



ARTIGO ORIGINAL

Infecção pelo vírus Epstein-Barr em crianças com AIDS*Epstein-Barr virus infection in children with AIDS*Aroldo P. de Carvalho¹, Luiz V. Gandolfi², Edward Tonelli³**Resumo**

Objetivo: A associação das infecções por HIV e vírus Epstein-Barr tem sido relatada em diversos estudos, especialmente em crianças que apresentam pneumonia intersticial linfóide. Analisou-se a incidência da infecção pelo vírus Epstein-Barr em crianças com AIDS, naquelas com AIDS com e sem pneumonia intersticial linfóide, comparando-se com crianças não infectadas pelo HIV.

Métodos: Realizou-se um estudo transeccional com 60 crianças com AIDS e 54 não infectadas pelo HIV, pareadas por sexo e idade, no Hospital Infantil Joana de Gusmão em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, de junho de 1994 a junho de 1995. A seleção dos casos seguiu a ordem de atendimento. Pesquisou-se anticorpos anticapsídeo do vírus Epstein-Barr por imunofluorescência indireta e ELISA, e antinucleares por ELISA. Definiu-se o estágio da infecção conforme as respostas sorológicas.

Resultados: A linfadenopatia ocorreu em 59 casos (98,3%), hepatomegalia em 51 (85,0%), a esplenomegalia em 46 (76,7%), broncopneumonias recorrentes em 41 (68,3%). Observou-se pneumonia intersticial linfóide em 21 casos (35,0%), dos quais 19 (90,5%) tinham sorologia positiva ao vírus Epstein-Barr. A média geométrica dos títulos de IgG anticapsídeo, por imunofluorescência indireta, foi de 1:439,5 nos casos e 1:42,8 nos controles. Detectou-se IgM anticapsídeo, por imunofluorescência indireta, em 16 (26,7%) dos 60 casos e em um de 53 controles (1,9%) ($p=0,0002$). A infecção primária pelo vírus Epstein-Barr foi mais freqüente nos casos ($p<0,0001$), bem como a infecção reativada ($p=0,0745$).

Conclusões: A incidência de infecção primária e reativada pelo vírus Epstein-Barr foi mais freqüente nos pacientes com AIDS. Evidenciou-se infecção primária ou reativada na quase totalidade dos pacientes com diagnóstico de pneumonia intersticial linfóide (90,5%).

J. pediatr. (Rio J.). 1998; 74(2):125-134: síndrome da imunodeficiência adquirida, HIV, patogenicidade, mononucleose infecciosa, vírus Epstein-Barr.

Abstract

Objective: The association of the HIV and Epstein-Barr virus infections has been reported in several studies, specially in children that present lymphocytic interstitial pneumonitis. The analysis of the incidence of Epstein-Barr virus infection was performed in children with AIDS, in those with AIDS with and without lymphocytic interstitial pneumonitis, comparing to children without HIV infection.

Methods: A cross-sectional study was performed with 60 children with AIDS and 54 children not infected by HIV, matched by sex and age, in the Hospital Infantil Joana de Gusmão in Florianópolis city, Santa Catarina State, Brazil, between June 1994 and June 1995. The selection of the cases followed the order of the consultation. The detection of antibodies against Epstein-Barr capsid antigen was performed by standard indirect immunofluorescence techniques and ELISA, and antibodies against nuclear antigen only by ELISA. The stage of the infection was defined according to serologic responses.

Results: Lymphadenopathy occurred in 59 cases (98.3%), hepatomegaly in 51 (85.0%), splenomegaly in 46 (76.7%), recurrent bronchopneumonia in 41 (68.3%). Lymphocytic interstitial pneumonitis was observed in 21 cases (35.0%), 90.5% of which showed positive serologic reactions to EBV. The geometric mean of the IgG against capsid antigen titers was 1:439.5 in the cases group and 1:42.8 in the controls. The IgM against capsid antigen by indirect immunofluorescence techniques was positive in 16 (26.7%) of the 60 cases and only in one of the 53 controls (1.9%) ($p=0.0002$). The primary Epstein-Barr virus infection was evidenced with greater frequency in the children with AIDS ($p<0.0001$), as well as the reactivated infection ($p=0.0745$).

Conclusions: The incidence of primary and reactivated Epstein-Barr virus infection was more frequent in the patients with AIDS. The primary and reactivated Epstein-Barr virus infection was observed in almost all of the patients with diagnosis of lymphocytic interstitial pneumonitis (90.5%).

J. pediatr. (Rio J.). 1998; 74(2):125-134: Acquired Immunodeficiency Syndrome, Human Immunodeficiency Virus, Infectious Mononucleosis, Epstein-Barr Virus.

1. Mestre em pediatria pela Fac. de Medicina da UFMG, Infectologista Pediatra do HIJG e Hosp. Univ. da UFSC, Aluno do Curso de Pós-Graduação em Pediatria, nível de Doutorado- Fac. Medicina da UFMG.

2. Bioquímico do Setor de Virologia do Lab. Central do Estado de Santa Catarina.

3. Professor livre docente do Depto. de Pediatria da UFMG.

Instituições: Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).
Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG).
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Fontes financiadoras: Programa Estadual de DST/AIDS de Santa Catarina e Programa Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde do Brasil.

Introdução

As similaridades clínicas decorrentes da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pelo vírus Epstein-Barr (EBV), especialmente relacionadas às manifestações envolvendo o sistema linfático, além de semelhanças no comprometimento do sistema imunológico,

fizeram com que incansáveis estudos fossem desenvolvidos com o objetivo de se comprovar os mecanismos de uma possível atuação conjunta na patogênese dessas manifestações. Esses estudos vêm demonstrando títulos elevados de anticorpos contra antígenos do EBV em pacientes com AIDS¹⁻⁵.

O sucesso do crescimento do HIV em linhagens de células linfoblastóides, obtidas através da transformação dos linfócitos B pelo EBV, levantaram a hipótese da implicação dos vírus do grupo Herpes na patogênese da AIDS⁶.

