Bij deze studie wordt niet vermeld hoe lang asymptomatische pasgeborenen werden opgevolgd. Ook hier moeten we de bemerking maken dat zwangerschappen met enkel echogene darmen die beëindigd werden, bij de *niet-ernstige* groep gerekend worden.

Een laatste studie is die van Nedelec et al. (26). Van deze studie hebben we enkel het abstract bekeken en beschikken we dus niet over alle informatie.

De auteurs bestudeerden 12 foetussen met een congenitale CMV-infectie en besloten dat er geen verschil was in de viral load van symptomatische en asymptomatische foetussen. Ook hier moeten we de bemerking maken dat het gaat om een zeer kleine patiëntenpopulatie.

Uit de studies van Picone et al. en Gouarin et al. werd bovendien geconcludeerd dat er bij symptomatische foetussen een correlatie lijkt te bestaan tussen de viral load en de zwangerschapsduur; deze correlatie werd niet teruggevonden bij de asymptomatische foetussen. Ook Revello et al. zagen bij een tweede punctie (5 weken na de eerste) bij 3 asymptomatische foetussen geen duidelijke stijging van de viral load.

Gegevens UZ Gasthuisberg:

Alle 41 vrouwen met een positieve vruchtwaterpunctie werden gecontacteerd met de vraag tot medewerking aan onze studie. 35 vrouwen gaven hun toestemming. Vervolgens werden de gynaecologen en pediaters die bij de opvolging van deze vrouwen of hun kinderen betrokken waren, aangeschreven met het verzoek een vragenlijst in te vullen. De antwoorden die we al ontvangen hebben zijn samengevat in tabel 3 en 4.

a) Beëindigde zwangerschappen**Tabel 3: positieve vruchtwaterpunctie en zwangerschapsonderbreking**

Pat.	Punctie op (weken)	Aantal weken na infectie	Resultaat	ZWS beëindigd op	Afwijkingen op echo
1	21.5 w.	>12 weken	1.29×10^7	35 w.	Cerebrale afw., echogene darmen
2	21.4 w.	>13 weken	8.51×10^6	25.1 w.	Cerebrale afw., vrij vocht
3	20.3 w.		3.21×10^5		
4	22 w.		6.76×10^7	23.3 w.	Vrij vocht, IUGR, echogene darmen
5	21 w.	>20 weken	4.22×10^5	34.2 w.	Cerebrale afw., IUGR, echogene darmen
6	21.6 w.		5.22×10^5	22.5 w.	Cerebrale afw., IUGR, cordecensatie
7	14.6 w.		2.80×10^3		
8	21.3 w.	±11-13 weken	8.60×10^5	23.4 w.	Geen afwijkingen
9	21.0 w.	±16 weken	4.80×10^6	22.4 w.	Geen afwijkingen
10	25.4 w.	± 8 weken	1.72×10^7	27.3 w.	Cerebrale afw., IUGR
11	15.5 w. 19.5 w.		4.7×10^4 5.62×10^6		
12			6.4×10^6		
13	22.4 w.	±12 weken	5.23×10^5	24.5 w.	Geen afwijkingen

IUGR= Intrauteriene groeiretardatie

Bij de meeste van deze zwangerschappen zien we dat er effectief afwijkingen zichtbaar waren op echografie. Bij 3 zwangerschappen echter werd de zwangerschap louter op basis van de positieve punctie onderbroken zonder dat er al afwijkingen zichtbaar waren. In deze gevallen is het dus niet uit te maken of deze kinderen al dan niet symptomatisch zouden geweest zijn.

De resultaten van het anatomopathologisch onderzoek waren als volgt:

- 6 foetussen: APO onderzoek uitgevoerd en CMV-inclusies aangetoond;
- 2 foetussen: geen APO onderzoek uitgevoerd;

- 5 foetussen: resultaat volgt.

