

# Acuidade de Critérios Clínicos e Testes Laboratoriais na Infecção Primária pelo Vírus Epstein-Barr em Idade Pediátrica

## Accuracy of Polymerase Chain Reaction Assay for DNA Load in the Diagnosis of Primary Epstein-Barr Virus Infection in Children

Liane Correia Costa<sup>1,2</sup>, Luís Nogueira-Silva<sup>3,4</sup>, Inês Azevedo<sup>1,2</sup>, Sílvia Conde<sup>5</sup>, João Luís Barreira<sup>1,2</sup>

1. Serviço de Pediatria, Hospital Pediátrico Integrado, Centro Hospitalar São João, EPE, Porto, Portugal

2. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal

3. Serviço de Medicina Interna, Centro Hospitalar São João, EPE, Porto, Portugal

4. Centro de Investigação e Tecnologias e Sistemas de Informação em Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal

5 Serviço de Patologia Clínica, Centro Hospitalar São João, EPE, Porto, Portugal

Acta Pediatr Port 2015;46:326-32

### Resumo

**Introdução:** O vírus Epstein-Barr é o principal responsável por síndromes mononucleósicas. O diagnóstico laboratorial inicia-se por avaliação do hemograma, testes de deteção de anticorpos heterófilos e anticorpos específicos (serologia), mas é cada vez mais frequente o recurso à pesquisa de ácido desoxirribonucleico deste vírus por técnicas de biologia molecular. Estudou-se a relação entre clínica e testes laboratoriais em idade pediátrica na infecção primária por vírus Epstein-Barr.

**Métodos:** Foram revistos registos clínicos de imunocompetentes até 18 anos com pesquisa de serologias e ácido desoxirribonucleico de vírus Epstein-Barr, entre janeiro 2007 e junho 2010. Classificaram-se os casos em grupos serológicos (infecção primária, seropositivos e seronegativos) e foram definidos critérios clínicos de síndromes mononucleósicas. Considerou-se positiva a deteção quantitativa de ácido desoxirribonucleico  $\geq 500$  cópias/mL (sangue total). Calculou-se acuidade diagnóstica de critérios clínicos e pesquisa de ácido desoxirribonucleico face à serologia.

**Resultados:** Foram incluídos 100 doentes (mediana idade 38 meses; 52 sexo masculino). Cumpriram critérios clínicos de síndromes mononucleósicas 29 doentes. Estes apresentaram sensibilidade 79%, especificidade 86%, valor preditivo positivo 66%, valor preditivo negativo 92%. A pesquisa de ácido desoxirribonucleico de vírus Epstein-Barr foi positiva em 40 casos; 16 eram seropositivos com carga viral inferior à primoinfecção (mediana 2500 vs 36000 cópias/mL,  $p < 0,001$ ). A pesquisa de ácido desoxirribonucleico apresentou sensibilidade 96%, especificidade 78%, valor preditivo positivo 58%, valor preditivo negativo 98%.

**Discussão:** Os critérios clínicos têm boa precisão no diagnóstico de primoinfecção. A pesquisa de ácido desoxirribonucleico aumenta a sensibilidade e é particularmente útil quando negativa porque exclui doença, mas a realização da pesquisa de ácido desoxirribonucleico em sangue total (*versus* soro / plasma) deve ser tida em conta na interpretação dos resultados. A pesquisa de ácido desoxirribonucleico poderá ser útil face a resultados serológicos inconclusivos.

**Palavras-chave:** Anticorpos Heterófilos/uso diagnóstico; Infecções por Vírus Epstein-Barr/diagnóstico; Mononucleose Infeciosa/diagnóstico; Testes Sorológicos; Reação em Cadeia da Polimerase

### Abstract

**Introduction:** Epstein-Barr virus infections are often diagnosed based on clinical features and blood count and heterophile antibody testing or Epstein-Barr virus-specific antibody tests. Nowadays, quantitative polymerase chain reaction assays are extensively used for detecting and quantifying Epstein-Barr virus. We evaluated the accuracy of this method in children with suspected primary Epstein-Barr virus infection.

