

Nº 113
250



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**CITOMEGALOVIRUS; BIOLOGIA, PATOGENIA Y
DIAGNOSTICO**

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
HECTOR MANUEL OCAMPO PONCE



MEXICO, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

PREFACIO.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. BIOLOGIA	12
2.1. Taxonomía	13
2.2. Morfología	14
2.3. Reactividad a agentes físicos y químicos	15
2.4. Características Bioquímicas	17
2.5. Características Antigénicas	21
2.6. Genética y Ciclo Replicativo	22
2.6.1. Cepas	22
2.6.2. Descripción del Genoma	22
2.6.3. Ciclo Replicativo	25
2.6.4. Período de Latencia	28
2.7. Células susceptibles de Infección <i>in vitro</i>	29
3. PATOGENIA	31
3.1. Infección Congénita y Perinatal	32
3.2. Retinitis	36
3.3. Gastroenteropatías	38
3.4. Neumonía	38

3.5. Infección en Transplantes	40
3.6. Infección en Pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. (SIDA)	43
3.7. Potencial Oncógeno	45
4. METODOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO	
DEL CITOMEGALOVIRUS	47
4.1. Aislamiento del Citomegalovirus en cultivos celulares	48
4.2. Neutralización	50
4.3. Fijación de Complemento	51
4.4. Inmunofluorescencia	55
4.4.1. Inmunofluorescencia Directa	55
4.4.2. Inmunofluorescencia Indirecta	55
4.4.3. Sistema Biotina-Avidina	56
4.4.4. Aplicación de Anticuerpos Mono- clonales en Inmunofluorescencia	57
4.4.5. Inmunofluorescencia Anticomple- mentaria. (IFAC)	57
4.5. Método de ELISA	61
4.6. Reacción de Polimerasas en Cadena (PCR)	64
5. CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFIA	73

P R E F A C I O

El presente trabajo pretende dar un conocimiento profundo sobre las características tanto del Citomegalovirus propio, como de la infección que éste causa, para de esta forma comprender la gran importancia que tiene el estudiar y diagnosticar a este virus hoy en día. Para esto se ha dividido el trabajo en cinco capítulos.

En el primer capítulo se mencionan las generalidades y la historia de la infección que este virus causa; desde los inicios en que se acuñó el nombre de Citomegalovirus, hasta su aparición relevante en enfermedades y padecimientos que ocurren en la medicina moderna como son el trasplante de órganos o el actual Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Se proporcionan en este capítulo datos epidemiológicos ilustrativos, para que se sitúe al Citomegalovirus en un lugar importante dentro del campo de la infectología.

El segundo capítulo describe lo que es propiamente el Citomegalovirus; sus características biológicas, bioquímicas y genéticas, así como su ciclo de replicación. Se tocan puntos que son sumamente importantes debido a su relación que tienen con otros capítulos como son la patogenia y el diagnóstico.

Las entidades clínicas con las que se relaciona están descritas en el capítulo 3. Es conocido que el Citomegalovirus

está involucrado en una amplia gama de padecimientos, algunos de los cuales son tratados superficialmente debido a su limitada importancia.

En un cuarto capítulo son tratados los métodos de laboratorio para el diagnóstico del Citomegalovirus. Es importante mencionar que el objetivo de este capítulo no es el de enseñar técnicas ni fundamentos de los métodos ya que se parte de la idea de que estos son ya bien conocidos. Tal vez una excepción a esto sea el método de la Reacción de Polimerasas en Cadena (PCR) por lo que se explica su metodología. El objetivo es mostrar al lector la utilidad del método en discusión, así como su confiabilidad para poder formar así un criterio de elección personal. Los métodos que en el presente trabajo se tratan no son todos los que se han descrito, sin embargo se estudian aquí únicamente aquellos métodos que por sus características fueron considerados en algún tiempo como métodos de elección o confirmativos. Otros métodos no son tratados aquí debido a su baja confiabilidad o elevado costo como en el Radioinmunoensayo (RIA), lo que hace de estos métodos inapropiados para su uso diagnóstico.