Het tijdstip waarop de punctie werd uitgevoerd varieerde tussen 14.6 weken en 25.4 weken zwangerschap (mediaan: 21.4 weken). Ook de punctie op 14.6 weken was positief, hoewel iets lager dan de overige resultaten. Verder zien we een grote variatie in tijdsduur tussen de maternale infectie en het moment van de punctie. Het moment van de maternale infectie is gebaseerd op de resultaten van de serologie en is meestal slechts een ruwe schatting. Ook kan er niet altijd uitgemaakt worden of het een primo-infectie of een reactivatie/herinfectie betreft.

Bij één patiënte (nr. 11) gebeurden er twee puncties met een maand tussentijd en zien we een significante stijging van de viral load.

b) Niet-onderbroken zwangerschappen

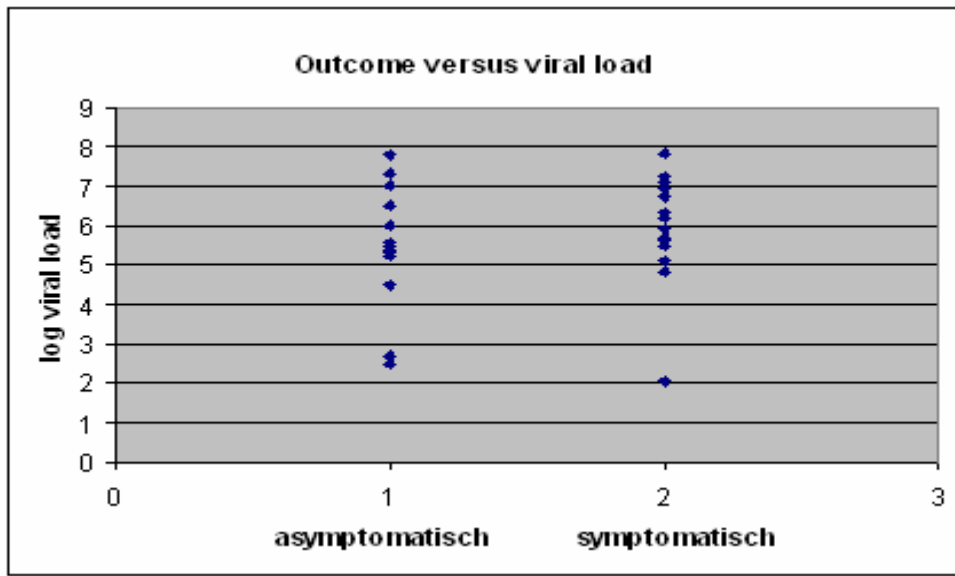
Tabel 4: positieve vruchtwaterpunctie zonder zwangerschapsonderbreking

Pat.	Tijdstip van de punctie	Aantal weken na infectie	Resultaat	Outcome	Huidige lft. kind
1	23 w.	± 8 weken	6.30×10^7	Voorlopig geen problemen	2.5 maand
2	32.1 w.	± 8 weken	1.03×10^6	Voorlopig geen problemen	5 maand
3	20.6 w.	> 11 weken	1.98×10^5	Voorlopig geen problemen	3 maand
4	21.1 w.	±10-12 weken	<500	Voorlopig geen problemen	6 maand
5	20.4 w.	± 11 weken	2.28×10^5	Voorlopig geen problemen	6 maand
6	30.2 w.	± 10 weken	1.12×10^7	Voorlopig geen problemen	8.5 maand
7	21 w.	± 11 weken	8.37×10^5	Petechiën, purpura, trombopenie	6.5 maand
8	24.2 w.	± 8 weken	2.09×10^7	Voorlopig geen problemen	8 maand
9	20 w.	± 8 weken	7.10×10^4	Links doof geboren	8 maand
10	22 w.		1.05×10^7	Voorlopig geen problemen	11 maand
11	27.5 w.	± 8 weken	2.18×10^5	Voorlopig geen problemen	1 jaar 3 maand
12	22.6 w.	± 12-18 weken	2.20×10^6	Hersenen: cystische germinolyse	1 jaar 7 maand
13	26 w.	± 7 weken	1.19×10^2	Hypotroof corpus callosum, verbrede ventrikels	1 jaar 7 maand
14	20 w.	>12 weken	3.10×10^4	Voorlopig geen problemen	1 jaar 7 maand
15	22.1 w.	±10-12 weken	3.11×10^5	Voorlopig geen problemen	1 jaar 8 maand
16	25.3 w.	± 8 weken	3.16×10^2	Voorlopig geen problemen	1 jaar 7 maand
17	18.4 w.	±16 weken	1.30×10^5	Bilateraal doof geboren	1 jaar 8 maand
18	19.4 w.	± 7 weken	1.6×10^6	Cerebrale cysten, licht gestegen levertesten, 3 weken behandeld	1 jaar 10 maand
19	25.2 w.		2.18×10^2	Rechts mogelijk gehoorverlies?	2 jaar 7 maand
20			3.64×10^5	Voorlopig geen problemen	2 jaar 5 maand
21			1.64×10^5	Voorlopig geen problemen	2 jaar 11 maand
22	24.6 w.		3.39×10^6	Voorlopig geen problemen (tweeling)	3 jaar

