

DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM NAS INFECÇÕES PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS PELO CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL

Claudio Sergio PANNUTI (1), Lucy Santos VILAS BOAS (1), Vicente AMATO NETO (1),
Maria José de Oliveira ANGELO (2) & Emil SABBAGA (3)

R E S U M O

Foram acompanhados 27 pacientes submetidos a transplante renal para avaliação do comportamento dos anticorpos IgM e IgG CMV-específicos.

Dos 27 casos estudados, 17 (63,0%) tinham anticorpos IgG, detectados pela reação de fixação de complemento (RFC), antes de serem submetidos ao transplante, e 10 (37,0%) eram soro negativos. A pesquisa de anticorpos IgM (técnica de imunofluorescência indireta) foi negativa em todas as amostras pré-transplante. Num período de acompanhamento que variou de 28 a 425 dias (média de 115 dias) após o transplante, observou-se que 20 dos 27 (74,1%) apresentaram evidências sorológicas de infecção pelo CMV, ocorrendo a maioria dos casos (14/20, 70%) em pacientes que já tinham anticorpos para o CMV antes do transplante. A pesquisa de anticorpos IgM CMV-específicos foi positiva em 12 dos 14 pacientes com evidências sorológicas de reinfeção ou reativação da infecção pelo CMV, e em 100% (6/6) dos pacientes com infecção primária. Dentre os 10 pacientes acompanhados por mais de 4 meses, somente 1 (10%) negativou o IgM neste período.

UNITERMOS: Anticorpos IgM anti-citomegalovírus; Infecções primárias e secundárias; Transplante Renal.

I N T R O D U Ç Ã O

Numerosos estudos, publicados nas últimas 2 décadas, tem demonstrado a importância da infecção pelo citomegalovírus (CMV) nos pacientes submetidos a transplante renal^{8, 13}. Estas infecções podem ocorrer tanto em indivíduos sem exposição prévia ao CMV, caracterizando portanto uma infecção primária, quanto em pacientes que já possuíam anticorpos para o CMV antes de receber o rim transplantado. Neste último caso, admite-se que a reativação de infecção la-

tente desencadeada pela imunossupressão à qual o paciente é submetido no período pós-transplante seria o principal mecanismo envolvido. Entretanto, a possibilidade da existência de mecanismos adicionais como a reinfeção exógena pelo CMV, a partir do rim transplantado ou adquirida através de transfusões de sangue ou contacto com outros indivíduos infectados, não está afastada.

(1) Instituto de Medicina Tropical de São Paulo: Laboratórios de Investigação Médica HC FMUSP. Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 470. 05403 São Paulo, SP — Brasil.

(2) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

(3) Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As infecções podem ser totalmente assintomáticas ou apresentarem-se com quadro clínico discreto. Contudo, uma parcela dos pacientes infectados apresenta doença disseminada, grave, que pode levar ao óbito^{8, 13}.

Vários estudos tem indicado que, nos pacientes com transplante renal, a infecção primária associa-se mais freqüentemente à doença sintomática e complicações secundárias do que a reativação^{3, 4, 14, 29, 30}. A caracterização de uma infecção primária não apresenta dificuldades quando se dispõe de amostra de sangue pré-transplante. Todavia, quando o estado imunitário prévio é desconhecido, a diferenciação laboratorial entre infecção primária e reativação ou reinfeção torna-se difícil.

Em indivíduos imunocompetentes, a detecção de anticorpos de classe IgM específicos para o CMV, através da reação de imunofluorescência indireta (IFI)^{10, 19}, técnica imunoenzimática²⁴ ou radioimunoensaio^{16, 18, 25}, apresenta-se como alternativa de grande valor para o diagnóstico da infecção primária, aguda. Nestes pacientes, o IgM aparece sistematicamente na fase aguda da infecção e tem duração limitada a alguns poucos meses, de modo que sua presença sempre indica infecção recente pelo CMV^{16, 19}. Contudo, em pacientes submetidos a transplante renal, alguns estudos demonstraram que os anticorpos IgM CMV-específicos podiam ser detectados em casos bem documentados de reativação de infecções latentes, pré-existent^{20, 22, 26}. Nestes pacientes, a detecção de IgM anti-CMV em amostra isolada de sangue não poderia distinguir uma infecção primária de uma reativação. Estes achados porém, não foram confirmados por outros pesquisadores¹⁶.

