

Infecção Congénita pelo Vírus Citomegalo

Resultados Preliminares de Estudo Prospectivo*

Sílvia Lopo[1], Paula Palminha[1], Marina Pité[1], Tânia Caçador[1], Elsa Vinagre[1], Maria Amável Pereira[1], Maria Teresa Paixão[1], Maria João Brito[2], José Maria Garrote[2], Helena Carreira[2], Maria Céu Machado[2]

1 Unidade de Herpes vírus/Rubéola, Centro de Virologia, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa.
2 Departamento de Pediatria, Hospital Fernando Fonseca, Amadora.

RESUMO

O vírus Citomegalo (VCM) é o vírus mais frequentemente associado à infecção congénita, com uma incidência de 0,5-2,2% do total de nascimentos nos países desenvolvidos. Em Portugal desconhece-se a incidência de infecção congénita pelo VCM. Apresentamos os resultados preliminares de um estudo prospectivo de diagnóstico de infecção congénita por este vírus; determinámos a proporção de crianças infectadas, morbilidade, mortalidade e sequelas da infecção congénita pelo VCM num grupo de recém-nascidos do Hospital Fernando Fonseca. Estudámos 757 recém-nascidos consecutivos, estabelecendo-se o diagnóstico laboratorial pelo isolamento viral em urina colhida nos primeiros dias de vida. O PCR foi efectuado no sangue do cordão em 653 casos. A infecção congénita pelo VCM foi diagnosticada em 5/757 casos (0,7%) estando os recém-nascidos assintomáticos ao nascer; em 2 casos foram detectados sinais/sintomas de doença no primeiro mês de vida. Não foi detectado genoma do vírus nos sangues do cordão. A proporção de infecção congénita está de acordo com a descrita na literatura. O isolamento do VCM na urina do recém-nascido mostrou ser a técnica indicada no diagnóstico de infecção congénita, com melhores resultados que a técnica de PCR no sangue do cordão. As crianças infectadas, sintomáticas/assintomáticas serão seguidas clínica/laboratorialmente até aos 36 meses de vida.

ABSTRACT

Cytomegalovirus (CMV) is considered the most frequent cause of congenital infections, occurring in approximately 0.5-2.2% of all live births. There is no knowledge about the incidence of CMV congenital infection in Portugal. We report the results of a prospective study on the diagnosis of congenital CMV infection where we determine the proportion of infected neonates, morbidity, mortality and sequelae in a group of neonates from Hospital Fernando-Fonseca. Seven hundred seven consecutive newborns were studied for diagnosis of CMV congenital infection. Laboratory diagnosis was established by isolation of CMV from urine, during the first days of life. In 653 cases where cord blood was available, PCR was performed. Congenital CMV infection was diagnosed in 5/757 cases (0.7%) all asymptomatic. Two newborns showed signs/symptoms of congenital CMV disease during the first month of life. In all samples of cord blood CMV viral genome was not detected. In this prospective study, the intrauterine proportions transmission is in agreement with literature. The isolation of CMV in shell-vial from urine was a reliable method for the diagnostic of congenital CMV infection, as opposed to PCR in cord blood. Infected newborns both symptomatic and asymptomatic will be followed for 36 months.

INTRODUÇÃO

O VCM é um vírus sem predomínio sazonal conhecido, mas com uma prevalência de infecção que varia nos Estados Unidos entre 50% e 85% em adultos (1). Em Portugal ainda não foram efectuados estudos que nos permitam conhecer a prevalência do VCM na população.

O VCM é o vírus associado com maior frequência a infecção congénita em países desenvolvidos, com uma incidência de 0,4-2,2% do total de nascimentos (2,3) sendo responsável por casos de mortalidade e morbilidade neonatal; é também frequente a infecção assintomática no período neonatal, mas que se vem a manifestar em sequelas tardias nas crianças.

Em Portugal não há conhecimento da incidência da infecção congénita por este vírus e não existe linha condutora obrigatória no que respeita ao screening do VCM em exame antenatal e/ou durante a gravidez.



A infecção materna pelo VCM na maioria dos casos é assintomática ou cursa com sintomas inespecíficos como febre, odinofagia, fadiga e mau estar. Analiticamente pode existir apenas leucopenia com linfocitose. A transmissão ocorre por via orofaríngea e genital e em ambos os casos pode ocorrer transmissão transplacentar. Numa infecção primária materna, a transmissão do VCM ao feto é de aproximadamente 40%; este valor baixa para aproximadamente 0,5% em mulheres com imunidade pré-existente para o vírus antes da concepção (4, 5). No entanto, se ocorrer infecção intrauterina o feto pode vir a não ser afectado pelo VCM.