**Methods:** Records of immunocompetent patients aged  $<18$  years who were tested simultaneously for Epstein-Barr virus-specific antibodies and Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction assay over a 42-month period (January 2007 to June 2010), in a tertiary care hospital, were reviewed. Patients were classified as primary Eps-

tein-Barr virus infection, Epstein-Barr virus-seropositive or Epstein-Barr virus-seronegative. Infectious mononucleosis was diagnosed if specified clinical findings and/or positive heterophile antibody were present. A threshold of deoxyribonucleic acid (DNA) load of  $\geq 500$  copies/ml (whole blood) was considered positive.

**Results:** One hundred patients were included (median age 38 months; 52 male). Twenty-nine patients fulfilled criteria for infectious mononucleosis. Twenty-three (96%) patients with primary infection had detectable Epstein-Barr virus DNA load (median 36 000 copies/ml); 18 fulfilled criteria for infectious mononucleosis. Sixteen (46%) seropositive patients had detectable Epstein-Barr virus DNA but viral load was lower than in primary infections (median 2500 copies/ml,  $p < 0.001$ ); five had criteria for infectious mononucleosis. Sensitivity, specificity,

positive and negative predictive values (and 95% confidence interval) of clinical criteria vs. polymerase chain reaction assay in comparison with serology were, respectively: 79.2% (59.5-90.8%) vs. 95.8% (79.8-99.3%), 85.9% (76.0-92.2%) vs. 77.6% (67.1-85.5%), 65.5% (47.4-80.1%) vs. 57.5% (42.2-71.5%) and 92.4% (83.5-96.7%) vs. 98.3% (91.1-99.7%).

**Discussion:** Clinical criteria are accurate in Epstein-Barr virus infection diagnosis. Polymerase chain reaction assay brings increased sensitivity and is particularly useful when negative, excluding infection. The clinical usefulness of this expensive technique in immunocompetent children is questionable unless serology is inconclusive.

**Keywords:** Antibodies Heterophile/diagnostic use; Epstein-Barr Virus Infections/diagnosis; Infectious Mononucleosis/diagnosis; Polymerase Chain Reaction; Serologic Tests

## Introdução

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um vírus ubiquitário da família *Herpesviridae* e o principal responsável por síndromes mononucleósicas (SM) em crianças. A infecção por este vírus é muito frequente, com um pico de incidência entre os 10 e os 19 anos e atingindo na idade adulta uma prevalência de seroconversão próxima dos 90%, que pode persistir toda a vida.<sup>1-3</sup> A apresentação clínica da infecção primária por EBV pode ser muito variada. Em crianças abaixo dos 3 anos, a infecção é frequentemente assintomática e, quando sintomática, apresenta-se geralmente como um quadro inespecífico. Em crianças mais velhas e jovens adultos, é mais frequente a manifestação de um conjunto de sinais e sintomas que constituem a entidade clínica designada por mononucleose infecciosa (MI), caracterizada pela ocorrência de febre, faringite, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e mal-estar.<sup>2</sup>

O diagnóstico de MI/SM causado por EBV é classicamente baseado em critérios clínicos e na presença de anticorpos heterófilos (AcH) e específicos anti-EBV - anti-*viral capsid antigen* (anti-VCA) e anti-Epstein-Barr *nuclear antigen* (anti-EBNA). O teste de AcH apresenta elevada especificidade diagnóstica (baixa probabilidade de resultados falsos positivos), mas tem uma sensibilidade de 80% em crianças dos 4 aos 16 anos e abaixo desta idade é ainda inferior, de cerca de 30%.<sup>4,5</sup> Além do seu limitado interesse nas idades mais jovens, a pesquisa de AcH é também pouco sensível nas primeiras semanas de doença. Por este motivo, a pesquisa de anticorpos específicos para EBV está indicada em casos de clínica muito sugestiva com teste AcH negativo, em