O objetivo do presente estudo é avaliar, em pacientes submetidos a transplante renal, o comportamento dos anticorpos IF IgM em relação ao estado imunitário pré-transplante, procurando estabelecer sua capacidade em discriminar as reativações e as infecções primárias pelo CMV.

MATERIAL E MÉTODOS

A. Casuística

Foram estudados 27 pacientes submetidos a transplante renal na Unidade de Transplante

Renal do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no período de 1972 a 1974. Estes pacientes foram estudados anteriormente no sentido de se verificar a incidência de infecção pelos vírus do Herpes simplex (VHS), vírus de Epstein-Barr (VEB) e CMV²³. A idade dos pacientes, na época do transplante, variou de 09 a 54 anos (média = 26,8), sendo 14 do sexo masculino e 13 do sexo feminino. Todos foram submetidos à imunossupressão após o transplante, com prednisona e azathioprina, conforme esquema descrito em detalhes na referida publicação²³.

B. Coleta de amostras de soro e seguimento

Os pacientes foram acompanhados por períodos que variaram de 28 a 425 dias (média de 115 dias) após o transplante. Neste período, obteve-se uma amostra de sangue pré-transplante de todos os pacientes, e uma a 6 amostras no período pós-transplante (média de 3,4 por paciente). Os soros foram mantidos congelados a -20°C.

C. Reações sorológicas

Em todas as amostras colhidas foram dosados anticorpos para o vírus de Epstein-Barr, para o vírus do Herpes simplex e para o citomegalovírus.

Em relação ao VEB foram pesquisados anticorpos IgG anti-cápsideo viral (anti-EBVCA) pela técnica de imunofluorescência indireta de HENLE & HENLE¹² usando-se como fonte de antígeno o clone PeHR1 da linhagem Jijoye. Para o vírus do Herpes simplex também foi usada a imunofluorescência indireta, servindo como fonte de antígeno a amostra Mc Intyre do VHS tipo I, inoculado em células Vero.

Para o citomegalovírus, empregou-se, para detecção de anticorpos IgG, a técnica de fixação do complemento (FC) com 50% de hemólise e como antígeno a amostra Ad 169 (Flow); para detecção de anticorpos IgM empregou-se a técnica da imunofluorescência (IF-IgM) servindo como fonte de antígeno a amostra Ad 169 do CMV mantida em culturas de células diplóides de fibroblastos de prepúcio obtidos a partir de crianças postectomizadas. O conjugado anti-IgM hu-

mano foi obtido comercialmente (Hyland Diagnostics).

Em todas as amostras de soro pesquisou-se a presença do fator reumatóide através do teste do látex. Nas amostras de soro com teste do látex positivo e pesquisa de anticorpos IF-IgM-CMV também positiva, procedeu-se à absorção do fator reumatóide com suspensão de partículas de látex sensibilizadas com IgG humana. Após a negatização do teste do látex, repetia-se a pesquisa de anticorpos IF-IgM CMV-específicos, sendo consideradas positivas somente as amostras que apresentavam títulos ≥ 5 após a absorção do fator reumatóide²⁸. Em relação à RFC, considerou-se como positivas as amostras com títulos ≥ 4 , e para a reação de IF anti-EBVCA e anti-VHS títulos ≥ 10 .

RESULTADOS

Dos 27 casos estudados, 17 (63,0%) tinham anticorpos FC presentes antes de serem submetidos ao transplante renal e 10 (37,0%) eram soronegativos.

Utilizando-se a combinação das reações de FC e pesquisa de IgM anti-CMV pela imunofluorescência indireta pode-se constatar evidência sorológica de infecção pelo CMV em 20 (74,1%) dos 27 pacientes estudados.