De zwangerschapsduur waarop de punctie werd uitgevoerd schommelde hier tussen de 18.4 en de 32.1 weken (mediaan 22.6 weken). Opnieuw zien we grote variaties in de tijdsduur tussen maternele infectie en het moment van de punctie.

Wanneer we het logaritme van de viral load uitzetten tegenover het al dan niet symptomatisch zijn van het kind bekomen we onderstaande grafiek (figuur 1). Zwangerschappen die beëindigd werden zonder dat er afwijkingen zichtbaar waren op echografie werden geëxcludeerd.

Figuur 1: viral load versus outcome



Zowel voor de symptomatische als de asymptotische groep bemerken we een zeer brede verdeling van de viral loads die bovendien in grote mate overlapt. Wanneer we het gemiddelde en de mediaan van beide groepen vergelijken, zien we dat dit voor de symptomatische groep iets hoger ligt dan voor de asymptotische groep (tabel 5), doch dit verschil is niet significant (Mann-Whitney: $p=0.48$).

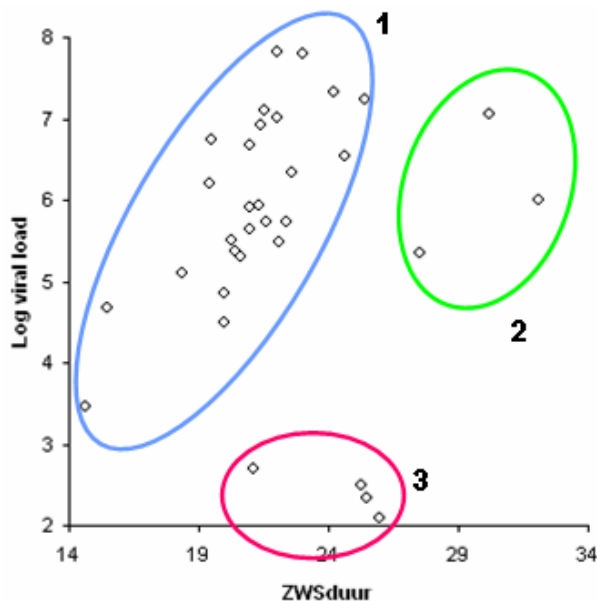
Tabel 5: viral load versus outcome

	Asymptotische groep	Symptomatische groep
Gemiddelde	5.6	5.9
Mediaan	5.5	6.1

Ook wanneer we bv. patiënte nr. 10 uit tabel 3 vergelijken met patiënte nr. 1 uit tabel 4, bemerken we dat dit twee zwangeren zijn met ongeveer eenzelfde tijdstip van vruchtwaterpunctie, eenzelfde interval na de maternele infectie en eenzelfde viral load. Nochtans is de eerste foetus aangetast en is het tweede kind (voorlopig) asymptotisch.