que há suspeita da possibilidade de um falso negativo, permitindo documentar infecção primária mas também infecção passada quando constatada seroconversão.<sup>3,6,7</sup> No entanto, os testes serológicos específicos de EBV também carecem de sensibilidade e os seus resultados podem ser de difícil interpretação, sobretudo em crianças pequenas. Nestas, há possibilidade de persistência de anticorpos maternos da classe da imunoglobulina (Ig) G ou por imaturidade do sistema imune, após a infecção primária, o aumento de anticorpos IgM podem persistir por vários meses. O diagnóstico pode ainda ser dificultado pela presença de infecção por outros agentes que podem causar SM (citomegalovírus ou *Toxoplasma gondii*, entre outros) com serologia positiva para EBV ou por aumentos inespecíficos de anticorpos de tipo IgG e IgM para vários agentes durante o período de infecção por EBV, geralmente atribuído a uma ativação policlonal.<sup>8</sup> Assim, com o advento de técnicas de biologia molecular tem sido cada vez mais frequente o recurso à pesquisa de ácido desoxirribonucleído (ADN) de EBV por técnicas de biologia molecular para efetuar o diagnóstico de MI, que se tem provado em diversos estudos, ter uma sensibilidade elevada na criança e, sobretudo importante, nas mais jovens.<sup>9,10</sup> No entanto, apesar do recurso a esta técnica se pautar por uma tentativa de aumentar a sensibilidade para o diagnóstico, especula-se em vários estudos que a pesquisa por técnicas de biologia molecular pode, tal como acontece com os testes serológicos específicos de EBV, ser algo inespecífica no diagnóstico de infecção primária. Devido à elevada sensibilidade do método, com deteção de um número muito reduzido de cópias virais, podem alguns resultados positivos traduzir latência ou reativação da infecção vírica e não uma infecção primária.<sup>11</sup> No entanto, é inegável que este método, trazendo um acréscimo de sensibilidade, poderá esclarecer situações em que a clínica é inespecífica, em que os testes serológicos são duvidosos ou inconclusivos, em fases iniciais de doença ou em casos em que a clínica é pouco concordante com achados laboratoriais, analíticos ou serológicos.<sup>6,8-10</sup>

O presente estudo teve como objetivo investigar a relação entre as manifestações clínicas, os perfis serológicos e os resultados de pesquisa por reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) de EBV (em sangue total) obtidos em indivíduos imunocompetentes em idade pediátrica.

## Métodos

Foi realizado um estudo retrospectivo, com análise dos registos clínicos de doentes imunocompetentes com idade inferior a 18 anos a quem foram efetuados testes

serológicos de EBV e pesquisa de ADN de EBV em simultâneo ou com um intervalo máximo de 14 dias. Foram incluídos doentes observados num hospital terciário, em regime de internamento, consulta externa ou urgência, no período entre janeiro de 2007 e junho de 2010. Foram excluídos os doentes cujos resultados de testes serológicos foram considerados duvidosos pelo laboratório ou cujos resultados não permitiram a inclusão num dos três grupos serológicos prédefinidos.

#### Recolha de dados

Foram recolhidos dos processos clínicos dados de caracterização sociodemográfica e dados clínicos relativos à presença e duração de febre, adenopatias cervicais palpáveis, amigdalofaringite, organomegalia (detetada clinicamente ou por ecografia) e fadiga. Foram também recolhidos os resultados das primeiras análises sanguíneas efetuadas no episódio de doença considerado, nomeadamente hemograma (leucócitos, linfócitos, neutrófilos e linfócitos atípicos), atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gamaglutamiltransferase (GGT), bilirrubina total e proteína C reativa.

Em cinco doentes não foi possível aceder a nenhum dado clínico e em três doentes estes dados estavam incompletos. Estes oito casos foram excluídos da análise referente a manifestações clínicas nas variáveis em que não apresentavam informação disponível.

