

ESTUDO DE SEROPREVALÊNCIA DA INFEÇÃO POR VÍRUS TOSCÂNIA NA REGIÃO DO PORTO

Lurdes SANTOS, Maria João CARDOSO, Ana Sofia MARINHO,
Tiago GUIMARÃES, António SARMENTO

RESUMO

Introdução - A infecção por vírus Toscana (VT), endémica em Itália, tem sido documentada nos últimos anos em outros países da bacia mediterrânica. É um vírus com neurotropismo e nos últimos anos, em alguns destes países têm sido efectuados também estudos de seroprevalência. Em estudo recente incluindo 308 doentes com meningite, documentamos meningite por VT em 6 (5,6%).

Objectivo - Estudo de prevalência de anticorpos numa amostra de população hospitalar. **Material e métodos** - Em amostras de sangue colhidas no estudo serológico de rotina foi feita a pesquisa de anticorpos específicos para o vírus Toscana. Este estudo incluiu amostras de sangue de doentes admitidos com diagnósticos diversos, de forma a conseguir uma amostra de população variável. Os doentes imunodeprimidos (infecção VIH, em quimioterapia ou transplantados) foram excluídos. A determinação de anticorpos IgG para VT foi efectuada por técnica de Micro-Elisa (ENZYWELL), de acordo com instruções do fabricante, sendo positivo para um cutt-off >1,2. **Resultados** - Foram estudados 334 soros seleccionados de forma aleatória. A amostra incluiu soros de adultos (304) e crianças (30) de ambos os sexos. Em 13 (3,9%) o anticorpo IgG foi positivo, em 21 amostras o resultado foi duvidoso e, nas restantes 300 foi negativo. As amostras com presença de anticorpo IgG positivo eram todas de adultos, 8 deles com idade superior a 60 anos, e incluíram ambos os sexos (8 mulheres e 5 homens).

Conclusão - Foi documentada uma seroprevalência de 3,9% para o vírus Toscana, com predomínio em adultos com mais de 60 anos. Estes resultados são inferiores aos observados em outros países do sul da Europa, nomeadamente em Espanha (5-22%).

L.S., A.S., Serviço de Doenças Infecciosas. Hospital de S. João – Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Portugal.
M.C., A.M., T.G., Serviço de Patologia Clínica. Hospital de S. João. Porto – Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Portugal.

SUMMARY

Seroprevalence survey of Toscana virus infection in Oporto region

Toscana virus (TOSV) endemic in central Italy, has been documented in several European countries of the Mediterranean region. It is a neurotropic virus and in some of these countries studies to investigate seroprevalence have been done. In a recent etiologic study of meningitis we chose 106 of 308 samples to be tested for TOSV using a nested RT-PCR assay, and found six (5.6%) cases of meningitis by Toscana virus.

Aim – To investigate the seroprevalence of antibodies against TOSV in a cohort of a population attended in our Hospital.

Material and methods - In serum samples collected for routine study we have investigated the presence of antibodies for TOSV. The study included samples of patients hospitalized and others observed in ambulatory and includes children and adults. Immunocompromised patients were excluded. The test was based on the-ELISA technique ((ENZYWELL), according to the manufacture instructions, being positive for a cutt-off >1.2, negative if the cutt-off <0.8 and doubtful if the cutt-off >0.8 e <1.2.

Results - 334 serum samples arbitrarily were used for seroprevalence study of antibodies to TOSV, 304 adults and 30 children. Positive results for anti-TOSV were obtained in 13 (3.9%) samples; in other 21 the result was doubtful and in those cases it was not possible

to repeat because we have only one pair of serum and in the remaining 300 the result was negative. The positive samples were all from adults, 8 females and 5 males, 8 (62%) of them were older than 60 years. All children's samples were negative for TOSV antibodies. Conclusion – We documented a seroprevalence of 3.9% to TOSV, namely in adults older than 60 years. Our prevalence is lower when compared to other European countries, namely Spain (5-22%)

INTRODUÇÃO

O vírus Toscana é o vírus da febre da mosca da areia, sendo transmitido por um *Phlebotomus*. É também um arbovírus, fazendo parte da família *Bunyaviridae*, género *Phlebovirus*. Existem três serótipos deste arbovírus associados a doença humana: vírus Nápoles, vírus Sicília e vírus Toscana propriamente dito ^{1,2}.