O comportamento dos anticorpos FC e anticorpos IgM anti-CMV nos casos de infecção primária e nas reativações das infecções pelo CMV pode ser observado na Tabela I.

O tempo de acompanhamento dos pacientes após o transplante renal foi muito variável (1 a 14 meses). Contudo, dentre os 10 pacientes com IF-IgM anti-CMV positiva que puderam ser acompanhados por mais de 4 meses, somente 1 (10,0%) negatizou o IgM durante o período de observação.

Anticorpos IgG anti-EBVCA estavam presentes em todas as 27 amostras pré-transplante. Em nenhuma das amostras houve aumento significativo dos títulos após o transplante.

Em relação ao vírus do Herpes simplex, das 27 amostras pré-transplante testadas, observou-se presença de anticorpos IgG em 23 (85,2%). Nas amostras pós-transplante não se observou variação significativa dos títulos em nenhum dos casos. Os 4 pacientes soronegativos, não apresentaram soroconversão durante o acompanhamento.

A pesquisa do fator reumatóide foi positiva em 6 dos 27 pacientes estudados (32,3%). Todos os 6 eram pacientes que apresentaram evidências sorológicas de infecção primária (1/6) ou reativação (5/6) de infecção pelo CMV, com pesquisa IgM anti-CMV positiva. Contudo, em nenhum deles houve negatização dos anticorpos IgM específicos para o CMV após a absorção do fator reumatóide.

DISCUSSÃO

A demonstração de infecção pelo CMV em 74,1% dos 27 pacientes estudados no presente

TABELA I
Comportamento dos anticorpos FC e IF-IgM CMV específicos em 27 pacientes submetidos a transplante renal

	Anticorpos FC anti-CMV antes do transplante		
	Nº (%) positivos (n = 17)	Nº (%) negativos (n = 10)	Nº (%) total (n = 27)
IgM + pré-transplante	0	0	0
Aumento significativo do título de anticorpos FC pós-transplante	12 (70,6)	5 (50,0)	17 (63,0)
Positivização do IgM anti-CMV pós-transplante	12 (70,6)	6 (60,0)	18 (66,7)
Evidências sorológicas de infecção nos primeiros 60 dias pós-transplante	9 (52,9)	4 (40,0)	13 (48,1)
Evidências sorológicas de infecção nos primeiros 90 dias pós-transplante	13 (76,5)	6 (60,0)	19 (70,4)
Total das infecções (FC + IgM)	14 (82,3)	6 (60,0)	20 (74,1)

trabalho está de acordo com as taxas observadas por numerosos investigadores que estudaram prospectivamente pacientes submetidos a transplante renal. Nestes estudos as incidências de infecção pelo CMV variaram de 43% a 92%, com média de 75%.

A maioria das infecções, tanto nos pacientes com infecção primária quanto nos pacientes previamente soropositivos, ocorreu nos primeiros 3 meses pós-transplante (Tabela I). Estes achados são concordantes com as observações de outros pesquisadores^{3, 7, 15, 26, 29, 30}.

Com poucas exceções, houve concordância entre o aumento de anticorpos FC e aparecimento de anticorpos IgM CMV-específicos. Contudo, constatou-se casos em que a infecção só foi evidenciada pelo IgM e outras em que houve aumento do título de anticorpos FC e o IgM permaneceu negativo (Tabela I). Observa-se também que entre os pacientes infectados, a maioria (14/20, 70%) já tinham anticorpos FC para o CMV antes do transplante, configurando portanto uma reativação. Todavia, a possibilidade de ocorrência de reinfecção não pode ser afastada. Em pacientes submetidos a transplante de medula estudos de epidemiologia molecular demonstraram que a infecção pós-transplante ocorre fundamentalmente por reativação de vírus já presentes antes do transplante³¹. A maior frequência de infecção pelo CMV em pacientes previamente soropositivos neste e em outros trabalhos⁸ sugere que no transplante renal o mecanismo de reativação também deve ser o mais importante.