Em biópsias de tecido pulmonar de crianças com AIDS com diagnóstico de pneumonia intersticial linfóide (PIL), freqüentemente observada em pacientes pediátricos com AIDS, têm-se evidenciado presença de DNA do EBV e RNA do HIV. O envolvimento dessas viroses na PIL ainda não está elucidado, questiona-se, entretanto, se uma interação entre a infecção pulmonar pelo HIV e a presença de células B infectadas pelo EBV nos tecidos pulmonares não poderia ser responsável pela proliferação linfóide⁷. Alguns relatos demonstram sorologicamente infecção primária ou reativação de infecção latente pelo EBV, nos pacientes com AIDS que apresentam PIL⁸⁻¹².

O interesse por este estudo fundamentou-se ainda, na constatação de que o EBV não tem sido investigado em nosso meio, como um possível microorganismo envolvido na patogênese das manifestações da AIDS.

O diagnóstico precoce das infecções associadas, especialmente daquelas para as quais se dispõe de um tratamento eficaz, pode tornar mais favorável a evolução do quadro, aumentando a sobrevida dos pacientes.

O benefício do tratamento de infecções pelo EBV com agentes antiviróticos como o acyclovir em pacientes imunocomprometidos tem sido relatado por alguns autores^{13,14}.

O objetivo do presente estudo foi o de verificar se crianças com AIDS apresentam evidências sorológicas de infecção pelo EBV, e se estas ocorrem com uma freqüência maior do que em crianças não infectadas pelo HIV. Objetivou-se, ainda, observar se há uma maior incidência de infecção recente ou reativada nas crianças com AIDS.

Casuística e Métodos

Realizou-se um estudo transeccional controlado no serviço de referência estadual para o atendimento de crianças portadoras do HIV do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG), em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, em colaboração com as Universidades Federais de Minas Gerais UFMG) e Santa Catarina (UFSC), Programa Estadual de DST/AIDS de Santa Catarina, Laboratório Central do Estado de Santa Catarina e Laboratório Médico Ciência de Florianópolis.

Foram pesquisados anticorpos contra o EBV em crianças portadoras do HIV sintomáticas, cujos resultados fo-

ram comparados com a pesquisa em crianças não portadoras do HIV.

Grupo de casos

Entre 177 pacientes com sorologia positiva para o HIV atendidos neste serviço no período compreendido entre junho de 1994 e junho de 1995, selecionaram-se 60 crianças, de acordo com critérios laboratoriais e clínicos, para comporem o grupo de casos. Os critérios laboratoriais para a inclusão no grupo de casos foram aqueles que comprovam a infecção pelo HIV na criança, e os critérios clínicos, aqueles que definem as manifestações da AIDS, especialmente as manifestações linfoproliferativas (linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, aumento de glândulas parótidas, PIL, linfoma não Hodgkin), de acordo com a classificação da infecção pelo HIV na infância do Centro para o Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, de 1987¹⁵, revisada em 1994¹⁶. Limitou-se a casuística pela viabilidade dos laboratórios em realizar os testes apenas neste número. A seleção dos casos seguiu a ordem de atendimento no referido período, com inclusão das crianças que preenchiam os critérios estabelecidos, até completar 60.

O diagnóstico de PIL foi baseado em achados clínicos e radiológicos, os quais podem ser característicos, levando a um diagnóstico presuntivo sem necessidade de comprovação histológica⁷.

A comprovação da infecção pelo HIV foi determinada nas crianças menores de dois anos de idade, pela presença de pelo menos um exame pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) evidenciando detecção de DNA e, ELISA, imunofluorescência indireta (IFI) ou *Western-blot* persistentemente positivos. A positividade na detecção do DNA através de PCR, ou a demonstração de pelo menos dois testes sorológicos distintos positivos para o vírus, definiu a infecção nas crianças acima desta faixa etária¹⁶.

Foram obtidos também dados quanto a criança ser institucionalizada ou não, pelo maior risco de disseminação de agentes infecciosos em aglomerados de pessoas.

Os testes laboratoriais utilizados para a pesquisa da infecção pelo HIV constaram de ELISA, IFI, *Western-blot*, e PCR.

Grupo controle

Os pacientes do grupo controle foram selecionados de crianças hospitalizadas no HIJG em razão de outras enfermidades, durante o mesmo período da seleção dos casos.

O número integrante do grupo controle foi equivalente ao do grupo de casos, uma vez que se realizou um pareamento por sexo e idade (mais ou menos seis meses), na proporção de 1:1.

A condição para que a criança fosse incluída neste grupo foi primeiramente a de apresentar uma enfermidade com história clínica não sugestiva de um quadro de imunodeficiência. Pesquisou-se nestas crianças a presença de

manifestações linfoproliferativas, constituindo, a ausência destas, também, um critério de inclusão. Realizaram-se nestas crianças dois testes de ELISA de diferentes fornecedores, além de uma imunofluorescência indireta para o HIV. Todas as selecionadas para este grupo deveriam apresentar os testes negativos para o vírus.

Testes para o diagnóstico da infecção pelo EBV

Os testes sorológicos para o diagnóstico da infecção pelo EBV constaram, além de monoteste e Paul-Bunnell-Davidsohn (P-B-D), de ELISA para anticorpos das classes IgG e IgM contra antígenos do capsídeo viral (VCA) e antígenos nucleares (EBNA); e de IFI para a detecção de anticorpos da classe IgG e IgM anti-VCA. Para a realização dos testes sorológicos do EBV foram obtidos cerca de 5 ml de amostras de soro dos pacientes, congelados a -20°C com o objetivo de realizá-los simultaneamente.

Em algumas amostras não foram realizados todos os testes pela não disponibilidade de kits suficientes. Os critérios para a exclusão foram estabelecidos pelos próprios laboratoristas, efetuando-se os exames sequencialmente até completar o número de kits disponíveis.

Tomou-se cuidado para que os pacientes não houvessem recebido administrações de gamaglobulina endovenosa pelo menos em um período de dois meses antes da coleta.