#### Classificação clínica e definições

Foi definida clinicamente a existência de SM com base em determinados sinais e sintomas (clínica de apresentação do doente) e no resultado do teste de Ach, por ser de resultado rápido e estar disponível na generalidade dos serviços de urgência. Assim, o doente foi classificado como tendo SM se apresentasse teste de Ach positivo ou pelo menos três dos seguintes sinais ou sintomas: febre, amigdalite, adenopatias cervicais, organomegalia e linfócitos atípicos no sangue.<sup>4</sup>

Quanto aos testes serológicos, os doentes foram também classificados em três grupos:

- Infecção primária (VCA IgM +);
- Seropositivos / infecção passada (VCA IgM - e EBNA +);
- Seronegativos / sem evidência de infecção (VCA IgM -, VCA IgG -, EBNA -).

A pesquisa por PCR de ADN de EBV foi efetuada em sangue total, segundo protocolo do laboratório de biologia molecular do hospital, em vigor durante todo o período do estudo, utilizando reagentes comerciais na extração, amplificação e quantificação (EZ1® DNA Blood Kit, artus® EBV RG PCR Kit, Qiagen, Hilden, Alemanha). Este laboratório participa num programa de controlo de qua-

lidade externo para estas determinações. Os resultados quantitativos deste teste são apresentados em valores contínuos a partir de cargas virais de 500 cópias/mL, que representam o limite inferior de linearidade do método. Na análise estatística, foram considerados dois valores de corte (500 e 1000 cópias/mL).<sup>12</sup>

#### Análise estatística

Foram usados testes paramétricos e não paramétricos para amostras independentes para variáveis contínuas e testes de qui-quadrado para variáveis categóricas. Foram calculados valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos com intervalos de confiança a 95% (IC 95%). A acuidade diagnóstica de critérios clínicos e laboratoriais e pesquisa de ADN de EBV por PCR foi calculada considerando o resultado das serologias (e respetivo grupo serológico) como teste padrão (*gold standard*). Foi utilizado o programa SPSS 18 (SPSS Inc., Chicago, EUA) para toda a descrição e análise estatística de resultados, definindo-se significância estatística um valor de  $p < 0,05$ .

## Resultados

#### Descrição da amostra

Foram identificados 114 doentes e excluídos 14 casos (seis com resultados serológicos considerados duvidosos pelo laboratório e oito com resultados serológicos que não permitiam a inclusão em nenhum dos três grupos serológicos definidos). Os 100 doentes incluídos tinham uma mediana de idades de 38 meses (mínimo 16 dias, máximo 18 anos), 52 eram do sexo masculino. Serologicamente, 24 casos foram classificados como infecção primária por EBV, 35 como seropositivos e 41 como seronegativos / sem infecção. Entre estes três grupos não foi observada diferença significativa no que diz respeito à idade e distribuição por sexos. A duração total da doença e a presença e duração de febre também não foram significativamente diferentes entre os doentes com infecção primária e os restantes. No entanto, a maioria dos pedidos de testes diagnósticos para EBV na presente amostra foi efetuada em contexto de doença febril aguda.

Nos oito casos para os quais não estava disponível informação clínica detalhada relativa a todos os sinais e sintomas pesquisados, foram excluídos da análise de cada variável os casos com informação omissa para a mesma. No grupo com infecção primária, a presença de adenomegalias, amigdalofaringite e organomegalia (hepato e/ou esplenomegalia) foi significativamente superior, comparativamente aos restantes grupos (Tabela 1). A presença de organomegalia (hepato e/ou esplenome-

galia) foi detetada no exame objectivo em 11 doentes e noutros seis por ecografia abdominal. No grupo com infecção primária, uma proporção significativamente maior de doentes apresentava linfócitos atípicos no sangue periférico e teste AcH positivo e verificou-se menor contagem de neutrófilos e maior de linfócitos e valores superiores de AST e ALT (Tabela 1).

