



Infeção Congénita por Citomegalovírus Prevenção e Tratamento

Stéphanie Lopes Ferreira

Monografia do 2ºciclo de Estudos
Conducente ao Grau de Mestre em Análises Clínicas.

Trabalho realizado sob orientação de:

Professora Doutora Maria de São José Garcia Alexandre

Professora Catedrática – Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Setembro 2014

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA MONOGRAFIA.

“A satisfação está no esforço feito para alcançar o objetivo, e não em tê-lo alcançado.”

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

A escrita de uma monografia conducente ao grau de mestre marca o término de uma importante etapa do meu percurso académico, substancial para a minha evolução individual e académica. Atingir este objetivo só foi possível através de muito trabalho, determinação e persistência.

Para todos aqueles que, de alguma maneira, me apoiaram durante o período em que procurei concretizar este projeto profissional e pessoal, dedico estas páginas de abertura para exprimir o meu agradecimento. Que possam as minhas atitudes e comportamentos para com eles corresponderem ao que de mim sempre esperaram.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria São José Garcia Alexandre, pela compreensão, paciência, incentivo e motivação para que eu pudesse atingir os objetivos académicos a que me propus. Sem ela nunca teria chegado à escrita desta monografia.

Aos elementos da área técnico-científica de Análises Clínicas e Saúde Pública da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Mestre Maria Manuela Amorim Silva e Sousa, Anabela Dias Fernandes Moreira, Sandra Marlene Mota e Teresa Raquel Lemos Moreira pelo apoio incondicional e pessoal que sempre me deram.

Aos meus pais e irmão porque nunca duvidaram de mim.

Ao Eduardo, meu marido, por me ter feito acreditar que era possível.

Resumo

O citomegalovírus (CMV) é a principal causa de infeção congénita em todo o mundo, afetando cerca de 0,6-0,7% dos recém-nascidos (RN) nos países desenvolvidos. Em Portugal estima-se que a prevalência da infeção congénita por CMV seja de 1,05%. Os RN com infeção congénita manifestam à nascença sinais de envolvimento multiorgânico ou a forma mais grave da infeção congénita, a doença das inclusões citomegálicas, que além do envolvimento multissistémico existe comprometimento do sistema nervoso central.

Os elevados custos associados ao tratamento e apoio às crianças com sequelas, nomeadamente a surdez neurosensorial infantil e o atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, demonstram que a infeção congénita por CMV é um problema social importante. O diagnóstico laboratorial da infeção por CMV durante a gravidez bem como as medidas preventivas contra a infeção congénita por CMV têm sido alvo de vários estudos cujo objetivo é diminuir o impacto da infeção congénita por CMV na saúde pública. Contudo, o diagnóstico laboratorial persiste como um assunto controverso na comunidade médica. De facto a determinação dos anticorpos anti-CMV na grávida não fornece informação adicional para a prevenção e o prognóstico de uma provável infeção congénita. No entanto, em países cujo estudo serológico da grávida se realiza, a confirmação laboratorial de infeção materna pelo CMV durante a gravidez implica verificar a possibilidade de comprometimento fetal, através de técnicas invasivas e não invasivas. A confirmação da infeção congénita pelo CMV no recém-nascido é realizada através de métodos diretos como a técnica de *shell-vial* e a PCR em amostras de urina ou saliva, até às 2 semanas de nascimento, de modo a garantir que a transmissão do CMV ocorreu durante a gravidez.

A prevenção da infeção congénita durante a gravidez assenta em medidas preventivas primárias. No entanto, estas medidas não são 100% eficazes na prevenção da transmissão intra-uterina do CMV. A ausência de um tratamento adequado e aprovado para grávidas e recém-nascidos infetados, conduziu a vários estudos recorrerem à imunização passiva, através da administração de imunoglobulinas hiperimunes em mulheres com primoinfeção durante a gravidez, e à imunização ativa, via vacinação de mulheres seronegativas, como medidas preventivas eficazes da infeção congénita pelo CMV. Embora sem conclusões definitivas, os resultados destes estudos revelam conclusões promissoras na prevenção da transmissão intra-uterina do CMV e consequentemente da infeção congénita pelo CMV.

Palavras-chave: citomegalovírus, infeção congénita, prevenção, diagnóstico, tratamento, vacinas

Abstract

Cytomegalovirus (CMV) is the leading cause of congenital infection worldwide, affecting about 0,6-0,7% of newborns (NB) in developed countries. In Portugal it is estimated that the prevalence of congenital CMV infection is 1,05%. Newborns with congenital infection at birth manifested signs of multiorgan involvement, or the most severe form of congenital infection, the disease cytomegalic inclusions, that besides the multisystemic involvement it affects the central nervous system.

The high costs associated with treatment and support for children with sequelae, including sensorineural hearing loss and cognitive deficits, demonstrate that congenital CMV infection is a major social problem. The laboratory diagnosis of CMV infection during pregnancy as well as preventive measures against congenital CMV infection have been the target of several studies aimed at reducing the impact of congenital CMV infection in public health. However, the laboratory diagnosis remains a controversial subject in the medical community. In fact the determination of anti-CMV antibodies in pregnant does not provide additional information for the prevention and prognosis of probable congenital infection. Yet, in countries where the pregnant serological study is carried out, a laboratory confirmation of maternal CMV infection during pregnancy involves checking the possibility of fetal compromise using invasive and non-invasive techniques. On the other hand, in the newborn confirmation of congenital CMV infection is performed using methods such as shell vial technique and PCR until 2 weeks of birth, in order to ensure that the transmission of CMV occurred during pregnancy.

The prevention of congenital infection during pregnancy is based on primary preventive measures. But, these measures are not 100% effective in preventing intrauterine transmission of CMV. The absence of an approved treatment for infected pregnant women and newborns, has led to several studies resort to passive immunization, via administration of hyperimmune immunoglobulins in women with primary infection during pregnancy, and active immunization, by vaccination in seronegative women, as effective measures of congenital CMV infection. There is still a long way to go, however the results of clinical trials show promising findings in the prevention of intrauterine transmission of CMV and consequently of congenital CMV infection.

Keywords: congenital cytomegalovirus, newborn, prevention, diagnosis, treatment, vaccines

Índice

1. Citomegalovírus	1
2. Infecção congênita por citomegalovírus	3
2.1. Transmissão intra-uterina.....	4
2.2. Manifestações clínicas	5
3. Diagnóstico laboratorial da infecção congênita por CMV	6
3.1. Na mulher grávida.....	7
3.2. No feto	10
3.3. No recém-nascido.....	13
4. Prevenção da infecção congênita	15
4.1. Medidas de higiene	15
4.2. Imunização passiva.....	18
4.2.1. Imunoglobulina hiperimune CMV - CytoGam®, CSL Behring.....	19
4.2.2. Imunoglobulina hiperimune CMV - Cytotect®, Biotest.....	19
4.3. Imunização ativa	22
4.3.1. Vacinas contra o CMV	25
4.3.2. Vacinas para a prevenção da infecção congênita por CMV	28
4.3.3. Estratégias de vacinação	31
5. Tratamento da infecção congênita	33
5.1. Período Pré-natal.....	33
5.1.1. Valaciclovir.....	33
5.2. Período Pós-natal	34
5.2.1. Ganciclovir	34
5.2.2. Valganciclovir.....	35
6. Conclusão	37
7. Bibliografia	38

Índice de Figuras

Figura 1 - Seroprevalência do CMV distribuída pelos distritos de Portugal.....	2
Figura 2 – Algoritmo perante um resultado IgM positivo para CMV	8
Figura 3 - Conhecimento das mulheres sobre as patologias no recém-nascido	16
Figura 4 - Conhecimento de mulheres sobre as patologias no recém-nascido	17
Figura 5 - Estrutura do CMV com as principais proteínas estruturais	23
Figura 6 - Complexo pentamérico das proteínas UL128, UL130, UL131, gH e gL do CMV....	28

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Vacinas contra o CMV em ensaios pré-clínicos	25
Tabela 2 – Vacinas contra o CMV em ensaios clínicos de Fase I.....	26
Tabela 3 – Vacinas contra o CMV em ensaios clínicos de Fase II.....	27
Tabela 4 – Estratégias vacinais na prevenção da infeção pelo CMV	31

Lista de Abreviaturas

CTLs - células T citotóxicas

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CMV – citomegalovírus

CMV-HIG - (*Cytomegalovirus hyperimmunoglobulin*) imunoglobulina hiperimune CMV

DNA – (*deoxyribonucleic acid*) ácido desoxirribonucleico

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drugs Administration*

GCV- ganciclovir

gB – glicoproteína B

HSV – (*Herpes simplex virus*) vírus herpes simplex

IgG – imunoglobulina classe G

IgM – imunoglobulina classe M

LA – líquido amniótico

PCR – (*Polimerase Chain Reaction*) Reação de polimerização em cadeia

PNDP - Programa Nacional de Diagnóstico Precoce

RNM - ressonância nuclear magnética

RN – recém-nascido

Val-GCV – valganciclovir

VZV – (*Varicella-zoster virus*) vírus varicela-zoster

1. Citomegalovírus

O citomegalovírus (CMV), também designado Herpesvirus Humano tipo 5, é um vírus de DNA pertencente à família *Herpesviridae* e subfamília *β -herpesvirinae*. Como outros membros desta família, o CMV possui capacidade de latência, após uma primoinfeção. Esta característica permite ao CMV estabelecer uma infeção persistente no interior das células hematopoiéticas progenitoras e monócitos, sem ativar o sistema imunitário (Shenks et al, 2013). Em imunocompetentes a primoinfeção pelo CMV é na maioria dos casos assintomática, podendo no entanto provocar nalguns casos um síndrome mononucleósica, caracterizado por febre, fadiga, ligeira faringite, reduzida linfadenopatia e ainda hepatoesplenomegalia nalguns casos (Shenks et al, 2013).

Durante o período de latência podem ocorrer reativações do CMV, que consiste num período de replicação ativa do vírus. Embora os fatores envolvidos no processo de reativação ainda não estejam completamente esclarecidos, estas infeções têm sido observadas em situações de imunossupressão ou durante a gravidez (Shenks et al, 2013). Geralmente são infeções assintomáticas, exceto em indivíduos imunocomprometidos, podendo provocar pneumonia, esofagite, encefalite, hepatite, colite e retinite (Shenks et al, 2013).

O CMV é um vírus com uma distribuição mundial, cuja seroprevalência varia entre 45-100% de acordo com as condições socioeconómicas e os fatores demográficos como o sexo, a raça e a faixa etária (Cannon et al, 2010; (Kenneson et al, 2007). Segundo a literatura, a seroprevalência é maior em indivíduos do sexo feminino em idade reprodutiva, não-caucasianos e de classe social mais baixa (Cannon et al, 2010).

A seroprevalência do CMV em Portugal é de 77% e os distritos com maior percentagem são Guarda, Braga e Vila Real (Figura 1), com 89,5%, 86,4% e 85,2%, respetivamente (Lopo et al, 2011).

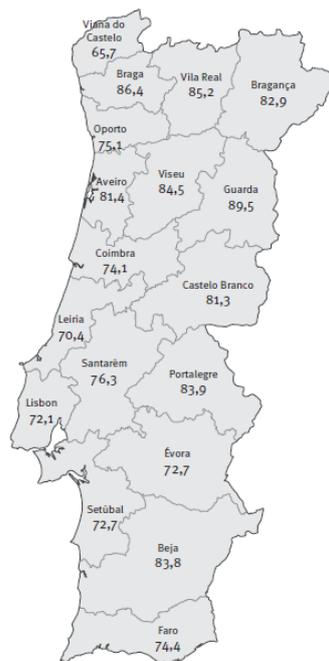


Figura 1 - Seroprevalência do CMV distribuída pelos distritos de Portugal (Lopo et al, 2011)

Face à elevada prevalência de anticorpos anti-CMV e à capacidade de latência, o CMV suscita particular interesse na saúde materno-infantil, especialmente no que concerne a infeção congénita por CMV e as suas implicações diagnósticas, terapêuticas e preventivas.

Torna-se desde logo importante distinguir uma infeção congénita de uma infeção perinatal, devido à maior morbilidade associada à infeção congénita. A infeção perinatal é geralmente assintomática e não está associada a lesões a nível do sistema nervoso central (Shenks et al, 2013).

A infeção congénita por CMV distingue-se da infeção perinatal pelo período em que ocorre a transmissão do vírus. A infeção congénita ocorre durante a gravidez enquanto a infeção perinatal ocorre durante o parto através do contato com as secreções cervicais, ou durante as primeiras semanas de vida através da ingestão de leite materno ou do contacto com fluídos biológicos de indivíduos infetados (Shenks et al, 2013).

O impacto da infeção congénita por CMV na Saúde Pública já é conhecido e debatido pela comunidade médica. Nos Estados Unidos da América (EUA) e em vários países da Europa é reconhecida como um problema social importante, devido aos custos relacionados com o tratamento e apoio às crianças com sequelas como a surdez neurosensorial infantil e com o acompanhamento das famílias afetadas (Lopo et al, 2011).

2. Infeção congénita por citomegalovírus

O CMV é a principal causa de infeção congénita em todo o mundo, afetando cerca de 0,6-0,7% dos recém-nascidos (RN) nos países desenvolvidos (Kenneson et al, 2007; Dollard et al, 2007). Um estudo sistemático que englobou dados estatísticos de 11 países de África, Ásia e América Latina mostrou uma prevalência superior, nomeadamente 0,6-6,1% dos RN (Lanzieri et al, 2014).

Em Portugal estima-se que a prevalência da infeção congénita por CMV seja de 1,05% (Paixão et al, 2009), valor superior à prevalência média de 0,64% obtida numa meta-análise que incluiu 34 estudos distribuídos por vários países europeus, americanos e asiáticos (Kenneson et al, 2007).

O registo nacional de casos de infeção congénita por CMV pela Unidade de Vigilância Pediátrica da Sociedade Portuguesa de Pediatria está implementado desde janeiro 2006 e registou até Junho de 2009, um total de 36 casos (Paixão et al, 2010).

A infeção congénita por CMV é mais frequente em RN de mães anteriormente seronegativas para o CMV e que adquiriram a sua primoinfeção durante a gravidez (Shenks et al, 2013). Em Portugal, a prevalência de mulheres seronegativas é de 19,8%, sendo que 43% são mulheres em idade reprodutiva, entre os 20 e 44 anos (Lopo et al, 2011), representando o principal grupo de risco para a primoinfeção do CMV com potencial capacidade de transmissão do vírus ao feto. Por outro lado, 80,2% das mulheres em Portugal são seropositivas para o CMV (Lopo et al, 2011). No entanto, a infeção congénita em grávidas seropositivas para o CMV, pode ocorrer também através de infeções secundárias como a reinfeção e a reativação (Shenks et al, 2013).

Em populações com elevada taxa de seroprevalência do CMV, o risco de transmissão é superior assim como o número de reinfeções. Estima-se que um aumento de 10% da seroprevalência nas mulheres é responsável por um aumento de 0,26% na prevalência da infeção congénita no RN (Kenneson et al, 2007).

2.1. Transmissão intra-uterina

A primoinfeção por CMV durante a gravidez ocorre entre 1-7% das grávidas seronegativas (Hyde et al, 2010). A transmissão intra-uterina do CMV para o feto nas grávidas seronegativas ocorre entre 14,2-52,4% dos casos (Kenneson et al, 2007).

A reativação ou reinfeção do CMV durante a gravidez ocorre entre 10-30% das grávidas seropositivas e o risco de transmissão intra-uterina é de 1,1-1,7% (Kenneson et al, 2007; Guerra et al, 2000; Stagno et al, 1986).

A principal via de transmissão é a via hematogénica, pela passagem de leucócitos maternos infetados para o epitélio tubular renal fetal, através dos vasos sanguíneos do cordão umbilical. O CMV inicia a sua replicação nas células epiteliais (Ornoy et al, 2006). A relação íntima entre as células endoteliais uterinas e as células epiteliais do citotrofoblasto, que estão em contacto com os fibroblastos das vilosidades coriônicas e as células endoteliais dos capilares fetais, permitem a transmissão intra-uterina (Revello et al, 2004; (Adler et al, 2007).

Foram descritas outras vias de transmissão intra-uterina, nomeadamente, a infeção direta do endotélio através de leucócitos maternos infetados, pela presença de lesões na camada do sinciotrofoblasto, particularmente no terceiro trimestre da gravidez; e a infeção do citotrofoblasto subjacente ao sinciotrofoblasto por transcitose do CMV ligado às imunoglobulinas de classe G (IgG) de baixa avidéz, uma vez que o complexo não é reconhecido pelos macrófagos das vilosidades coriônicas (Revello et al, 2004; (Maidji et al, 2006; Fisher et al, 2000).

Nas diferentes vias de transmissão podem ocorrer lesões a nível da placenta como a inflamação, a fibrose e necrose das vilosidades coriônicas, e a nível do feto. As complicações clínicas que os RN manifestam à nascença como a microcefalia resultam principalmente da insuficiência placentária, já as lesões a nível do sistema nervoso central são consequência da infeção fetal e hipóxia (Adler et al, 2007; Cheeran et al, 2009).

A infeção congénita pode ocorrer em qualquer período da gravidez, embora as complicações clínicas para o feto sejam mais severas no 1º trimestre da gravidez, cerca de 35-45% diminuindo até 0-25% no 2º e 3º trimestres (Lazzarotto et al, 2011; Pass et al, 2006). De facto, nos primeiros meses de gravidez o CMV provoca efeitos teratogénicos no feto, período correspondente com a migração das células neuronais da zona germinativa paraventricular para a placa cortical, entre as 12 e 24 semanas de gravidez (Gressens et al, 2006).

O CMV provoca maiores lesões nas células neurais não diferenciadas, induzindo a perda de células tronco neurais e células intermediárias, que se manifesta em microcefalia. Polimicrogiria, braquicéfalo, espaços pericerebrais dilatados são outras consequências dos problemas de diferenciação neural e migração de células tronco (Gressens et al, 2006; Buonsenso et al, 2012). Primoinfeções após este período resultam em lesões da matéria branca do cérebro sem desenvolvimento de malformações cerebrais (Jones et al, 2003).