Os profissionais responsáveis pelo desenvolvimento dos testes desconheciam os grupos a que pertenciam as amostras de soro.

O monoteste foi realizado em 57 casos e em 24 controles, expresso em resultados positivo ou negativo. Já para uma reação de P-B-D, realizada em 56 casos e 24 controles, ser considerada diagnóstica da infecção pelo EBV, os títulos deveriam ser iguais ou superiores a 1:56¹⁷⁻²⁰.

Utilizou-se o método de IFI para pesquisa de IgG e IgM anti-VCA desenvolvido pela *Organon Teknika Corporation*.

A realização dos testes de ELISA para detecção de IgG e IgM anticapsídeo foi efetuada com kits da *Sigma Diagnostics*, obtidos da *Sigma Chemical Company Ltd*. O princípio do exame consiste na fixação de antígenos purificados do capsídeo do EBV em focetas de microplacas, nas quais se adicionam as amostras a serem testadas. O método de ELISA para detecção de IgG e IgM antinúcleo, também desenvolvido pela *Sigma Diagnostics*, utiliza o antígeno polipeptídico recombinante EBNA-1, o qual é fixado nas focetas da lâmina.

Interpretação dos resultados

A pesquisa de IgG anti-VCA por IFI foi considerada positiva quando a titulação era maior do que 1:10, de IgM anti-VCA por IFI com resposta positiva (teste qualitativo) e os testes de ELISA, quando superiores ao "cutoff". Os valores de referência seguiram as orientações dos fornecedores.

Analisando-se os resultados dos testes de IFI e ELISA, o paciente foi considerado como apresentando uma infecção primária, caso demonstrasse um resultado elevado na pesquisa de anticorpos IgG anti-VCA (1:160), com resposta negativa de anticorpos IgG anti-EBNA, ou se apresentasse IgM anti-VCA positiva, também na ausência de anticorpos IgG anti-EBNA^{11,18,21}.

A resposta positiva IgM anti-EBNA, maior do que IgG anti-EBNA, também foi indicativa de infecção primária.

A reativação de uma infecção latente foi definida quando os exames resultaram em uma resposta elevada de IgG anti-VCA (1:320) e uma resposta positiva de anticorpos IgG anti-EBNA^{11,24}.

Evidenciou-se a possibilidade de uma infecção passada quando a resposta de IgG anti-VCA foi positiva, porém não elevada (1:40 a 1:160), a IgM anti-VCA foi negativa, na presença de um resultado positivo dos anticorpos IgG anti-EBNA^{11,21,22}.

Caso o paciente apresentasse ausência de reação sorológica ou apenas IgG anti-VCA em título igual a 1:10, considerou-se como soro-negativo.

O estado infeccioso permaneceu indefinido quando os títulos de IgG anti-VCA, por IFI, foram maiores do que 1:10 e menores do que 1:160, com ausência de IgM anti-VCA e de anticorpos antinucleares. Ainda foi considerado indefinido caso evidenciasse apenas IgG ou IgM anti-EBNA.

Os testes de ELISA foram interpretados seguindo as orientações do fabricante, em unidades arbitrárias (AU/ml), as quais foram obtidas de curvas padronizadas de amostras de soro, com titulação conhecida de anticorpos específicos anti-EBV²³.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da UFMG e pelos Comitês de Ética do Hospital das Clínicas da UFMG e do HJG.

A análise estatística dos resultados constou de estudos de variabilidade como média aritmética, mediana e desvio padrão. Obtiveram-se as médias geométricas para comparação dos títulos de IgG anti-VCA através de IFI, no grupo de casos e no grupo controle, utilizando-se, para isso, a escala logarítmica na base 10, por se tratar de titulação, com o objetivo de estabilização das variâncias.

Os testes do qui-quadrado, exato de Fisher e razão das chances foram utilizados para a comparação de respostas dicotômicas, os resultados do monoteste e Paul-Bunnell-Davidsohn, os agrupamentos dos casos e controles por intervalos de títulos de IgG-VCA por IFI e as respostas de IgM-VCA ao teste de IFI. Estes métodos estatísticos foram empregados ainda na avaliação dos resultados dos exames de ELISA para anticorpos contra antígenos do EBV e na comparação do estado infeccioso dos pacientes nos dois grupos em relação a este vírus.

O nível de significância estatística adotado na análise foi de 5,0%.

Resultados

A distribuição das crianças do grupo de casos e do grupo controle por faixa etária e sexo pode ser visualizada na Tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de crianças do sexo masculino e feminino em qualquer dos dois grupos ($p=0,4964$).

Tabela 1 - Distribuição por sexo e faixa etária das crianças do grupo de casos e do grupo controle

Faixa etária (meses)	Grupo de casos				Grupo controle			
	Sexo		Total	%	Sexo		Total	%
M	F	M			F			
00 - 05	1	0	1	1,6	3	1	4	7,3
06 - 11	3	1	4	6,7	3	1	4	7,3
12 - 17	2	1	3	5,0	1	2	3	5,4
18 - 23	4	8	12	20,0	1	3	4	7,3
24 - 59	10	11	21	35,0	12	9	21	38,2
60 - 95	7	8	15	25,0	7	7	14	25,4
96 - 131	3	1	4	6,7	4	1	5	9,1
Total	30	30	60	100,0	31	24	55	100,0

A média de idade no grupo de casos foi de 45,48 meses (mínimo de três e máximo de 122 meses, desvio padrão de 29,85), enquanto que no grupo controle foi de 47,25 meses (mínimo de quatro e máximo de 124 meses, desvio padrão de 32,33), não havendo diferença significativa ($p=0,7604$).

Entre as crianças do grupo de casos, 93,3% eram brancas e 6,7% negras. Já, no grupo controle, 90,9% eram brancas e 9,1% negras ($p=0,7351$).