Finalmente se escribe en concreto aquellos conceptos con los cuales se reafirma lo más sobresaliente de esta infección, haciendo hincapié en las metodologías de diagnóstico, en la importancia patológica. También se sugieren algunas medidas para su erradicación. Esto constituye el quinto y último capítulo con

lo cual el lector puede estar seguro de contar con lo más reciente de la información que existe sobre la infección por Citomegalovirus hasta el momento.

Es importante indicar que este trabajo no resuelve completamente la interrogante del porqué la relación tan estrecha entre Citomegalovirus y el SIDA ya que aún no se ha logrado definir claramente. Queda también pendiente de resolver la problemática de un tratamiento eficaz contra esta infección.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

A principios del siglo XX algunos patólogos informaron la presencia de grandes células tumefactas en hígado, pulmón, riñones y páncreas de niños muertos por presencia de sífilis congénita. En 1921 se reconoció que estas células se asemejaban a las células lesionadas con inclusiones, observadas en algunas infecciones virales y acuñaron el término " citomegalia ". Posteriormente se reconoció citomegalia en glándulas salivales en un 12% de niños muertos por causas diversas. Se decía entonces que los niños con abundante citomegalia presentaban enfermedad por inclusión citomegálica. Así, después se asignó a un virus la etiología de la enfermedad y se le conoció como CITOMEGALOVIRUS (CMV), (36)

Desde ese momento se reconocieron infecciones congénitas causadas por citomegalovirus. Su diagnóstico en ese entonces se basaba en estudios patológicos de casos postmortem, lo cual creó la impresión de que dicha infección era rara y habitualmente fatal. (36, 31)

Estudios más recientes incluyen técnicas virológicas y exfoliativas, con las cuales puede demostrarse citomegaloviruria en un 1 a 2 % de los recién nacidos. (24, 36) Entre el 15 y 20 % de estos niños eventualmente presentan lesión del Sistema Nervioso Central (SNC), (36) También se ha demostrado que en niños entre 2 y 8 años de edad, un 15 % de éstos excretan al virus en orina y que existen citomegalovirurias hasta de 4 ó 5 años (24)

Anteriormente se había creído que el pasaje transplacentario de CMV sólo ocurría después de una infección materna primaria durante la gestación. Sin embargo se ha informado el nacimiento de más de un niño infectado en forma prenatal con CMV. (36)

Hoy en día la infección por CMV se ha asociado con un amplio espectro de entidades clínicas. El cuadro que surge de los controles epidemiológicos es el de un virus ubicuo que puede ser eliminado en forma persistente por huéspedes infectados. Frente a la persistencia y diseminada ocurrencia ha sido difícil asignar al CMV una responsabilidad etiológica específica, aún cuando se ha recuperado el virus en asociación con una entidad clínica. (36, 37)

El CMV es conocido ahora como el parásito más común en el hombre. Sin embargo rara vez llega a producir enfermedad pero permanece largos periodos produciendo una enfermedad crónica latente. (31, 35) Pese a esto la frecuencia de esta enfermedad en recién nacidos y en pacientes inmunodeficientes establece que el CMV es de gran importancia médica, ya que es la causa más importante de microcefalia y es incluso una causa de anomalías congénitas más frecuente que la rubéola. Se le considera también como el agente infeccioso más común de retraso mental y de sordera sensorial congénita. (36, 40)

Los lactantes que son sintomáticos al nacer por lo general

desarrollan incapacidades a largo plazo, originándose un daño irreversible en el cerebro, ojos y oídos. (24, 30)

Recientemente se ha valorado el riesgo de transmisión sexual de este virus, ya que los homosexuales, drogadictos, alcohólicos y prostitutas, representan la población de máxima seropositividad, condición que contribuye al compromiso de la inmunidad celular, provocando no sólo la emergencia del SIDA, sino ser responsable de la muerte del 10 % de los transplantados, 20 % de los rechazos de estos órganos o tejidos, 20 % de la llamada fiebre postransplante, 30 % de la presencia de leucopenia y en hospitales es causa importante del Síndrome Postransfusional. (6)

Investigaciones en los Estados Unidos y en Costa de Marfil han demostrado que la infección primaria durante el embarazo no protege al niño de una infección por CMV. Y más aún, se ha visto que la infección prenatal ocurre con mayor frecuencia en grupos de mujeres sensibilizadas. Esto hace dudosa la eficacia de una vacuna para prevenir la infección en el feto. (30, 31)