2.2. Manifestações clínicas

Entre 85-90% dos recém-nascidos (RN) com infecção congênita, confirmada laboratorialmente, são assintomáticos à nascença. No entanto 10-15% destes RN assintomáticos podem desenvolver sequelas tardias como surdez neurosensorial, diminuição da acuidade visual e alterações neurológicas progressivas e perceptíveis ao longo da infância, geralmente nos primeiros 2 anos (Shenks et al, 2013).

Os RN sintomáticos, 10-15% dos casos, manifestam sinais típicos de infecção congênita, com envolvimento de múltiplos órgãos: hepatoesplenomegalia, icterícia, microcefalia, calcificações intracranianas, hidropsia, petéquias ou púrpura. Podem ainda manifestar a forma mais grave da infecção congênita, a doença das inclusões citomegálicas, que além do envolvimento multissistêmico há ainda comprometimento do sistema nervoso central (Shenks et al, 2013). Estes RN podem manifestar algumas sequelas nomeadamente atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, crises convulsivas, corioretinites, atrofia do nervo ótico, perda auditiva e defeitos na dentição (Shenks et al, 2013). Estima-se que 30% dos RN sintomáticos cursem com evolução letal, devido a coagulação intravascular disseminada, disfunção hepática e hemorragias (Dollard et al, 2007; Buonsenso et al, 2012).

A infecção congênita por CMV decorrente de uma primoinfeção durante a gravidez está associada a um maior número de problemas fetais, sobretudo nas primeiras 16 a 22 semanas de gravidez (Fowler et al, 1992). As reinfeções e reativações em grávidas seropositivas para o CMV raramente provocam sequelas graves no feto e os RN são geralmente assintomáticos à nascença, o que demonstra o contributo das IgG maternas na prevenção da transmissão e infecção fetal (Zalel et al, 2008). No entanto, já foram descritas complicações clínicas severas em RN com infecção congênita por CMV de grávidas seropositivas (Gaytant et al, 2003; Ahlfors et al, 2001).

3. Diagnóstico laboratorial da infecção congênita por CMV

A determinação do estado imunitário para o CMV na grávida permite a identificação das mulheres não imunes e a determinação de uma primoinfecção pelo CMV (Toscano et al, 2009).

Em vários países da Europa e também em Israel, o estudo serológico do perfil imunitário da mulher é realizado antes da gravidez e, no caso de grávidas seronegativas, monitorizado durante a gravidez (Adler et al, 2013; Nigro et al, 2012; Reichman et al, 2014). Contudo, o rastreio pré-concepcional sistemático não é recomendado devido: i) ao prognóstico inconclusivo dos fetos infetados; ii) à ausência medidas preventivas efetivas; iii) à ausência de uma vacina eficaz; e iv) à segurança questionável das medidas terapêuticas (Lazzarotto et al, 2011; Vide Tavares et al, 2011).

Embora a Norma nº37/2013, da Direção Geral de Saúde, relativo aos exames laboratoriais na gravidez de baixo risco, não contemple o rastreio da infecção pelo CMV, este é aconselhado desde 2006 na Circular Normativa nº2/DSMIA, como componente básico dos cuidados pré-concepcionais, salientando a importância do estudo do perfil imunitário para o CMV da futura grávida (Direção Geral de Saúde (DGS), 2013; DGS 2006).

Devido à ausência de um rastreio pré-concepcional para o CMV várias abordagens têm sido apresentadas, nomeadamente: i) o rastreio universal a todas as mulheres ou grávidas recentes; ii) o rastreio apenas a mulheres com maior risco de adquirirem uma primoinfecção (mulheres cujo contacto com crianças com idade inferior a 3 anos é frequente ou prolongado, mulheres com filhos pequenos, mulheres que trabalham em creches ou infantários); iii) o rastreio e respetivo teste de avididade a grávidas com 20 semanas de gravidez, uma vez que o risco de infecção é superior neste período (Walker et al, 2013).

Um estudo analisou a relação custo-eficácia destas 3 abordagens e concluiu que o rastreio universal apresenta melhor relação custo-eficácia quando comparado com a alternativa terapêutica pela administração da imunoglobulina hiperimune CMV (Cahill et al, 2009).

3.1. Na mulher grávida

O diagnóstico da infecção pelo CMV durante a gravidez é um assunto controverso na comunidade médica, visto que a determinação dos anticorpos anti-CMV na grávida não fornece informação adicional para a prevenção e o prognóstico de uma provável infecção congênita.

Em grávidas seronegativas um resultado positivo para anticorpos anti-CMV durante o decorrer da gravidez não determina a probabilidade de ocorrer transmissão intra-uterina do CMV e conseqüentemente de ocorrer infecção congênita. Por outro lado, um resultado negativo para anticorpos anti-CMV não exclui a probabilidade de ocorrer infecção congênita, uma vez que a adoção das medidas preventivas não são 100% eficazes na prevenção da infecção congênita por CMV (Lazzarotto et al, 2011).

De igual modo, em grávidas seropositivas a presença de anticorpos contra o CMV não exclui a probabilidade de ocorrer uma infecção congênita, dado que a seropositividade não traduz imunidade contra o CMV (Lazzarotto et al, 2011). Na infecção pelo CMV, a imunidade celular tem um papel mais relevante face a novas infecções, do que os anticorpos neutralizantes produzidos após infecção natural (Gerna et al, 2008).

No entanto, ainda é usual o estudo serológico do perfil imunitário para o CMV durante a gravidez. A detecção de anticorpos anti-CMV é geralmente realizada por ensaios imunoenzimáticos como a ELISA (*enzyme linked sorbent immunoassay*), ELFA (*enzyme-linked fluorescence assay*) ou por quimioluminescência (Lazzarotto et al, 2008). Ambas as metodologias determinam os níveis de anticorpos específicos IgM e IgG anti-CMV.

O diagnóstico de uma primoinfecção por CMV assenta na observação de uma seroconversão das IgG em amostras séricas colhidas com um intervalo superior a 4 semanas (Adler et al, 2011). A detecção de uma seroconversão durante a gravidez nem sempre é possível devido à ausência de uma colheita pré-concepcional. Na impossibilidade de detecção da seroconversão, a presença de anticorpos IgM anti-CMV numa amostra sérica não é condição suficiente para um diagnóstico de infecção primária, uma vez que estes anticorpos podem: i) persistir até 6 a 9 meses após uma primoinfecção; ii) manter-se em título elevado entre gestações consecutivas e iii) ser detetados em infecções não associadas ao CMV, devido a reação cruzada com IgM específicas contra outros vírus (parvovírus B19, vírus *Epstein-Barr*) e o fator reumatóide (De Carolis et al, 2010; Lazzarotto et al, 2004). Assim, a presença de anticorpos IgM é indicativo de uma infecção primária recente ou tardia ou até mesmo uma reativação ou reinfeção (Lazzarotto et al, 2011).

O diagnóstico de uma reativação ou reinfeção pelo CMV é obtido pelo aumento do título de IgG anti-CMV ou pela presença de IgM anti-CMV (Lazzarotto et al, 2011). Contudo, o diagnóstico serológico realizado de modo isolado, nas grávidas seropositivas nem sempre indica a presença de uma infeção secundária por reativação ou reinfeção, uma vez não se verifica aumento do título de IgG anti-CMV nem a presença de IgM anti-CMV, que confirmem a observação de alterações morfológicas no feto pela ecografia fetal (Zalel et al, 2008; Zafar et al, 2006).

Visto que a deteção de anticorpos IgG e IgM anti-CMV não define a ocorrência de uma primoinfeção durante a gravidez ou o risco de transmissão intra-uterina, recorre-se a outras técnicas de apoio para esse efeito, nomeadamente ao teste de avidez das IgG e/ou ao *western-blot* para a deteção de IgM (Figura 2) (Leruez-Ville et al, 2013).

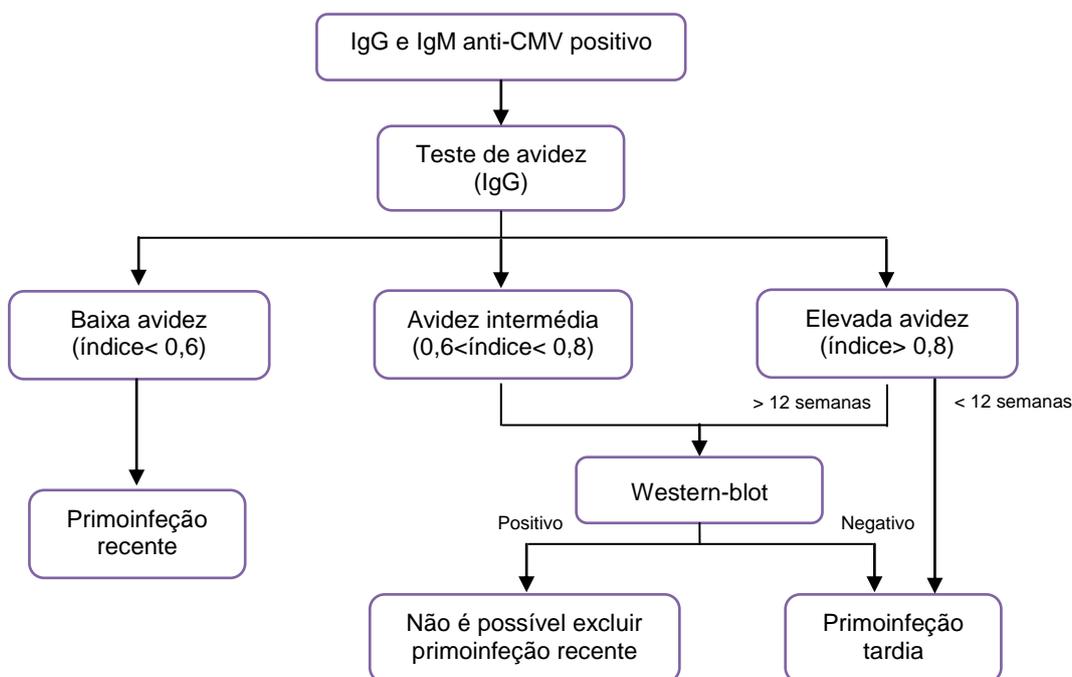


Figura 2 – Algoritmo perante um resultado IgM positivo para CMV
(adaptado da Sociedade Portuguesa de Virologia, 2009; Toscano et al, 2009)

O teste de avidez consiste na determinação da afinidade funcional dos anticorpos da classe IgG ao antígeno, através da determinação da resistência da ligação antígeno-anticorpo a um agente dissociante como agentes desnaturantes de proteínas ou desestabilizantes de ligações de pontes de hidrogénio, tais como soluções de dietilamina, cloridrato de guanidina ou ureia (Blackburn et al, 1991). O título de anticorpos IgG anti-CMV é quantificado através de ensaios imunoenzimáticos antes e após tratamento com o

agente dissociante, para a obtenção do índice de avidéz. A razão entre os valores de densidade ótica obtidos no ensaio com o agente dissociante e no ensaio sem o agente dissociante corresponde ao valor do índice de avidéz (Blackburn et al, 1991).

A afinidade funcional dos anticorpos ao antigénio específico aumenta progressivamente ao longo da resposta imunológica. Até os três primeiros meses após a infeção primária, as IgG produzidas apresentam uma baixa avidéz, que evidencia uma infeção recente. Por outro lado, a deteção de IgG anti-CMV de alta avidéz, mesmo na presença de IgM anti-CMV, caracteriza a infeção como tardia com a presença de IgM residual (Lazzarotto et al, 2000). Trata-se de um teste altamente específico (100%) quando realizado entre as 6 e 18 semanas de gravidez (Lazzarotto et al, 2000). A realização deste teste antes das 18 semanas de gravidez permite excluir com elevada probabilidade uma infeção primária pelo CMV, no entanto depois das 20 semanas de gravidez a sensibilidade deste teste diminui para 62,5% (Lazzarotto et al, 2000).

O *western-blot* é uma técnica alternativa em grávidas com idade gestacional superior a 12 semanas ou em grávidas cujo índice de avidéz das IgG se situa entre 0,6 e 0,8. Consiste num ensaio imunoenzimático que avalia a presença de anticorpos IgM anti-CMV contra proteínas do CMV: p150, p38 e p52. Consoante o perfil de reatividade é possível classificar o resultado como positivo, negativo ou indeterminado. Um resultado positivo implica reatividade para duas ou três proteínas do CMV, incluindo a proteína p52 (Lazzarotto et al, 1997).

O uso de várias proteínas víricas para a deteção de IgM anti-CMV aumenta a especificidade do *western-blot*, sendo considerado como um teste confirmatório. É uma técnica cuja sensibilidade e especificidade são de 100% (Lazzarotto et al, 2000).

De suporte ao diagnóstico serológico existem testes virológicos diretos como o teste de antigenemia que deteta antigénios do CMV e a técnica de *Polimerase Chain Reaction* (PCR) que amplifica e identifica o ácido desoxirribonucleico (DNA) do CMV. Todavia, estes métodos não permitem datar o curso da infeção nem estimar o risco de transmissão e gravidade da infeção congénita (Lazzarotto et al, 2008; Lazzarotto et al, 2004). Além de que ambos os testes apresentaram baixa sensibilidade (14.3% teste de antigenemia e 47.6% PCR) para a deteção da transmissão intra-uterina do CMV em gestantes que adquiriram primoinfeção entre as 4 e 30 semanas de gravidez (Lazzarotto et al, 2004).

3.2. No feto

Após confirmação laboratorial de infecção materna pelo CMV durante a gravidez é imperativo verificar a possibilidade de comprometimento fetal, através de técnicas invasivas como a amniocentese e cordocentese e técnicas não invasivas como a ecografia fetal e a ressonância nuclear magnética (Lazzarotto et al, 2011).

O diagnóstico de infecção congênita através do líquido amniótico (LA) obtido por amniocentese é o mais apropriado (Lazzarotto et al, 2011). A amniocentese deve ser realizada pelas 20 e 23 semanas de gravidez, período suficiente para a transmissão intra-uterina do CMV, e até 6 a 7 semanas após o início da infecção materna, período em que o feto excreta quantidade suficiente do vírus (Vide Tavares et al, 2011; Yinon et al, 2010; Goegebuer et al, 2009).

O CMV pode ser detetado no LA pela técnica de PCR em tempo real ou pela técnica de *shell-vial* (Goegebuer et al, 2009). A técnica de PCR em tempo real permite a detecção do DNA do CMV. A detecção do DNA do CMV confirma a presença de infecção fetal (valor preditivo positivo de 100%), mas não determina a sua gravidade. No entanto, um estudo estabeleceu um valor preditivo de infecção congênita assintomática e um valor preditivo de infecção congênita sintomática quando a carga vírica é superior a 1000 cópias/mL e a 100000 cópias/mL, respetivamente (Guerra et al, 2000). É uma técnica com elevada especificidade mas com um valor preditivo negativo de 94,2% (Lazzarotto et al, 2011), sendo possível a obtenção de resultados falso-negativos. As principais situações que dão origem a estes resultados são: o tempo inadequado de amniocentese; o inapropriado transporte ou processamento da amostra; e a inibição da PCR por compostos do próprio LA (Goegebuer et al, 2009).

A técnica de *shell-vial* combina a cultura celular em tubo com técnicas imunológicas para a detecção de antigénios nucleares do CMV (Gleaves et al, 1985). A técnica de *shell-vial* utiliza uma cultura em monocamada de células MRC5 (células permissivas à infecção por CMV) numa lamela contida num tubo de vidro. A centrifugação da amostra sobre a cultura antes da incubação potencializa a entrada do vírus na cultura celular através da ligação das glicoproteínas víricas aos recetores celulares. Após 24 ou 48 horas de incubação realiza-se uma reação de imunofluorescência em que os anticorpos anti-CMV conjugados com a fluoresceína reagem com uma das glicoproteínas do CMV (ex.: pp65) nas células infetadas da cultura celular. A cultura celular é observada ao microscópio de fluorescência para a identificação de células infetadas por CMV, pela emissão de cor verde fluorescente (Gleaves et al, 1985).

A cordocentese consiste na colheita de sangue fetal pelo cordão umbilical. Como técnica invasiva com um risco de perda fetal de 0,5-1% dos casos, não é indicada para o diagnóstico de infecção congênita por CMV (Coll et al, 2009). No entanto, é recomendada nos casos de infecção congênita grave, a fim de confirmar a disseminação da infecção e estabelecer o prognóstico (Benoist et al, 2008). A sensibilidade da técnica de PCR em sangue do cordão (41-92,3%) é inferior à sensibilidade obtida no LA (Revello et al, 2002). No entanto, a presença de trombocitopenia inferior a $100\ 000/\text{mm}^3$ no sangue do cordão umbilical é indicativo de mau prognóstico (Benoist et al, 2008).

Perante um resultado negativo para DNA do CMV no LA, a grávida deve ser informada de um possível resultado falso-negativo, pelas razões acima referidas. Pelo que se recomenda a deteção do CMV na urina do recém-nascido até às 2 semanas após o nascimento. Por outro lado, na presença de um resultado positivo para DNA do CMV no LA, recomenda-se a realização de uma ecografia fetal ou ultrassonografia para avaliar a gravidade da infecção congênita. Esta técnica não invasiva fornece informações importantes a respeito do prognóstico fetal, pela identificação de malformações estruturais no feto. As possíveis alterações ecográficas evidenciadas numa infecção congênita incluem alterações no (Vide Tavares et al, 2011; Benoist et al, 2008):

- a) sistema nervoso central - ventriculomegalia, hidrocefalia, microcefalia, calcificações intracranianas;
- b) sistema gastrointestinal - hiperecogenicidade intestinal, focos hiperecogénicos hepáticos e esplénicos, hepatoesplenomegalia, ascite;
- c) sistema cardiovascular - cardiomegalia; cardiomiopati, derrame pericárdico, defeitos cardíacos septais;
- d) sistema urinário - rins hiperecogénicos; hidronefrose
- e) crescimento – restrição de crescimento fetal grave e precoce
- f) líquido amniótico – oligodramnia ou polidramnia (índice de líquido amniótico $< 8\text{mm}$ e $> 180\text{mm}$, respetivamente) e eventual anasarca feto-placentária
- g) placenta – placentomegalia

A ecografia fetal deve ser realizada a cada 2 a 4 semanas, de forma a monitorizar ao longo da gravidez o aparecimento de alterações morfológicas, que podem auxiliar no prognóstico da infecção congênita (Bonalumi et al, 2011). No entanto, a sensibilidade da ecografia fetal é baixa, apenas 20% dos fetos infetados são identificados, o que significa que a ausência de alterações morfológicas não exclui a presença de infecção congênita (Guerra et al, 2008).

