

ARTÍCULO  
ORIGINAL

QFB. Natividad Navarrete  
Delgadillo<sup>1</sup>  
QFB. Myriam Villanueva  
Méndez<sup>1</sup>  
QFB. Elsa Álvarez Manilla  
Toquero<sup>1</sup>  
Rafael García González<sup>2,3</sup>

## Detección de *citomegalovirus* humano en el paciente pediátrico.

### RESUMEN

La infección por CMVH continúa siendo una complicación seria en receptores de trasplantes sólidos y de médula ósea, así como en pacientes inmunocomprometidos. En los últimos años se hicieron grandes avances en su diagnóstico. En el presente trabajo se llevó a cabo la detección de este virus, a través de la determinación del ARNm de pp67 basada en la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), determinación de antigenemia (pp65), determinación de anticuerpos del tipo de IgG e IgM, en un grupo de 58 pacientes, con un rango de edad de menos de 1 año a 18 años. En los resultados el mayor índice de positividad se encontró en los menores de 5 años. El 92% fueron positivos para pp65, 53% positivos para pp67, 62% positivos para IgM y el 100% de positividad para IgG del total de los pacientes estudiados, y se demostró su contacto con antígenos de CMVH. En conclusión, a través de estas 4 determinaciones, se pudo evidenciar en 19 pacientes el paso de infección a enfermedad ocasionada por CMV.

**Palabras claves:** Amplificación, antigenemia, inmunosupresión, NASBA,

### ABSTRACT.

Cytomegalovirus infection still being a serious complication in solid organ and bone marrow transplant recipients and patients immunocompromised. In the last years, great advances have been made in the diagnosis of cytomegalovirus infection. It was studied by qualitative determination of pp67 mRNA by nucleic acid sequence based amplification (NASBA), antigenemia (pp65) and detection of IgG and IgM, one series of 58 patients. The prevalence of evidence of CMVH infection in 58 patients was high in < 1 to 5 years old. The positive of antigenemia, NASBA, IgG and IgM were 92,53,62 and 100 %, respectively. In conclusion, it's clear from our results that the antigenemia is positive more frequently than the NASBA assay and the NASBA assay was able to distinguish infection from disease in 19 patients.

**Key words:** Amplification, antigenemia, immunosuppression, NASBA.

- 1 Laboratorio de Virología, Departamento de Análisis Clínicos y Exámenes Especiales, Instituto Nacional de Pediatría. SS.
- 2 Departamento de Análisis Clínicos y Exámenes Especiales. Instituto Nacional de Pediatría. SS
- 3 Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

## INTRODUCCIÓN.

El Citomegalovirus (CMV) tipo 5, es miembro de la Familia *Herpesviridae*, subfamilia *herpesvirinae*. Se caracteriza por poseer ácido desoxirribonucleico de doble cadena, de tipo lineal, con una longitud de 245 kilo bases (Kb). Su genoma está dividido en dos fragmentos, uno corto (US) y otro largo (UL), unidos por secuencias repetidas, que lo capacitan para presentar 4 isómeros. Está cubierto por una nucleocapside de simetría icosaédrica, la que a su vez, está rodeada por un tegumento amorfo o matriz, compuesto principalmente de fosfoproteínas de diferente peso molecular, y actividad inmunogénica. Al CMV lo cubre una envoltura fosfolípida, trilaminar, en la que se encuentran además, glicoproteínas.<sup>1</sup>

El CMV es ubicuo y se adquiere por contacto de persona a persona, afecta entre el 40 al 80 % de los sujetos de más de 40 años de edad. Es causa de procesos infecciosos de tipo primario y recurrente, como consecuencia de su capacidad para presentar un estado de latencia. En cualquier tipo de infección, el CMV se replica, por lo que existe un proceso infeccioso activo, que produce una amplia variedad de manifestaciones clínicas. Lo que ocasiona elevación en la morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, y en aquellos que son receptores de trasplante de órganos sólidos y médula ósea.<sup>2</sup>