#### Análise de critérios clínicos

Dos 95 casos em que estava disponível informação clínica detalhada, 29 (30,5%) cumpriam critérios de SM (19 infecções primárias, sete seropositivos e três seronegativos).

Considerando o resultado serológico específico de EBV como *gold standard*, os critérios clínicos de SM apresentaram sensibilidade de 79% (IC95% 59,5-90,8%), especificidade de 86% (IC95% 76,0-92,2%), valor preditivo positivo (VPP) de 66% (IC95% 47,4-80,1%) e valor preditivo negativo (VPN) de 92% (IC95% 83,5-96,7%) (Tabela 2). Os valores são semelhantes tendo ou não em conta o resultado positivo no teste AcH como critério diagnóstico.

Considerando o achado de linfócitos atípicos no sangue isoladamente, verificou-se a seguinte acuidade diagnóstica: sensibilidade 63% (IC95% 73,8-90,5%), especificidade 84% (IC95% 73,8-90,5%), VPP 56% (IC95% 37,3-72,4%) e VPN 87% (IC95% 37,3-72,4%).

#### Análise de resultados dos testes de biologia molecular

A pesquisa de ADN de EBV por PCR foi positiva em 40 casos: 23 (95,8%) casos com infecção primária, 16 (45,7%) casos seropositivos e um (2,4%) caso seronegativo.

Dos 16 casos seropositivos com PCR positiva, cinco apresentavam critérios de SM (em quatro não foi identificado nenhum outro agente infeccioso e num foi detetado parvovírus B19). Dos 19 casos com critérios de SM e infecção primária, a pesquisa por PCR foi positiva em 18 casos.

A carga viral detetada na infecção primária (mediana de 36000 cópias/mL, mínimo 1000 cópias/mL, máximo 753000 cópias/mL) foi significativamente superior à detetada no grupo de seropositivos (mediana 2500 cópias/mL, mínimo 500 cópias/mL, máximo 18000 cópias/mL) ( $p < 0,001$ ).

Face ao resultado das serologias, quando considerado o valor de corte igual ou superior a 500 cópias/mL, a pesquisa de ADN de EBV apresentou sensibilidade de 96% (IC95% 79,8-99,3%), especificidade de 78% (IC95% 67,1-85,5%), VPP de 58% (IC95% 42,2-71,5%) e VPN de 98% (IC95% 91,1-99,7%). Se considerado como valor de corte para resultado positivo o valor de igual ou superior a 1000 cópias/mL, verificou-se que o valor de sensibilidade era semelhante (96%, IC95% 87,8-100%) e havia um ligeiro acréscimo de especificidade (80%, IC95% 71,3-89,2%) e do VPP (61%, IC95% 45,0-76,1%) e VPN (98%, IC95% 95,3-100%) (Tabela 3).

Tabela 1. Distribuição de manifestações clínicas e resultados analíticos, de acordo com o grupo serológico de infecção por EBV

| Manifestações clínicas                | Infecção primária  | Seropositivos / Sem infecção | p       |
|---------------------------------------|--------------------|------------------------------|---------|
| Febre                                 | 21/24 (87,5%)      | 51/71 (71,8%)                | 0,121   |
| Adenomegalias                         | 16/23 (69,6%)      | 15/70 (21,4%)                | < 0,001 |
| Amigdalofaringite                     | 16/24 (66,7%)      | 14/70 (20,0%)                | < 0,001 |
| Organomegalia*                        | 8/24 (33,3%)       | 9/68 (13,2%)                 | 0,015   |
| <b>Resultados analíticos</b>          |                    |                              |         |
| Leucócitos totais ( $\times 10^9/L$ ) | 13,36 (8,76-19,28) | 10,41 (7,68-15,21)           | 0,116   |
| Linfócitos (%)                        | 62,0 (52,7-67,7)   | 28,7 (21,0-53,9)             | < 0,001 |
| Neutrófilos (%)                       | 27,0 (20,3-32,7)   | 59,4 (32,6-68,3)             | < 0,001 |
| Presença de linfócitos atípicos       | 15/24 (62,5%)      | 12/74 (16,2%)                | < 0,001 |
| Aspartato aminotransferase (U/L)      | 61 (37-121)        | 41 (28-69)                   | 0,026   |
| Alanina aminotransferase (U/L)        | 56 (27-168)        | 23 (15-48)                   | 0,002   |
| Gamaglutamil transferase (U/L)        | 28 (13-86)         | 17 (12-51)                   | 0,345   |
| Bilirrubina total (mg/dL)             | 4,3 (3,5-5,5)      | 4,2 (3,0-6,8)                | 0,780   |
| Proteína C reativa (mg/dL)            | 17,1 (5,0-61,9)    | 44,3 (6,7-125,9)             | 0,214   |