A ressonância nuclear magnética (RNM) pode ser utilizada como método complementar à ecografia fetal para esclarecer o diagnóstico das alterações morfológicas fetais, oferecendo informações adicionais, principalmente a nível do sistema nervoso central (Vide Tavares et al, 2011; Picone et al, 2008). De facto, a inclusão da RNM como exame complementar da ecografia fetal aumenta o valor preditivo positivo do diagnóstico de alterações cerebrais em fetos infetados pelo CMV (Benoist et al, 2008). Além de auxiliar no diagnóstico, a RNM permite estabelecer o prognóstico da infecção fetal pela presença das respetivas alterações morfológicas fetais (Bonalumi et al, 2011). Se evidência de malformações, considerar interrupção voluntária da gravidez por indicação médica ou administração de imunoglobulina hiperimune (Walker et al, 2013).

3.3. No recém-nascido

O diagnóstico de infecção congênita por CMV no RN deve ser realizado até às 2 semanas de nascimento, de modo a garantir que se está a diagnosticar uma infecção que ocorreu durante a gravidez (de Vries et al, 2012). Após este período a transmissão pelo CMV pode ocorrer via leite materno ou por contacto com fluídos biológicos infetados, sendo considerada uma infecção perinatal (Shenks et al, 2013).

A deteção de anticorpos séricos anti-CMV no RN não é utilizada no diagnóstico de infecção congénita, uma vez que os anticorpos IgG podem ser de origem materna por transferência placentária e os anticorpos IgM, embora indicadores de infecção congénita, estão presentes apenas em 20-70% dos RN (Revello et al, 2002).

O diagnóstico de infecção congénita por CMV no RN é realizado através de métodos diretos como a técnica de *shell-vial* e o PCR em amostras de urina ou saliva. O produto biológico mais indicado no diagnóstico de infecção congénita em RN é a urina, dada a intensa excreção viral através do sistema urinário do RN (de Vries et al, 2012).

Na urina, o CMV pode ser isolado e identificado pela técnica de *shell-vial* ou detetado através do DNA pela técnica de PCR. O método de referência no diagnóstico de infecção congénita em RN é a técnica *shell-vial*, no entanto o PCR tem sido descrita como um método sensível, específico e rápido no diagnóstico de infecção congénita em RN (Lazzarotto et al, 2011; Paixao et al, 2012).

Um resultado negativo em ambas as técnicas indica que o RN não tem infecção congénita por CMV e não necessita de ser sujeito a outros testes laboratoriais. Um resultado positivo é indicativo de infecção congénita por CMV e devem ser realizados exames audiométricos e avaliações de desenvolvimento periodicamente ao RN, nos meses 1, 3, 6 e 12 até completar o primeiro ano e anualmente até à idade escolar (Lazzarotto et al, 2011).

Face à dificuldade técnica da colheita de urina no RN vários estudos realizaram a deteção do CMV por PCR em amostras de saliva (Boppana et al, 2011; Yamamoto et al, 2011; Yamamoto et al, 2006).

Um estudo com 9845 amostras de saliva de RN colhidas imediatamente após o nascimento concluiu que a deteção do DNA do CMV por PCR em amostras de saliva é eficaz e viável para o diagnóstico de infecção congénita por CMV em RN (Barkai et al, 2014). Todas as amostras salivares positivas para DNA do CMV foram confirmadas pela técnica de *shell-vial* e PCR em amostras de urina. No entanto, a presença de outros vírus na mucosa bucal do RN podem dar origem a resultados falso-positivos, o que implica a

confirmação de todos os resultados positivos em amostras de urina (Balcarek et al, 1993).

A técnica de *shell-vial*, embora específica e sensível para o diagnóstico da infeção congénita por CMV, não permite o estudo epidemiológico em grande escala do CMV. O facto de ser uma técnica demorada (cerca de 24 a 48 horas) e dispendiosa e a necessidade de manter a estabilidade do poder infeccioso do vírus para isolamento são algumas razões que impedem a realização de estudos epidemiológicos (Barbi et al, 2006). Nos últimos anos a utilização dos *guthrie cards*, como alternativa ao método *shell-vial* para o diagnóstico da infeção congénita por CMV em RN, tem sido alvo de vários estudos (Barbi et al, 1996; Barbi et al, 2000; Paixao et al, 2009). Os *guthrie cards* são utilizados no rastreio neonatal para a identificação de doenças hereditárias do metabolismo, responsáveis por provocar atraso mental irreversível, atraso motor, alterações neurológicas ou a morte da criança (Vilarinho et al, 2006). Em Portugal, o Programa Nacional de Diagnóstico Precoce (PNDP) teve início em 1979 com o rastreio da fenilcetonúria e desde 2004 faz o rastreio de aminoacidopatias, doenças da beta oxidação mitocondrial e acidúrias orgânicas (Ministério da Saúde, 2010). Embora o PNDP não contemple a deteção do CMV, segundo a Lei Nº 12/2005 de proteção de dados genéticos, as amostras de sangue seco em papel obtidas no rastreio neonatal podem ser utilizadas para investigação desde que previamente anonimizadas (Assembleia da República, 2005).

A utilização de amostras de sangue seco colhidas em papel de filtro tem como principais vantagens: i) a garantia de que a presença de CMV se deve exclusivamente a uma transmissão intra-uterina durante a gravidez, uma vez que a amostra de sangue seco é colhida entre o terceiro e o sexto dia de vida (Programa Nacional de Diagnóstico Precoce et al, 2007); ii) a estabilidade da amostra (já foi detetado o DNA do CMV em 63 *guthrie cards* arquivados há 18 anos) (Barbi et al, 2000); iii) evita que o RN seja sujeito a um novo procedimento invasivo através de uma colheita de sangue destinada para a deteção do DNA do CMV.

A deteção do CMV nos *guthrie cards* é realizada através da técnica de PCR, cuja sensibilidade varia entre 71% e 100%, dependendo do método de extração do ácido nucléico e da população estudada (de Vries et al, 2009).

4. Prevenção da infecção congênita

4.1. Medidas de higiene

Na ausência de uma vacina aprovada contra o CMV e de um tratamento eficaz aprovado tanto no período pré-natal como no período pós-natal, a principal forma de prevenção da infecção congênita por CMV é evitar a transmissão do vírus da mãe para o feto (Thackeray et al, 2013; Gaulão et al, 2013).

A prevenção é essencial não só na grávida seronegativa como também na seropositiva, uma vez que pode ocorrer reinfeção. A grávida deve estar alerta para medidas que reduzem o risco de adquirir uma infecção pelo CMV durante a gravidez, tais como: (Lazzarotto et al, 2011; Johnson et al, 2012; Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge et al; *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), 2012)

- Reforçar os hábitos de higiene pessoal: lavagem das mãos com água e sabão (durante 15-20 segundos), após o contato com fraldas, saliva ou secreções respiratórias de crianças, uma vez que são o principal reservatório do CMV e excretam prolongadamente grandes quantidades de vírus na urina, fezes e saliva. A transmissão do CMV é consideravelmente reduzida através de hábitos de higiene redobrados, uma vez que o invólucro lipídico do CMV é facilmente degradado pela maioria dos detergentes, sabões ou álcoois, o que significa que a utilização destes produtos é uma forma eficiente de inativar o vírus (Shenks et al, 2013).
- Não beijar crianças com idade inferior a 6 anos, na boca ou na face; limitar-se a beijar na testa, na cabeça ou substituir o beijo por um abraço.
- Não partilhar comida, bebida ou utensílios (brinquedos, chupeta) com as crianças.
- Grávidas cuja situação profissional implica um relacionamento com crianças deverão trabalhar com crianças com idade superior a 2 anos e meio, sobretudo se seronegativa ou se desconhece o seu estado imunitário para o CMV.

Vários estudos corroboram as medidas preventivas divulgadas pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos EUA e dão relevância à educação e formação das mulheres em idade fértil, grávidas e futuras grávidas relativamente à infecção pelo CMV e às suas implicações (Jeon et al, 2006; (Lim et al, 2012; (Cordier et al, 2012). Estudos demonstraram que a formação em grávidas sobre medidas de higiene pessoal durante a gravidez resultou na diminuição da taxa de seroconversão do CMV (Adler et al 2004; Vauloup-Fellous et al 2009).

Um estudo em mães seronegativas com filhos em infantários, instruídas relativamente às medidas de prevenção da transmissão do CMV, revelou uma taxa de infeção por CMV significativamente mais baixa comparativamente a mães não instruídas (Johnson et al, 2012).

Em março de 2013, um ensaio clínico deu início ao processo de recrutamento de grávidas seronegativas com idade gestacional inferior a 20 semanas com o objetivo de avaliar se a intervenção comportamental para a prevenção do CMV pode alterar os comportamentos de higiene da grávida, a fim de diminuir o risco de infeção primária na gravidez (ClinicalTrials.gov NCT01819519). O grupo experimental será abordado durante a consulta pré-natal com uma intervenção educacional através de um vídeo de prevenção do CMV e entrega de informação preventiva e calendário com informação sobre os comportamentos de higiene. Receberão ainda semanalmente mensagens/e-mails como lembretes sobre os comportamentos de higiene. A data estimada para a conclusão do estudo é março de 2015, pelo que não existem ainda resultados disponíveis.

A relação entre a formação das grávidas sobre medidas de higiene pessoal durante a gravidez e a diminuição da taxa de seroconversão do CMV, levou ao desenvolvimento de outros estudos sobre o conhecimento da infeção congénita por CMV por parte da população. Entre eles está um estudo que envolveu 643 mulheres dos EUA onde foi demonstrado que apenas 22% das mulheres tinham conhecimento da infeção congénita por CMV (Jeon et al, 2006). A infeção congénita por CMV ocupa o último lugar das patologias de transmissão transplacentária conhecidas pelas mulheres incluídas neste estudo (Figura 3) (Jeon et al, 2006).

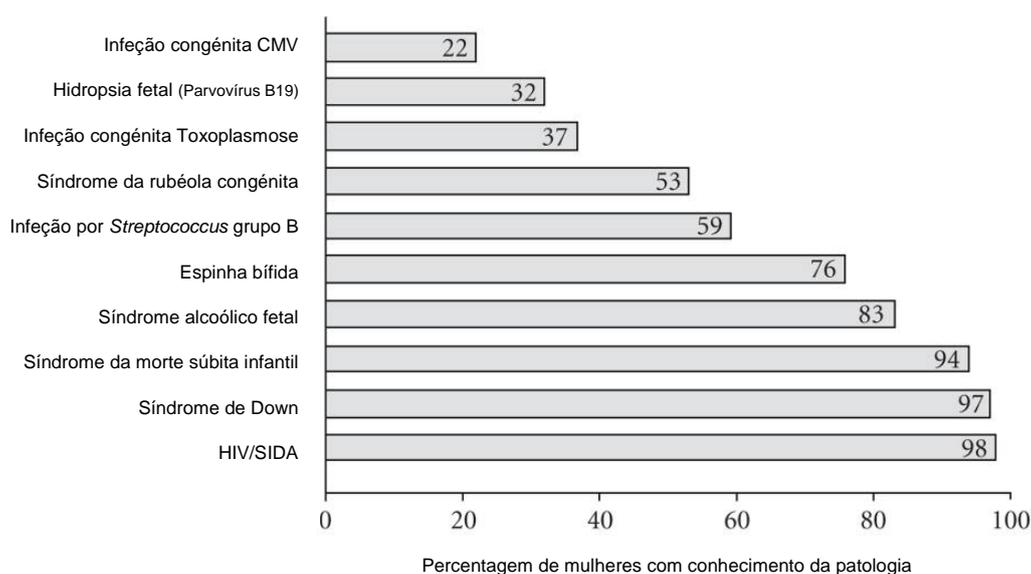


Figura 3 - Conhecimento das mulheres sobre as patologias no recém-nascido (adaptado de Jeon et al, 2006)

Outro estudo analisou as respostas do questionário da *Healthstyles* de 4184 participantes dos EUA, 2181 mulheres e 2003 homens, tendo-se verificado que apenas 13% das mulheres (Figura 4) e 7% dos homens tinham conhecimento da infecção congénita por CMV (Cannon et al, 2012). A percentagem das mulheres com conhecimento da infecção congénita por CMV foi inferior à obtida no estudo realizado em 2008, em que 14% das mulheres tinham conhecimento desta infecção (Ross et al, 2008).

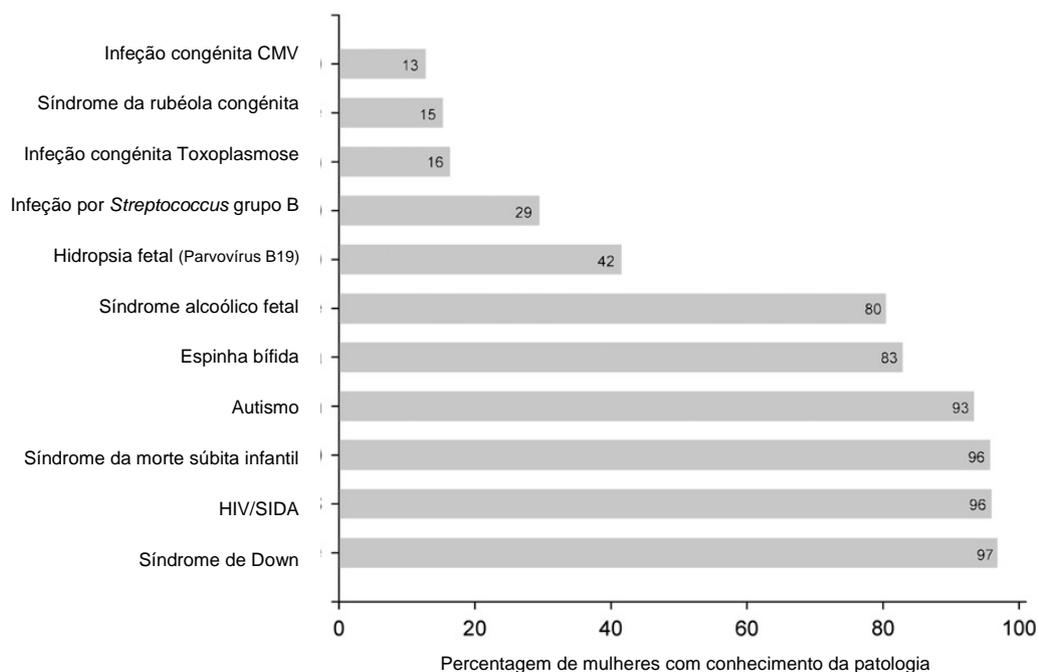


Figura 4 - Conhecimento de mulheres sobre as patologias no recém-nascido (adaptado de Cannon et al, 2012)

As diferenças encontradas nos acima estudos descritos (Jeon et al 2006, Ross et al 2008, Cannon et al 2012) devem-se essencialmente ao tipo de amostragem que não pode ser inferido para a população e à aplicação de diferentes questionários. A amostragem por conveniência pode introduzir viés na interpretação dos resultados, uma vez que o conhecimento da infecção pelo CMV varia significativamente com a idade, raça, nível de formação, zona geográfica e condições socioeconómicas.

No entanto, a percentagem de mulheres que conhecem a infecção congénita por CMV é muito baixa em todos os estudos, sendo importante uma maior consciencialização de toda a população sobre a problemática da infecção congénita por CMV e formação sobre as medidas preventivas, a fim de alterar hábitos comportamentais envolvidos na transmissão do CMV.

4.2. Imunização passiva

A imunização passiva consiste na administração de anticorpos a um indivíduo não imune com o objetivo de conferir imunidade imediata contra um agente infeccioso. É geralmente indicada após exposição ao agente e em situações em que a imunização ativa não está disponível, está contraindicada, ou não tenha sido administrada antes da exposição (Tavares et al, 2005; Baxter et al, 2007).

Estes anticorpos podem ser adquiridos naturalmente, pela passagem das IgG maternas ao feto via transplacentária e leite materno, ou pela administração de imunoglobulinas hiperimunes (Baxter et al, 2007).

A imunidade adquirida por uma mulher após infecção natural pelo CMV antes da gravidez não confere completa proteção ao feto contra a infecção congênita, assim como não confere imunidade à criança até à idade fértil. O tempo de semi-vida das IgG maternas é cerca de 30 dias (Zhang et al, 2014). Assim, o estudo da administração de imunoglobulinas hiperimunes em mulheres com primoinfecção durante a gravidez para a prevenção da infecção congênita por CMV tem sido alvo de vários estudos (Nigro et al, 2012; Nigro et al, 2005; Buxmann et al, 2012). Estes estudos demonstraram que a imunização passiva aumenta significativamente a concentração de IgG anti-CMV e respetiva avidéz e diminui o número de células *natural killer* e células ativadas HLA-DR+ (Nigro et al, 2012; Buxmann et al, 2012; Adler et al, 2009). Concluíram ainda que a administração de imunoglobulina hiperimune CMV (CMV-HIG) está associada a um menor risco de infecção congênita (Nigro et al, 2012; Buxmann et al, 2012).