El diagnóstico etiológico en los procesos infecciosos que ocasiona el CMV, es crucial para la toma de decisiones terapéuticas, si se considera que con el tratamiento específico, se reduce la gravedad y mortalidad de la enfermedad producida por el CMV en pacientes transplantados, así como en la terapia profiláctica y preventiva.<sup>3</sup>

En los últimos años se realizaron grandes avances en el área de virología diagnóstica. Entre los procedimientos empleados, actualmente se cuenta con las reacciones serológicas, encaminadas a la detección de IgM e IgG, ya sea de anticuerpos totales en contra del CMV o de manera independiente.<sup>4</sup> Por otro lado, se emplea el cultivo clási-

co, la identificación inmunológica de antígenos obtenidos por gradiente de centrifugación en cultivos *Shell* vial.<sup>5</sup> La determinación de antigenemia, a través de la detección en leucocitos de sangre periférica de portadores de la fosfoproteína estructural temprana 65 (pp65) con el empleo de anticuerpos monoclonales, la que con títulos altos, relaciona bien con síntomas específicos de infección por CMV.<sup>3,6-8</sup> Otros procedimientos empleados incluyen; la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cualitativa y cuantitativa, en leucocitos de sangre periférica, con el fin de detectar ADN del CMV.<sup>9-11</sup> A estos sistemas se les suma la determinación temprana y directa de ARNm para la fosfoproteína de matriz 67 (pp67), codificada por el gene UL65 del segmento UL, expresada durante la replicación viral y no en el estadio de latencia del virus, en una variedad de muestras de tejidos humanos y líquidos corporales.<sup>3,9,12,13</sup>

El objetivo del presente trabajo tuvo como finalidad, correlacionar los diferentes procedimientos de diagnóstico a fin de determinar el estado infeccioso latente (ausencia de expresión de pp67) o de enfermedad por CMV (caracterizado por la existencia de niveles altos de pp67) en el paciente, de acuerdo a la literatura y a los hallazgos encontrados en muestras enviadas para su estudio.

## MÉTODO:

Detección directa cualitativa de la proteína temprana 65 (pp65), a partir de leucocitos de sangre periférica (sangre total con anticoagulante EDTA), y el empleo del equipo CMV-Vue Kit, de *DiaSorin*; que incluye anticuerpos monoclonales (IgM) para CMV, conjugado HRP, solución de cromógeno / sustrato, como colorante de contraste se empleó hematoxilina. La lectura de las laminillas se efectuó con un microscopio de luz *Leitz Labor Luxs*.

Se realizó la prueba inmunoenzimática para la detección de anticuerpos IgM e IgG humanos contra Citomegalovirus (CMV), en suero o plasma (con EDTA, citrato o heparina) obtenidas de acuer-

do a la técnica estándar del laboratorio y el empleo de; Enzygnost Anti CMV IgG e IgM de *Behring ELISA* utilizando BEP 2000.

Se utilizó el Sistema NASBA. La extracción, amplificación y detección de ARNm para pp 67, que fueron realizadas con el empleo del sistema CMV-NASBA (*Biomérieux*).

En la extracción del ácido nucleico se empleó la tecnología de fase sólida, con uso de sílica como lo describe Boom y colaboradores.<sup>14</sup>

Amplificación: Los iniciadores empleados permitieron la amplificación del ARNm que codifica para la fosfoproteína pp67. Se llevó a cabo la reacción NASBA, como lo describe Gerna y colaboradores.<sup>15</sup>

La detección del producto amplificado se realizó por electro quimioluminiscencia, se empleó una sonda de captura biotinada específica para ARNm pp67 (CMV pp67 CAP1) unida a perlas magnéticas cubiertas con estreptovidina y moléculas de un complejo electro quimioluminiscente (ECL) (Tris [ 2-2 bipiridinal ] rutenio [II]- sonda de oligonucleótidos marcado, específico para ARN WT pp67 [CMV pp67 ECL1] o ARN del SC (SC-EC11)

## RESULTADOS:

Entre enero del año 2000 a septiembre de 2003, se sometió a la detección de CMV, muestras clínicas de sangre tratadas con anticoagulante y suero de 58 pacientes (el número de muestras recibidas por paciente, fueron en promedio de dos) con un rango de edad de 2 meses a 18 años, de ambos sexos, a fin de descartar la presencia de CMV.