Als we het logaritme van de viral load uitzetten tegenover de zwangerschapsduur waarop de punctie werd uitgevoerd, bekomen we volgende grafiek (figuur 2).

Figuur 2: viral load versus zwangerschapsduur



Voor de punten in de blauwe cirkel (1) bestaat er een duidelijke correlatie tussen de zwangerschapsduur en de viral load (Spearman correlatie: $p=0.0001$). Mogelijke verklaringen voor deze stijging van de viral load met de zwangerschapsduur, zijn de opstapeling van het virus in het vruchtwater en de toenemende foetale urinaire flow.

De punten in de groene cirkel (2) zijn puncties op latere tijdstippen tijdens de zwangerschap. Het betreft hier vrouwen die later tijdens de zwangerschap werden geïnfecteerd. Een mogelijke hypothese is dat foetussen die later tijdens de zwangerschap worden geïnfecteerd een betere afweer tegen het virus vertonen en dat daardoor de viral load lager ligt. Het is ook geweten dat infecties later tijdens de zwangerschap minder frequent leiden tot cerebrale aantasting in vergelijking met infecties tijdens het eerste trimester.

De punten in de roze cirkel (3) tenslotte zijn puncties waarvan het resultaat opvallend laag ligt. Nochtans werden de puncties afgenomen op een juist tijdstip (vanaf 21 weken en minstens 6 weken na maternelle infectie). Eén van deze kinderen was symptomatisch met hersenafwijkingen, 2 zijn er voorlopig asymptomatisch en het vierde kind heeft mogelijk gehoorverlies. We hebben geen duidelijke verklaring voor deze lage waarden. Een mogelijke hypothese is hier opnieuw dat het CMV-stammen betreft die moeilijk gedetecteerd kunnen worden door onze PCR.

Conclusie:

Noch uit de literatuurgegevens, noch uit onze eigen studie kunnen we concluderen dat er een significante relatie bestaat tussen de viral load in het amniosvocht en de outcome bij de baby. Er lijkt wel een relatie te bestaan tussen de viral load en het tijdstip in de zwangerschap waarop de punctie wordt uitgevoerd. Het al dan niet symptomatisch zijn van het kind is mogelijk gecorreleerd aan andere factoren (zoals het CMV-genotype), maar verdere studies zijn nodig om dit te bevestigen.

3) Clinical impact

3.1 *Diagnostic aspect*

Momenteel zijn de middelen om foetale infectie en ernst van symptomen te voorspellen uiterst beperkt. Indien de moeder een CMV-infectie oploopt tijdens de zwangerschap, baseert men zich voornamelijk op de resultaten van echografie en eventueel KST om afwijkingen bij de foetus aan te tonen. Afwijkingen die op echografie gevisualiseerd kunnen worden zijn microcefalie, intracranieële calcificaties, cerebrale ventriculomegalie, hyperechogene darmen, hepatosplenomegalie, ascites en IUGR. KST kan belangrijke bijkomende informatie geven, zoals polymicrogyrie, hippocampale dysplasie en cerebellaire hypoplasie (22).

Beeldvorming heeft echter veel beperkingen. Simonazzi et al. (51) bestudeerden de echo's van 148 foetussen met een intra-uteriene CMV-infectie. Zij bekwamen voor de echografie een sensitiviteit van 20.2 % en een specificiteit van 92.1 % om een symptomatische congenitale CMV-infectie te voorspellen. Bovendien werden de afwijkingen bij meer dan een derde van de gevallen slechts zichtbaar in het derde trimester van de zwangerschap. Door deze lage negatieve predictieve waarde kan men een normale echografie dus niet gebruiken om een normale outcome bij de geboorte te voorspellen.

De diagnostische meerwaarde van de kwantitatieve CMV PCR op amniosvocht is in deze setting zeer beperkt. Een positieve punctie toont aan dat het kind geïnfecteerd is maar zegt niets over de prognose van het kind. Een negatieve punctie is geen sluitend bewijs dat het kind niet geïnfecteerd is.