Outros estudos avaliaram o uso de CMV-HIG em grávidas com infecção congênita confirmada laboratorialmente no estudo das alterações a nível da placenta, como marcadores de infecção congênita (La Torre et al, 2006). Estes estudos verificaram uma diminuição da espessura da placenta, consequência da diminuição da inflamação e da resposta pro-inflamatória das citocinas (La Torre et al, 2006; Maidji et al, 2010). Estes dados resultam da capacidade imunomoduladora da CMV-HIG, como a regulação negativa da síntese das interleucinas, o bloqueio dos recetores Fc e anticorpos específicos para os recetores de células T (Adler et al, 2007; Adler et al, 2009).

Também foi estudada a relação entre o uso de CMV-HIG e as alterações morfológicas detetadas pela ecografia fetal, nos fetos com infecção congênita confirmada laboratorialmente, nomeadamente hidropsia, hepatomegalia, ventriculomegalia, hiperecogenicidade renal e placentomegalia (Nigro et al, 2008; Sato et al, 2007; Moise et al, 2008; Moxley et al, 2008). Estes estudos verificaram regressão das

alterações morfológicas nos fetos das mães tratadas com CMV-HIG (Sato et al, 2007; Moise et al, 2008; Moxley et al, 2008), e ainda alterações no desenvolvimento sensorial, mental e motor normal nas crianças com infecção congênita por CMV, até aos 7 anos de idade (Nigro et al, 2008). Estes resultados estão de acordo com o estudo realizado em ratinhos recém-nascidos cuja administração de anticorpos anti-CMV mostrou prevenir o desenvolvimento de lesões cerebrais e da alteração da migração neuronal (Cekinovic et al, 2008).

Neste momento, estão em curso dois ensaios clínicos que visam a prevenção da infecção congênita por CMV após primoinfecção durante a gravidez, através da administração de uma CMV-HIG:

4.2.1. Imunoglobulina hiperimune CMV - CytoGam®, CSL Behring

O mecanismo antiviral do CytoGam® baseia-se na neutralização do vírus pela interação dos anticorpos anti-CMV com as glicoproteínas virais do invólucro (Adler et al, 2013; Schleiss et al, 2005). Foi aprovada pela Food and Drugs Administration (FDA) para administração individual ou combinada com análogos de nucleósidos em indivíduos transplantados como profilaxia contra o CMV (Schleiss et al, 2005). Mas em 2012 um ensaio clínico de fase III recrutou 800 grávidas com diagnóstico de primoinfecção pelo CMV em 14 centros médicos nos EUA, com o objetivo de avaliar a eficácia da administração intravenosa de Cytogam® (100 mg/kg) em grávidas na redução do número de RN infetados pelo CMV. A data estimada para a conclusão do estudo é dezembro de 2018, pelo que não estão ainda disponíveis resultados (ClinicalTrials.gov NCT01376778).

4.2.2. Imunoglobulina hiperimune CMV - Cytotect®, Biotest

O efeito antiviral desta imunoglobulina deve-se à sua capacidade de neutralização e também imunomoduladora, diminuindo o número de células *natural killer* e HLA-Dr+. (Nigro et al, 2012; Nigro et al, 2005; Adler et al, 2009; Maidji et al, 2010) Consequentemente, há diminuição da carga vírica sistémica e placentária, diminuindo assim o risco de transmissão e consequentemente infecção congénita. Em fetos infetados reduz a inflamação da placenta e/ou do feto, resultando num aumento do fluxo de sangue fetal (Nigro et al, 2012; Adler et al, 2009). Este mecanismo poderá também contribuir para a reversão das alterações observadas na ecografia fetal.

O primeiro ensaio clínico multicêntrico de fase II (2009-2011) pretendeu avaliar a eficácia da imunoglobulina hiperimune Cytotec® em 123 grávidas, com primoinfeção pelo CMV entre as 5 a 26 semanas de gravidez, na prevenção da transmissão transplacentária (Revello et al, 2014). A imunoglobulina hiperimune foi administrada no grupo experimental 6 semanas após a primoinfeção. A taxa de infeção congénita foi de 30% (18 fetos ou recém-nascidos de 61 mulheres) no grupo experimental e 44% (27 fetos ou recém-nascidos de 62 mulheres) no grupo controlo, não tendo assim tido demonstrado uma redução significativa na taxa de transmissão do CMV em grávidas que receberam Cytotec® (Revello et al, 2014). Além disso, a administração da CMV-HIG não alterou o título de anticorpos neutralizantes nem a carga vírica no sangue materno e na placenta (Revello et al, 2014). Estes resultados não estão de acordo com os resultados obtidos no estudo de Nigro et al (2005) que concluiu que a administração de CMV-HIG aumentou a concentração de anticorpos anti-CMV e diminui o número de células *natural killer* e células ativadas HLA-DR+, associadas a um menor risco de infeção congénita por CMV (Nigro et al, 2005).

O segundo ensaio clínico multicêntrico de fase III com Cytotec® (2008-) envolveu 7000 grávidas, com seroconversão no primeiro trimestre de gravidez, de 4 países europeus (Alemanha, Bélgica, Austria e Hungria) e pretendeu avaliar a eficácia da imunoglobulina hiperimune Cytotec® na prevenção da transmissão transplacentária do CMV. Em janeiro de 2011 a análise preliminar confirmou a eficácia da Cytotec® no grupo experimental mas ainda não foram publicadas as conclusões finais deste estudo (Biotest, 2011).

Os resultados destes dois ensaios clínicos, desenvolvidos nos EUA e Europa, respetivamente poderão esclarecer a eficácia e segurança da CMV-HIG como um meio de prevenção da transmissão transplacentária do CMV.

Embora não haja resultados conclusivos de ensaios clínicos controlados e randomizados no homem, é consensual por parte dos obstetras a utilização de CMV-HIG nos casos de evidência ecográfica de infeção fetal, como alternativa à interrupção da gravidez (Adler et al, 2009; Schleiss et al, 2006).

A administração de CMV-HIG para a prevenção da transmissão intra-uterina do CMV apresenta alguns problemas, nomeadamente a variabilidade de lote, a possibilidade de transmissão de infeção acidental, os volumes administrados e a dificuldade em manter um fornecimento adequado da CMV-HIG (Auerbach et al, 2014). A utilização de um anticorpo monoclonal contra o CMV com eficácia terapêutica contra a transmissão intra-uterina do CMV poderá ser uma alternativa mais vantajosa à CMV-HIG.

Um ensaio pré-clínico em porquinhos da Índia verificou que a administração de anticorpos monoclonais neutralizantes contra as glicoproteínas gH/gL do invólucro do CMV neste modelo animal previne a transmissão intra-uterina do CMV (Auerbach et al, 2014).

4.3. Imunização ativa

A resposta imunológica tem um papel importante no controlo da infeção pelo CMV, uma vez que se verifica um menor número de RN infetados em grávidas seropositivas (Zalel et al, 2008). Assim a indução de resposta imunológica por meio de vacinação torna-se um objetivo desejado. Para isso e de forma a compreender as barreiras que surgiram à vacinação contra o CMV ao longo dos anos é necessário compreender a resposta imunológica celular citotóxica frente ao CMV. Embora o papel da imunidade humoral seja importante para impedir a disseminação do vírus na fase aguda da infeção, ela não é capaz de eliminar o vírus em estado latente (Nash et al, 2013). Numa infeção viral latente os mecanismos da imunidade celular são mais importantes na defesa do organismo (Nash et al, 2013).

Após penetração do vírus na célula, os antígenos do CMV são degradados pela via endógena ou proteossomal (Nash et al, 2013). Os péptidos resultantes da degradação sofrem processamento no retículo endoplasmático e são ligados ao complexo major de histocompatibilidade de classe I, que os apresenta à superfície da membrana celular de forma a serem reconhecidos pelas células T citotóxicas (CTLs), dando origem à resposta celular citotóxica. As CTLs reconhecem os péptidos resultantes da degradação das proteínas do CMV (proteína de matriz pp65, a fosfoproteína pp150 e as glicoproteínas B e H) que estão à superfície das células infetadas pelo CMV e procede à lise celular (Nash et al, 2013).

A indução desta resposta celular citotóxica mediante vacinação é mais eficaz em vacinas que estimulam o processamento intracelular dos antígenos, como nas vacinas atenuadas que possuem as glicoproteínas imunogénicas ou nas vacinas de DNA e nos vetores vacinais em que no plasmídeo são introduzidos os genes que codificam para as glicoproteínas imunogénicas do CMV (gB, gH e pp65) (Wang et al, 2014). Além de induzir resposta celular citotóxica, a vacinação tem como objetivo induzir a produção anticorpos neutralizantes em título suficiente para conferir imunidade contra a infeção pelo CMV (Wang et al, 2014).

Tendo em conta a estrutura do CMV (Figura 5), os potenciais alvos imunológicos para o desenvolvimento de uma vacina são a(s) (Schleiss et al, 2005):

- Proteínas do invólucro: complexo glicoproteico I (gB), complexo glicoproteico II (gM/gN) e complexo glicoproteico III (gH, gL, gO). Estas proteínas são responsáveis pela ativação da resposta humoral com produção de anticorpos

neutralizantes, essencialmente as glicoproteínas gB e gH. Os complexos glicoproteicos I e III também ativam as CTLs.

- Proteína estrutural – fosfoproteína 65 (pp65) codificada pelo gene UL83
É alvo principal das CTLs e também dos anticorpos anti-CMV
- Proteína não estrutural – IE1 codificada pelo gene UL123 (Buonsenso et al, 2012; (Schoppel et al, 1997; (Zanghellini et al, 1999).
É alvo das CTLs e também dos anticorpos anti-CMV

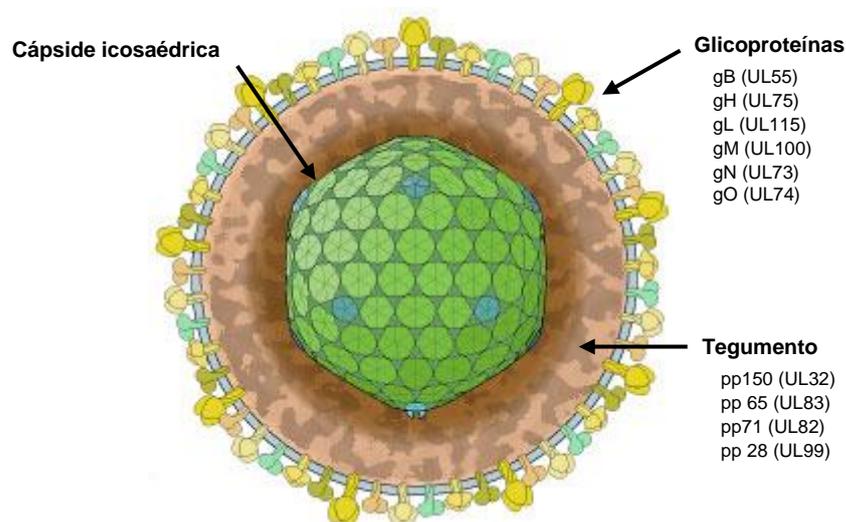


Figura 5 - Estrutura do CMV com as principais proteínas estruturais (Adaptado de Hulo et al, 2011)

Anticorpos contra outras proteínas estruturais e não estruturais, nomeadamente proteínas do tegumento pp150 (UL32), pp28 (UL99), pp71 (UL82) e a proteína de ligação do DNA pp52 (UL44), também estão presentes em soros de indivíduos seropositivos, contudo, o papel destes anticorpos na imunidade contra o CMV não está completamente esclarecido (Pass et al, 2002).

Para avaliar a segurança e eficácia de uma vacina são realizados ensaios clínicos que consistem em estudos randomizados duplamente cegos (*World Health Organization*, 2004). O processo de investigação de uma vacina contempla duas fases: a fase pré-clínica e a fase clínica. A fase pré-clínica consiste em avaliar a atividade citotóxica em cultura celular e atividade antiviral em modelos animais, quando a vacina apresenta baixa toxicidade e atividade inibitória. No modelo animal estabelecem-se as concentrações não

tóxicas, absorção, metabolização e eliminação, determina-se a dose terapêutica e identificam-se possíveis efeitos teratogênicos e carcinogênicos (WHO, 2004).

Estão em curso ensaios pré-clínicos de vacinas contra o CMV no modelo animal (Tabela 1).

A fase clínica consiste na avaliação da vacina em humanos e divide-se em 4 fases (WHO, 2004):

Fase I – Avaliação da segurança, farmacocinética e farmacodinâmica.

Ensaio limitado a um reduzido número de voluntários adultos saudáveis, com o objetivo de avaliar a segurança e tolerância clínica da vacina.

Fase II – Avaliação da segurança e imunogenicidade na população alvo.

Ensaio realizado numa população de 100 a 200 voluntários para qual a nova vacina foi desenvolvida, com a finalidade de demonstrar a atividade imunogénica da vacina (imunogenicidade) e de estabelecer a dose ideal, o programa de vacinação e o perfil de segurança.

Fase III – Avaliação da segurança e eficácia.

Ensaio que envolve um grande número de voluntários alvos de vacinação futura, para avaliar se os efeitos imunogénicos e a segurança demonstrados na fase II têm significância estatística e relevância clínica, para uma indicação e para um grupo específico de voluntários. Após aprovação, a vacina ficará disponível.

Fase IV – Estudo da eficácia e farmacovigilância

Estudos pós-comercialização para a monitorização da eficácia e segurança da vacina nos voluntários vacinados, a fim de avaliar possíveis efeitos adversos da vacina; estratégias operacionais alternativas para administrar a vacina; conhecer a duração da imunidade; avaliar o efeito da vacinação em situações epidemiológicas distintas; e avaliar o impacto epidemiológico da vacinação na transmissão da doença.

O estudo de vacinas como medida preventiva contra as infeções pelo CMV, nomeadamente a infeção congénita, deu início nos anos 70 com a vacina atenuada Towne (Dasari et al, 2013). No entanto até hoje, nenhuma das vacinas desenvolvidas foi testada em ensaios clínicos de fase III, mas os resultados dos ensaios clínicos da fase I e II (Tabela 2 e 3) revelaram-se muito promissores na prevenção da transmissão intra-uterina do CMV e conseqüentemente da infeção congénita por CMV.

4.3.1. Vacinas contra o CMV

Tabela 1 – Vacinas contra o CMV em ensaios pré-clínicos

Tipo vacinas	Designação/Descrição	Modelo animal	Resultados	Referência
Vacina recombinante	gB-G eVLPs	ratinho	induz imunidade humoral	(Kirchmeier et al, 2014)
Vacina atenuada	vAM409 vírus atenuado com deleção do gene GP83 (pp65 homóloga)	porquinho da índia	induz imunidade humoral	(Schleiss et al, 2013)
Vetor vacinal	MVA Vetor MVA contém genes codificantes para as proteínas gB, IE1 e pp65	porquinho da índia	induz imunidade humoral e celular	(Wang et al, 2006)
		Macaco	induz imunidade humoral e celular	(Yue et al, 2008)
	VRP Vetor alphavirus contém genes codificantes da gB ou pp65/EI1	Coelho e ratinho	induz imunidade humoral e celular	(Reap et al, 2007)
Vacina de DNA	Complexo glicoproteico II (gM/gN) Vetor pJW4303 possui os genes codificantes do complexo glicoproteico II (gM/gN)	Coelho e ratinho	Induz imunidade humoral	(Shen et al, 2007)
	pRc/CMV2-gB Vetor pRc/CMV2 e gB	ratinho	Induz imunidade humoral	(Temperton et al, 2003)
	Plasmídeo recombinante MCMV MW97.01 com genes codificantes da DNA polimerase (M54) e helicase (M105)	ratinho	Induz imunidade celular	(Morello et al, 2007)
	pRep4-HBs-MCMV BAC Plasmídeo pRep4-HBs em cromossoma bacteriano artificial com genes do MCMV	ratinho	Induz resposta das células T	(Cicin-Sain et al, 2003)
Vacina sub-unitária	Vacina Dense Body partículas defetivas, formadas durante a replicação do CMV em cultura celular, que contém as proteínas do invólucro e pp65	ratinho	Induz imunidade humoral e celular	(Pepperl-Klindworth et al, 2002)
	CMV gB/AS01 e CMV gB/AS02 Glicoproteína B e adjuvante AS01 e AS02	porquinho da índia	Induz imunidade humoral	(Schleiss et al, 2014)

gB – glicoproteína B; **VLP** – *virus-like particles*; **MVA** - Vírus *vaccinia ankara* modificado; **IE1** – proteína não estrutural; **pp65** – fosfoproteína 65; **VRP** – *alphavirus replicon particle vaccine for cytomegalovirus*; **BAC** – *bacterial artificial chromosome*; **MCMV** - *murine cytomegalovirus*;