A infecção ocorre predominantemente na região mediterrânica e manifesta-se por síndrome febril com cefaleias e mialgias, meningite ou meningoencefalite ou de forma assintomática.

O diagnóstico pode ser efectuado por cultura, o método menos sensível, ou por métodos serológicos (IgM por IFA). A técnica de RT-PCR é considerada como a mais sensível e específica para o diagnóstico ³.

O vírus Toscana é endémico no centro de Itália (Toscânia), particularmente na área de Siena, sendo referido como a causa mais comum (80%) de meningite em crianças desta região, durante o verão, com pico no mês de Agosto, devido ao ciclo de vida do vector ⁴.

Estudos serológicos demonstram a presença de infecção por estes vírus no sul da Europa, mas só foi isolado em Itália e em Portugal (um caso num turista sueco após visita a Portugal em 1985 (5). Trabalhos recentes mostraram a ocorrência desta meningite asséptica em Espanha, nas províncias de Granada e de Madrid ^{6,7}. Dois outros casos foram também documentados no Sul de França ⁸, estando ainda descrito o seu aparecimento de forma esporádica em Chipre, na Grécia e no Egipto ⁹.

Num trabalho por nós efectuado foi feita a investigação da etiologia de 308 casos de infecção vírica do SNC de doentes internados consecutivamente entre 2002 e 2005, nos Serviços de Urgência (SU) dos Hospitais da região do Porto. A pesquisa de vírus Toscana por técnica de RT-PCR, foi efectuada em 106 amostras de doentes com idade inferior a 30 anos e com meningite diagnosticada entre Maio e Setembro, que apresentassem no estudo inicial pesquisa negativa para Enterovírus e/ou vírus Herpes (se o contexto clínico o justificava).

O PCR para vírus Toscana foi positivo em seis doentes (5,6%) com meningite, dois casos tendo ocorrido em Maio, dois outros em Junho e dois em Julho, sendo três crianças (4, 8, 8 anos), uma adolescente (16 anos) e

dois adultos (23 e 30 anos), todos tendo tido uma evolução favorável ¹⁰.

Do nosso conhecimento, estes seis casos são os primeiros de meningite por vírus Toscana referidos em Portugal e que apoiam outros estudos efectuados em anos recentes em Espanha e no sul de França, em que o vírus tem sido uma causa de meningite asséptica, embora com uma incidência muito inferior à que é descrita em Itália, onde é referido em alguns estudos como sendo a causa mais habitual de meningite na criança durante o verão.

OBJECTIVO

Este estudo destina-se a complementar o estudo anterior, por avaliação serológica numa amostra aleatória de população hospitalar, e observar a importância deste agente na região metropolitana do Porto.

MATERIAL E MÉTODOS

Nas amostras de sangue colhidas no estudo serológico de rotina, foi efectuada a pesquisa de anticorpos específicos para o vírus da Toscana. Este estudo incluiu amostras de sangue de rotina analítica de doentes da consulta ou de doentes internados por causas diversas, de forma a conseguir uma amostra de população variável. Os doentes imunodeprimidos (infecção VIH, em quimioterapia ou transplantados) foram excluídos.

A determinação de anticorpos IgG para VT foi efectuada por técnica de Micro-Elisa (ENZYWELL), de acordo com instruções do fabricante, sendo considerado positivo para um *cutt-off* >1,2; negativo se *cutt-off* <0,8 e indeterminado se *cutt-off* >0,8 e <1,2.

De salientar que o estudo laboratorial irá utilizar as amostras de soro colhidas no estudo laboratorial de rotina, não requerendo por isso nem outras colheitas nem acréscimo do volume para a pesquisa de anticorpos específicos

O estudo foi feito no Laboratório de Microbiologia do Hospital de S. João.

O projecto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de S. João.