A presença do fator reumatóide, que é um anticorpo IgM anti-IgG humano inespecífico, tem sido apontado como causa de reações falso positivas na pesquisa de anticorpos IgM²⁸. Nesta casuística, embora estivesse presente em 6 dos 18 casos com pesquisa de anticorpos IgM anti-CMV positiva, em nenhum houve modificação dos resultados após absorção do fator reumatóide. Por outro lado, a possibilidade de reações cruzadas com anticorpos resultantes de infecção pelo vírus de Epstein-Barr^{9, 11} também foi afastada no presente trabalho, já que nenhum dos 27 pacientes estudados apresentou evidência de infecção aguda pelo EBV.

Relatos anteriores^{20,26} demonstrando que, em pacientes submetidos a transplante renal e posterior imunodepressão, a detecção de IgM anti-CMV em amostras de sangue isoladas não permite a diferenciação entre infecção primária e reativação de infecção pré-existentes foram confirmados pelos resultados obtidos no presente trabalho. Isto pode ser claramente observado na Tabela I pelo aparecimento destes anticorpos em 70,6% dos pacientes com infecção prévia pelo CMV antes do transplante renal, caracterizando desta forma mecanismos de reativação ou reinfecção. Por outro lado, nos pacientes susceptíveis que apresentaram infecção primária pelo CMV no período pós-transplante, estes anticorpos foram detectados em todos os casos.

Diferindo do que ocorre em pacientes imunocompetentes, os anticorpos IF-IgM CMV-específicos nos pacientes imunodeprimidos perduram por muitos meses²⁶. Isto pode ser constatado na presente série, já que dentre os 10 pacientes com IgM positivo que puderam ser acompanhados por mais de 4 meses, somente em 1 (10%) o exame se negativou. Por isso, ao serem detectados num paciente transplantado, estes anticorpos não permitem, isoladamente, determinar com segurança a época em que ocorreu a infecção.

A demonstração recente de drogas antivirais com atividade "in vivo" contra o CMV, tais como DHPG^{2, 5, 6, 21, 27} e o Foscarnet^{1, 17}, trouxeram novas perspectivas para o controle desta infecção nos imunodeprimidos. Contudo, nos pacientes submetidos a transplante renal, as diferenças na intensidade e gravidade dos sintomas observados nas infecções primárias e nas reinfecções ou reativações de infecções latentes torna muito importante, nos protocolos de estudo destes antivirais, separar estas formas de infecção. O presente trabalho demonstra que a detecção de anticorpos IgM CMV-específicos não pode ser utilizada isoladamente com esta finalidade.

SUMMARY

Specific IgM antibodies in primary and secondary cytomegalovirus infections after renal transplantation

Twenty-seven patients who underwent renal allograft transplants were periodically screened for the presence of IgM and IgG cytomegalovirus (CMV) antibodies.

Before transplantation, 17 (63%) had IgG antibodies by complement fixation and 10 (37%) were seronegative. Immunofluorescent IgM CMV-antibodies were absent in all pre-transplant sera.

During a follow-up period of 28 to 425 days (median of 115 days), 20 (74%) developed serologic evidence of CMV infection. Of these, 6 (30%) were primary and 14 (70%) secondary (reactivation or reinfection). IF-IgM antibodies were seen in 12 out of 14 patients with secondary CMV infection and in all patients with primary infection.

