

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/13555164>

Cytomegalovirus infection diagnosis measuring antibodies against the virus or the antigen presence in peripheral leukocytes

Article in *Revista médica de Chile* · June 1998

Source: PubMed

CITATION

1

READS

49

3 authors, including:



José Gutiérrez-Fernández

University of Granada

472 PUBLICATIONS 3,973 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Correlación entre la presencia de anticuerpos y antígeno de citomegalovirus en los leucocitos de sangre para el diagnóstico de la infección activa primaria

José Gutiérrez F, Gonzalo Piédrola A, Carmen Maroto V.

Cytomegalovirus infection diagnosis measuring antibodies against the virus or the antigen presence in peripheral leukocytes

Background: The diagnosis of cytomegalovirus infections measuring IgG or IgM antibodies has a high rate of false positive or negative results, specially in immunocompromised patients. **Aim:** To compare the diagnostic yield of antibodies against cytomegalovirus with the measurement of the antigen in peripheral leukocytes. **Material and methods:** Forty three blood samples coming from pediatric patients with suspected cytomegalovirus infections were analyzed. Low affinity IgG and IgM antibodies against Epstein Barr virus and cytomegalovirus, using indirect ELISA assays, and the virus antigen in peripheral leukocytes, using a commercial immunoperoxidase assay, were measured. **Results:** Seven patients had positive IgM antibodies against cytomegalovirus. In five of these the viral antigen was detected in peripheral leukocytes. Twenty patients had positive antibodies against Epstein Barr virus, and in 16 patients all serologic tests were negative. **Conclusions:** There is not a good correlation between antibodies against cytomegalovirus and the detection of its antigen in patients with acute infections.

(Key-words: Cytomegalovirus infectious; Antibodies, viral; Leukocytes)

Recibido el 11 de diciembre, 1996. Aceptado en versión corregida el 19 de marzo, 1998.
Departamento de Microbiología, Hospital Universitario San Cecilio, Universidad de Granada, España.

El citomegalovirus (CMV) es un herpesvirus de amplia distribución entre la población. Produce primoinfecciones asintomáticas en la mayor parte de los casos y un escaso número de infec-

ciones con síntomas, que son más frecuentes cuanto mayor es la edad del individuo. Su capacidad para permanecer en el sujeto produciendo infecciones latentes le permite tener reactivaciones, con síntomas clínicos o no, las primeras más frecuentes en inmunodeprimidos¹.

El diagnóstico indirecto de la enfermedad mediante la investigación de IgG o IgM no

Correspondencia a: Dr. José Gutiérrez, c/ Camino Bajo de Huetor 84, 1ªA. 18008 Granada, España. Fax: 34-58-246119.

resuelve todos los diagnósticos por existir falsos positivos y negativos, sobre todo en enfermos inmunodeprimidos¹⁻². El cultivo del virus mediante *shell-vials* tiene el inconveniente, sobre todo, de la interpretación clínica de un resultado positivo, pues la detección viral no necesariamente implica presencia de enfermedad. Esto se debe a las particulares características patogénicas de este virus el cual, por establecer una infección persistente de tipo latente, puede reactivarse, permitiendo la detección del virus en alguna secreción corporal, pero sin que esto determine manifestaciones clínicas³. Estos problemas se han pretendido evitar mediante la cuantificación en los leucocitos del ADN o del antígeno vírico⁴⁻⁶. En este trabajo se realiza un estudio comparativo entre la detección de anticuerpos y del antígeno de CMV en la enfermedad por éste de sujetos no inmunodeprimidos para conocer su grado de relación y eficacia diagnóstica.

MATERIAL Y MÉTODO

Pacientes. Durante 1994 y 1995 se estudió una muestra de 10 ml de sangre con EDTA de 43 enfermos (edad 15 ± 5 años) no inmunodeprimidos, asistidos en los Servicios de Pediatría y Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario San Cecilio para excluir la enfermedad actual por CMV o virus de Ebstein-Barr (VEB). En el momento del estudio el tiempo de evolución de la enfermedad fue entre 10 y 15 días. Los enfermos presentaron dos o más de los siguientes signos o síntomas clínicos: fiebre, adenopatía y linfomonocitosis.