Tabela 2 – Vacinas contra o CMV em ensaios clínicos de Fase I

Tipo vacinas	Designação	Amostra	Resultados	Referência
Vacina atenuada	Quimera Towne/Toledo	25 adultos saudáveis seropositivos para CMV	Boa tolerância Em curso em indivíduos seronegativos	(Heineman et al, 2006) (ClinicalTrials.gov NCT01195571)
Vetor vacinal	ALVAC-CMV (vCP139) Vetor canarypox e gB	20 adultos saudáveis seropositivos e seronegativos para CMV	Induz imunidade humoral	(Adler et al, 1999)
	ALVAC-CMV (vCP260) Vetor canarypox e pp65	20 adultos saudáveis seronegativos para CMV	Induz imunidade humoral e celular	(Berencsi et al, 2001)
	AVX601 Vetor alphavirus e gB/pp65/IE1	40 adultos saudáveis seronegativos para CMV	Induz imunidade humoral e celular	(Bernstein et al, 2009)
Vacina sub-unitária	CMV gB/MF59 Glicoproteína B e adjuvante MF59	95 adultos saudáveis seronegativos para CMV	Induz imunidade humoral	(Frey et al, 1999)
	CMV gB/MF59	46 adultos saudáveis seronegativos para CMV	Induz imunidade humoral	(Pass et al, 1999)
	CMV gB/MF59	18 crianças seronegativas para o CMV	Induz imunidade humoral	(Mitchell et al, 2002)
	CMV gB/MF59	150 mulheres seropositivas para o CMV	Induz imunidade humoral e celular	(Sabbaj et al, 2011)
	GSK 1492903A (gB) Glicoproteína B e adjuvante	40 homens saudáveis seronegativos para o CMV	Sem resultados publicados (estudo terminado em 2009)	(ClinicalTrials.gov NCT00435396)
	V160 Partícula defetiva com complexo pentamérico gH	170 adultos saudáveis seronegativos para CMV (valor estimado)	Em curso (fase de recrutamento)	(ClinicalTrials.gov NCT01986010)
Vacina de peptídeo sintético	CMV pp65-A 0201	46 adultos saudáveis seronegativo e seropositivos para CMV	Sem resultados publicados (estudo terminado em 2009)	(ClinicalTrials.gov NCT00712634)
	PADRE-CMV peptídeo de fusão contendo o epítopo CTL HLA A*0201 pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ e o epítopo sintético PADRE	36 adultos saudáveis seronegativo e seropositivos para CMV	Induz imunidade celular	(La Rosa et al, 2012)
	TetP2-CMV peptídeo de fusão contendo o epítopo das células Th HLA A*0201 pp65 ₄₉₅₋₅₀₃ e o epítopo tetanus	22 adultos saudáveis seronegativo e seropositivos para CMV		
	Vacina DNA	VCL-CT02 Plasmídeo trivalente gB/pp65/IE1	17 adultos saudáveis seronegativos para CMV	Induz imunidade humoral e celular

Adaptado de (Rieder et al, 2014)

ALVAC - canarypox virus; **gB** - glicoproteína B; **pp65** - fosfoproteína 65; **PADRE** - Pan DR epitope; **TetP2** - Tetanus toxin P2; **NCT01195571** - <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01195571?term=NCT01195571&rank=1>; **NCT00435396** - <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00435396?term=NCT00435396&rank=1>; **NCT01986010** - <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01986010?term=NCT01986010&rank=1>; **NCT00712634** - <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00712634?term=NCT00712634&rank=1>

Tabela 3 – Vacinas contra o CMV em ensaios clínicos de Fase II

Tipo vacinas	Designação	Amostra	Resultados	Referência
Vacina atenuada	Towne	177 transplantados renais seronegativos para CMV	Boa tolerância Em curso em indivíduos seronegativos	(Plotkin et al, 1994)
Vetor vacinal	ALVAC-CMV (vCP260) Vetor canarypox e pp65	38 transplantados de células hematopoéticas seronegativos e seropositivos para CMV	Sem resultados publicados (estudo terminado em 2008)	(ClinicalTrials.gov NCT00353977)
Vacina sub-unitária	CMV gB/MF59 Glicoproteína B e adjuvante MF59	464 mulheres seronegativas para o CMV	Induz imunidade humoral	(Pass et al, 2009)
	CMV gB/MF59 Glicoproteína B e adjuvante MF59	409 mulheres seronegativas para o CMV	Sem resultados publicados (estudo terminado em 2013)	(ClinicalTrials.gov NCT00133497)
	CMV gB/MF59 Glicoproteína B e adjuvante MF59	36 transplantados de órgãos sólidos (rim e fígado) seronegativos e seropositivos para CMV	Induz imunidade humoral	(Griffiths et al, 2011)
Vacina DNA	TransVax ASP0113 Plasmídeo bivalente (gB, pp65) com adjuvante CRL1005 e cloreto de benzalconio	108 transplantados de células hematopoética seropositivos para CMV	Induz imunidade humoral e celular	(Kharfan-Dabaja et al, 2012)

Adaptado de (Rieder et al, 2014)

ALVAC - canarypox virus; gB – glicoproteína B; pp65 – fosfoproteína 65;

NCT00353977 - <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00353977?term=NCT00353977&rank=1>; NCT00133497 - <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00133497?term=NCT00133497&rank=1>

4.3.2. Vacinas para a prevenção da infecção congénita por CMV

Dos resultados dos ensaios clínicos com as diferentes formulações de vacinas, destacam-se duas vacinas candidatas para a prevenção da infecção congénita por CMV, nomeadamente a vacina viva atenuada Towne e a vacina sub-unitária gB/MF59 (Fu et al, 2014).

Vacina viva atenuada – Towne

A vacina Towne foi formulada através da estirpe CMV de uma criança com infecção congénita por CMV, que foi atenuada por várias passagens em culturas celulares de fibroblastos. (Fu et al, 2014; Plotkin et al, 1976) Estas passagens em culturas celulares permitiram o aparecimento de mutações no DNA da estirpe CMV Towne, especificamente deleções nas regiões UL131-128 e UL/b (Wang et al, 2014; Fu et al, 2014; Plotkin et al, 1976; Goodrum et al, 2007). A deleção do locus UL131-128 é responsável pela perda do complexo pentamérico gH (Wang et al, 2014), composto pelas glicoproteínas gH, gL, UL128, UL130 e UL131 (Figura 6). Este complexo é o complexo viral responsável pela penetração do CMV nas células epiteliais (Freed et al, 2013). Assim, esta estirpe vacinal não tem capacidade de infetar células endoteliais, epiteliais nem células dendríticas essenciais na apresentação antigénica às células T e por isso não é capaz de provocar infecção latente (Freed et al, 2013; Gerna et al, 2005).

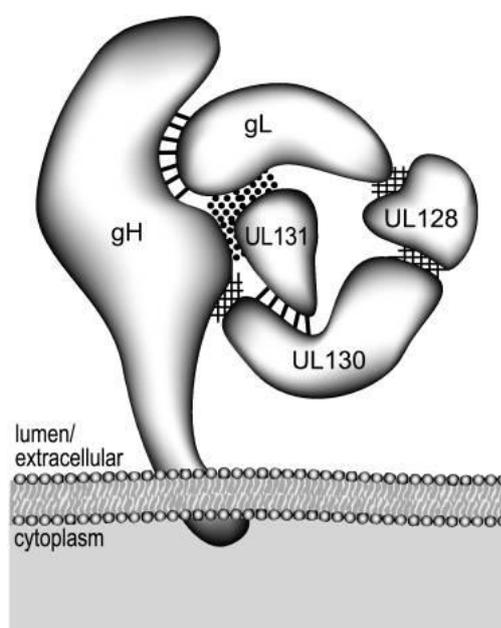


Figura 6 - Complexo pentamérico das proteínas UL128, UL130, UL131, gH e gL do CMV (Ryckman et al, 2008)

É imunogénica em indivíduos seronegativos pelo CMV ocorrendo seroconversão 4 semanas após vacinação (Fu et al, 2014). No entanto o título de anticorpos neutralizantes é inferior ao produzido após imunização natural. A ausência do complexo pentamérico é responsável pela baixa imunogenicidade da vacina, uma vez que este complexo induz a produção de anticorpos neutralizantes que previnem a infeção das células epiteliais e resposta das células T (Fu et al, 2014; Gerna et al, 2005; Gerna et al, 2006).

Um estudo em mães seronegativas cujas crianças frequentavam creches demonstrou que a vacinação não conferiu proteção às mulheres contra a infeção pelo CMV. A falta de eficácia da vacina Towne foi associada à atenuação exagerada da estirpe vacinal do CMV. A fim de contornar esta falta de eficácia, foi formulada uma vacina quimera com a estirpe CMV Towne e a estirpe atenuada CMV Toledo (Heineman et al, 2006). Num ensaio clínico de fase I, esta vacina foi administrada a indivíduos seropositivos para o CMV e revelou boa tolerância clínica. De momento está a ser avaliada em indivíduos seronegativos (ClinicalTrials.gov NCT01195571).

Vacina sub-unitária gB/MF59

A vacina sub-unitária gB/MF59 possui na sua composição apenas a glicoproteína B do CMV e o adjuvante MF59. A escolha desta glicoproteína está relacionada com o facto de ser codificada por um gene conservado do vírus, de ser semelhante em todas as estirpes de CMV e de induzir a produção de anticorpos neutralizantes (Pass et al, 2009).

Esta vacina foi desenvolvida através da gB da estirpe mutante CMV Towne em culturas celulares CHO, cuja porção transmembranar da gB e a ligação dissulfureto necessária para a dimerização foram removidas para facilitar a produção da gB glicosilada (Pass et al, 2009).

Em contraste com a vacina Towne, a vacina gB/MF59 tem capacidade de induzir a produção de anticorpos anti-gB CMV e imunidade celular em indivíduos seropositivos (Sabbaj et al, 2011).

Nos ensaios clínicos de fase I, realizados em crianças e adultos, a vacina foi considerada segura e imunogénica. Nestes ensaios, a vacina induziu a produção de anticorpos neutralizantes para a gB em concentrações semelhantes aos induzidos pela infeção natural. No entanto, o título de anticorpos diminuiu rapidamente após a conclusão da imunização, embora aumentasse rapidamente após a administração de uma dose adicional de vacina (Pass et al, 1999; Mitchell et al, 2002).

O estudo de Pass et al (2009), ensaio clínico de fase II, aplicou um protocolo de vacinação de 3 doses (20 µg/dose aos 0, 1 e 6 meses) em 464 puérperas saudáveis seronegativas para o CMV e obteve uma diminuição em 50% da taxa de infecção materna no grupo vacinado. No entanto, a vacina não conferiu imunidade prolongada, mostrando a eficácia ser maior nos primeiros 12 a 15 meses após vacinação, o que não permite avaliar a imunização face à transmissão transplacentária (Pass et al, 2009).

Os resultados preliminares de outros ensaios clínicos de fase II realizados com mulheres seronegativas para o CMV concluíram que a vacina reduz a taxa de infecção materna e congênita por CMV, todavia a sua eficácia necessita de ser confirmada em ensaios clínicos de fase III (Lazzarotto et al, 2011; Pass et al, 2009).

A eficácia limitada da vacina viva atenuada Towne e da vacina sub-unitária gB/MF59 deve-se à indução de um baixo título de anticorpos neutralizantes, devido à ausência do complexo pentamérico (Freed et al, 2013). Os últimos estudos pretendem incorporar o complexo pentamérico no desenho de duas novas vacinas, uma vez que é o principal alvo da imunidade humoral e dado o seu papel na neutralização do CMV, reduzindo o risco de transmissão intra-uterina (Freed et al, 2013; Lilleri et al, 2013).

O complexo pentamérico foi incorporado numa vacina que utiliza um vetor alphavírus, que expressa o complexo glicoproteico gH/gL (Loomis et al, 2013). Esta vacina em ratinhos induziu a produção de anticorpos neutralizantes contra as glicoproteínas gH e gL (Loomis et al, 2013). A outra vacina é constituída pela estirpe CMV AD169 atenuada por passagens em culturas celulares ARPE-19, de modo a reverter o tropismo endotelial deste vírus e restaurar a expressão do complexo pentamérico (Loomis et al, 2013). Esta vacina provocou um aumento significativo de anticorpos neutralizantes em macacos rhesus, semelhantes aos encontrados em soros de indivíduos seropositivos (Fu et al, 2012).

Embora esteja demonstrado que a vacinação em mulheres seropositivas para o CMV provoca uma resposta imunológica, esses dados não são suficientes para a prevenção da reativação e reinfeção, descritas como responsáveis por um número importante de casos de infecção congênita (Naessens et al, 2005; Dar et al, 2008).

4.3.3. Estratégias de vacinação

Distintas estratégias vacinais contra o CMV foram estudadas em modelos matemáticos, tendo em conta a população-alvo e a faixa etária, com a finalidade de prevenir a infecção materna e congénita (Azevedo et al, 2011; (Lanzieri et al, 2014; Griffiths et al, 2001; Griffiths et al, 2012). As estratégias vacinais utilizadas foram (Tabela 4) (Krause et al, 2014):

- Vacinar RN ou bebés até 18 meses de idade, de ambos os sexos, logo após o nascimento a fim de eliminar a fonte de transmissão (excreção viral durante anos) e evitar a infecção neonatal pelo contato com pessoas seropositivas para o CMV.
- Vacinar jovens do sexo feminino seronegativas para o CMV antes do início da atividade sexual.
- Vacinar mulheres em idade fértil antes do primeiro trimestre de gravidez.

Tabela 4 – Estratégias vacinais na prevenção da infecção pelo CMV

Estratégia vacinal		
População- alvo	Vantagens	Desvantagens
0-18 meses de ambos os sexos	<ul style="list-style-type: none"> • Idade em que a cobertura vacinal é mais fácil de alcançar • Redução rápida das taxas de infecção congénita por CMV 	<ul style="list-style-type: none"> • Potencial resistência face a doses adicionais • Questões éticas sobre a imunização de bebés/crianças com ausência de risco de doença grave • Necessidade de administração de nova vacina se ocorrer infecção • Não apresenta qualquer efeito direto sobre a transmissão sexual, a menos que a proteção persiste durante anos • O efeito da vacina em seropositivos e seronegativos pode ser diferente, o que implica um rastreio serológico que poderá dificultar a distribuição da vacina
Jovens do sexo feminino	<ul style="list-style-type: none"> • Imunização da população alvo antes da gravidez 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de reforço da imunização com outra dose • Dificuldade em atingir uma elevada cobertura vacinal • O efeito da vacina em seropositivos e seronegativos pode ser diferente, o que implica um rastreio serológico que poderá dificultar a distribuição da vacina
Mulheres em idade fértil antes do primeiro trimestre de gravidez	<ul style="list-style-type: none"> • População responsável pela transmissão da infecção congénita por CMV 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de reforço da imunização com outra dose • Dificuldade em atingir uma elevada cobertura vacinal • O efeito da vacina em seropositivos e seronegativos pode ser diferente, o que implica um rastreio serológico que poderá dificultar a distribuição da vacina • Dificuldade em identificar as mulheres de risco e vacinar antes da gravidez

Adaptado de Krause et al, 2014

O modelo matemático de Griffiths et al (2001) concluiu que para erradicar o CMV seria necessária uma taxa de 59-62% de cobertura vacinal, tendo em conta a seroprevalência de mais de 14000 mulheres com primoinfeção pelo CMV durante a gravidez.

O modelo matemático de Azevedo et al (2011) avaliou a relação entre o programa de vacinação e a faixa etária, de uma comunidade urbana de São Paulo, Brasil, e concluiu que a melhor estratégia vacinal engloba a administração de 2 doses, a primeira antes de 1 ano de idade e a segunda aos 10-11 anos.

Já, os resultados do modelo matemático utilizado por Lanzieri et al (2014) demonstraram que a vacinação em crianças resulta numa diminuição mais significativa da taxa de infecção congénita por CMV do que a vacinação restrita a jovens do sexo feminino ou mulheres em idade fértil.

5. Tratamento da infecção congênita

5.1. Período Pré-natal

5.1.1. Valaciclovir

Valaciclovir é um antivírico indicado para infecções provocadas por vírus da família *Herpesviridae*, especificamente para o vírus herpes simplex (HSV) e vírus varicela-zoster (VZV). Também é recomendado para a prevenção da infecção e doença pelo CMV após transplante de órgãos em indivíduos seronegativos (Caramona et al, 2012).

Segundo as categorias de fármacos para uso na gravidez da FDA, o valaciclovir pertence à categoria C, pois não existem estudos adequados e bem controlados da administração do valaciclovir em mulheres grávidas (Caramona et al, 2012). No entanto, os resultados de um estudo em 1804 grávidas permitiram concluir que a administração oral de valaciclovir no primeiro trimestre de gravidez não foi associada a um risco aumentado de defeitos congênitos, quando comparado com o grupo de grávidas não expostas a este antivírico (Pasternak et al, 2010).

Trata-se do sal cloridrato de éster de L-valina do aciclovir, cuja atividade inibitória é altamente seletiva, devido à sua afinidade para a enzima timidina quinase presente nas células infetadas pelo HSV e VZV (Caramona et al, 2012). A seletividade mantém-se no CMV pela enzima fosfotransferase codificada pelo gene UL97, responsável pela fosforilação do aciclovir em monofosfato de aciclovir, um análogo de nucleótido. O monofosfato de aciclovir é ainda convertido em difosfato e trifosfato enzimas quinase celulares. In vitro, o aciclovir trifosfato inibe a replicação do DNA viral pela inibição competitiva da DNA polimerase viral, pela incorporação e terminação da sequência de DNA (GlaxoSmithKline, 2008).

A administração de valaciclovir via oral (8g/dia) em grávidas com diagnóstico de primoinfecção pelo CMV e infecção congênita confirmada por PCR no LA contribui para a diminuição da carga vírica no sangue fetal e conseqüentemente possível redução das implicações clínicas no RN da infecção congênita (Jacquemard et al, 2007). Perante estes resultados, um ensaio clínico multicêntrico de fase IV está a avaliar a eficácia da administração oral de 8g/dia de valaciclovir em grávidas, cujos fetos com infecção congênita confirmada por PCR no LA apresentam sinais extracerebrais visíveis na ultrassonografia típicas de infecção congênita, na redução do número de crianças sintomáticas à nascença e do número interrupções voluntária da gravidez por indicação médica. Este estudo experimental teve início em setembro de 2009 em França e foi concluído

em junho de 2013, não estando ainda os resultados publicados (ClinicalTrials.gov NCT01037712).

5.2. Período Pós-natal

Atualmente existem 4 fármacos para o tratamento da infecção pelo CMV em adultos aprovados pela FDA: ganciclovir, valganciclovir, cidofovir e foscarnet (Biron et al, 2006). Nenhum destes fármacos se encontra licenciado para uso terapêutico na infecção congênita por CMV, devido às suas características mutagênicas, teratogênicas e carcinogênica, embora o ganciclovir e valganciclovir sejam utilizados em RN infetados com sintomatologia a nível do sistema nervoso central (Nassetta et al, 2009).

Recentemente foram desenvolvidas novas moléculas ativas contra o CMV, nomeadamente Maribavir (GW1263W94), Tomeglovir (BAY 38-4766), GW275175X e os ésteres de cidofovir (hexadeciloxipropil-cidofovir e octadeciloxipropil-cidofovir). No entanto, a sua utilização na gravidez defronta-se com ausência de informação relativa à sua teratogenicidade e toxicidade (Buonsenso et al, 2012; Vide Tavares et al, 2011; Nassetta et al, 2009; James et al, 2009).