IgM antibodies became negative in one out of 10 IgM-positive patients who were followed-up for 4 months or more.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APPERLEY, J. F.; MARCUS, R. E.; GOLDMAN, J. M.; WARDLE, D. G.; GRAVETT, P. J. & CHANAS, A. — Foscarnet for cytomegalovirus pneumonitis. *Lancet*, 1: 1151, 1985.
2. BACH, M. C.; BAGWELL, S. P.; KNAPP, N. P.; DAVIS, K. M. & HEDSTROM, P. S. — 9-(1, 3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine for acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 103: 381-382, 1985.
3. BETTS, R. F.; FREEMAN, R. B.; DOUGLAS JR., R. G. & TALLEY, T. E. — Clinical manifestations of renal allograft derived primary cytomegalovirus infection. *Amer. J. Dis. Child.*, 131: 759-763, 1977.
4. CHATTERJEE, S. N.; FIALA, M.; WEINER, J.; STEWART, J. A.; STACEY, B. & WARNER, N. — Primary cytomegalovirus and opportunistic infections. Incidence in renal transplant recipients. *J. Amer. med. Ass.*, 240: 2446-2449, 1978.
5. COLLABORATIVE DHPG TREATMENT STUDY GROUP — Treatment of serious cytomegalovirus infections with 9-(1, 3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine in patients with AIDS and other immunodeficiencies. *New Engl. J. Med.*, 314: 801-805, 1986.
6. FELSENTIN, D.; D'AMICO, D. J.; HIRSCH, M. S.; NEUMEYER, D. A.; CEDERBERG, D. M.; MIRANDA, P. & SCHOOLEY, R. T. — Treatment of cytomegalovirus reti-

ritis with 9-(1, 3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine. *Ann. intern. Med.*, 103: 377-380, 1985.

7. FRYD, D. S.; PETERSON, P. K.; FERGUSON, R. M.; SIMMONS, R. L.; BALFOUR JR., H. H. & NAJARIAN, J. S. — Cytomegalovirus as a risk factor in renal transplantation. *Transplantation*, 30: 436-439, 1980.
8. GLENN, J. — Cytomegalovirus infections following renal transplantation. *Rev. infec. Dis.*, 3: 1151-1178, 1981.
9. HANSHAW, J. B.; NIEDERMAN, J. C. & CHESSIN, L. N. — Cytomegalovirus macroglobulin in cell-associated herpesvirus infections. *J. infect. Dis.*, 125: 304-306, 1972.
10. HANSHAW, J. B.; STEINFELD, H. J. & WHITE, C. J. — Fluorescent-antibody test for cytomegalovirus macroglobulin. *New Engl. J. med.*, 279: 566-570, 1968.
11. HEKKER, A. C.; BRAND-SAATHOF, B.; VIS, J. & MEIJERS, R. C. — Indirect immunofluorescence test for detection of IgM antibodies to cytomegalovirus. *J. infect. Dis.*, 140: 596, 600, 1979.
12. HENLE, G. & HENLE, W. — Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bact.*, 91: 1248-1256, 1966.
13. HO, M. — Human cytomegalovirus infections in immunosuppressed patients. In: HO, M. — *Cytomegalovirus: biology and infection*. New York, Plenum Medical Book Company, 1982. p. 171-204.
14. HO, M.; SUWANSIRIKUL, S.; DOWLING, J. N.; YOUNGBLOOD, L. A. & ARMSTRONG, J. A. — The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. *New Engl. J. Med.*, 293: 1109-1112, 1975.
15. IANHEZ, L. E.; SARTURI, P. S.; PAULA, F. J. & SABBAGA, E. — Infecção por citomegalovírus pós-transplante renal. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*, 39: 47-53, 1984.
16. KANGRO, H. O. — Evaluation of a radioimmunoassay for IgM-class antibodies against cytomegalovirus. *Brit. J. exp. Path.*, 61: 512-520, 1980.
17. KLINTMALM, G.; LONNQVIST, B.; OBERG, G.; GAHRTON, G.; LERNESTEDT, J.-O.; LUNDGREN, G.; RINGDEN, O.; ROBERT, K.-H.; WAHREN, B. & GROTH, C.-G. — Intravenous foscarnet for the treatment of severe cytomegalovirus infection in allograft recipients. *Scand. J. infect. Dis.*, 17: 157-163, 1985.
18. KNEZ, V.; STEWART, J. A. & ZIEGLER, D. W. — Cytomegalovirus specific IgM and IgG response in humans studies by radioimmunoassay. *J. Immunol.*, 117: 2006-2013, 1976.
19. LANGEHUYSEN, M. M. A. C.; THE, T. H.; NIEWEG, H. O. & KAPSENBERG, J. G. — Demonstration of IgM cytomegalovirus antibodies as an aid to early diagnosis in adults. *Clin. exp. Immunol.*, 6: 387-393, 1970.