3.2 *Treatment*

Antivirale therapie werd reeds met succes toegepast voor de preventie en behandeling van CMV-infecties bij immuungecompromitteerde patiënten. Voor de behandeling van congenitale CMV-infecties bestaat er momenteel echter beperkte evidence. Theoretisch bestaan er twee opties: prenatale en postnatale therapie.

a) Prenatale therapie

Een recente studie van Nigro et al. (17) over het toedienen van CMV hyperimmuunglobulines aan zwangeren suggereert dat een dergelijke behandeling effectief kan zijn in de preventie en behandeling van congenitale CMV-infecties. Er is echter heel wat kritiek op deze studie en verdere validatie door middel van gerandomiseerde studies is nodig. Pereira et al. (48) bestudeerden de placenta's van de patiënten uit deze studie. Bij geïnfecteerde foetussen zagen zij vele grote fibrinoiden welke de bloedvaten occludeerden, met als gevolg een verminderde bloedstroom naar de placenta en een gedaalde aanvoer van zuurstof en voedingsstoffen naar de foetus. Bij de patiënten die behandeld waren met hyperimmuunglobuline, bemerkten ze de ontwikkeling van kleine gevasculariseerde villi aan het oppervlak van de placenta's, vermoedelijk ter compensatie van de hypoxie.

b) Postnatale therapie

Momenteel is er één randomized controlled trial verschenen aangaande postnatale therapie met IV ganciclovir. Deze studie toonde een klinisch gunstig effect aan op gehoorsverlies bij behandeling van symptomatische pasgeborenen met aantasting van het centraal zenuwstelsel. Verdere studies zijn nodig om dit te bevestigen. Er bestaat momenteel geen literatuur over de behandeling van kinderen die bij de geboorte asymptomatisch zijn. Nochtans zal ook 5 % van deze kinderen gehoorsverlies ontwikkelen. Uit studies bleek bovendien dat binnen de groep van asymptomatische kinderen, deze met een hogere viral load in urine en/of bloed meer risico hebben om neurologische sequellen en gehoorsverlies te ontwikkelen. Verdere studies zijn nodig om uit te maken of anti-virale therapie in deze gevallen nuttig zou kunnen zijn (11).

Anderzijds moet men rekening houden met de neveneffecten van antivirale therapie (5). Zo kan een behandeling met ganciclovir resulteren in hematologische afwijkingen (vnl. neutropenie). Dierstudies toonden bovendien aan dat dit product carcinogeen en teratogeen kan zijn en aspermatogenese kan veroorzaken. Tot slot zijn er de cathetergerelateerde problemen zoals infecties en catheter-dysfunctie. Dit laatste probleem zou men kunnen oplossen door de perorale toediening van valganciclovir. Een grote multicenter trial is onderweg om de veiligheid en efficiëntie van valganciclovir-siroop te evalueren bij kinderen met symptomatische congenitale CMV-infecties.

Momenteel kan een positieve vruchtwaterpunctie dus nog niet gekoppeld worden aan het opstarten van een therapie, tenzij in studieverband.

3.3 Prevention

Uit een rapport van het Institute of Medicine bleek dat een vaccin tegen CMV behoort tot de groep van de meest kosteffectieve vaccins (54). Een verklaring hiervoor is dat veel kinderen met sequellen overleven. Naast de preventie van congenitale infecties zou het vaccin ook nuttig zijn voor de preventie van CMV-infecties bij transplantpatiënten. Tot slot speelt CMV mogelijk een rol bij het ontstaan van atherosclerose en immunosenescentie. Een vaccin is momenteel echter nog toekomstmuziek.

4) Organisational impact

De vruchtwaterpunctie moet worden uitgevoerd vanaf 21 zwangerschap en minstens 6 weken na de maternale infectie. De PCR voor CMV gebeurt in het labo twee maal per week, samen met de andere stalen voor CMV.