A maioria das crianças do grupo controle teve como diagnóstico de internação a broncopneumonia, constatada em 15 casos (27,3%), seguido de meningite viral em 9 (16,4%), meningite bacteriana em 8 (14,5%) e celulite de face em 4 (7,3%).

As crianças que viviam em instituições somaram 15 casos (25,0%) das 60 com AIDS, todas no Lar Recanto do Carinho, casa mantida pelo Grupo de Apoio ao Paciente com AIDS (GAPA) de Florianópolis. Nenhuma criança do grupo controle vivia em instituições.

A quase totalidade dos pacientes (93,3%) contraiu o vírus através da transmissão perinatal. Apenas um paciente (1,7%) adquiriu por meio de transfusão de sangue contaminado. Esta criança, de nove anos e oito meses de idade, foi portadora de anemia congênita recebendo várias transfusões quando recém-nascida. O mecanismo de transmissão não pôde ser definido em três crianças (5,0%).

As manifestações clínicas mais frequentes nos pacientes com AIDS foram a linfadenopatia, ocorrendo em 59 casos (98,3%), hepatomegalia em 51 (85,0%), esplenomegalia em 46 (76,7%), broncopneumonia recorrente em 41 (68,3%), lesões de pele em 39 casos (65,0%). O aumento de glândulas parótidas ocorreu em 27 pacientes (45,0%) e a PIL em 21 (35,0%).

Reação de monoteste e Paul-Bunnell-Davidssohn

A média de idade dos 57 pacientes do grupo de casos, nos quais foi efetuada a reação de monoteste, foi de 45,08 meses (mínimo de três e máximo de 122 meses, desvio padrão de 29,99 meses), e nos 56 submetidos à reação de P-B-D, esta média foi de 43,82 meses (mínimo de três e máximo de 122 meses, desvio padrão de 28,68 meses). Já das 24 crianças do grupo controle, nas quais se realizaram os dois testes, a média de idade foi de 61,16 meses (mínimo de 17 e máximo de 124 meses, desvio padrão de 32,31 meses). A diferença foi significativa do ponto de vista estatístico ($p=0,03$ e $p=0,01$, respectivamente).

A maioria dos 57 pacientes do grupo de casos (37 - 64,9%), que foram submetidos à reação de monoteste, e dos 56 (37 - 66,1%), que foram submetidos à reação de P-B-D, tinha idade menor ou igual a quatro anos. Já entre os 24 do grupo controle, nos quais se realizaram os dois testes, 11 (45,8%) pertenciam a este grupo etário. Essa diferença, no entanto, não foi significativa ($p=0,11$ e $p=0,09$, respectivamente).

Os resultados das reações de monoteste e Paul-Bunnell-Davidssohn evidenciaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p=0,1719$ e $p=0,5501$ respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados das reações de monoteste e Paul-Bunnell-Davidssohn nas crianças com AIDS e no grupo controle

Reação	Grupo de casos		Grupo controle		Valor de P*
	n	%	n	%	
Monoteste					
Positiva	6	10,5	0	0,0	0,1719
Negativa	51	89,5	24	100,0	
Total	57	100,0	24	100,0	
Paul-Bunnell-Davidssohn					
Positiva	3	5,4	0	0,0	0,5501
Negativa	53	94,6	24	100,0	
Total	56	100,0	24	100,0	

* Valor de P obtido através do teste exato de Fisher.

IFI para IgM-VCA

Os resultados da pesquisa de anticorpos da classe IgM contra os antígenos do capsídeo do EBV podem ser observados na Tabela 3. Todos os pacientes do grupo de casos

Tabela 3 - Comparação dos resultados da pesquisa de IgM-VCA, obtida por IFI, em amostras de soro dos pacientes com AIDS e das crianças soro-negativas para o HIV

IgM-VCA	Grupo de casos		Grupo controle		Valor de P*
	n	%	n	%	
Positiva	16	26,7	1	1,9	0,0002
Negativa	44	73,3	52	98,1	
Total	60	100,0	53	100,0	

* Obtido pelo teste do qui-quadrado.

com IgM-VCA positiva evidenciaram títulos de IgG-VCA, por IFI, 1:640, e o único paciente do grupo controle com IgM-VCA positiva tinha título de IgG-VCA, por IFI, de 1:1.280.

IFI para IgG-VCA

Entre os 60 pacientes do grupo de casos foi evidenciada uma resposta de anticorpos IgG anti-VCA significativamente mais elevada em relação à resposta em 53 pacientes do grupo controle ($p < 0,0001$) (Tabela 4). A média geométrica dos títulos no grupo de casos foi de 1:439,5, enquanto que no grupo controle foi de 1:42,8.

Deteção de IgG e IgM anti-VCA e IgG e IgM anti-EBNA pelo método de ELISA

Observa-se, na Tabela 5, que houve diferença estatisticamente significativa na deteção de IgG anti-VCA pelo

método de ELISA entre as crianças do grupo de casos e controles ($p < 0,0001$), o mesmo não ocorrendo com a deteção dos outros anticorpos.

Interpretação dos resultados dos testes sorológicos

A proporção de infecção pelo EBV nas 50 crianças com AIDS, nas quais foram realizados testes sorológicos através das duas técnicas (IFI e ELISA), foi de 98,0%, enquan-

Tabela 5 - Deteção de IgG e IgM anti-VCA e anti-EBNA, através do método de ELISA, em 50 crianças com AIDS, comparada com a deteção em 40 crianças soro-negativas para o HIV

Classe de anticorpos	Grupo de casos		Grupo controle		Valor de P
	n	%	n	%	
IgG-VCA					
positivo	37	74,0	3	7,5	< 0,0001 *
negativo	13	26,0	37	92,5	
total	50	100,0	40	100,0	
IgM-VCA					
positivo	4	8,0	2	5,0	0,6889 †
negativo	46	92,0	38	95,0	
total	50	100,0	40	100,0	
IgG-EBNA					
positivo	7	14,0	7	17,5	0,6507 *
negativo	43	86,0	33	82,5	
total	50	100,0	40	100,0	
IgM-EBNA					
positivo	9	18,0	6	15,0	0,7059 *
negativo	41	82,0	34	85,0	
total	50	100,0	40	100,0	

*Obtido pelo teste do qui-quadrado; † Obtido pelo teste exato de Fisher.