20. LINNEMANN JR., C. C.; DUNN, C. R.; FIRST, M. R.; ALVIRA, M. & SCHIFF, G. M. — Late onset of fatal cytomegalovirus infection after renal transplantation. *Arch. intern. Med.*, 138: 1247-1250, 1978.
21. MASUR, H.; LANE, H. C.; PALESTINE, A.; SMITH, P. D.; MANISCHEWITZ, J.; STEVENS, G.; FUJIKAWA, L.; MACHER, A. M.; NUSSENBLATT, R.; BAIRD, B.; MEGILL, M.; WITTEK, A.; QUINNANN, G. V.; PARRILLO, J. E.; ROOK, A. H.; ERON, L. J.; PORETZ, D. M.; GOLDENBERG, R. I.; FAUCI, A. S. & GELMANN, E. P. — Effect of 9 (1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine on serious cytomegalovirus disease in eight immunosuppressed homosexual men. *Ann. intern. Med.*, 104: 41-44, 1986.
22. NAGINGTON, J. — Cytomegalovirus antibody production in renal transplant patients. *J. Hyg. (Lond.)*, 69: 645-660, 1971.
23. PANNUTI, C. S.; CARVALHO, R. P. S.; AMATO NETO, V.; SABBAGA, E. & ANGELO, M. J. O. — Infecções por vírus do grupo Herpes em pacientes submetidos a transplante renal. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 20: 353-358, 1978.
24. PANNUTI, C. S.; STEWIEN, K. E.; CARVALHO, R. P. S.; MIRANDA, M. N.; ANGELO, M. J. O.; VILAS BOAS, L. S. & AMATO NETO, V. — Síndrome "mononucleose simle" na infância. Incidência da infecção por citomegalovírus diagnosticado através da detecção imunoenzimática de anticorpos IgM. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 25: 300-304, 1983.
25. PANNUTI, C. S.; VILAS BOAS, L. S.; ANGELO, M. J. O.; AMATO NETO, V.; LEVI, G. C.; MENDONÇA, J. S. & GODOY, C. V. F. — Cytomegalovirus mononucleosis in children and adults differences in clinical presentation. *Scand. J. infect. Dis.*, 17: 153-156, 1985.
26. PASS, R. F.; GRIFFITHS, P. D. & AUGUST, A. M. — Antibody response of cytomegalovirus after renal transplantation: comparison of patients with primary and recurrent infections. *J. infect. Dis.*, 147: 40-46, 1983.
27. SHEP, D. H.; DANDLIKER, P. S.; MIRANDA, P.; BURNETTE, T. C.; CEDERBERG, D. M.; KIRK, L. E. & MEYERS, J. D. — Activity of 9-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxymethyl guanine in the treatment of cytomegalovirus pneumonia. *Ann. intern. Med.*, 103: 368-373, 1985.
28. SHIRODARIA, P. V.; FRASER, K. B. & STANFORD, F. — Secondary fluorescent staining of virus antigens by rheumatoid factor and fluorescein-conjugated anti-IgM. *Ann. rheum. Dis.*, 32: 53-57, 1973.
29. SPENCER, E. S. — Clinical aspects of cytomegalovirus infection in kidney-graft recipients. *Scand. J. infect. Dis.*, 6: 315-323, 1974.
30. SUWANSIRIKUL, S.; RAO, N.; DOWLING, J. N. & HO, M. — Primary and secondary cytomegalovirus infection. Clinical manifestations after renal transplantation. *Arch. intern. Med.*, 137: 1026-1029, 1977.
31. WINSTON, D. J.; HUANG, E-S.; MILLER, M. J.; LIN, C-H.; HO, W. G.; GALE, R. P. & CHAMPLIN, R. E. — Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections associated with bone marrow transplantation. *Ann. intern. Med.*, 102: 16-20, 1985.

Recebido para publicação em 08/07/87.