Cinco a 15% das crianças infectadas pelo VCM são sintomáticas no período neonatal com manifestações clínicas que incluem calcificações intracranianas, icterícia, hepatoesplenomegalia e púrpura ou petéquias; 30 a 60% das crianças manifestam sequelas tardiamente tais como, perda de audição, diminuição da acuidade visual, corioretinite, atraso psicomotor, alterações neuromusculares, microcefalia, atraso mental, entre outros. Nas crianças com infecção congénita pelo VCM assintomáticas no período neonatal, a infecção passa facilmente despercebida, não sendo possível diagnosticar nem tratar a criança precocemente.

Com base em estudos anteriores realizados noutros países (6), apresentamos os resultados preliminares de um estudo prospectivo de diagnóstico da infecção congénita pelo VCM num grupo de recém-nascidos consecutivos do Hospital Fernando Fonseca.

OBJECTIVO

Determinar a proporção de crianças infectadas, bem como a morbilidade, mortalidade e sequelas da infecção congénita pelo VCM num grupo de recém-nascidos consecutivos, do Hospital Fernando Fonseca, na região de Lisboa, no espaço de 3 meses.

METODOLOGIA

População estudada

Entre Maio e Agosto de 2002, foram estudados 757 recém-nascidos consecutivos, para o diagnóstico clínico e laboratorial da infecção congénita pelo VCM, com o consentimento informado de todas as mães incluídas no projecto.

Foram obtidos registos sobre os ante-cedentes familiares do recém-nascido e condições socioeconómicas, bem como sobre a história clínica neonatal das crianças.

Nos casos laboratorialmente diagnosticados foi efectuado um follow-up aos 3 e 6 meses que incluiu avaliação neurológica, auditiva, oftalmológica e de desenvolvimento do estado ponderal e psicomotor. As crianças infectadas pelo VCM são seguidas clinicamente de forma periódica.

Técnicas laboratoriais

O diagnóstico laboratorial da infecção congénita por VCM foi efectuado pelo isolamento viral (técnica shell-vial) em urina colhida nos primeiros dias de vida. A detecção do genoma viral pela técnica de amplificação enzimática do ADN (PCR) efectuou-se no sangue do cordão dos casos disponíveis e na urina dos casos em que o isolamento viral foi positivo.

Foram realizados periodicamente testes serológicos e isolamento do VCM nos recém-nascidos com infecção intrauterina. Estas crianças continuam, de forma periódica, a ser seguidas laboratorialmente.

Isolamento viral

Utilizou-se a técnica de cultura rápida shell-vial no isolamento do VCM das urinas dos 757 recém-nascidos estudados.

Os produtos foram inoculados em tubos shell-vial sobre uma monocamada de células MRC5 (Vircell S.L. Santa Fe, Granada, Espanha), que cresce em lamelas removíveis, seguindo-se uma centrifugação a baixa velocidade (30', 300 g) e incubação (60', 37ºC).

Quadro I
Follow-up laboratorial dos recém-nascidos assintomáticos e sintomáticos infectados congenitamente pelo VCM e das suas

Follow-up laboratorial	Recém-nascidos Assintomáticos												Recém-nascidos Sintomáticos							
	Caso nº 1 Data de nascimento: 18/05/02				Caso nº 2 Data de nascimento: 21/05/02				Caso nº 4 Data de nascimento: 10/06/02				Caso nº 3 Data de nascimento: 26/05/02				Caso nº 5 Data de nascimento: 03/07/02			
Casos	Isol. viral	PCR	IgG	IgM	Isol. viral	PCR	IgG	IgM	Isol. viral	PCR	IgG	IgM	Isol. viral	PCR	IgG	IgM	Isol. viral	PCR	IgG	IgM
Nascimento	P	N	P	N	P	n.d.	n.d.	n.d.	P	N	P	N	P	N	P	P 38,52, 150	P	N	P	P 38,52, 150
Após 15 dias - 1mês	N		P	N	P		P	N	P		P	N	n.d.		P	P 38,52	P	N	P	Ind. 52
Após 2 meses	N		P	N	n.e.		n.e.	n.e.	n.e.		n.e.	n.e.	N		n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.
Após 3 meses	n.e.		n.e	n.e.	P		P	N	P		P	N	N		n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.
Após 5 meses	N		P	N	n.e.		n.e	n.e.	n.e.		n.e	n.e.	n.e.		n.e	n.e.	n.d.		n.d.	n.d.
Após 6 meses	P		P	N	N		P	N	n.e.		n.e	n.e.	P		n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.
Mães			P	N			P	N			P	N			P	P			P	N

n.d.= não disponível; n.e.= não efectuado; P= Resultado positivo; N= Resultado negativo; Ind.= Resultado indeterminado; 38, 52, 150 = proteínas recombinantes do VCM; Isol. viral = Isolamento viral.