RESULTADOS

Foram estudados 334 soros seleccionados de forma aleatória de doentes internados ou da consulta externa. A amostra incluiu soros de adultos (n=304) e crianças (n=30) de ambos os sexos. As idades das crianças variaram entre 0,5 e 15 anos (6 ±4) e dos adultos entre 17 e 86 anos (44 ± 21); 51% eram do sexo masculino.

Em 13 (3,9%) o anticorpo IgG foi positivo, em 21 amostras o resultado foi duvidoso e, nas restantes 300, foi negativo. As amostras com presença de anticorpo IgG positivo foram todas de adultos, idades entre 29 a 78 anos (27± 25), 8 (62%) deles com idade superior a 60 anos, e incluíram ambos os sexos (oito mulheres e cinco homens). Nos casos com resultado indeterminado, não foi possível a repetição pois só havia uma amostra de soro. A pesquisa efectuada nos soros das 30 crianças foi negativa.

DISCUSSÃO

O vírus Toscana causa infecção endémica em Itália sendo a causa mais comum de meningite em crianças na região Toscana (80%), estando contudo também documentados casos de meningite em outros países da bacia mediterrânica. Para além do atingimento neurológico, este vírus é causa de síndrome febril e de infecção assintomática. Este facto justifica os estudos de seroprevalência que têm sido efectuados em alguns países da Europa de forma a conhecer de um modo mais correcto a ocorrência da infecção, com alguma variação da prevalência ^{11, 12}.

Os estudos de seroprevalência na região central de Itália mostram presença de anticorpos em cerca de 20% das amostras. Em Espanha na região de Granada a percentagem de anticorpos para o vírus Toscana é cerca de 25%. Em ambos, os Países é referido que a positividade da serologia para este vírus aumenta com a idade e também é maior na população rural, indicando uma potencial maior exposição ^{6, 7}.

Num estudo de seroprevalência na região da Toscana entre 1999 e 2006 efectuado em 2737 amostras de doentes entre um e 60 anos (2097 crianças e 640 adultos) admitidos por doença não neurológica, foram encontrados anticorpos para o vírus Toscana em 19,8% dos adultos e 5,8% das crianças e embora fosse observado um pico de incidência no grupo entre os 41 e 50 anos, não houve um crescimento linear com a idade no grupo dos adultos ¹².

Um trabalho da região de Granada, incluindo 184 doentes com meningite asséptica, mostrou que a infecção foi por vírus Toscana em 15 (8%) doentes, todos com menos de 14 anos; no mesmo estudo foi feita a pesquisa de anticorpos em 1268 soros de 1181 hemodadores e de 87 crianças de diferentes regiões de Espanha, sendo

encontrados anticorpos para o vírus Toscana em 26,2% dos soros, para o vírus de Nápoles em 11,9% e para o vírus da Sicília em 2,2%, confirmando assim que o vírus é também endémico no país vizinho. Um outro estudo na região de Madrid que incluiu 81 amostras de LCR de meningite asséptica com pesquisa de anticorpos no LCR e soro confirmou diagnóstico em sete casos. O mesmo estudo incluiu a pesquisa de anticorpos em 457 soros de indivíduos saudáveis e também residentes na mesma região, tendo-se documentado uma seroprevalência de 5,0%, com aumento nos adultos com mais de 30 anos (8%) ⁶.

Outros estudos apontam para uma seroprevalência de 20% em Chipre, Grécia 35%, Alemanha 1,6%. Em França eram descritos casos isolados, mas recentemente foram descritos estudos de seroprevalência, com 12% de anticorpos no sangue de voluntários saudáveis e 18,9% de Ig G no soro de doentes internados com infecção do SNC, confirmando assim a circulação do vírus na região ^{13, 14}.

Até ao presente estudo, desconhecemos dados de seroprevalência pelo vírus Toscana em Portugal. A amostra que estudamos, mostra uma percentagem muito inferior aos estudos de Espanha. Como já foi anteriormente estudado, o vector (*Ph perniciosus*) existe em Portugal com um pico de actividade entre Maio e Outubro, existindo pois condições epidemiológicas para a ocorrência da infecção, que para além do tropismo neurológico, pode apresentar-se por síndrome febril auto-limitada ou mesmo subclínica e passar despercebida ¹⁵.