Tabela 4 - Comparação dos títulos de IgG contra antígenos do capsídeo do vírus Epstein-Barr, obtidos por IFI, em amostras de soro de crianças com AIDS e de crianças soro-negativas para o HIV

Título de IgG-VCA	Grupo de casos		Grupo controle		Razão das chances (IC)*	Valor de P†
	n	%	n	%		
≤ 1:10	7	11,7	16	30,2	1,00	< 0,0001
1:20 - 1:160	4	6,7	27	51,0	0,34 (0,09-1,34)	
1:320 - 1:640	17	28,3	5	9,4	7,77 (2,04-29,54)	
> 1:640	32	53,3	5	9,4	14,63 (4,01-53,41)	
Total	60	100,0	53	100,0		

* Intervalo de confiança de 95,0%;

† Obtido pelo teste de qui-quadrado para tendência linear.

to que nas 39 do grupo controle foi de 74,4% ($p=0,0151$) (Tabela 6).

A mediana das idades nas crianças soro-negativas para o EBV do grupo controle foi de nove meses e nas soropositivas foi de 47 meses. Entre as crianças com AIDS, apenas uma era soro-negativa.

Analisando-se a soro-positividade para o EBV por faixa etária, nas crianças em que foram realizados ambos os testes, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes do grupo de casos com idade de 24 meses ou menos, comparando-se com as do grupo controle ($p=0,0024$). Nas demais faixas etárias não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Esses dados também podem ser visualizados na Tabela 6.

Interpretando-se os resultados dos testes sorológicos para o EBV através de ambas as técnicas, nos 50 pacientes com AIDS e nos 39 controles, constatou-se que houve uma diferença estatisticamente significativa na incidência de ausência de infecção e infecção passada, as quais foram mais frequentes nas crianças do grupo controle ($p=0,0009$ e $p=0,0337$ respectivamente). Já os pacientes do grupo de casos evidenciaram uma maior incidência de infecção primária e reativada pelo EBV ($p<0,0001$ e $p=0,0745$ respectivamente) (Tabela 7).

Nas 21 crianças do grupo de casos que apresentavam pneumonia intersticial linfóide, 16 (76,2%) demonstraram evidências sorológicas de infecção primária pelo EBV, três (14,3%) de infecção reativada e, em duas (9,5%), o estado infeccioso não pôde ser definido. Nenhuma destas crianças apresentou infecção passada ou foi soro-negativa para o EBV. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa com as que não apresentavam PIL, para qualquer dos estados de infecção pelo EBV ($p > 0,5$).

Discussão

O amplo espectro de manifestações clínicas que acompanham a AIDS pode ser decorrente, inúmeras vezes, de processos infecciosos associados, como consequência do estado de imunodepressão. Isso tem levado os pesquisadores a uma busca constante de outros agentes que possam estar relacionados à fisiopatologia da infecção pelo HIV.

A PIL, doença pulmonar observada em cerca de 50 a 90% das crianças com AIDS e raramente em adultos, manifesta-se por uma insidiosa e progressiva taquipnéia e hipoxemia. O exame radiológico de tórax revela um infiltrado intersticial nodular difuso, e o exame histológico evidencia uma proliferação intersticial e peri-brônquica de células linfóides. As crianças com AIDS portadoras desse

Tabela 6 - Comparação por faixa etária do resultado da sorologia para o EBV, através da interpretação conjunta dos testes de IFI* e ELISA†, entre os pacientes do grupo de casos e do grupo controle

Faixa etária (m.) / sorologia	Grupo de casos		Grupo controle		Total		Valor do P	
	n	%‡	n	%‡	n	%§		
0 a 24	positiva	15	93,8	4	36,4	19	70,4	0,0024
	negativa	1	6,2	7	63,6	8	29,6	
	total	16	100,0	11	100,0	27	100,0	
25 a 48	positiva	12	100,0	10	100,0	22	100,0	indefinido
	negativa	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	total	12	100,0	10	100,0	22	100,0	
49 a 60	positiva	4	100,0	3	75,0	7	87,5	1,0000
	negativa	0	0,0	1	25,0	1	12,5	
	total	4	100,0	4	100,0	8	100,0	
> 60	positiva	18	100,0	12	85,7	30	93,7	0,1834
	negativa	0	0,0	2	14,3	2	6,3	
	total	18	100,0	14	100,0	32	100,0	
Todas as faixas	positiva	49	98,0	29	74,4	78	87,6	0,0151 [¶]
	negativa	1	2,0	10	25,6	11	12,4	
	total	50	100,0	39	100,0	89	100,0	

* IFI positiva: título > 1:10

† ELISA positivo: superior ao "cutoff"

‡ Porcentagem em relação ao total por faixa etária de cada grupo;

§ Porcentagem em relação ao total por faixa etária dos dois grupos;

|| Obtido pelo teste exato de Fisher;

¶ Obtido pelo teste do qui-quadrado.

Tabela 7 - Interpretação do estado infeccioso em relação ao EBV, no grupo de casos e grupo controle, nos quais foram realizados ambos os testes (IFI e ELISA)

Infecção pelo EBV	Grupo de casos		Grupo controle		Valor de P* (IC)†	Razão das chances	Valor de P‡
	n	%	n	%			
Ausente	1	2,0	10	25,6	0,0009§	1,00 (referência)	< 0,0001
Primária	35	70,0	10	25,6	< 0,0001	35,00 (3,99-307,30)	
Passada	0	0,0	4	10,3	0,0337§	0,00	
Reativada	7	14,0	1	2,6	0,0745§	70,00 (3,72-1317,94)	
Indefinida	7	14,0	14	35,9	0,0164	5,00 (0,53-47,30)	
Total	50	100,0	39	100,0			

* Valor de P para a diferença do estado infeccioso entre o grupo de casos e grupo controle;

† Intervalo de confiança de 95,0%;

‡ Valor de P para a diferença entre a razão das chances;

§ Obtido pelo teste exato de Fisher;

|| Obtido pelo teste do qui-quadrado.

tipo de patologia, não raramente, demonstram a presença do genoma do vírus Epstein-Barr⁹.