Após adição do meio de manutenção os tubos incubam durante 48 horas. Após este período, as lamelas são fixadas, retiradas dos tubos e colocadas em lâmina. A infecção pelo VCM é detectada pela técnica de imunofluorescência indirecta, utilizando anticorpos monoclonais específicos para os antigénios precoces (EA) (MW=50,000) e precoces imediatos (IEA) (MW=72,000), segundo as instruções do fabricante (CMV Culture Identification Test, Trinity Biotech plc, Co. Wicklow, Irlanda).

Detecção do ADN

A técnica de PCR efectuou-se no sangue do cordão dos 653 casos disponíveis. Nas urinas em que o isolamento viral foi positivo também foi efectuada a técnica de PCR.

Os produtos foram processados utilizando um kit comercial cujo ensaio se baseia em 3 passos principais, nomeadamente a extracção do ADN viral das amostras, a amplificação genómica e a visualização com sondas específicas por hibridação em microplaca, utilizando oligonucleótidos específicos para o VCM (Herplex, Genómica, Coslada, Madrid, Espanha).

A extracção do ADN viral foi efectuada em 50 ml de cada produto (urina e soro). Utilizou-se também um controlo interno positivo, indicando a sua presença que ocorreu amplificação do ADN e assegurando que os resultados negativos são verdadeiros negativos.

Detecção de anticorpos

Nos recém-nascidos infectados foram realizados testes serológicos nos sangues do cordão disponíveis e nos soros, de forma periódica.

As amostras de soro foram testadas para a detecção de anticorpos da classe G e da classe M anti-VCM, por técnicas comerciais de imunofluorescência indirecta (Merifluor CMV IgG/IgM , Gull, Cincinnati, Ohio, EUA) e/ou imunoenzimática - técnica ELFA (VIDAS CMV IgG/IgM, bioMérieux sa, Marcy l'Etoile, França), segundo as instruções do fabricante.

Os produtos positivos para IgM foram confirmados por imunoblot, utilizando um teste comercial para detecção das proteínas p38, p52 e p150 (CMV IgM Blot 3.0, Genelabs Diagnostics Pte Ltd., Singapura).

Às mães dos recém-nascidos infectados congenitamente foi também efectuada a detecção serológica de IgG e de IgM, após terem sido informadas do resultado laboratorial positivo dos seus filhos.

RESULTADOS

A infecção congénita pelo VCM foi diagnosticada quer por cultura viral, quer pela técnica de PCR, em 5 dos 757 casos estudados. A proporção de transmissão intrauterina foi de 0,7%. Não foi detectado genoma do VCM nos 653 sangues do cordão analisados.

Os 5 recém-nascidos nasceram assintomáticos. Em 2 casos foram detectados sinais/sintomas de doença, durante o

primeiro mês de vida: pneumonia e vasculite dos núcleos da base (1 caso); pancitopénia, aplasia medular, hepatite e vasculite dos núcleos da base (1 caso). A proporção de recém-nascidos com sintomatologia durante o primeiro mês de vida foi de 2/5 (40%).

Os resultados dos testes periódicos realizados para cada um dos recém-nascidos infectados congenitamente estão expressos no quadro 1, bem como os resultados no que respeita ao status serológico das mães dos 5 filhos com infecção congénita pelo VCM.

As 2 crianças com sintomatologia no primeiro mês de vida apresentaram resultados positivos para a IgG e resultados positivo e indeterminado, respectivamente, para a IgM na colheita de sangue do cordão e na colheita efectuada no primeiro mês de vida. No que respeita às mães, estas foram convocadas para colheita de sangue após o resultado do diagnóstico laboratorial de infecção congénita, tendo sido a determinação de IgM negativa para 4 casos e positiva para um dos casos em que a criança era sintomática.

Quatro mães são de raça negra e apenas uma é caucasóide (4/5). A mãe do caso 2 é seropositiva para o VIH2. O recém-nascido foi tratado com zidovudina nas primeiras 6 semanas de vida. Até aos 6 meses de vida foi detectada a presença de anticorpos para o VIH2; após este período registou-se a ausência de anticorpos para o VIH2, sendo a pesquisa do antigénio p24 e a técnica de PCR negativas.