Los resultados permitieron observar que la mayor incidencia de detección se encontró en pacientes menores de 5 años de edad, con predominio del sexo femenino. (Fig. 1 y 2) El número de muestras recibidas fue en promedio de dos por paciente.

16 de 30 pacientes (53%) fueron positivos en la detección de ARNm de la fosfoproteína 67 (pp 67) y

en 38 de 39 (92%) los resultados fueron positivos para el antígeno pp 65. La determinación de IgM resultó positiva en 29 de 47 pacientes (62%), en tanto que para IgG el porcentaje de positividad correspondió al 100% en 34 muestras clínicas (Tabla 1).

Tomando en cuenta a 19 pacientes en los que se realizaron las cuatro determinaciones, los resultados obtenidos, fueron los siguientes; positivos a pp65 84%, pp67 53%, IgM 42% e IgG 95% (Tabla 2).

De los 58 pacientes estudiados, en 10 se obtuvo la confirmación de infección activa, en base a la evidencia de replicación viral (pp67 positiva), cuatro de ellos con diagnóstico de insuficiencia renal, sometidos a transplante, uno con artritis reactiva por CMV, otro con tumor rabdoide y neumonía, y el séptimo con retraso en el crecimiento intrauterino. Cinco recibieron tratamiento antiviral (ganciclovir a una dosis que fue de 5 a 12 mg/k/día, el sexto recibió ganciclovir 10 mg/k/día y aciclovir 750 mg/m/día y el séptimo factor de transferencia acompañado de cloroquina), de los que en solo uno de ellos (con transplante renal), no se observó negativización de pp67. En los tres pacientes restantes, aún cuando nos fueron sometidos a tratamiento antiviral específico, se negativizó pp65 y pp67 (Tabla 3).

Sobre la base de los cuatro exámenes, se formaron 11 grupos, siendo el más abundante aquel que presentó los 4 exámenes positivos, y dos grupos con pp 65 y pp67 positivos y variantes en los resultados sobre IgG e IgM.

**Tabla 1. Resultados de la determinación de CMV**

DETERMINACION	POSITIVO	NEGATIVO
pp 65	36/39 (92%)	3/39 (8%)
pp 67	16/30 (53%)	14/30 (47%)
Ig M	29/47 (62%)	18/47 (38%)
Ig G	34/34 (100%)	0/34 (0 %)

**Tabla 2. Resultados de 19 pacientes a los que se les realizaron 4 exámenes**

Determinación	Positivos
pp 65	86 %
pp 67	47 %
Ig M	38 %
Ig G	95 %

## DISCUSIÓN.

Se considera al Citomegalovirus como agente exitoso, que produce infección diseminada. Sin embargo, rara vez ocasiona la muerte de su hospedero, generando una infección crónica mientras se mantiene en estado de latencia.<sup>16</sup>

La infección por este microorganismo es común en la mayoría de la población, se observa una seroprevalencia que va del 40 al 100% en los habitantes de países en desarrollo.<sup>16</sup> Población que adquiere esta infección en etapas tempranas de la vida, a diferencia de lo observado en países desarrollados.<sup>17</sup>

En el presente trabajo se pudo confirmar este hecho, en los pacientes estudiados. La infección se

detectó en pacientes menores de un año y el grupo etario más afectado fue el comprendido entre uno a cinco años de edad. (Fig. 1)