Técnicas. A partir del plasma se investigaron los anticuerpos anti-CMV y anti-VEB. Se separaron las células blancas mediante dextrano y posterior lisis hipotónica según técnica ya descrita⁷. A partir de las mismas se investigó la presencia del antígeno de CMV. Retrospectivamente, los enfermos se clasificaron en los grupos 1: infección aguda por CMV, 2: infección aguda por VEB, y 3: ninguna de los anteriores, en base a un mayor número de resultados de laboratorio indicativos de esa infección. Se calculó la eficacia diagnóstica de la investigación de anticuerpos y de antígeno para el diagnóstico de la enfermedad por CMV.

Anticuerpos frente a CMV y VEB. Se estudió la presencia de IgM, IgG e IgG de baja avidez por el antígeno (Behring, Alemania)⁸⁻¹⁰. La IgM fue determinada mediante un ELISA indirecto previo tratamiento de la muestra con anti-IgG (Behring, Alemania). El resultado se consideró positivo cuando la absorbancia obtenida en las muestras superó el valor 0,2.

Para la investigación de la IgG de baja avidez, la determinación de IgG se realizó, mediante un ELISA indirecto, en una ocasión sin sustancia desnaturizante y, en otra, con urea 8 molar. Ésta se adicionó en el ensayo durante 10 minutos tras la incubación de las muestras. Para conocer la cantidad de IgG de baja avidez por el antígeno se sustrajeron los valores obtenidos mediante ambas formas (con y sin urea) y se refirieron en porcentajes respecto del total de IgG. La presencia de porcentajes de IgG de baja avidez por el antígeno en cantidad igual o superior al 55% se consideró indicativo de primoinfección reciente.

Los ensayos se realizaron en dos ocasiones, utilizándose el valor medio obtenido, siempre que no hubiera dispersión superior al 10%.

Antígeno de CMV. Se estudió mediante un ensayo comercial (Incstar, EEUU) de inmunoperoxidasa indirecta que emplea anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la proteína estructural de 65 kDa presente en los leucocitos. Se cuantificó el resultado cuando éste fue positivo y se expresó como el número de células infectadas por 2×10^5 leucocitos examinados.

RESULTADOS

Hubo 7 casos de enfermedad por CMV (grupo 1), 20 casos de enfermedad por VEB (grupo 2) y 16 casos de etiología diferente a CMV o VEB. Dentro del grupo 1 no se encontró antígeno del virus en un enfermo y en 2 no se detectaron IgG anti-CMV ni el antígeno. Dentro del grupo 2 un enfermo tuvo IgM anti-CMV, pero no tenía IgG de baja avidez (Tabla 1). La eficacia de cada prueba para el diagnóstico de enfermedad primaria por CMV se refleja en la Tabla 2.

Tabla 1. Resultados obtenidos en las pruebas de anticuerpos y antigenemia aplicadas a los enfermos

Caso clínica	Enfermedad	Citomegalovirus			Virus de Epstein-Barr	
		IgM	IgG de baja avidez (%)	Antigenemia*	IgM	IgG de baja avidez (%)
1	CMV	+, 0,3	88	40	-	0
2	CMV	+, 0,4	99	0	-	0
3	CMV	+, 0,3	69	76	-	0
4	CMV	+, 0,4	77	40	-	0
5	CMV	+, 0,3	98	35	-	0
6	CMV	+, 0,3	0	0	-	0
7	CMV	+, 0,3	0	0	-	0
8	VEB	-	20	0	+, 0,3	67
9	VEB	-	0	0	+, 0,4	79
10	VEB	-	0	0	+, 0,3	99
11	VEB	-	0	0	+, 0,3	68
12	VEB	-	0	0	+, 0,3	78
13	VEB	-	0	0	+, 0,5	99
14	VEB	-	0	0	+, 0,5	77
15	VEB	+, 0,2	40	0	+, 0,3	89
16	VEB	-	0	0	+, 0,3	99
17	VEB	-	0	0	+, 0,6	99
18	VEB	-	0	0	+, 0,3	99
19	VEB	-	0	0	+, 0,3	98
20	VEB	-	0	0	+, 0,4	89
21	VEB	-	0	0	+, 0,3	60
22	VEB	-	0	0	+, 0,3	65
23	VEB	-	0	0	+, 0,3	80
24	VEB	-	0	0	+, 0,5	79
25	VEB	-	0	0	+, 0,5	88
26	VEB	-	0	0	+, 0,3	89
27	VEB	-	0	0	+, 0,3	99
28	OC	-	0	0	-	0
29	OC	-	0	0	-	0
30	OC	-	0	0	-	0
31	OC	-	0	0	-	0
32	OC	-	0	0	-	0
33	OC	-	0	0	-	0
34	OC	-	0	0	-	0
35	OC	-	0	0	-	0
36	OC	-	0	0	-	0
37	OC	-	0	0	-	0
38	OC	-	0	0	-	0
39	OC	-	0	0	-	0
40	OC	-	0	0	-	0
41	OC	-	0	0	-	0
42	OC	-	0	0	-	0
43	OC	-	0	0	-	0