Aos 6 meses de vida as 5 crianças infectadas apresentaram um desenvolvimento do estado ponderal normal assim como a avaliação neurológica e oftalmológica. Laboratorialmente verificou-se que o caso 3 apresentasse uma linfocitose relativa com as transaminases ligeiramente alteradas para o grupo etário e o caso 5 linfocitose relativa com neutropenia.

COMENTÁRIOS

Não existe conhecimento prévio acerca da proporção de infecções congénitas causadas pelo VCM neste hospital nem no nosso país. No estudo efectuado, a proporção de infecções congénitas causadas pelo VCM foi de 0.7% e a proporção de recém-nascidos com infecção congénita e com sintomatologia durante o primeiro mês de vida foi de 2/5 (40%). Analisando os resultados obtidos, a proporção de infecção congénita, está de acordo com a descrita na literatura (2,3,).

Não foi detectado genoma viral pela técnica de PCR no sangue do cordão; esta técnica poderá não ser a técnica apropriada para detecção de infecção congénita, uma vez que o período virémico pode já não estar em curso.

O isolamento do VCM na urina do recém-nascido por shell-vial mostrou ser a técnica indicada para o diagnóstico de infecção congénita por este vírus uma vez que são encontrados resultados positivos sem evidência clínica ou patológica de infecção congénita na criança.

No que respeita aos resultados da serologia nas crianças pode inferir-se que o diagnóstico de infecção congénita baseado apenas nos resultados da colheita de sangue do cordão não é suficiente uma vez que a IgM pode não ser detectada na altura da colheita. O facto de apenas uma mãe ter um resultado de IgM positiva na colheita realizada após o nascimento da criança e as restantes serem negativas, não nos permite tirar conclusões acerca do período de infecção materno pois as imunoglobulinas da classe M podem ser detectadas por um período variável de tempo, variando de indivíduo para indivíduo.

Embora aos 6 meses de idade a avaliação do desenvolvimento das crianças infectadas mas assintomáticas seja normal, é prudente um longo período de follow-up, uma vez que estas poderão vir a desenvolver sequelas neurológicas a longo prazo. As crianças infectadas sintomáticas e assintomáticas irão ser seguidas clínica e laboratorialmente até aos 36 meses de vida.

O diagnóstico da infecção pelo VCM nos recém-nascidos é importante, quer ao nível epidemiológico, quer pela importância em identificar as crianças infectadas sem sintomatologia, pois permite que estas crianças sejam incluídas num programa de follow-up por forma a detectar e prevenir alguns problemas de desenvolvimento (4).

A importância da detecção de infecção fetal pelo VCM ainda é controversa, no entanto, achamos que o diagnóstico precoce poderá proporcionar uma intervenção clínica mais rápida (2,4,7).

PATROCÍNIOS

Este projecto (POCTI/ESP/43311/2001) foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

CORRESPONDÊNCIA

Sílvia Lopo
Unidade de Herpesvírus/Rubéola.
Centro de Virologia.
Instituto Nacional de Saúde
Dr. Ricardo Jorge
Avenida Padre Cruz
1649-016 Lisboa
Tel.: +351-21-7519206
Fax: +351-21-7526400
E-mail: uherpes.cvir@insa.min-saude.pt

BIBLIOGRAFIA

1 - National Center for Infectious Diseases. Cytomegalovirus Infection. [serial on line cited 2000 Jul 25]. Available from: http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/cmv.htm

2 - Lazzarotto T, Guerra B, Spezzacatena P, Varani S, Gabrielli L, Landini MP, et al. Prenatal Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection. J Clin Microbiol 1998;36:3540-44.

3 - Maine G, Lazzarotto T, Landini MP. New Developments in the diagnosis of maternal and Congenital CMV infection. Expert Rev Mol Diagn 2001;1(1):19-29.

4 - Lazzarotto T, Varani S, Spezzacatena P, Gabrielli L, Pradelli P, Landini MP, et al. Maternal IgG Avidity and IgM Detected by Blot as Diagnostic Tools to Identify Pregnant Women at Risk of Transmiting Cytomegalovirus. Viral Immunol 2000;13:137-41.

5 - Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Henderson RE, Moore EG, Alford CA, et al. Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection. N Engl J Med 1982;306:945-49.

6 - Peckham CS, Chin KS, Coleman JC, Henderson K, Hurley R, Preece PM. Cytomegalovirus infection in pregnancy: preliminary findings from a prospective study. Lancet 1983;18:1352-55.

7 - Whitley RJ, Kimberlin DW. Treatment of viral infections during pregnancy and the neonatal period. Clin Perinatol 1997;24:267-83.