5.2.1. Ganciclovir

Foi o primeiro fármaco a ser aprovado pela FDA no tratamento da infecção pelo CMV em adultos. Consiste num análogo nucleosídeo acíclico, cuja estrutura é similar à guanina, cujo mecanismo de ação é semelhante ao valaciclovir. Torna-se ativo após fosforilação pela enzima fosfotransferase e os metabolitos trifosfatos obtidos inibem competitivamente a DNA polimerase e por consequência a síntese do DNA (Whitley et al, 2012; Markham et al, 1994; Kimberlin et al, 2003).

Como atravessa a barreira hematoencefálica a sua administração é indicado em RN com sintomatologia do SNC (microcefalia, calcificações intracranianas, coriorretinites, líquido cefeloraquidiano anormal para a idade e/ou défices auditivos) (Kimberlin et al, 2003). O estudo de Whitley et al. (2012) verificou que a terapêutica intravenosa de ganciclovir (GCV) durante 6 semanas (12mg/Kg/dia - 6mg/Kg 2 vezes por dia) em RN com sintomatologia auditiva e a nível do SNC aumentou ou estabilizou a capacidade auditiva em 16% dos casos, e uma diminuição da carga vírica na urina dos RN à semelhança do estudo de Kimberlin et al (2003). Contudo, após término da terapêutica a carga vírica aumentou até valores próximos daqueles observados antes da terapêutica (Whitley et al, 2012).

A administração do GCV por via intravenosa deve-se à baixa biodisponibilidade deste fármaco quando administrado via oral (menos de 10% do fármaco é absorvido por via oral) (Whitley et al, 2012; Schleiss et al, 2004). Alguns estudos avaliaram a eficácia do GCV administrado por via oral em grávidas, cujos fetos com infecção congênita por CMV foi confirmada laboratorialmente, e verificaram a ausência de efeitos teratogênicos quando o fármaco é administrado nas primeiras fases da gravidez (Adler et al, 2007; Brandy et al, 2002; Puliyanda et al, 2005).

Como agente tóxico pode provocar mielossupressão (anemia, neutropenia, trombocitopenia), insuficiência renal e hepática, coma, convulsão e distúrbios eletrolíticos (hipocalcemia, hipomagnesemia, hipofosfatemia e hipocalemia) (Whitley et al, 2012; Schleiss et al, 2004; Syggelou et al, 2010).

Na presença de neutropenia recomenda-se a administração paralela de fator de crescimento de colônias de macrófagos e granulócitos. No entanto, a terapêutica deve ser suspensa na presença de neutropenia (contagem absoluta <500 células/ μ L, trombocitopenia (contagem absoluta <25000 células/ μ L). No caso de provocar insuficiência renal procede-se à redução da dose, visto que a clearance do ganciclovir ocorre a nível renal (Buonsenso et al, 2012; Schleiss et al, 2004).

O uso concomitante de GCV e foscarnet para o tratamento da encefalite e retinite provocada pelo CMV foi descrita em lactente com SIDA (Schleiss et al, 2005).

5.2.2. Valganciclovir

É um éster de valina do pró-fármaco GCV que após administração oral, é rapidamente hidrolisado, por esterases gastrointestinais e hepáticas a ganciclovir, e no aminoácido essencial valina. O mecanismo de ação, o espectro antiviral, o padrão de resistência e o perfil de segurança são exatamente iguais ao GCV. A biodisponibilidade absoluta de valganciclovir (val-GCV) oral é 10 vezes superior ao GCV (cerca de 60%), tornando-se uma alternativa terapêutica face aos problemas relacionados com uso de dispositivos invasivos (Schleiss et al, 2005; Whitley et al, 2012; Allen et al, 2011).

Atualmente, este fármaco está licenciado para a prevenção da infecção pelo CMV em indivíduos transplantados com elevado risco de desenvolver doença grave e em casos de tratamento de retinite em indivíduos com SIDA (Whitley et al, 2012).

Pela ausência de estudos da farmacocinética em RN, um estudo em RN com infecção congênita por CMV estabeleceu uma dose de 16mg/kg via oral, o equivalente a 6mg/kg

de GCV (Kimberlin et al, 2008). A toxicidade é similar ao GCV provocando neutropenia, anemia e diarreia (Whitley et al, 2012; Allen et al, 2011).

Um estudo pretendia avaliar a melhoria da hipoacusia em 13 RN infetados com a administração de 32 mg/kg/dia de val-GCV durante 6 meses em média. Seis em 10 RN com hipoacusia leve ou moderada no início do estudo melhoraram durante o tratamento, que foi confirmada após 1 ano de *follow-up* (del Rosal et al, 2012).

O Comitê de Doenças Infeciosas da Academia Americana de Pediatria afirma que a terapia com val-GCV em RN congenitamente infetados com sintomatologia a nível do sistema nervoso central diminui a progressão da deficiência auditiva (Pickering LK et al, 2006). Já a Sociedade Espanhola de Doenças Infeciosas Pediátricas recomenda GCV seguido por val-GCV em crianças com infecção congênita por CMV com envolvimento do SNC ou doença orgãoespecífica (Baquero-Artigao et al, 2009). No entanto, face à potencial toxicidade do val-GCV a longo prazo são necessários estudos adicionais (Pickering LK et al, 2006).

Num dos ensaios clínicos de fase III, que teve como objetivo avaliar a eficácia da terapêutica oral val-GCV nas alterações auditivas e neurológicas em 109 RN com infecção congênita por CMV, sujeitos a terapêutica oral val-GCV durante 6 meses, verificou melhorias do défice auditivo e cognitivo nos RN (ClinicalTrials.gov NCT00466817).

Estudos mais controlados serão igualmente importantes para o estudo de resistências a estes dois fármacos em RN com infecção congênita por CMV. A imaturidade do sistema imunitário neonatal pode contribuir para a seleção de estirpes mutantes. As mutações associadas com resistência ao GCV/val-GCV localizam-se normalmente na região UL97: A594T/V, M460V/I, C592G, C607S e 597-600 (Campanini et al, 2012).

6. Conclusão

A infecção congénita por CMV tem um impacto relevante na Saúde Pública, face aos elevados custos associados ao tratamento e apoio às crianças com sequelas nomeadamente a surdez neurosensorial infantil.

A determinação do perfil imunitário da mulher, o incentivo da população para o conhecimento da infecção congénita por CMV e a adoção de medidas preventivas durante a gravidez poderão diminuir a frequência de transmissão do CMV.

Nos últimos anos, o estudo da infecção congénita por CMV envolveu a avaliação das medidas preventivas primárias e secundárias eficazes contra a infecção congénita por CMV. A utilização da CMV-HIG em grávidas com primoinfecção pelo CMV está associada a um menor risco de infecção congénita (devido ao aumento significativo do título de anticorpos IgG anti-CMV) e a uma regressão das alterações morfológicas do feto e das alterações no desenvolvimento sensorial, mental e motor normal nas crianças com infecção congénita por CMV. A administração de anticorpos monoclonais neutralizantes em modelo animal, como alternativa aos problemas técnicos da CMV-HIG, demonstrou prevenir a transmissão intra-uterina do CMV. Ressalva-se a importância do estudo da utilização destes anticorpos em ensaios clínicos de fase II e III.

A vacinação contra o CMV, como medida preventiva secundária, tem sido alvo de estudos para a resolução da problemática da infecção congénita por CMV. Desde os anos 70 que decorrem vários ensaios clínicos para avaliar a eficácia de uma vacina contra a infecção congénita por CMV. A eficácia limitada das vacinas candidata contra a infecção congénita, devido à reduzida indução de anticorpos neutralizantes, não tem permitido o estudo destas em ensaios clínicos de fase III. No entanto, novos desenhos de vacinas têm demonstrado a indução de elevados títulos de anticorpos neutralizantes no modelo animal. Estas vacinas incluem o complexo pentamérico gH presente no invólucro do CMV, composto pelas glicoproteínas gH, gL, UL128, UL130 e UL131, que é responsável pela infecção das células epiteliais e indução de anticorpos neutralizantes, cujo título é semelhante ao dos indivíduos seropositivos para o CMV por infecção natural.

Uma vacina eficaz contra o CMV é no século XXI uma prioridade mundial na prevenção da transmissão da infecção pelo CMV.

7. Bibliografia

- Adler SP, Finney JW, Manganello AM, Best AM. Prevention of Child-to-Mother Transmission of Cytomegalovirus among Pregnant Women. *J Pediatr*. 2004 Oct;145(4):485-91.
- Adler SP, Nigro G, Pereira L. Recent Advances in the Prevention and Treatment of Congenital Cytomegalovirus Infections. *Semin Perinatol*. 2007;31(1):10-8.
- Adler SP, Nigro G. Findings and Conclusions from Cmv Hyperimmune Globulin Treatment Trials. *J Clin Virol*. 2009 Dec;46 Suppl 4:S54-7.
- Adler SP, Nigro G. Prevention of Maternal-Fetal Transmission of Cytomegalovirus. *Clin Infect Dis*. 2013 Dec;57 Suppl 4:S189-92.
- Adler SP, Plotkin SA, Gonczol E, Cadoz M, Meric C, Wang JB, Dellamonica P, Best AM, Zahradnik J, Pincus S, Berencsi K, Cox WI, Gyulai Z. A Canarypox Vector Expressing Cytomegalovirus (Cmv) Glycoprotein B Primes for Antibody Responses to a Live Attenuated Cmv Vaccine (Towne). *J Infect Dis*. 1999 Sep;180(3):843-6.
- Adler SP. Screening for Cytomegalovirus During Pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2011;2011:1-9.
- Ahlfors K, Ivarsson SA, Harris S. Secondary Maternal Cytomegalovirus Infection--a Significant Cause of Congenital Disease. *Pediatrics*. 2001 May;107(5):1227-8.
- Allen A, Baquero-Artigao F. Revisión Y Recomendaciones Sobre La Prevención, Diagnóstico Y Tratamiento De La Infección Posnatal Por Citomegalovirus. *An Pediatr*. 2011;74(1):52.e1—e13.
- Assembleia da República. Lei Nº 12/2005 - Informação Genética Pessoal E Informação De Saúde. Sect. *Diário da República Série I-A Nº18 (26 de Janeiro 2005)*.
- Auerbach MR, Yan D, Vij R, Hongo JA, Nakamura G, Vernes JM, Meng YG, Lein S, Chan P, Ross J, Carano R, Deng R, Lewin-Koh N, Xu M, Feierbach B. A Neutralizing Anti-Gh/GI Monoclonal Antibody Is Protective in the Guinea Pig Model of Congenital Cmv Infection. *PLoS Pathog*. 2014 Apr;10(4):e1004060.
- Azevedo RS, Amaku M. Modelling Immunization Strategies with Cytomegalovirus Vaccine Candidates. *Epidemiol Infect*. 2011 Dec;139(12):1818-26.
- Balcarek KB, Warren W, Smith RJ, Lyon MD, Pass RF. Neonatal Screening for Congenital Cytomegalovirus Infection by Detection of Virus in Saliva. *J Infect Dis*. 1993 Jun;167(6):1433-6.
- Baquero-Artigao F. Consensus Document from the Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases (Seip) on the Diagnosis and Treatment of Congenital Cytomegalovirus Infection. *An Pediatr (Barc)*. 2009 Dec;71(6):535-47.
- Barbi M, Binda S, Caroppo S. Diagnosis of Congenital Cmv Infection Via Dried Blood Spots. *Rev Med Virol*. 2006 Nov-Dec;16(6):385-92.
- Barbi M, Binda S, Primache V, Caroppo S, Dido P, Guidotti P, Corbetta C, Melotti D. Cytomegalovirus DNA Detection in Guthrie Cards: A Powerful Tool for Diagnosing Congenital Infection. *J Clin Virol*. 2000 Sep 1;17(3):159-65.
- Barbi M, Binda S, Primache V, Luraschi C, Corbetta C. Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection by Detection of Viral DNA in Dried Blood Spots. *Clin Diagn Virol*. 1996 Jun;6(1):27-32.
- Barkai G, Ari-Even Roth D, Barzilai A, Tepperberg-Oikawa M, Mendelson E, Hildesheimer M, Kuint J. Universal Neonatal Cytomegalovirus Screening Using Saliva - Report of Clinical Experience. *J Clin Virol*. 2014 Aug;60(4):361-6.

- Baxter D. Active and Passive Immunity, Vaccine Types, Excipients and Licensing. *Occup Med*. 2007 Dec;57(8):552-6.
- Benoist G, Salomon LJ, Jacquemard F, Daffos F, Ville Y. The Prognostic Value of Ultrasound Abnormalities and Biological Parameters in Blood of Fetuses Infected with Cytomegalovirus. *BJOG*. 2008 Jun;115(7):823-9.
- Benoist G, Salomon LJ, Mohlo M, Suarez B, Jacquemard F, Ville Y. Cytomegalovirus-Related Fetal Brain Lesions: Comparison between Targeted Ultrasound Examination and Magnetic Resonance Imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008 Dec;32(7):900-5.
- Berencsi K, Gyulai Z, Gonczol E, Pincus S, Cox WI, Michelson S, Kari L, Meric C, Cadoz M, Zahradnik J, Starr S, Plotkin S. A Canarypox Vector-Expressing Cytomegalovirus (Cmv) Phosphoprotein 65 Induces Long-Lasting Cytotoxic T Cell Responses in Human Cmv-Seronegative Subjects. *J Infect Dis*. 2001 Apr 15;183(8):1171-9.
- Bernstein DI, Reap EA, Katen K, Watson A, Smith K, Norberg P, Olmsted RA, Hoepfer A, Morris J, Negri S, Maughan MF, Chulay JD. Randomized, Double-Blind, Phase 1 Trial of an Alphavirus Replicon Vaccine for Cytomegalovirus in Cmv Seronegative Adult Volunteers. *Vaccine*. 2009 Dec 11;28(2):484-93.
- Biotest. Interim Analysis of the Cytotec Phase Iii Trial in Congenial Cytomegalovirus (Cmv) Infection Shows Clear Indication of Efficacy. Biotest; 2011 Disponível em: (http://www.biotest.de/www/en/pub/investor_relations/news/newsdetails.cfm?newsID=1025191). [accedido a 02 Julho 2014]
- Biron KK. Antiviral Drugs for Cytomegalovirus Diseases. *Antivir Res*. 2006 Sep;71(2-3):154-63.
- Blackburn NK, Besselaar TG, Schoub BD, O'Connell KF. Differentiation of Primary Cytomegalovirus Infection from Reactivation Using the Urea Denaturation Test for Measuring Antibody Avidity. *J Med Virol*. 1991 Jan;33(1):6-9.
- Bonalumi S, Trapanese A, Santamaria A, D'Emidio L, Mobili L. Cytomegalovirus Infection in Pregnancy: Review of the Literature. *J Prenat Med*. 2011 Jan;5(1):1-8.
- Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels MG, Sanchez PJ, Bernstein DI, Tolan RW, Jr., Novak Z, Chowdhury N, Britt WJ, Fowler KB. Saliva Polymerase-Chain-Reaction Assay for Cytomegalovirus Screening in Newborns. *N Engl J Med*. 2011 Jun 2;364(22):2111-8.
- Brandy RC, Schleiss MR, Witte DP, Siddiqi TA, Fame PT. Placental Transfer of Ganciclovir in a Woman with Acquired Immunodeficiency Syndrome and Cytomegalovirus Disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2002 Aug;21(8):796-7.
- Buonsenso D, Serranti D, Gargiullo L, Ceccarelli M, Ranno O, Valentini P. Congenital Cytomegalovirus Infection: Current Strategies and Future Perspectives. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012 Jul;16(7):919-35.
- Buxmann H, Stackelberg OM, Schlosser RL, Enders G, Gonser M, Meyer-Wittkopf M, Hamprecht K, Enders M. Use of Cytomegalovirus Hyperimmunoglobulin for Prevention of Congenital Cytomegalovirus Disease: A Retrospective Analysis. *J Perinat Med*. 2012 Jun;40(4):439-46.
- Cahill AG, Odibo AO, Stamilio DM, Macones GA. Screening and Treating for Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy: Where Do We Stand? A Decision-Analytic and Economic Analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2009 Nov;201(5):466 e1-7.
- Campanini G, Zavattoni M, Cristina E, Gazzolo D, Stronati M, Baldanti F. Multiple Ganciclovir-Resistant Strains in a Newborn with Symptomatic Congenital Human Cytomegalovirus Infection. *J Clin Virol*. 2012 May;54(1):86-8.
- Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of Cytomegalovirus Seroprevalence and Demographic Characteristics Associated with Infection. *Rev Med Virol*. 2010;20(4):202-13.

Cannon MJ, Westbrook K, Levis D, Schleiss MR, Thackeray R, Pass RF. Awareness of and Behaviors Related to Child-to-Mother Transmission of Cytomegalovirus. *Prev Med.* 2012 May;54(5):351-7.

Caramona M, Esteves A, Gonçalves J, Macedo T, Mendonça J, Osswald W, Pinheiro R, Rodrigues A, Sepodes B, Teixeira A, Barreiras P, Duarte A, Leite L, Machado C, Pinto I, Ramalheite C, Soares L. *Prontuário Terapêutico - 11: INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, IP / Ministério de Saúde; 2012.*

Cekinovic D, Golemac M, Pugel EP, Tomac J, Cicin-Sain L, Slavuljica I, Bradford R, Misch S, Winkler TH, Mach M, Britt WJ, Jonjic S. Passive Immunization Reduces Murine Cytomegalovirus-Induced Brain Pathology in Newborn Mice. *J Virol.* 2008 Dec;82(24):12172-80.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Preventing Congenital Cmv Infection. 2012; Disponível em: <http://www.cdc.gov/cmV/prevention.html>. [acedido a 02 Julho 2014]

Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of Congenital Cytomegalovirus Infection: Disease Mechanisms and Prospects for Intervention. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):99-126.