*número de células infectadas por cada 2×10^5 leucocitos.

CMV= citomegalovirus; VEB= virus Epstein-Barr; OC= otra causa.

Tabla 2. Eficacia diagnóstica de las pruebas en la enfermedad por citomegalovirus

	IgM	IgG de baja avidez	Antigenemia
Sensibilidad	100	71,4	57,1
Especificidad	97,2	100	100
Valor Predictivo Positivo	87,5	100	100
Valor Predictivo Negativo	100	94,7	92,3

DISCUSIÓN

El diagnóstico de laboratorio de la enfermedad por CMV no está resuelto por múltiples causas, principalmente por la capacidad de persistir y de reactivarse en el sujeto de forma espontánea o en el curso de otras infecciones. Si estas reactivaciones ocurren en sujetos inmunodeprimidos es de gran importancia plantearse realizar profilaxis o tratamientos específicos. Junto a los marcadores indirectos de la infección, recientemente se ha descrito que es posible la investigación de ADN de CMV en leucocitos de la sangre y plasma de forma cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa. No se ha establecido el punto de corte de la prueba a partir del cual se puede decir que el resultado positivo indica enfermedad¹¹⁻¹⁶.

En nuestro trabajo se investiga la eficacia de diferentes pruebas de laboratorio en una población de sujetos sin inmunodepresión adquirida. El interés del estudio radica, entre otras cosas, en la necesidad de conocer la etiología de procesos infecciosos con una sintomatología similar en muchos casos, más que en el análisis de los resultados falsamente positivos que surgen por reactivaciones víricas asintomáticas en los inmunodeprimidos. En nuestra serie, en los enfermos del grupo I la eficacia de la detección de antígeno podría ser inferior a la investigación de los anticuerpos. El antígeno no fue detectado en 3 de los 7 enfermos, lo que se pudo deber al tiempo de evolución de la enfermedad, a la necesidad de utilizar anticuerpos que detecten otras proteínas de degradación tardía del virus para evitar los falsos negativos, a tener que tomar más muestras para mejorar su rendimiento o a que se trata de sujetos inmunocompetentes los cuales rápidamente neutralizan el antígeno. Desde el punto de vista meto-

dológico esta prueba fue bastante más compleja en comparación a la investigación de anticuerpos. Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros autores en el diagnóstico de infección neonatal⁶, en los que la sensibilidad llegó al 100%. Las diferencias se pudieron deber a la distinta población estudiada (quizás entre los recién nacidos la viremia es más intensa porque tienen una inmunodepresión selectiva para ese antígeno) y a la metodología usada para detectar el antígeno.

Los mejores resultados se obtuvieron con la investigación de anticuerpos, aunque: 1º) en dos casos no se detectaron IgG anti-CMV, con IgM positiva anti-CMV, por la precocidad en la realización de la prueba. Aunque, con posterioridad, se pudo confirmar la seroconversión de la IgG, la IgM fue el único marcador positivo inicialmente; y 2º) en un caso de enfermedad por VEB se encontró IgM anti-CMV. Esta podría tratarse de: 1º) una IgM residual, por una infección previa por CMV ya que la IgG de baja avidez estaba algo elevada sin llegar a ser significativa; o 2º) una respuesta heteróloga entre CMV y VEB por reactivación del primero o reactividad sérica compartida entre ambos.