5) Cost impact: in and outside the laboratory

De kostprijs van een CMV PCR bedraagt zo'n 30 euro per test. Er is geen terugbetaling voorzien in België.

6) Decision making

Stel we voeren een vruchtwaterpunctie uit vanaf 21 weken zwangerschap en minstens 6 weken na de maternale infectie en het resultaat is negatief, dan kunnen we *niet* garanderen dat het kind niet geïnfecteerd zal zijn. Als het resultaat positief is, dan weten we dat het kind geïnfecteerd zal zijn maar we kunnen *geen* voorspelling doen over de ernst van de infectie aan de hand van de viral load. Momenteel kunnen we een positieve punctie ook *niet* koppelen aan het opstarten van een therapie. Vandaar dat we ons de vraag stellen wat het nut is van het verder uitvoeren van deze test.

COMMENTS

Praktijk in andere CMD's:

UZ Gent:

CMV PCR op vruchtwater wordt niet uitgevoerd.

Virga Jesse ziekenhuis, Hasselt:

Er gebeurt een kwantitatieve CMV PCR op vruchtwater, maar het resultaat wordt enkel semi-kwantitatief gerapporteerd.

Heilig Hart Roeselaere

Er gebeurt een kwantitatieve CMV PCR op vruchtwater maar enkel op uitdrukkelijke vraag en na overleg met de klinisch bioloog. Het resultaat wordt onder voorbehoud gerapporteerd.

OLV ziekenhuis, Aalst

Er bestaat een mogelijkheid tot kwantitatieve CMV PCR op vruchtwater, doch dit gebeurt zeer zelden (<1x/jaar).

TO DO/ACTIONS

1. Kwantitatieve CMV PCR op amniosvocht

- Een overleg met de gynaecologen is nodig om te beslissen of we deze test naar de toekomst toe nog verder zullen aanbieden. Indien we de test toch nog uitvoeren, moet de clinicus weten dat hij geen prognose kan koppelen aan het resultaat van de viral load en dat een negatieve punctie een congenitale infectie niet volledig uitsluit. Eventueel kan dit als commentaar aan het resultaat worden toegevoegd. Een andere optie is dat we het resultaat enkel nog kwalitatief rapporteren.
- In onze studie waren er een aantal congenitale infecties waarbij de PCR op amniosvocht negatief was. Verder waren er ook een aantal zeer zwakke resultaten. Een hypothese is dat het hier CMV-stammen betreft die moeilijker door onze PCR worden opgepikt. Om deze hypothese te bevestigen, zouden we deze amniosvochten moeten hertesten met een andere PCR-techniek of onze primers/probes moeten aanpassen om te kijken of we zo onze detectie kunnen verbeteren

2. Virale urinecultuur

Uit onze studie bleek dat de urinecultuur voor CMV soms vals negatief is.

- Een mogelijke verklaring voor vals negatieve resultaten is een slecht transport/bewaren van de stalen. Mogelijke opties zijn:
 - a) Het invoeren van rejectiecriteria
 - Bv. geen stalen testen die later dan 72 uur na afname in het labo toekomen of die in bevroren toestand toekomen.
 - b) Het toevoegen van een commentaar bij de (extra-muros) resultaten
 - CMV is enkel stabiel indien stalen bewaard/getransporteerd worden op 4-8°C
- Een tweede mogelijke verklaring is dat de excretie van CMV in de urine intermitterend verloopt. In dit geval zou het nuttig zijn een tweede staal af te nemen. Een mogelijkheid is om, in samenspraak met de dienst neonatologie, een studie op te zetten waarbij we telkens twee stalen op verschillende tijdstippen afnemen. Na bv. een jaar kan dan de opbrengst van dit tweede staal geëvalueerd worden.

ATTACHMENTS

[Bijlage 1 : PCR op amniosvocht: sensitiviteit en specificiteit](#)

Zie bijgevoegd excel-document

[Bijlage 2: Kwantitatieve PCR op amniosvocht: correlatie met de outcome van de baby](#)

Zie bijgevoegd excel-document