A PIL foi observada em 21 pacientes estudados na presente série, 76,2% dos quais com evidência sorológica de infecção primária pelo EBV e 14,3% com demonstração de infecção reativada, totalizando 90,5%. Entretanto, não se observou diferença estatisticamente significativa com as crianças com AIDS que não apresentavam esta patologia. Considerando-se que manifestações linfoproliferativas estavam presentes em praticamente todas as crianças estudadas, poder-se-ia aventar a possibilidade de que os pacientes sem PIL, em uma fase posterior, estariam sujeitos a desenvolver esse quadro pulmonar.

As dificuldades no diagnóstico da infecção pelo EBV em crianças, através das reações que pesquisam anticorpos heterófilos, residem no fato de que, especialmente naquelas menores de quatro anos de idade, não há produção desses anticorpos^{24,25}.

As diferenças evidenciadas nas reações de monoteste ou P-B-D não foram significantes entre os pacientes com AIDS e as crianças do grupo controle, apesar do monoteste ter sido positivo em seis crianças do grupo de casos e o P-B-D em três, e de nenhuma criança do grupo controle ter apresentado resultado positivo em qualquer dos dois métodos. Salienta-se ainda que as crianças do grupo controle, que foram submetidas a estes testes, apresentavam uma média de idade maior.

A evidência de infecção aguda pelo EBV em crianças portadoras de AIDS tem sido documentada por vários autores^{4,5,26}.

As diferenças observadas no presente estudo, entre os pacientes do grupo de casos e do grupo controle, foram estatisticamente significantes, não somente nos títulos de anticorpos, como também no estado infeccioso dos pacientes em relação à infecção pelo EBV.

Apenas um paciente com AIDS e 10 do grupo controle não apresentaram resposta sorológica ao EBV, correspondendo aos relatos de literatura, os quais mencionam que a prevalência da infecção por este vírus em crianças varia de 50 a 80%^{24,27-29}.

A proporção de soro-positividade foi maior nas crianças com AIDS (98,0%) comparadas com as crianças soro-negativas para o HIV (74,4%), analisando-se aquelas nas quais a pesquisa foi efetuada tanto pelo método de ELISA quanto pela IFI (p=0,0151). As crianças com ausência de resposta sorológica ao EBV do grupo controle apresentavam uma idade mais baixa do que as soropositivas. A mediana das idades nas soro-negativas foi de nove meses, comparada com a mediana de 47 meses nas soro-positivas. No grupo de casos este dado não pôde ser obtido, pois apenas uma criança era soro-negativa.

Este achado está de acordo com vários estudos realizados, os quais demonstram que quanto menor a faixa etária, menor é a prevalência da infecção por este vírus^{27,29,30}.

Observou-se, através dos resultados dos testes sorológicos realizados por ambas as técnicas, em 50 crianças com AIDS e em 39 controles, que entre as 16 crianças do grupo de casos na faixa etária de zero a 24 meses, 15 (93,8%) evidenciaram anticorpos contra o EBV, enquanto que esses anticorpos foram demonstrados em apenas quatro (36,4%) das 11 crianças do grupo controle nesta faixa etária ($p = 0,0024$). Nos demais grupos de idade, não houve diferença na detecção desses anticorpos. Pode-se supor, com isso, que as crianças com AIDS desenvolveram a infecção pelo EBV em uma fase mais precoce da vida, com 24 meses de idade ou menos.

Entre as crianças com AIDS soro-positivas para a IgG anti-VCA do EBV por IFI, 80,0% apresentaram títulos iguais ou superiores a 1:640, enquanto que 81,1% das do grupo controle evidenciaram títulos iguais ou inferiores a 1:160. A média geométrica dos títulos foi de 1:439,5 no grupo de casos e de 1:42,8 no grupo controle. As diferenças observadas nos dois grupos foram significantes do ponto de vista estatístico ($p < 0,0001$), com uma chance maior das crianças com AIDS apresentarem títulos iguais ou superiores a 1:320.

Sumaya *et al.* (1986)³¹, quando pesquisaram o EBV e as respostas sorológicas a ele, encontraram títulos significativamente mais elevados de IgG-VCA em indivíduos com AIDS, onde a média geométrica foi de 1:583,5, comparada com 1:267,6 nos casos de indivíduos com complexo relacionado à AIDS, 1:288,9 em pacientes com mononucleose infecciosa e 1:136,4 em indivíduos saudáveis.

A detecção da IgG anti-VCA, através da técnica de ELISA, também evidenciou diferença estatisticamente significativa entre as crianças com AIDS e as do grupo controle ($p < 0,0001$). Esta técnica tem sido referida em alguns trabalhos como sensível e específica para a pesquisa de anticorpos contra antígenos virais do EBV^{23,32}.

Os relatos de literatura a respeito da utilização do ELISA para o diagnóstico da infecção pelo EBV ainda são poucos, não se chegando a uma conclusão definitiva sobre a qualidade do teste. Esse exame, no entanto, associado com outros testes diagnósticos como a IFI, pode ser útil na elucidação do estado infeccioso do paciente.

A presença isolada de positividade nos anticorpos da classe M contra os antígenos do capsídeo do EBV pode ser suficiente para o diagnóstico de uma infecção aguda²⁰. Baseado nesta afirmação, se estivesse disponível somente este teste, poder-se-ia concluir que as crianças com AIDS deste estudo apresentaram uma proporção significativamente maior de infecções agudas pelo EBV do que as crianças do grupo controle ($p = 0,0002$).