En resumen, en el curso de la enfermedad primaria por CMV en inmunocompetentes no siempre se encuentra una correlación entre los marcadores indirectos y la presencia de antigenemia, en detrimento de esta última. La investigación de IgM es un marcador sensible aunque es incapaz de diferenciar entre enfermedad actual o pasada; o una reacción heterotípica. Por esto aconsejamos que, en base a la metodología utilizada, todo resultado positivo de IgM se debe completar su determinación con los estudios de la avidez de la IgG. Esto permitiría diferenciar infección reciente o pasada, siempre que exista IgG. En los ensayos de antigenemia, la detección de la proteína 65 se debe unir a otras de aparición más tardía y estudiar más de una muestra. Todo esto encarece la prueba y retrasa el resultado. No obstante, estos planteamientos diagnósticos podrían verse modificados debido a: 1º) nuevos estudios con un mayor número de muestras positivas para CMV y 2º) la utilización de nuevos métodos para el diagnóstico de la enfermedad por CMV.

REFERENCIAS

1. HO M. *Cytomegalovirus, biology and infection*. 2ª ed. New York: Plenum Medical Book Company, 1991.
2. GUTIÉRREZ J, MAROTO C, PIÉDROLA G. Evaluation of a new reagent for anti-cytomegalovirus and anti-Epstein-Barr virus IgG. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2603-5.
3. RABELLA N, PÉREZ JL, PUMAROLA T. El laboratorio de virología en la infección por citomegalovirus. Posibilidades actuales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997; 15 (suppl 2): 69-76.
4. BOECK MP, WOODGERT PM, STEVENS-AYERS T, RAY CG, BOWDEN RA. Factors influencing detection of quantitative cytomegalovirus antigenemia. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 832-4.
5. GERNA G, ZIPETO D, PAREA M, ET AL. Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia and DNAemia. *J Infect Dis* 1991; 164: 488-98.
6. BARBI M, BINDA S, PRIMACHE V, NOVELLI CH. Cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of infants with congenital or postnatal infection. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 898-903.
7. GUTIÉRREZ J, MAROTO C, PIÉDROLA G. Granulocyte abnormalities in parenteral drug addicts. The influence of HIV infection. *Allergol Immunopathol* 1989; 17: 251-5.
8. GUTIÉRREZ J, PIÉDROLA G, MAROTO C. Reliability of four methods for the diagnosis of acute infection by Epstein-Barr virus. *J Clin Lab Am* 1997; 11: 78-81.
9. GUTIÉRREZ J, RODRÍGUEZ M, MAROTO C. Relación entre el tiempo de evolución de la brucelosis humana y la avidéz de los anticuerpos IgG específicos. *Rev Méd Chile* 1995; 123: 819-22.
10. GUTIÉRREZ J, RODRÍGUEZ M, MAROTO MC, PIÉDROLA G, PEIRON J. Behaviour of IgG antibody avidity for the antigen and of IgA antibody in active cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, herpes simplex virus and human herpes virus 6 infections. Adaptation of a commercial test. *J Infect* 1997; 35: 25-30.
11. GERNA G, BALDANTI F, SARASINI A AND THE ITALIAN FOSCARNET STUDY GROUP. Effect of foscarnet induction treatment on quantitation of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in peripheral blood polymorphonuclear leukocytes and aqueous humor of AIDS patients with HCMV retinitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 38-44.
12. GERNA G, FURIONE M, BALDANTI F, SARASINI A. Comparative quantitation of human cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2709-17.
13. PERCIVALLE E, REVELLO MG, VAGO L, MORINI F, GERNA G. Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. *J Clin Invest* 1993; 92: 663-70.
14. SCHMIDT RL, OETTLE H, WILBORN F, ET AL. Demonstration of cytomegalovirus after bone marrow transplantation by polymerase chain reaction, virus culture and antigen detection in buffy coat leukocytes. *Bone Marrow Transplant* 1994; 13: 71-5.
15. WOLF D, SPECTOR SA. Early diagnosis of human cytomegalovirus disease in transplant recipients by DNA amplification in plasma. *Transplantation* 1993; 56: 330-4.
16. ZIPETO D, BALDANTI F, ZELLA D, ET AL. Quantification of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood polymorphonuclear leukocytes of immunocompromised patients by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993; 44: 45-56.