\* Organomegalia inclui hepatomegalia e esplenomegalia.

Valores apresentados como mediana (percentil 25 - percentil 75) ou n/n total na categoria (%).

## Discussão

No presente estudo pretendeu-se analisar a relação entre a apresentação clínica e testes laboratoriais na infecção primária por EBV em idade pediátrica, comparando a acuidade diagnóstica de critérios clínicos e pesquisa de ADN, com a de testes serológicos específicos de EBV. A crescente disponibilidade de testes moleculares para deteção de microrganismos permitiu aumentar a capacidade de diagnosticar infeções. No entanto, são necessários estudos que ajudem a melhor perceber a dinâmica dos testes de biologia molecular, identificando as suas vantagens e potenciais limitações, para que possam ser aplicados em situações clínicas selecionadas tirando maior partido dos mesmos.

### Acuidade diagnóstica

Os critérios clínicos mostraram ter uma boa precisão no diagnóstico de primoinfecção por EBV. Os valores foram semelhantes tendo ou não em conta o resultado positivo no teste AcH como critério diagnóstico, o que provavelmente é explicado pelo facto de raramente ser pedido o teste de AcH em casos que não apresentem manifestações clínicas sugestivas de SM. Por outro lado, a pesquisa de ADN trouxe um aumento de sensibilidade relativamente ao uso de critérios clínicos e foi particularmente útil quando negativa (VPN elevado). Os valores de acuidade diagnóstica da pesquisa de ADN foram

sobreponíveis aos descritos em estudos prévios, com valores semelhantes ou superiores no que respeita à sensibilidade e VPN.<sup>5,6,13</sup> No entanto, em relação à especificidade e VPP, os resultados obtidos foram inferiores aos descritos na literatura para esta técnica.<sup>5,6,13</sup>

### Não concordância dos métodos

Foram identificados 16 casos com serologias sugestivas de infecção passada (com seroconversão) mas com pesquisa de ADN positiva ( $\geq 500$  cópias/mL). Estes casos poderiam corresponder a situações com um tempo de evolução de doença superior, estando já em fase de seroconversão, mas em que os níveis de ADN viral ainda não teriam diminuído para valores não detetáveis. No entanto, verificou-se que apenas seis destes casos apresentavam uma evolução clínica superior a sete dias. O declínio do número de cópias detetadas ao longo do curso de doença é descrito por vários autores, com uma relação inversa com a duração de sintomas e a melhoria clínica.<sup>7,9,13-15</sup> Embora esteja descrito que a carga viral atinge geralmente um pico por volta das duas semanas após a infecção, diminuindo depois ao longo de semanas a meses, sabe-se que pode demorar um ano até serem atingidos valores estáveis e baixos ou indetetáveis após infecção ativa.<sup>7,16</sup> Na verdade, esta cinética pode apresentar grande variabilidade interindividual, podendo até ocorrer uma nova subida da viremia após um declínio inicial, o que pode explicar este achado na amostra estudada.

Observaram-se cinco doentes seropositivos com pesquisa de ADN positiva e critérios clínicos de SM (em quatro dos quais nenhum outro agente foi identificado), ou seja, pesquisa de ADN e clínica concordantes entre si, mas discordantes do método serológico (*gold standard*). Estes casos podem corresponder a reativações / reinfeções por EBV, situação em que o recurso à pesquisa de ADN parece ter especial interesse.

