



“BIBLIOTECA VIRTUAL”

www.carpermor.com

**EVALUACION DE LA INFECCION POR CITOMEGALOVIRUS (CMV)
CON PRUEBAS DE BIOLOGIA MOLECULAR (PCR)
DR.EDUARDO STALIN GARCIA
LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR**

INTRODUCCIÓN.

Infección por Citomegalovirus (CMV) es causa de morbilidad y mortalidad en individuos inmunodeprimidos, principalmente los que reciben trasplantes de médula ósea y de órganos sólidos, así como en pacientes con SIDA, por ocasionar enfermedades de diferentes órganos tales como retinitis, colitis, y encefalitis. La profilaxis antiviral ha reducido estas causas, sin embargo, la toxicidad asociada con estos fármacos (ej. Ganciclovir, foscarnet y cidofovir) conlleva al enfoque del tratamiento a pacientes con alto riesgo de contraer la enfermedad por este virus (1).

La diseminación de CMV en la sangre ocurre en una infección activa, y la viremia se ha reconocido como el mayor factor de riesgo para la progresión hacia enfermedad. Por esta razón las pruebas diagnósticas se han encaminado a la detección y cuantificación (carga) de CMV para permitir la valoración del desarrollo de la enfermedad por CMV. Los requerimientos necesarios para un ensayo óptimo son: (i) una alta sensibilidad para la detección temprana en individuos de alto riesgo para adquirir la enfermedad por CMV, (ii) potencial para detectar los casos positivos y medir la carga viral durante tratamiento antiviral, (iii) rapidez para el inicio o cambio de tratamiento, y (iv) alto grado de reproducibilidad. Métodos de cuantificación por detección de antígeno y amplificación por PCR proveen las herramientas necesarias para el cumplimiento de estos requerimientos.

PATOFISIOLOGÍA DE LA DISEMINACIÓN DE CMV.

La diseminación de este virus en sangre es un factor importante en la patogénesis de la enfermedad en infecciones primarias y de reactivación. El DNA de CMVs se puede detectar en diferentes fracciones de leucocitos durante una infección activa, entre los que se incluyen los mononucleares (MN) y polimorfonucleares (PMN). Aunque el CMV es un virus intracelular, también se puede detectar en plasma o suero. Se tiene la hipótesis que el DNA viral libre en plasma puede derivarse de la lisis de células infectadas con CMV como las PMN y células endoteliales (2). En estas últimas se ha detectado en la sangre periférica durante una infección activa en pacientes HIV y de los que han recibido un trasplante.

PRUEBAS DIAGNOSTICAS.

La cuantificación de CMV se puede realizar en diferentes fracciones de sangre (celular y plasma) y fluidos (cerebro espinal, orina, expectoración, y semen). Se ha encontrado que suero es un substrato equivalente a plasma para la detección por PCR de DNA-CMV y es el mejor método para predecir el desarrollo de la sintomatología de la infección en trasplante de hígado (3). La cuantificación de CMV en plasma es útil en individuos afectados con HIV, donde

Carpermor
Laboratorio de Referencia Internacional
MEXICO



“BIBLIOTECA VIRTUAL”

www.carpermor.com

la progresión a enfermedad es frecuentemente de varias semanas o meses. Sin embargo, el análisis en leucocitos es el más utilizado y apropiado en situaciones donde la carga viral de DNA es baja. Las pruebas utilizadas para la detección o cuantificación de CMV son las siguientes (4):

Cultivos virales cuantitativos. Consiste en inocular diferentes diluciones de la muestra en fibroblastos cultivados en medio semi-sólido después de la infección, posteriormente los virus son observados por placas. La significancia práctica de estos ensayos es limitada por la baja sensibilidad, el tiempo en que se realiza el método, y la pérdida de viabilidad en muestras almacenadas. Tiene poco valor en las estrategias de tratamiento antiviral y en su seguimiento.

Ensayo cuantitativo por antigenemia de pp65. Esta prueba consiste en la tinción directa por anticuerpo contra pp65 en células PMN. Este método provee una estima de CMV sistémico que correlaciona con los obtenidos por PCR, y la desventaja de este ensayo es la subjetividad de interpretación de la laminilla.