O método de ELISA não se mostrou uma boa técnica para a detecção da IgM anti-VCA na presente série, havendo uma correlação bastante insignificante com a IFI. Isso pode ser decorrente do fato de a maioria dos pacientes não se encontrar na fase inicial de uma infecção pelo EBV, quando, talvez, a técnica de ELISA poderia detectar esses

anticorpos. O número bastante pequeno de resultados positivos prejudica em muito a avaliação da qualidade do teste. Para que essa avaliação fosse mais fidedigna, a pesquisa da IgM deveria ser realizada em pacientes comprovadamente na fase inicial de uma infecção por esse vírus, nos quais a chance de se detectar a IgM provavelmente seria maior.

A pesquisa de anticorpos contra antígenos nucleares do EBV com a utilização de peptídeos sintéticos para a detecção do anti-EBNA1 torna o método de ELISA um exame altamente sensível e específico^{32,33}. Uma das vantagens do ELISA é a detecção de IgM anti-EBNA, aparecendo em uma fase precoce da infecção, três a seis dias após o início dos sintomas. Outra vantagem reside no fato de os níveis de IgM anti-EBNA baixarem quando começam a elevar-se os níveis de IgG anti-EBNA. Pode-se, assim, estabelecer uma relação entre essas duas determinações, auxiliando no diagnóstico da infecção aguda. A relação inferior a 1,0 é sugestiva de uma infecção primária pelo EBV³³.

A detecção de anticorpos anti-EBNA, tanto da classe G quanto da M, não evidenciou diferenças significantes entre os dois grupos ($p=0,6507$ para IgG e 0,7059 para IgM). Justifica-se essa similaridade pelo fato de não ter havido distinção na observação de infecções passadas ou reativadas nesses grupos, ou ainda, apesar de uma diferença significativa na evidência de infecção primária, estas já deveriam estar em uma fase de não mais se observar a presença de IgM anti-EBNA, enquanto que os níveis de IgG-EBNA não teriam ainda se elevado o suficiente para serem considerados positivos.

A frequência com que os pacientes com AIDS demonstraram uma infecção primária pelo EBV foi bastante elevada quando comparada com as crianças do grupo controle ($p < 0,0001$). Essa maior incidência de infecção primária poderia ser explicada pelo estado de imunodepressão em que se encontravam as crianças com AIDS, tornando-as mais suscetíveis à infecção. Associado a este fato, muitos pacientes eram institucionalizados, o que favoreceria a disseminação do agente.

Corroborando essas hipóteses, foi observada uma diferença significativa na soronegatividade entre os dois grupos. Apenas um paciente com AIDS era soronegativo para o EBV, comparado com 10 crianças não portadoras de AIDS ($p=0,0009$).

A infecção reativada pelo EBV foi constatada em sete casos (14,0%) e em apenas um controle (2,6%) ($p=0,0745$).

A chance de as crianças com AIDS apresentarem infecção primária ou reativada foi significativamente maior do que a das crianças soro-negativas para o HIV (RC de 35,00 com IC de 95,0% de 3,99 a 307,30 e RC de 70,00 com IC de 95,0% de 3,72 a 1.317,94 respectivamente).

A resposta ao componente *Bam* HI K (EBNA 1) do antígeno nuclear do EBV parece ser essencial para o controle da infecção por esse vírus. A não produção de anticorpos contra esse componente tem sido observada

freqüentemente em pacientes com AIDS e com infecções crônicas ativas, podendo se constituir no defeito imunológico implicado no retorno da replicação viral^{8,34,35}.

O estudo da infecção pelo vírus Epstein-Barr em crianças com AIDS desenvolvido na presente pesquisa permitiu algumas conclusões a respeito das repercussões dessa imunodeficiência e do comportamento da infecção pelo EBV no grupo de crianças estudadas:

a) as crianças com AIDS desenvolveram a infecção pelo EBV em uma fase mais precoce da vida, com 24 meses de idade ou menos;

b) as reações de monoteste e Paul-Bunnell-Davidsohn não se mostraram adequadas para o diagnóstico da infecção pelo EBV;

c) os títulos de IgG anti-VCA foram mais elevados nas crianças com AIDS;

d) as crianças com AIDS evidenciaram infecção primária pelo EBV com uma freqüência mais elevada, o que pode ser devido ao seu estado de imunodepressão e/ou às condições de vida desses pacientes;

e) a reativação da infecção pelo EBV foi mais freqüente entre as crianças com AIDS.

Os estudos com a tentativa de elucidar essas questões devem prosseguir e, quem sabe, a descoberta definitiva dos níveis de envolvimento de agentes infecciosos como o EBV na patogênese da AIDS possam contribuir no tratamento definitivo dessa enfermidade.

A pesquisa sistemática desses agentes talvez deva fazer parte da condução dos pacientes infectados pelo HIV.

Agradecimentos

Agradecemos aos pediatras Sônia Maria de Faria, Defendente Debiasi, Helena Maria Vieira e Eliane Vieira Araújo, ao Programa Estadual de DST/AIDS da Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina, ao Programa Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde do Brasil, Setor de Virologia do Laboratório Central do Estado de Santa Catarina, ao Laboratório Médico Ciência de Florianópolis, às Universidades Federais de Santa Catarina e Minas Gerais, ao Hospital Infantil Joana de Gusmão, ao Professor Joel Alves Lamounier, ao Professor Eugênio Marcos Andrade Goulart, aos Professores do Serviço de Infectologia Pediátrica da UFMG e à CAPES/PICD.