Se ha observado que el paso de la infección a enfermedad por CMV es excepcional, mientras persiste el equilibrio entre la relación virus-hospedero.<sup>18</sup> Cuando este equilibrio se rompe a favor del agente infeccioso, como sucede en el paciente inmunocomprometido, e incluye aquellos con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y receptores de transplante de órgano sólido y médula ósea, dicha relación se transforma en enfermedad.<sup>6,19</sup>

El CMV puede encontrarse en múltiples sitios, entre los que se incluyen; glándulas salivales, riñón, hígado, retina, estómago, cerebro y pulmón. Se considera al CMV como el agente infeccioso causal más común de retraso mental, sordera sensorial congénita, y de neumonía.<sup>5,20</sup>

Como consecuencia de la importancia que tiene el CMV desde el punto de vista clínico y epidemiológico, es esencial el diagnóstico del laboratorio.<sup>5</sup>

Para lo que se emplean diferentes metodologías, entre las que se incluyen; el estudio histológico para

**Tabla 3. Características generales de pacientes con pp 65 y pp67 positivos.**

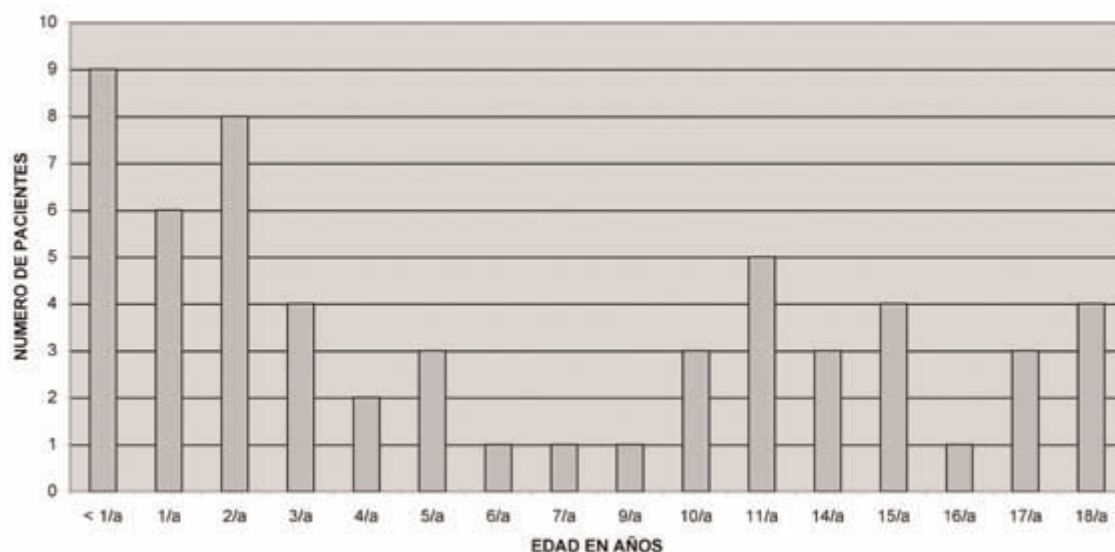
PACIENTE	pp 65	pp 67	IgM	IgG	DIAGNÓSTICO
1	(+)	(+)	(+)	(+)	Insuficiencia renal crónica, transplante renal.
2	(+)	(+)	(+)	(+)	Insuficiencia renal, transplante renal, rechazo agudo de transplante.
3	(+)	(+)	(-)	(+)	Transplante renal, neumonía intersticial.
4	(+)	(+)	(-)	(+)	Transplante renal.
5	(+)	(+)	(+)	(+)	Tumor rabdoide teratoide extra renal.
6	(+)	(+)	(+)	(+)	Artritis reactiva por CMV
7	(+)	(+)	(+)	(+)	Retraso de crecimiento intrauterino por CMV.
8	(+)	(+)	(+)	(+)	Meningitis aséptica.
9	(+)	(+)	(+)	(+)	Infección por CMV.
10	(+)	(+)	(+)	(+)	Síndrome colestásico prolongado.