Nos 19 casos em que havia concordância entre a clínica e os resultados serológicos específicos de EBV, apenas num deles a PCR foi inferior ao valor de corte definido, o

**Tabela 2. Acuidade diagnóstica dos critérios clínicos na infecção primária por EBV**

| Parâmetro      | Valor (IC95%) (%) |
|----------------|-------------------|
| Sensibilidade  | 79% (59,5-90,8%)  |
| Especificidade | 86% (76,0-92,2%)  |
| VPP            | 66% (47,4-80,1%)  |
| VPN            | 92% (83,5-96,7%)  |

VPN - valor preditivo negativo; VPP - valor preditivo positivo.

Os critérios clínicos de síndromes mononucleósicas considerados foram teste de anticorpos heterófilos positivo ou pelo menos três dos seguintes: febre, amigdalofaringite, adenomegalias, hepato e/ou esplenomegalia, presença de linfócitos atípicos no sangue.

**Tabela 3. Acuidade diagnóstica da pesquisa por PCR do ADN do EBV na infecção primária por EBV, tendo em conta dois valores de corte diferentes para considerar o teste positivo**

| Parâmetro      | Valor (IC95%) (%)    |                       |
|----------------|----------------------|-----------------------|
|                | $\geq 500$ cópias/mL | $\geq 1000$ cópias/mL |
| Sensibilidade  | 96% (79,8-99,3%)     | 96% (87,8-100%)       |
| Especificidade | 78% (67,1-85,5%)     | 80% (71,3-89,2%)      |
| VPP            | 58% (42,2-71,5%)     | 61% (45,0-76,1%)      |
| VPN            | 98% (91,1-99,7%)     | 98% (95,3-100%)       |

ADN - ácido desoxirribonucleio; EBV - vírus Epstein-Barr; PCR - reação em cadeia da polimerase; VPN - valor preditivo negativo; VPP - valor preditivo positivo.



que, além da possibilidade de erro pré-analítico ou analítico, poderá traduzir uma situação de SM causado por outro agente, em que os testes serológicos específicos positivos correspondem a ativação policlonal.

### Forças e limitações

Uma importante limitação deste e de outros estudos semelhantes está associada à dificuldade na interpretação dos valores de carga viral detetada por PCR, por não existirem na literatura valores de corte bem definidos para a população pediátrica.<sup>13,17</sup> São necessários estudos que relacionem a carga viral com o tempo de evolução de infecção, nomeadamente infecção primária, convalescença e cura, assim como reinfeção / reativação do vírus.

Neste estudo não foi analisada a relação entre a carga viral e o tempo de duração de doença, uma vez que o início da mesma nem sempre estava estabelecido temporalmente de forma precisa (limitação decorrente do desenho de estudo). Desta forma, admite-se a possibilidade de existirem variações importantes e não desprezíveis, que poderão em parte justificar a especificidade relativamente baixa identificada para a pesquisa de ADN de EBV por PCR.

Por outro lado, os métodos laboratoriais não estão padronizados, sendo que, atualmente, cada laboratório tem a responsabilidade de validar os seus procedimentos e valores de corte. Uma questão importante reside na opção de realizar o ensaio de amplificação do ADN vírico em sangue total ou em soro / plasma, o que pode conduzir a variações importantes nos resultados, com implicações óbvias no estabelecimento e validação de valores de corte. A pesquisa de ADN de EBV em sangue total (como neste estudo) pode levar a falsos positivos, sobrevalorizando a sensibilidade do método e possivelmente explicando os casos em que este teste é positivo mas com ausência de critérios de SM e teste serológico sem evidência de infecção activa. Especula-se que nestes casos a carga viral detetada possa ser resultado da deteção do vírus no compartimento celular por lise de linfócitos B memória imunológica (onde o vírus persiste latente após infecção primária), e não libertada por células infetadas em fase lítica do ciclo de replicação e

infecção ativa por EBV.<sup>17,18</sup>

Por fim, o presente estudo considera apenas três grupos serológicos, tendo sido excluídos 14 casos com serologias inconclusivas ou duvidosas, o que não permite inferir acerca do possível interesse do recurso à PCR nestes casos.