Cicin-Sain L, Brune W, Bubic I, Jonjic S, Koszinowski UH. Vaccination of Mice with Bacteria Carrying a Cloned Herpesvirus Genome Reconstituted in Vivo. *J Virol.* 2003 Aug;77(15):8249-55.

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT00133497. Gb/Mf59 Vaccine in Preventing Cytomegalovirus Infection in Healthy Adolescent Females. 2006-2013. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00133497?term=NCT00133497&rank=1>. [acedido a 02 Julho 2014]

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT00353977. Accelerated Immunization to Induce Cytomegalovirus Immunity in Stem Cell Donors. 2004-2008. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00353977?term=NCT00353977&rank=1>. [acedido a 02 Julho 2014]

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT00435396. Study to Evaluate Safety and Immunogenicity of the Gsk Bio Cmv Vaccine in Cmv-Seronegative Healthy Male Adult Subjects. 2007-2009. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00435396?term=NCT00435396&rank=1>. [acedido a 02 Julho 2014]

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT00466817. Short-Term Vs. Long-Term Valganciclovir Therapy for Symptomatic Congenital Cmv Infections. 2008-2014. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00466817?term=NCT00466817&rank=1>. [acedido a 02 Julho 2014]

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT00712634. Cytomegalovirus Vaccine in Healthy Participants. 1997-2009. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00712634?term=NCT00712634&rank=1>. [acedido a 02 Julho 2014]

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT01037712. In Utero Treatment of Cytomegalovirus Congenital Infection with Valacyclovir (Cymeval). 2009-2011. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01037712?term=NCT01037712&rank=1>. [acedido a 02 Julho 2014]

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT01195571. Safety Study of Four Chimera Cytomegalovirus (CMV) Vaccines in Healthy Adult Males 30-50 Years of Age. 2010-2014. Disponível em:

<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01195571?term=NCT01195571&rank=1>. [acedido a 02 Julho 2014]

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT01376778. A Randomized Trial to Prevent Congenital Cytomegalovirus. 2011-2013. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01376778?term=NCT01376778&rank=1>. [acedido a 02 Julho 2014]

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT01819519. Clinical Trial of Behavioral Modification to Prevent Congenital Cytomegalovirus (CDC/CMV). 2013-. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01819519?term=NCT01819519&rank=1>. [acedido a 02 Julho 2014]

ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Identifier NCT01986010. Safety, Tolerability, and Immunogenicity of the Human Cytomegalovirus Vaccine (V160) in Healthy Adults (V160-001). 2013 - Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01986010?term=NCT01986010&rank=1>. [acedido a 02 Julho 2014]

Coll O, Benoist G, Ville Y, Weisman LE, Botet F, Anceschi MM, Greenough A, Gibbs RS, Carbonell-Estrany X. Guidelines on Cmv Congenital Infection. *J Perinat Med*. 2009;37(5):433-45.

Cordier AG, Guitton S, Vauloup-Fellous C, Grangeot-Keros L, Ayoubi JM, Benachi A, Picone O. Awareness of Cytomegalovirus Infection among Pregnant Women in France. *J Clin Virol*. 2012 Apr;53(4):332-7.

Dar L, Pati SK, Patro AR, Deorari AK, Rai S, Kant S, Broor S, Fowler KB, Britt WJ, Boppana SB. Congenital Cytomegalovirus Infection in a Highly Seropositive Semi-Urban Population in India. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 Sep;27(9):841-3.

Dasari V, Smith C, Khanna R. Recent Advances in Designing an Effective Vaccine to Prevent Cytomegalovirus-Associated Clinical Diseases. *Expert Rev Vaccines*. 2013 Jun;12(6):661-76.

De Carolis S, Santucci S, Botta A, Garofalo S, Martino C, Perrelli A, Salvi S, Degennaro V, de Belvis A, Ferrazzani S, Scambia G. False-Positive Igm for Cmv in Pregnant Women with Autoimmune Disease: A Novel Prognostic Factor for Poor Pregnancy Outcome. *Lupus*. 2010 Jun;19(7):844-9.

de Vries JJ, Claas EC, Kroes AC, Vossen AC. Evaluation of DNA Extraction Methods for Dried Blood Spots in the Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Clin Virol*. 2009 Dec;46 Suppl 4:S37-42.

de Vries JJ, van der Eijk AA, Wolthers KC, Rusman LG, Pas SD, Molenkamp R, Claas EC, Kroes AC, Vossen AC. Real-Time Pcr Versus Viral Culture on Urine as a Gold Standard in the Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Clin Virol*. 2012 Feb;53(2):167-70.

del Rosal T, Baquero-Artigao F, Blazquez D, Noguera-Julian A, Moreno-Perez D, Reyes A, Vilas J. Treatment of Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection Beyond the Neonatal Period. *J Clin Virol*. 2012 Sep;55(1):72-4.

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

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

Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New Estimates of the Prevalence of Neurological and Sensory Sequelae and Mortality Associated with Congenital Cytomegalovirus Infection. *Rev Med Virol*. 2007 Sep-Oct;17(5):355-63.

Fisher S, Genbacev O, Maidji E, Pereira L. Human Cytomegalovirus Infection of Placental Cytotrophoblasts in Vitro and in Utero: Implications for Transmission and Pathogenesis. *J Virol*. 2000 Aug;74(15):6808-20.

Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The Outcome of Congenital Cytomegalovirus Infection in Relation to Maternal Antibody Status. *N Engl J Med*. 1992 Mar 5;326(10):663-7.

Freed DC, Tang Q, Tang A, Li F, He X, Huang Z, Meng W, Xia L, Finnefrock AC, Durr E, Espeseth AS, Casimiro DR, Zhang N, Shiver JW, Wang D, An Z, Fu TM. Pentameric Complex of Viral Glycoprotein H Is the Primary Target for Potent Neutralization by a Human Cytomegalovirus Vaccine. *Proc Natl Acad Sci*. 2013 Dec 17;110(51):E4997-5005.

Frey SE, Harrison C, Pass RF, Yang E, Boken D, Sekulovich RE, Percell S, Izu AE, Hirabayashi S, Burke RL, Duliege AM. Effects of Antigen Dose and Immunization Regimens on Antibody Responses to a Cytomegalovirus Glycoprotein B Subunit Vaccine. *J Infect Dis*. 1999 Nov;180(5):1700-3.

Fu TM, An Z, Wang D. Progress on Pursuit of Human Cytomegalovirus Vaccines for Prevention of Congenital Infection and Disease. *Vaccine*. 2014 May 7;32(22):2525-33.

Fu TM, Wang D, Freed DC, Tang A, Li F, He X, Cole S, Dubey S, Finnefrock AC, ter Meulen J, Shiver JW, Casimiro DR. Restoration of Viral Epithelial Tropism Improves Immunogenicity in Rabbits and Rhesus Macaques for a Whole Virion Vaccine of Human Cytomegalovirus. *Vaccine*. 2012 Dec 14;30(52):7469-74.

Gaulão M. Estudo Da Adesão De Mães De Crianças Até Aos 2 Anos De Idade Às Medidas De Prevenção Da Infecção Congênita Por Citomegalovírus [Tese de mestrado]. Covilhã: Universidade da Beira Interior; 2013.

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.

Gerna G, Lilleri D, Fornara C, Comolli G, Lozza L, Campana C, Pellegrini C, Meloni F, Rampino T. Monitoring of Human Cytomegalovirus-Specific Cd4 and Cd8 T-Cell Immunity in Patients Receiving Solid Organ Transplantation. *Am J Transplant*. 2006 Oct;6(10):2356-64.

Gerna G, Percivalle E, Lilleri D, Lozza L, Fornara C, Hahn G, Baldanti F, Revello MG. Dendritic-Cell Infection by Human Cytomegalovirus Is Restricted to Strains Carrying Functional UI131-128 Genes and Mediates Efficient Viral Antigen Presentation to Cd8+ T Cells. *J Gen Virol*. 2005 Feb;86(Pt 2):275-84.

Gerna G, Sarasini A, Patrone M, Percivalle E, Fiorina L, Campanini G, Gallina A, Baldanti F, Revello MG. Human Cytomegalovirus Serum Neutralizing Antibodies Block Virus Infection of Endothelial/Epithelial Cells, but Not Fibroblasts, Early During Primary Infection. *J Gen Virol*. 2008 Apr;89(4):853-65.

GlaxoSmithKline. Valtrex® (Valacyclovir Hydrochloride). GlaxoSmithKline, DSM Pharmaceuticals, Inc.; 2008.

Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Comparison of Standard Tube and Shell Vial Cell Culture Techniques for the Detection of Cytomegalovirus in Clinical Specimens. *J Clin Microbiol*. 1985 Feb;21(2):217-21.

Goegebuer T, Van Meensel B, Beuselinck K, Cossey V, Van Ranst M, Hanssens M, Lagrou K. Clinical Predictive Value of Real-Time Pcr Quantification of Human Cytomegalovirus DNA in Amniotic Fluid Samples. *J Clin Microbiol*. 2009 Mar;47(3):660-5.

Goodrum F, Reeves M, Sinclair J, High K, Shenk T. Human Cytomegalovirus Sequences Expressed in Latently Infected Individuals Promote a Latent Infection in Vitro. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):937-45.

Gressens P. Pathogenesis of Migration Disorders. *Curr Opin Neurol*. 2006 Apr;19(2):135-40.

Griffiths PD, McLean A, Emery VC. Encouraging Prospects for Immunisation against Primary Cytomegalovirus Infection. *Vaccine*. 2001 Jan 8;19(11-12):1356-62.

Griffiths PD, Stanton A, McCarrell E, Smith C, Osman M, Harber M, Davenport A, Jones G, Wheeler DC, O'Beirne J, Thorburn D, Patch D, Atkinson CE, Pichon S, Sweny P, Lanzman M, Woodford E, Rothwell E, Old N, Kinyanjui R, Haque T, Atabani S, Luck S, Prideaux S, Milne RS, Emery VC, Burroughs AK. Cytomegalovirus Glycoprotein-B Vaccine with Mf59 Adjuvant in Transplant Recipients: A Phase 2 Randomised Placebo-Controlled Trial. *Lancet*. 2011 Apr 9;377(9773):1256-63.

Griffiths PD. Burden of Disease Associated with Human Cytomegalovirus and Prospects for Elimination by Universal Immunisation. *Lancet Infect Dis*. 2012 Oct;12(10):790-8.

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;183(2):476-82.

Guerra B, Simonazzi G, Puccetti C, Lanari M, Farina A, Lazzarotto T, Rizzo N. Ultrasound Prediction of Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Apr;198(4):380 e1-7.

Heineman TC, Schleiss M, Bernstein DI, Spaete RR, Yan L, Duke G, Prichard M, Wang Z, Yan Q, Sharp MA, Klein N, Arvin AM, Kemble G. A Phase 1 Study of 4 Live, Recombinant Human Cytomegalovirus Towne/Toledo Chimeric Vaccines. *J Infect Dis*. 2006 May 15;193(10):1350-60.

Hulo C, de Castro E, Masson P, Bougueleret L, Bairoch A, Xenarios I, Le Mercier P. Viralzone: A Knowledge Resource to Understand Virus Diversity. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jan;39(Database issue):D576-82.

Hyde TB, Schmid DS, Cannon MJ. Cytomegalovirus Seroconversion Rates and Risk Factors: Implications for Congenital Cmv. *Rev Med Virol*. 2010 Sep;20(5):311-26.

Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Laboratório Nacional De Referência Para Citomegalovírus E Parvovírus B19 - Departamento De Doenças Infecciosas. In: INSA, editor. INSA. Lisboa.

Jacobson MA, Adler SP, Sinclair E, Black D, Smith A, Chu A, Moss RB, Wloch MK. A Cmv DNA Vaccine Primes for Memory Immune Responses to Live-Attenuated Cmv (Towne Strain). *Vaccine*. 2009 Mar 4;27(10):1540-8.

Jacquemard F, Yamamoto M, Costa JM, Romand S, Jaqz-Aigrain E, Dejean A, Daffos F, Ville Y. Maternal Administration of Valaciclovir in Symptomatic Intrauterine Cytomegalovirus Infection. *BJOG*. 2007 Sep;114(9):1113-21.

James SH, Kimberlin DW, Whitley RJ. Antiviral Therapy for Herpesvirus Central Nervous System Infections: Neonatal Herpes Simplex Virus Infection, Herpes Simplex Encephalitis, and Congenital Cytomegalovirus Infection. *Antiviral Res*. 2009 Sep;83(3):207-13.

Jeon J, Victor M, Adler SP, Arwady A, Demmler G, Fowler K, Goldfarb J, Keyserling H, Massoudi M, Richards K, Staras SA, Cannon MJ. Knowledge and Awareness of Congenital Cytomegalovirus among Women. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2006;2006:80383.

Johnson J, Anderson B, Pass RF. Prevention of Maternal and Congenital Cytomegalovirus Infection. *Clin Obstet Gynecol*. 2012 Jun;55(2):521-30.

Jones CA. Congenital Cytomegalovirus Infection. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2003 Mar;33(3):70-93.

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

Khafan-Dabaja MA, Boeckh M, Wilck MB, Langston AA, Chu AH, Wloch MK, Guterwill DF, Smith LR, Rolland AP, Kenney RT. A Novel Therapeutic Cytomegalovirus DNA Vaccine in Allogeneic Haemopoietic Stem-Cell Transplantation: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial. *Lancet Infect Dis*. 2012 Apr;12(4):290-9.

Kimberlin DW, Acosta EP, Sanchez PJ, Sood S, Agrawal V, Homans J, Jacobs RF, Lang D, Romero JR, Griffin J, Cloud GA, Lakeman FD, Whitley RJ. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Assessment of Oral Valganciclovir in the Treatment of Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Disease. *J Infect Dis*. 2008 Mar 15;197(6):836-45.

Kimberlin DW, Lin CY, Sanchez PJ, Demmler GJ, Dankner W, Shelton M, Jacobs RF, Vaudry W, Pass RF, Kiell JM, Soong SJ, Whitley RJ. Effect of Ganciclovir Therapy on Hearing in Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Disease Involving the Central Nervous System: A Randomized, Controlled Trial. *J Pediatr*. 2003 Jul;143(1):16-25.

Kirchmeier M, Fluckiger AC, Soare C, Bozic J, Ontsouka B, Ahmed T, Diress A, Pereira L, Schodel F, Plotkin S, Dalba C, Klatzmann D, Anderson DE. Enveloped Virus-Like Particle Expression of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Antigen Induces Antibodies with Potent and Broad Neutralizing Activity. *Clin Vaccine Immunol*. 2014 Feb;21(2):174-80.

Krause P, Bialek S, Boppana S, Griffiths P, Laughlin C, Ljungman P, Mocarski E, Pass R, Read J, Schleiss M, Plotkin A. Priorities for Cmv Vaccine Development. *Vaccine*. 2014;32:4-10.

La Rosa C, Longmate J, Lacey SF, Kaltcheva T, Sharan R, Marsano D, Kwon P, Drake J, Williams B, Denison S, Broyer S, Couture L, Nakamura R, Dadwal S, Kelsey MI, Krieg AM, Diamond DJ, Zaia JA. Clinical Evaluation of Safety and Immunogenicity of Padre-Cytomegalovirus (Cmv) and Tetanus-Cmv Fusion Peptide Vaccines with or without Pf03512676 Adjuvant. *J Infect Dis*. 2012 Apr 15;205(8):1294-304.

La Torre R, Nigro G, Mazzocco M, Best AM, Adler SP. Placental Enlargement in Women with Primary Maternal Cytomegalovirus Infection Is Associated with Fetal and Neonatal Disease. *Clin Infect Dis*. 2006 Oct 15;43(8):994-1000.

Lanzieri T, Bialek S, Ortega-Sanchez I, Gambhir M. Modeling the Potential Impact of Vaccination on the Epidemiology of Congenital Cytomegalovirus Infection. *Vaccine*. 2014;32(30):3780-6.

Lanzieri TM, Dollard SC, Bialek SR, Grosse SD. Systematic Review of the Birth Prevalence of Congenital Cytomegalovirus Infection in Developing Countries. *Int J Infect Dis*. 2014 May;22:44-8.

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.

Lazzarotto T, Guerra B, Gabrielli L, Lanari M, Landini MP. Update on the Prevention, Diagnosis and Management of Cytomegalovirus Infection During Pregnancy. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Sep;17(9):1285-93.

Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP. New Advances in the Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Clin Virol*. 2008 Mar;41(3):192-7.

Lazzarotto T, Maine GT, Dal Monte P, Ripalti A, Landini MP. A Novel Western Blot Test Containing Both Viral and Recombinant Proteins for Anticytomegalovirus Immunoglobulin M Detection. *J Clin Microbiol*. 1997 Feb;35(2):393-7.

Lazzarotto T, Varani S, Spezzacatena P, Gabrielli L, Pradelli P, Guerra B, Landini MP. Maternal Igg Avidity and Igm Detected by Blot as Diagnostic Tools to Identify Pregnant Women at Risk of Transmitting Cytomegalovirus. *Viral Immunol*. 2000;13(1):137-41.