la búsqueda de inclusiones intranucleares en cultivos de fibroblastos humanos, la detección rápida de antígenos tempranos mediante anticuerpos monoclonales, con el empleo del sistema de cultivo en laminillas con centrifugación a baja velocidad (Shell vial)<sup>5</sup>, pruebas inmunoenzimáticas para la determinación de IgM e IgG<sup>4,21,22</sup> determinación de antigenemia en leucocitos de sangre periférica buscando la fosfoproteína 65,<sup>3,6,8,12</sup> la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cualitativa y cuantitativa<sup>12,23</sup> y detección de ARNm tardío de la fosfoproteína pp 67 con el sistema NASBA.<sup>3,12,14</sup>

De estos procedimientos, se considera al cultivo como el estándar de oro en la búsqueda de CMV. Sin embargo, es laborioso y el resultado se obtiene tardíamente.<sup>5,19</sup> Por lo que estos procedimientos se reemplazaron en aquellos laboratorios que carecen de estas técnicas, por metodologías serológicas y moleculares. Sin embargo, del resto de los procedimientos empleados, ninguno de ellos correlaciona consistentemente con la replicación actual del virus in vivo, excepto la detección del ARNm de la pp67, donde la

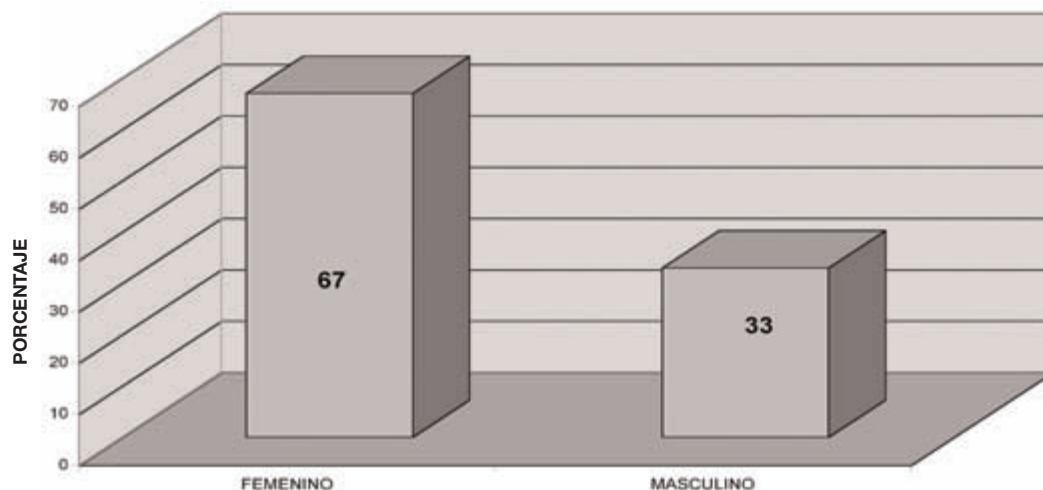
presencia del transcrito, refleja la replicación del virus. Esta condición es indispensable de la diseminación y enfermedad, además, de ser un marcador que se presenta en infección primaria o durante la reactivación del CMV.<sup>3,15</sup> Por lo que se puede afirmar, que de los 19 pacientes estudiados a través de las cuatro determinaciones, 10 de ellos, presentaron la reacción positiva para pp67, y son pacientes en los cuales la infección pasó a enfermedad, como se pudo confirmar a través de estos procedimientos. Se determinó que la existencia de CMV en ellos, se encuentra en proceso activo de replicación. El seguimiento de estos pacientes sometidos a tratamiento con ganciclovir, permitió observar la negativización de esta prueba en 5 de ellos. En tanto que en uno de los pacientes, a pesar de encontrarse bajo tratamiento, la prueba para determinar pp67 resultó positiva, lo que nos demuestra la actividad de replicación de CMV, y se observó evidencias de rechazo de trasplante renal en uno de ellos.