PCR cuantitativo. Es la amplificación exponencial de DNA viral por medio de DNA-polimerasa. Permite resultados confiables de 25 hasta 25,000 copias de DNA-CMV en un “background” de extractos de leucocitos de 10⁵ con variabilidad intra e inter-ensayo de 15 y 24% respectivamente.

Captura de híbrido CMV-DNA. Este método consiste en la hibridación del DNA genómico de CMV con una sonda de RNA de 40,000 pb complementaria al 17% del genoma viral. Estos híbridos RNA-DNA son capturados hacia la superficie de un tubo cubierto con anticuerpos (Acs) específicos para estos híbridos, posteriormente se provoca reacción de fosfatasa alcalina conjugado con Acs específicos para los híbridos, mediante un substrato quimioluminiscente. La detección se hace por medición de la luz, que es proporcional a la cantidad de DNA blanco presente en el espécimen. No presenta riesgo de contaminación como los métodos de amplificación y permite detectar desde 700 copias por mL de sangre total.

Amplificación señal por bDNA. Este método amplifica la señal con múltiplos de bDNA, Esta molécula tiene múltiples sitios de unión para una sonda de DNA acoplada con una enzima. El complejo es detectado con un substrato quimioluminiscente el cual la luz que desprende es proporcional a la cantidad de DNA viral contenida en la muestra.

TRATAMIENTO.

Los antivirales empleados inhiben la síntesis del DNA del virus actuando a nivel de la DNA polimerasa, entre estos están el ganciclovir, foscarnet, y cidofovir. Múltiples estudios clínicos demuestran la eficacia de ganciclovir en pacientes enfermos con CMV, y estudios recientes sugieren que la eficacia de foscarnet es similar al de ganciclovir en retinitis por CMV relacionado a pacientes con SIDA (5). La terapia estándar para la retinitis por CMV consiste de dosis oral de 4500 a 6000 mg/día de ganciclovir durante dos semanas. En el caso de enfermedad gastrointestinal ocasionado por este virus, el tratamiento es similar aunque el tiempo de inducción es de 3 a 6 semanas. Datos recientes indican que los cuerpos de inclusión del CMV desaparecen después de 3 semanas y la completa normalidad aparece posterior a las 6 semanas de terapia (6). Se ha usado la terapia con ganciclovir IV, foscarnet IV, o la combinación de los dos fármacos, en pacientes con enfermedad neurológica por CMV (7).

Carpermor
Laboratorio de Referencia Internacional
MEXICO



“BIBLIOTECA VIRTUAL”

www.carpermor.com

Usted puede solicitar la carga viral de Citomegalovirus por PCR al laboratorio CARPERMOR con el código 25012.

El espécimen puede ser 2.0 mL de sangre total (EDTA o ACD), 0.5 mL de fluido corporal ó 0.1 g de tejido.

BIBLIOGRAFIA.

1. Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA, y cols. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplant. N. Engl. J. Med. 325:1601-1607, 1991.
2. Boeckh M, Hawkins G, Myersin J, Zaia J, Bowden RA. Plasma PCR for cytomegalovirus DNA after allogeneic marrow transplantation: comparison with PCR using peripheral blood leukocytes, pp65 antigenemia, and viral culture. Transplantation 64:108-113, 1997.
3. Patel R, Smith TF, Espy M, Wiesner RH, Krom RA, Portela D, Paya CV. Detection of cytomegalovirus DNA in sera of liver transplant recipients. J. Clin. Microbiol 32:1431-1434, 1994.
4. Boeckh M, Boivin Guy. Quantitation of cytomegalovirus: Methodologic aspects and clinical applications. Clin. Microbiol Rev 11:533-554, 1998.
5. Jacobson MA. Treatment of cytomegalovirus retinitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med 337:105-114, 1997.
6. Poles MA, Dieterich DT. Foscarnet treatment of CMV gastrointestinal disease: a pharmacokinetic pilot study. Antimicrob Agents Chemoter 41:1226-1230, 1997.
7. Recomendaciones AIS-EEUU. Enfermedad por CMV. Mayo 1998. www.ctv.es/USERS/fpardo/vihcmvrc.htm

Carpermor
Laboratorio de Referencia Internacional
MEXICO