- Leruez-Ville M, Sellier Y, Salomon LJ, Stirnemann JJ, Jacquemard F, Ville Y. Prediction of Fetal Infection in Cases with Cytomegalovirus Immunoglobulin M in the First Trimester of Pregnancy: A Retrospective Cohort. *Clin Infect Dis*. 2013 May;56(10):1428-35.
- Lilleri D, Kabanova A, Revello MG, Percivalle E, Sarasini A, Genini E, Sallusto F, Lanzavecchia A, Corti D, Gerna G. Fetal Human Cytomegalovirus Transmission Correlates with Delayed Maternal Antibodies to Gh/GI/Pul128-130-131 Complex During Primary Infection. *PLoS One*. 2013;8(3):e59863.
- Lim SL, Tan WC, Tan LK. Awareness of and Attitudes toward Congenital Cytomegalovirus Infection among Pregnant Women in Singapore. *Int J Gynaecol Obstet*. 2012 Jun;117(3):268-72.
- Loomis RJ, Lilja AE, Monroe J, Balabanis KA, Brito LA, Palladino G, Franti M, Mandl CW, Barnett SW, Mason PW. Vectored Co-Delivery of Human Cytomegalovirus Gh and GI Proteins Elicits Potent Complement-Independent Neutralizing Antibodies. *Vaccine*. 2013 Jan 30;31(6):919-26.
- Lopo S, Vinagre E, Palminha P, Paixao MT, Nogueira P, Freitas MG. Seroprevalence to Cytomegalovirus in the Portuguese Population, 2002-2003. *Euro Surveill*. 2011;16(25).
- Lopo S. Epidemiologia Do Cmv. In: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge II, editor. Reunião dos Núcleos da Associação Portuguesa de Diagnóstico Pré-natal; Centro Cultural Vila Flor, Guimarães 2011.
- Maidji E, McDonagh S, Genbacev O, Tabata T, Pereira L. Maternal Antibodies Enhance or Prevent Cytomegalovirus Infection in the Placenta by Neonatal Fc Receptor-Mediated Transcytosis. *Am J Pathol*. 2006;168(4):1210-26.
- Maidji E, Nigro G, Tabata T, McDonagh S, Nozawa N, Shiboski S, Muci S, Anceschi MM, Aziz N, Adler SP, Pereira L. Antibody Treatment Promotes Compensation for Human Cytomegalovirus-Induced Pathogenesis and a Hypoxia-Like Condition in Placentas with Congenital Infection. *Am J Pathol*. 2010 Sep;177(3):1298-310.
- Markham A, Faulds D. Ganciclovir. An Update of Its Therapeutic Use in Cytomegalovirus Infection. *Drugs*. 1994 Sep;48(3):455-84.
- Ministério da Saúde. Despacho N.º 752/2010. Sect. Diário da República Série II - N.º7 (12 de Janeiro 2010).
- Mitchell DK, Holmes SJ, Burke RL, Duliege AM, Adler SP. Immunogenicity of a Recombinant Human Cytomegalovirus Gb Vaccine in Seronegative Toddlers. *Pediatr Infect Dis J*. 2002 Feb;21(2):133-8.
- Moise KJ, Wolfe H. Treatment of Second Trimester Fetal Cytomegalovirus Infection with Maternal Hyperimmune Globulin. *Prenat Diagn*. 2008 Mar;28(3):264-5.
- Morello CS, Kelley LA, Munks MW, Hill AB, Spector DH. DNA Immunization Using Highly Conserved Murine Cytomegalovirus Genes Encoding Homologs of Human Cytomegalovirus UI54 (DNA Polymerase) and UI105 (Helicase) Elicits Strong Cd8 T-Cell Responses and Is Protective against Systemic Challenge. *J Virol*. 2007 Jul;81(14):7766-75.
- Moxley K, Knudtson EJ. Resolution of Hydrops Secondary to Cytomegalovirus after Maternal and Fetal Treatment with Human Cytomegalovirus Hyperimmune Globulin. *Obstet Gynecol*. 2008 Feb;111(2 Pt 2):524-6.
- Naessens A, Casteels A, Decatte L, Foulon W. A Serologic Strategy for Detecting Neonates at Risk for Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Pediatr*. 2005 Feb;146(2):194-7.
- Nash A. Immunity to Viruses. In: Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I, editors. *Immunology*. 8 ed: Elsevier Saunders; 2013. p. 211-22.
- Nassetta L, Kimberlin D, Whitley R. Treatment of Congenital Cytomegalovirus Infection: Implications for Future Therapeutic Strategies. *J Antimicrob Chemother*. 2009 May;63(5):862-7.

- 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.
- Nigro G, Adler SP, Parruti G, Anceschi MM, Coclite E, Pezone I, Di Renzo GC. Immunoglobulin Therapy of Fetal Cytomegalovirus Infection Occurring in the First Half of Pregnancy--a Case-Control Study of the Outcome in Children. *J Infect Dis*. 2012 Jan 15;205(2):215-27.
- Nigro G, La Torre R, Pentimalli H, Taverna P, Lituania M, de Tejada BM, Adler SP. Regression of Fetal Cerebral Abnormalities by Primary Cytomegalovirus Infection Following Hyperimmunoglobulin Therapy. *Prenat Diagn*. 2008 Jun;28(6):512-7.
- Ornoy A, Diav-Citrin O. Fetal Effects of Primary and Secondary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy. *Reprod Toxicol*. 2006;21(4):399-409.
- Paixao P, Almeida S, Gouveia P, Vilarinho L, Vaz Osorio R. Prevalence of Human Cytomegalovirus Congenital Infection in Portuguese Newborns. *Euro Surveill*. 2009 Mar 5;14(9):13-5.
- Paixao P, Almeida S, Videira PA, Ligeiro D, Marques T. Screening of Congenital Cytomegalovirus Infection by Real-Time Pcr in Urine Pools. *Eur J Pediatr*. 2012 Jan;171(1):125-9.
- Paixão P, Neto M, Brito M, Rocha G, Marques T. Portuguese Registry on Congenital Cmv Infection - Preliminary Results. Lisboa: Unidade de Vigilância Pediátrica/Sociedade Portuguesa de Pediatria; 2010; Disponível em: <http://repositorio.chlc.min-saude.pt/handle/10400.17/1101>. [acedido a 14 Julho 2014]
- Pass RF, Burke RL. Development of Cytomegalovirus Vaccines: Prospects for Prevention of Congenital Cmv Infection. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2002 Jul;13(3):196-204.
- Pass RF, Duliege AM, Boppana S, Sekulovich R, Percell S, Britt W, Burke RL. A Subunit Cytomegalovirus Vaccine Based on Recombinant Envelope Glycoprotein B and a New Adjuvant. *J Infect Dis*. 1999 Oct;180(4):970-5.
- 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.
- Pass RF. Development and Evidence for Efficacy of Cmv Glycoprotein B Vaccine with Mf59 Adjuvant. *J Clin Virol*. 2009 Dec;46 Suppl 4:S73-6.
- Pasternak B, Hviid A. Use of Acyclovir, Valacyclovir, and Famciclovir in the First Trimester of Pregnancy and the Risk of Birth Defects. *JAMA*. 2010 Aug 25;304(8):859-66.
- Pepperl-Klindworth S, Frankenberg N, Plachter B. Development of Novel Vaccine Strategies against Human Cytomegalovirus Infection Based on Subviral Particles. *J Clin Virol*. 2002 Aug;25 Suppl 2:S75-85.
- Pickering LK, Baker CJ, Long SS, JA M. Red Book: 2006 Report of the Committee on Infectious Diseases, 27th Edition. American Academy of Pediatrics, editor. Elk Grove, Illinios: Emerg Infect Dis; 2006.
- Picone O, Simon I, Benachi A, Brunelle F, Sonigo P. Comparison between Ultrasound and Magnetic Resonance Imaging in Assessment of Fetal Cytomegalovirus Infection. *Prenat Diagn*. 2008 Aug;28(8):753-8.
- Plotkin SA, Farquhar J, Horberger E. Clinical Trials of Immunization with the Towne 125 Strain of Human Cytomegalovirus. *J Infect Dis*. 1976 Nov;134(5):470-5.
- Plotkin SA, Higgins R, Kurtz JB, Morris PJ, Campbell DA, Jr., Shope TC, Spector SA, Dankner WM. Multicenter Trial of Towne Strain Attenuated Virus Vaccine in Seronegative Renal Transplant Recipients. *Transplantation*. 1994 Dec 15;58(11):1176-8.

Programa Nacional de Diagnóstico Precoce. Teste Do Pezinho - Em Que Consiste? 2007; Disponível em: <http://www.diagnosticoprecoce.org/info.htm>. [acedido a 02 Julho 2014]

Puliyanda DP, Silverman NS, Lehman D, Vo A, Bunnapradist S, Radha RK, Toyoda M, Jordan SC. Successful Use of Oral Ganciclovir for the Treatment of Intrauterine Cytomegalovirus Infection in a Renal Allograft Recipient. *Transpl Infect Dis*. 2005 Jun;7(2):71-4.

Reap EA, Morris J, Dryga SA, Maughan M, Talarico T, Esch RE, Negri S, Burnett B, Graham A, Olmsted RA, Chulay JD. Development and Preclinical Evaluation of an Alphavirus Replicon Particle Vaccine for Cytomegalovirus. *Vaccine*. 2007 Oct 16;25(42):7441-9.

Reichman O, Miskin I, Sharoni L, Eldar-Geva T, Goldberg D, Tsafirir A, Gal M. Preconception Screening for Cytomegalovirus: An Effective Preventive Approach. *Biomed Res Int*. 2014;2014:135416.

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.

Revello MG, Gerna G. Pathogenesis and Prenatal Diagnosis of Human Cytomegalovirus Infection. *J Clin Virol*. 2004;29(2):71-83.

Revello MG, Lazzarotto T, Guerra B, Spinillo A, Ferrazzi E, Kustermann A, Guaschino S, Vergani P, Todros T, Frusca T, Arossa A, Furione M, Rognoni V, Rizzo N, Gabrielli L, Klersy C, Gerna G. A Randomized Trial of Hyperimmune Globulin to Prevent Congenital Cytomegalovirus. *N Engl J Med*. 2014 Apr 3;370(14):1316-26.

Rieder F, Steininger C. Cytomegalovirus Vaccine: Phase II Clinical Trial Results. *Clin Microbiol Infect*. 2014 May;20 Suppl 5:95-102.

Ross DS, Victor M, Sumartojo E, Cannon MJ. Women's Knowledge of Congenital Cytomegalovirus: Results from the 2005 Healthstyles Survey. *J Womens Health*. 2008 Jun;17(5):849-58.

Ryckman BJ, Rainish BL, Chase MC, Borton JA, Nelson JA, Jarvis MA, Johnson DC. Characterization of the Human Cytomegalovirus Gh/GI/UI128-131 Complex That Mediates Entry into Epithelial and Endothelial Cells. *J Virol*. 2008 Jan;82(1):60-70.

Sabbaj S, Pass RF, Goepfert PA, Pichon S. Glycoprotein B Vaccine Is Capable of Boosting Both Antibody and Cd4 T-Cell Responses to Cytomegalovirus in Chronically Infected Women. *J Infect Dis*. 2011 Jun 1;203(11):1534-41.

Sato A, Hirano H, Miura H, Hosoya N, Ogawa M, Tanaka T. Intrauterine Therapy with Cytomegalovirus Hyperimmunoglobulin for a Fetus Congenitally Infected with Cytomegalovirus. *J Obstet Gynaecol Res*. 2007 Oct;33(5):718-21.

Schleiss M. Progress in Cytomegalovirus Vaccine Development. *Herpes*. 2005 Dec;12(3):66-75.

Schleiss MR, Buus R, Choi KY, McGregor A. An Attenuated Cmv Vaccine with a Deletion in Tegument Protein Gp83 (Pp65 Homolog) Protects against Placental Infection and Improves Pregnancy Outcome in a Guinea Pig Challenge Model. *Future Virol*. 2013 Dec 1;8(12):1151-60.

Schleiss MR, Choi KY, Anderson J, Mash JG, Wettendorff M, Mossman S, Van Damme M. Glycoprotein B (Gb) Vaccines Adjuvanted with As01 or As02 Protect Female Guinea Pigs against Cytomegalovirus (Cmv) Viremia and Offspring Mortality in a Cmv-Challenge Model. *Vaccine*. 2014 May 13;32(23):2756-62.

Schleiss MR, McVoy MA. Overview of Congenitally and Perinatally Acquired Cytomegalovirus Infections: Recent Advances in Antiviral Therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2004 Jun;2(3):389-403.

Schleiss MR. Antiviral Therapy of Congenital Cytomegalovirus Infection. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2005 Jan;16(1):50-9.

Schleiss MR. The Role of the Placenta in the Pathogenesis of Congenital Cytomegalovirus Infection: Is the Benefit of Cytomegalovirus Immune Globulin for the Newborn Mediated through Improved Placental Health and Function? *Clin Infect Dis*. 2006 Oct 15;43(8):1001-3.

Schoppel K, Kropff B, Schmidt C, Vornhagen R, Mach M. The Humoral Immune Response against Human Cytomegalovirus Is Characterized by a Delayed Synthesis of Glycoprotein-Specific Antibodies. *J Infect Dis*. 1997 Mar;175(3):533-44.

Shen S, Wang S, Britt WJ, Lu S. DNA Vaccines Expressing Glycoprotein Complex Ii Antigens Gm and Gn Elicited Neutralizing Antibodies against Multiple Human Cytomegalovirus (Hcmv) Isolates. *Vaccine*. 2007 Apr 30;25(17):3319-27.

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

Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, Veren DA, Page F, Alford CA. Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy. Incidence, Transmission to Fetus, and Clinical Outcome. *JAMA*. 1986;256(14):1904-8.

Syggelou A, Iacovidou N, Kloudas S, Christoni Z, Papaevangelou V. Congenital Cytomegalovirus Infection. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Sep;1205:144-7.

Tavares E, Ribeiro J, Oliveira L. Imunização Ativa E Passiva No Prematuro Extremo. *J Pediatr*. 2005;81(1):89-94.

Temperton NJ, Quenelle DC, Lawson KM, Zuckerman JN, Kern ER, Griffiths PD, Emery VC. Enhancement of Humoral Immune Responses to a Human Cytomegalovirus DNA Vaccine: Adjuvant Effects of Aluminum Phosphate and Cpg Oligodeoxynucleotides. *J Med Virol*. 2003 May;70(1):86-90.

Thackeray R, Wright A, Chipman K. Congenital Cytomegalovirus Reference Material: A Content Analysis of Coverage and Accuracy. *Matern Child Health J*. 2013.

Toscano C, Galhano E, Martins L, Brito M, Palminha P, Paixão P, Lopo S, Almeida S. Recomendações Para O Diagnóstico Pré-natal Viroológico - Vírus Citomegálico Humano (Cmv). Sociedade Portuguesa de Virologia; 2009; Disponível em: http://www.spv.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=7&Itemid=13. [acedido a 03 Julho 2014]

Vauloup-Fellous C, Picone O, Cordier AG, Parent-du-Chatelet I, Senat MV, Frydman R, Grangeot-Keros L. Does Hygiene Counseling Have an Impact on the Rate of CMV Primary Infection During Pregnancy? Results of a 3-Year Prospective Study in a French Hospital. *J Clin Virol*. 2009 Dec;46 Suppl 4:S49-53.

Vide Tavares M, Domingues A, Tavares M, Malheiro E, Tavares F, Moura P. Citomegalovírus - Existe Lugar Para O Rastreo Durante a Gravidez? *Acta Med Port*. 2011;24(S4):1003-8.

Vilarinho L, Rocha H, Marcão A, Sousa C, Fonseca H, Bogas M, Osório R. Diagnóstico Precose: Resultados Preliminares Do Rastreo Metabólico Alargado. *Acta Pediatr Port*. 2006;37(5):186-91.

Walker SP, Palma-Dias R, Wood EM, Shekleton P, Giles ML. Cytomegalovirus in Pregnancy: To Screen or Not to Screen. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2013;13:96.

Wang D, Fu TM. Progress on Human Cytomegalovirus Vaccines for Prevention of Congenital Infection and Disease. *Curr Opin Virol*. 2014 Jun;6C:13-23.

Wang Z, La Rosa C, Lacey SF, Maas R, Mekhoubad S, Britt WJ, Diamond DJ. Attenuated Poxvirus Expressing Three Immunodominant Cmv Antigens as a Vaccine Strategy for Cmv Infection. *J Clin Virol*. 2006 Mar;35(3):324-31.

Whitley RJ. The Use of Antiviral Drugs During the Neonatal Period. *Clin Perinatol.* 2012 Mar;39(1):69-81.

World Health Organization. Guidelines on Clinical Evaluation of Vaccines: Regulatory Expectations. WHO Technical Report. Geneva: WHO, Standardization WECOB;2004. Report No.: 924.

Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Isaac Mde L, Amaral FR, Carvalheiro CG, Aragon DC, Manfredi AK, Boppana SB, Britt WJ. 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.

Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Marin LJ, Brito RM, Oliveira PF, Coelho TB. Is Saliva as Reliable as Urine for Detection of Cytomegalovirus DNA for Neonatal Screening of Congenital Cmv Infection? *J Clin Virol.* 2006 Jul;36(3):228-30.

Yinon Y, Farine D, Yudin MH. Screening, Diagnosis, and Management of Cytomegalovirus Infection in Pregnancy. *Obstet Gynecol Surv.* 2010 Nov;65(11):736-43.

Yue Y, Wang Z, Abel K, Li J, Strelow L, Mandarino A, Eberhardt MK, Schmidt KA, Diamond DJ, Barry PA. Evaluation of Recombinant Modified Vaccinia Ankara Virus-Based Rhesus Cytomegalovirus Vaccines in Rhesus Macaques. *Med Microbiol Immunol.* 2008 Jun;197(2):117-23.

Zafar U, Ong S, Gray J, Martin WM, Kilby MD. The Limitations of Cytomegalovirus Screening. *Prenat Diagn.* 2006 Sep;26(9):869-70.

Zalel Y, Gilboa Y, Berkenshtat M, Yoeli R, Auslander R, Achiron R, Goldberg Y. Secondary Cytomegalovirus Infection Can Cause Severe Fetal Sequelae Despite Maternal Preconceptional Immunity. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008 Apr;31(4):417-20.

Zanghellini F, Boppana SB, Emery VC, Griffiths PD, Pass RF. Asymptomatic Primary Cytomegalovirus Infection: Virologic and Immunologic Features. *J Infect Dis.* 1999 Sep;180(3):702-7.

Zhang Q, Gao Y, Peng Y, Fu M, Liu YQ, Zhou QJ, Yu J, Zheng XQ. Epidemiological Survey of Human Cytomegalovirus Antibody Levels in Children from Southeastern China. *Virol J.* 2014;11:123.