Se ha referido que el tratamiento a base de los tres antivirales generalmente usados en contra de



**Figura 1.** Frecuencia de CMV por edad.





**Figura 2.** Porcentaje de pacientes estudiados

CMV; ganciclovir, foscarnet y cidofovir, permite el surgimiento de variantes resistentes que mapean en el segmento UL97 que codifica para la fosfotransferasa o en el gene de la ADN polimerasa en pacientes con transplante de órganos sólidos<sup>24</sup> y de médula ósea<sup>25</sup>. En el caso de ganciclovir que se emplea en la profilaxis y tratamiento en receptores de transplante, este parece conducir a la selección inicial de variantes resistentes a este medicamento<sup>24</sup>. Ya que en pacientes sometidos a tratamiento profiláctico con ganciclovir, se observó replicación persistente.<sup>25</sup> Proceso demostrado por estos autores a través del estudio fenotípico y genético del CMV resistente a los antivirales referidos. En el presente trabajo únicamente se puede suponer la posibilidad de estar ante este fenómeno.

La detección directa del antígeno pp65 a partir de células de sangre periférica, se considera de alta sensibilidad, y permite predecir el desarrollo de la enfermedad y la respuesta a los antivirales.<sup>3</sup> Los resultados que obtuvimos dieron en los 19 pacientes sometidos a las cuatro determinaciones el 84% de positividad a este antígeno y se observó su persistencia ante la previa negatividad de pp67.

En resumen se puede decir, que por los resultados de la determinación de pp67, ésta constituye

una herramienta fundamental para el diagnóstico de enfermedad por CMV, que correlaciona bien con la antigenemia (detección de pp65), manteniéndose esta prueba positiva más tiempo que pp67, ya que la detección de esta última, nos señala replicación in vivo de CMV.

Por otro lado, la detección de IgG, con elevada frecuencia, indica que el contacto que el paciente tuvo con el microorganismo estudiado.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Mocarsk ES. Cytomegaloviruses and their replication. In; Fields DN, Knipe DM, Howley PM (ed). Fields Virology. Their Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996, pp 2447-81.
2. Britt WJ and Alford CA. Cytomegalovirus. In; Fields BN, Knipe DM, Howley PM (ed). Fields Virology. Their Edition. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. 1996, pp 2493-522.
3. Degre M, Kristiansen KI, Rollag H, Holter E and Nordal KP. Detection of human cytomegalovirus (HCMV) pp67-mRNA and pp65 antigenemia in relation to development of clinical HCMV disease in renal transplant recipients. J Clin Microbiol. 2001; 7:254-60.
4. Cho S. Newer methods for diagnosis of Cytomegalovirus infection. Rev Infect Dis. 1983; 12 (7) : 727-36.
5. Hernández CP, Demmler GJ. Diagnóstico por cultivo de tejidos del citomegalovirus. Infectología. 1988; 8 (4): 205-12.
6. Hayada K, Wunderli W, Deffernez C, Martín PY, Mentha G, Binet I, Perrin L and Kaiser L. Monitoring of Cytomegalovirus infection in solid-organ transplant recipients by an ultrasensitive plasma PCR assay. J Clin Microbiol. 2003; 41 (8): 3757-64.
7. Li H, Dummer JS, Estes WR, Meng S, Wright PF and Tang Y-W. Mea-

surement of human Cytomegalovirus loads by quantitative Real-Time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (1): 187-91.

8. Lervez-Ville M, Ouachée M, Delarue R, Sauget A-S, Blanche S, Buzyn A and Rouzioux C. Monitoring Cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a Real-Time PCR assay performed with blood plasma. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (5): 2040-46.

9. Revello MG, Lilleri D, Zavattoni M, Furione M, Middeldorp J and Gerna G. Prenatal diagnosis of congenital human Cytomegalovirus infection in amniotic fluid by nucleic acid sequence-based amplification assay. *J Clin Microbiol.* 41 (4): 1772-74.