Os critérios clínicos de SM têm boa acuidade diagnóstica. A pesquisa de ADN aumenta a sensibilidade e terá especial interesse em doentes com seroconversão, nos quais a clínica sugere reativação / reinfeção. O interesse da pesquisa de ADN de EBV em crianças imunocompetentes, com clínica sugestiva e serologias esclarecedoras e concordantes é discutível, ainda mais tendo em conta os custos que lhe estão associados. Além disso, ainda é necessário padronizar o método de pesquisa molecular deste agente e estabelecer os valores de referência para a sua interpretação, em cada idade e situação clínica.

### Conflitos de Interesse

Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse na realização do presente trabalho.

### Fontes de Financiamento

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

### Proteção de Pessoas e Animais

Os autores declaram que os procedimentos seguidos estavam de acordo com os regulamentos estabelecidos pelos responsáveis da Comissão de Investigação Clínica e Ética e de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial.

### Confidencialidade dos Dados

Os autores declaram ter seguido os protocolos do seu centro de trabalho acerca da publicação dos dados de doentes.

### Correspondência

Liane Correia Costa  
liane@med.up.pt

**Recebido:** 12/03/2015

**Aceite:** 04/06/2015

### Referências

1. Katz BZ, Miller G. Epstein-Barr virus infection. In: Katz SL, Gershon AA, Hotez PJ, editors. *Krugman's infectious diseases of children*. 10th ed. St. Louis: Mosby; 1998.p.98-115.
2. Cohen JL. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000;343:481-92.
3. Ebell MH. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Am*

*Fam Physician* 2004;70:1279-87.

4. Sumaya CV, Ench Y. Epstein-Barr virus infectious mononucleosis in children. II. Heterophil antibody and viral-specific responses. *Pediatrics* 1985;75:1011-9.
5. Pitetti RD, Laus S, Wadowsky RM. Clinical evaluation of a quantitative real time polymerase chain reaction assay for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection in children.

Pediatr Infect Dis J 2003;22:736-9.

6. Chan KH, Ng MH, Seto WH, Peiris JS. Epstein-Barr virus (EBV) DNA in sera of patients with primary EBV infection. J Clin Microbiol 2001;39:4152-4.

7. Gulley ML, Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. J Mol Diagn 2008;10:279-92.

8. She RC, Stevenson J, Phansalkar AR, Hillyard DR, Litwin CM, Petti CA. Limitations of polymerase chain reaction testing for diagnosing acute Epstein-Barr virus infections. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;58:333-5.

9. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: The significance and application for each EBV-associated disease. Rev Med Virol 2008;18:305-19.

10. Nakai H, Kawamura Y, Sugata K, Sugiyama H, Enomoto

Y, Asano Y, et al. Host factors associated with the kinetics of Epstein-Barr virus DNA load in patients with primary Epstein-Barr virus infection. Microbiol Immunol 2012;56:93-8.

11. Ambinder RF, Lin L. Mononucleosis in the laboratory. J Infect Dis 2005;192:1503-4.

12. Rowe DT, Qu L, Reyes J, Jabbour N, Yunis E, Putnam P, et al. Use of quantitative competitive PCR to measure Epstein-Barr virus genome load in the peripheral blood of pediatric transplant patients with lymphoproliferative disorders. J Clin Microbiol 1997;35:1612-5.

13. Bauer CC, Aberle SW, Popow-Kraupp T, Kapitan M, Hofmann H, Puchhammer-Stöckl E. Serum Epstein-Barr virus DNA load in primary Epstein-Barr virus infection. J Med Virol 2005;75:54-8.