Terá todo o interesse alargar este estudo serológico com uma amostra maior de população e verificar se a presença de anticorpos cresce tendencialmente com a idade ou se foi simplesmente um achado nesta amostra.

CONCLUSÕES

- Foi documentada uma seroprevalência de 3,9% para o vírus Toscana
- Verificou-se um predomínio de anticorpos em adultos acima dos 60 anos
- A presença de anticorpo é menor que a documentada outros países do sul da Europa
- Devemos continuar a pesquisar o VT como agente de meningite aguda (PCR negativo para outros vírus), sobretudo quando ocorre no verão

Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de Financiamento:

Este trabalho foi patrocinado pela Sociedade Portuguesa de Doenças Infecciosas (Bolsa Professor Doutor Carrington da Costa de 2007)

REFERÊNCIAS

1. DIONISIO D, VALASSINA M, CIUFOLINI MG *et al*: Encephalitis without meningitis due to sandfly fever virus serotype Toscana. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1241-3
2. BALDELLI F, CIUFOLINI G, FRANCISCI D *et al*: Unusual presentation of life-threatening Toscana virus meningoencephalitis. *Clin Infect Dis* 2004; 38 :515-20
3. VALASSINA M, CUSI M, VALENSIN P: Rapid identification of Toscana virus by nested PCR during an outbreak in Siena area of Italy. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2500-2
4. VALASSINA M, VALENTINI M, PUGLIESE A, VALENSIN PE, CUSI MG. Serological survey of Toscana virus infections in a high-risk population in Italy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(3): 483-4
5. EHRMST A, C PETERS, NIKLASSON B, SVEDMYR A, HOLMGREN B: Neurovirulent Toscana virus (a sandfly fever virus) in a swedish man after visit to Portugal. *Lancet* 1985: 1:1212-3
6. MENDONZA-MONTEIRO J, GAMÉZ-RUEDA M, NAVARRO-MARI J *et al*. Infections due to sandfly fever virus serotype Toscana in Spain. *Clin Infect Dis* 1998: 27: 434-6
7. NAVARRO JM, FERNÁNDEZ-ROLDÁN C, PÉREZ-RUIZ M, SANBONMATSU S, DE LA ROSA M, SÁNCHEZ-SECO MP: Meningitis by Toscana virus in Spain: description of 17 cases. *Med Clin (Barc)*. 2004 Mar 27;122(11):420-2
8. HEMMERSBACH-MILLER M, PAROLA P, CHARREL R, PAUL DURAND J, BROUQUI P: Sandfly fever due to Toscana virus: an emerging infection in Southern France. *Eur J Intern Med* 2004; 15: 316-7
9. ECHEVARRIA J, ORY F, GUIASOLA M *et al*: Acute meningitis due to Toscana virus infection among patients from both the Spanish Mediterranean region and the region of Madrid. *J Clin Virol* 2003: 26(1) 79-84
10. L SANTOS, J SIMÕES, R COSTA, S MARTINS, H LECOUR. Toscana Virus Meningitis in Portugal. *Eurosurveillance* 2007: 1; 12 (6):E3-4.
11. RÉMI N. CHARREL, PIERRE GALLIAN, JOSÉ-MARÍA NAVARRO-MARÍ, *et al*. Emergence of Toscana Virus in Europe. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(11):1657-63
12. MARIA G. CUSI, GIANNI G. SAVELLINI AND GIACOMO ZANELLI. Toscana Virus Epidemiology: From Italy to Beyond. *The Open Virol J*, 2010; 4, 22-8
13. C. TERROSI, R. OLIVIERI, C. BIANCO, C. CELLESI, M. G. CUSI: Age-Dependent Seroprevalence of Toscana Virus in Central Italy and Correlation with the Clinical Profile. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 483–484
14. VALASSINA M, CUSI M, VALENSIN PA: Mediterranean arbovirus: the Toscana virus. *J Neurovirol* 2003; 9(6) 577-83
15. F AMARO, MG CIUFOLINI, G VENTURI, C FIORENTINI, MJ ALVES: Diagnóstico Laboratorial de Flebovírus. (Vírus Toscana) . *Acta Med Port* 2007; 20: 341-5