10. Tarragó D, Queveda C. Different Cytomegalovirus glycoprotein B genotype distribution in serum and cerebrospinal fluid specimens determined by a novel multiplex nested PCR. 2003; 41 (7) 2872-77.

11. Ikewaki J, Ohtsuka E, Kawano R, Ogata M, Kikuchi H and Nasu M. Real-Time PCR assay compared to nested PCR and antigenemia assays for detecting Cytomegalovirus reactivation in adult T-cell leukemia-lymphoma patients. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (9): 4382-87.

12. Caliendo AM, Yen-Lieberman B, Baptista J, Andersen J, Crumpacker C, Schuurman R, Spector SA, Bremer J and Lurain N. Comparison of molecular tests for detection and quantification of cell-associated Cytomegalovirus DNA. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (8): 3509-13.

13. Hebart H, Rudolph T, Loeffler J, Middeldorp J, Ljubicic T, Jahn G and Einsele H. Infections post transplant. Evaluation of the NucliSens CMV pp67 assay for detection and monitoring of human cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation bone marrow transplantation. 2002; 30:181-87.

14. Gerna G, Baldanti F, Middeldorp JM, Furione M, Zavattori M, Lilleri D and Revello MG. Clinical significance of expression of human Cytomegalovirus pp 67 late transcript in heart, lung and bone marrow transplant recipients as determined by nucleic acid sequence-based amplification. *J Clin Microbiol.* 1999; 37 (4): 902-11.

15. Ho M. Epidemiology of Cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis.* 1990; 12 (s7): 701-10.

16. Sánchez CP y Pelayo CR. Múltiples estrategias de evasión de la respuesta inmune por Citomegalovirus humano: Mecanismos moleculares. *LABacta.* 1996; 8:65-73.

17. Grundy JE. Virologic and pathogenetic aspect of Cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis.* 1990. 12 (s 7): 711-19.

18. Weinberg A, Schissel D and Giller R. Molecular methods for Cytomegalovirus surveillance in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (11): 4203-6.

19. Connolly MG, Baughman RP, Dohn M and Linneman CC. Recovery of viruses other than Cytomegalovirus from bronchoalveolar lavage fluid. *Chest.* 1994; 105: 1775-81.

20. Merigan TC and Resta S. Cytomegalovirus: Where have we been and where are we going? *Rev Infect Dis.* 1990; 12 (7): 693-700.

21. Sipewa MJ, Goubau P and Bodéus M. Evaluation of a Cytomegalovirus glycoprotein B recombinant enzyme immunoassay to discriminate between a recent and a past infection. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (10): 3689-93.

22. Stocher M and berg J. Normalized quantification of human Cytomegalovirus DNA by competitive Real-Time PCR on the light cycler instrument. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (12): 4547-53.

23. Lurain NS, Sangeeta MB, Pursell KJ, Avery RK, Yeldandi VV, Isada CM, Robert ES, JohnDJ, Arens MQ, Garrity ER, Taege AJ, Mullen MG, Todd KM, Bremer JW and Yen-Lieberman B. Analysis and characterization of antiviral Drug-resistant Cytomegalovirus isolates from solid organ transplant recipients. *J Infect Dis.* 2002; 186:760-8.

24. Hamprecht K, Eckle T, Prix L, Faul C, Einsele H and Jahn G. Ganciclovir-resistant Cytomegalovirus disease after allogeneic Stem cell transplantation: Pitfalls of phenotypic diagnosis by In vitro selection of an UL97 mutant strain. *J Infect Dis.* 2003; 187:139-43.

25. Razonable RR, Cruijen HV, Brown RA, Wilson RA, Hermesen WS, Weisner RH, Smith TF and Paya CV. Dynamics of Cytomegalovirus replication during preemptive therapy with oral ganciclovir. *J Infect Dis.* 2003; 187: 1801-8