Referências bibliográficas

- Mildvan D, Mathur U, Enlow RW et al. Opportunistic infections and immune deficiency in homosexual men. *Ann Int Med* 1982; 96:700-704.
- Moll B, Emerson EE, Small CB, Friedland GH, Klein RS, Spigland I. Inverted ratio of inducer to suppressor T-lymphocyte subsets in drug abusers with opportunistic infections. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1982; 25:417-423.
- Essex M, Mc Lane MF, Lee TH, Falk L, Howe CWS, Mullins JI. Antibodies to cell membrane antigens associated with human T-cell leukemia virus in patients with AIDS. *Science* 1983; 220:859-862.
- Joncas JH, Delage G, Chad Z, Lapointe N. Acquired (or congenital) immunodeficiency syndrome in infants born of haitian mothers. *N Engl J Med* 1983; 308:842.
- Rubinstein A, Silcklick M, Gupta A et al. Acquired immunodeficiency with reversed T4/T8 ratios in infants born to promiscuous and drug-addicted mothers. *JAMA* 1983; 249:2350-2356.
- Montagnier L, Gruet J, Chameret S et al. Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines. *Science* 1984; 225: 63-66.
- Falloon J, Eddy J, Wiener L, Pizzo PA. Human immunodeficiency virus infection in children. *J Pediatr* 1989; 114:1-30.
- Andiman WA, Martin K, Rubinstein A et al. Opportunistic lymphoproliferations associated with Epstein-Barr viral DNA in infants and children with AIDS. *Lancet* 1985; 2:1390-1393.
- Fackler JC, Nagel JE, Adler WH, Mildvan PT, Ambinder RF. Epstein-Barr virus infection in a child with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Dis Child* 1985; 139:1000-1004.
- Katz BZ, Andiman WA, Eastman R, Martin K, Miller G. Infection with two genotypes of Epstein-Barr virus in an infant with AIDS and lymphoma of the central nervous system. *J Infect Dis* 1986; 153:601-604.
- Katz BZ, Berkman AB, Shapiro ED. Serologic evidence of active Epstein-Barr virus infection in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders of children with acquired immunodeficiency syndrome. *J Pediatr* 1992; 120: 228-232.
- Kramer MR, Saldana MJ, Ramos M, Pitchenik AE. High titers of Epstein-Barr virus antibodies in adult patients with lymphocytic interstitial pneumonitis associated with AIDS. *Resp Med* 1992; 86:49-52.
- Andersson J, Britton S, Ernberg I et al. Effect of acyclovir on infectious mononucleosis; a double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis* 1986; 153:283-290.
- Andersson J & Ernberg I. Management of Epstein-Barr virus infections. *Am J Med* 1988; 85:107-115.
- Centers for Diseases Control. Classification system for human immunodeficiency virus (HIV) infection in children under 13 years of age. *MMWR* 1987; 36:225-236.
- Centers for Diseases Control. Revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. *MMWR* 1994; 43:1-10.
- Rapp CE & Hewetson JF. Infectious mononucleosis and the Epstein-Barr virus. *Am J Dis Child* 1978; 132:78-86.
- Andiman WA. The Epstein-Barr virus and EB virus infections in childhood. *J Pediatr* 1979; 95:171-182.
- Carvalho LHFR. Mononucleose infecciosa. In: Tonelli E, ed. *Doenças infecciosas na infância*. Rio de Janeiro: MEDSI, 1987; 1:637-652.
- Bryant NJ. *Laboratory immunology & serology*. 3ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1992; Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): 231-252.

21. Sumaya CV & Jenson HB. Epstein-Barr virus. In: Rose NR, Macario EC, Fahey JL et al., eds. *Manual of clinical laboratory immunology*. 4ª ed., Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992; 568-575.
22. Andersson JP. Clinical aspects on Epstein-Barr virus infection. *Scand J Infect Dis* 1991; 78:94-104.
23. Luka J, Chase RC, Pearson GR. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against the major EBV-associated antigens. I. Correlation between ELISA and immunofluorescence titers using purified antigens. *J Immunol Meth* 1984; 67:145-156.
24. Fleisher G, Lennette ET, Henle G, Henle W. Incidence of heterophil antibody responses in children with infectious mononucleosis. *J Pediatr* 1979; 94:723-728.
25. Sumaya CV & Ench Y. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children; II heterophil antibody and viral-specific responses. *Pediatrics* 1985; 75:1011-1019.
26. Scott GB, Buck BE, Leterman JG, Bloom FL, Parks WP. Acquired immunodeficiency syndrome in infants. *N Engl J Med* 1984; 310:76-81.
27. Porter DD, Wimberly I, Benyesh-Melnick M. Prevalence of antibodies to EB virus and other herpesviruses. *J Am Association* 1969; 208:1675-1679.
28. Evans AS. Infectious mononucleosis and related syndromes. *Am J Med Sciences* 1978; 276:325-339.
29. Candeias JAN & Pereira MS. Pesquisa de anticorpos para o vírus EB em adultos e crianças. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1970; 12:333-338.
30. Sutton RNP, Marston SD, Almond EJP, Emond RTD. Aspects of Epstein-Barr infection in childhood. *Arch Dis Child* 1974; 49:102-106.
31. Sumaya CV, Boswell RN, Ench Y et al. Enhanced serological and virological findings of Epstein-Barr virus in patients with AIDS and AIDS-related complex. *J Infect Dis* 1986; 154:864-870.
32. Hopkins III RF, Witmer TJ, Neubauer RH, Rabin H. Detection of antibodies to Epstein-Barr virus antigens by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Infect Dis* 1982; 146:734-40.
33. Smith RS, Rhodes G, Vaughan JH, Horwitz CA, Geltosky JE, Whalley AS. A synthetic peptide for detecting antibodies to Epstein-Barr virus nuclear antigen in sera from patients with infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 1986; 154:885-89.
34. Schooley RT, Carey RW, Miller G et al. Chronic Epstein-Barr virus infection associated with fever and interstitial pneumonitis; clinical and serologic features and response to antiviral chemotherapy. *Ann Int Med* 1986; 104:636-43.
35. Miller G, Grogan E, Rowe D et al. Selective lack of antibody to a component of EB nuclear antigen in patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 1987; 156:26-35.

Endereço para correspondência:

Dr. Aroldo Prohmann de Carvalho
Rua Paula Ramos, 1353, Bairro Coqueiros
CEP 88080-400 - Florianópolis - SC
Fones: (048) 244.1587, (048) 983.0155
Fax: (048) 223.2077, (048) 228.1822