En poblaciones en desarrollo o en donde la densidad de población es muy alta, como es el caso de nuestro país, las infecciones por CMV son frecuentes a temprana edad. Existen datos de que en Chile hay una seropositividad que varía entre el 86 y el 90 % en diferentes poblaciones analizadas de mujeres embarazadas o en puerperio. (24) Se han registrado también índices del 1.7 %

de infección congénita por CMV en ese país y del 46.8 % de infección posnatal en niños indígenas de Guatemala durante su primer año de vida. En los Estados Unidos, por lo menos en un 50 a 90 % de los adultos a la edad de 35 años tienen evidencia de infección por CMV en tiempo pasado, según indican las pruebas serológicas. (24, 51)

En México de una población deambuladora de mujeres embarazadas a las que se aplicó el perfil TORCH, el 13.44 % presentó títulos positivos a CMV, siendo más frecuentes los títulos positivos a Rubéola con un 41.40 % , posteriormente, Toxoplasma con un 19.4 % , CMV con el porcentaje indicado y finalmente herpesvirus con el 1.07 % . De las pacientes con títulos positivos a CMV, el 48 % fueron casos únicos, el 44 % se asoció a rubéola, el 4 % a toxoplasma y el 4 % restante asociado simultáneamente a rubéola y toxoplasma. (45)

La infección posnatal por CMV se adquiere por el contacto directo personal, ya sea por relaciones sexuales, orina o saliva de individuos infectados. Las fuentes comunes de infecciones transmitidas son los niños, cónyuges y productos sanguíneos infectados con CMV; como son los órganos o tejidos transplantados, de individuos seropositivos. (18, 24, 36, 41, 51, 57)

Es de tomarse en cuenta la relación tan estrecha que tiene este virus con pacientes inmunocomprometidos y en aquellos que

sufren de infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). CMV cobra gran importancia en países con alto índice de natalidad debido a la gran cantidad de infecciones congénitas y perinatales y las consecuencias de éstas sobre el producto.

CAPITULO 2

BIOLOGIA

- 2.1. *Taxonomía.*
- 2.2. *Morfología.*
- 2.3. *Reactividad a Agentes Físicos y Químicos.*
- 2.4. *Características Bioquímicas.*
- 2.5. *Características Antigénicas.*
- 2.6. *Genética y Ciclo Replicativo.*
 - 2.6.1. *Cepas.*
 - 2.6.2. *Descripción del Genoma.*
 - 2.6.3. *Ciclo Replicativo.*
 - 2.6.4. *Periodo de Latencia.*
- 2.7. *Células Susceptibles de Infección in Vitro.*

C A P I T U L O 2

BIOLOGIA

2.1. TAXONOMIA (24. 05)

El CMV debido a su estructura y comportamiento biológico ha sido agrupado dentro de la familia Herpetoviridae, la cual comprende tres géneros:

* *Alfaherpesvirus*: Dentro de este género se encuentran agrupados el Virus del Herpes Simple tipo 1 (VHS-1) causante de las úlceras de la mucosa oral llamadas vulgarmente fuegos o aftas. El Virus del Herpes Simple tipo 2 (VHS-2), responsable principal del herpes genital. El Virus Varicela Zóster (VZV) causante de la varicela y del herpes zóster. Además en este género se encuentran otras variedades de virus animales como el Herpesvirus del mono, causante de encefalitis fatal en el humano que haya sufrido mordedura por este animal infectado.

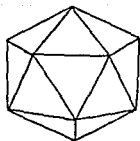
* *Betaherpesvirus*: En este género se encuentra agrupado el CMV llamado anteriormente virus de la inclusión citomegálica.

* *Gammaherpesvirus*: Comprende al Virus Epstein-Barr (VEB) agente etiológico de la mononucleosis infecciosa y causante del carcinoma de faringe y del Linfoma de Burkitt. Existen además en este género variedades animales.

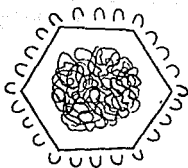
Los herpesvirus alfa tienen un espectro variable de huéspedes, la mayoría tiene un ciclo de replicación relativamente corto y son altamente citopáticos en células cultivadas. Con frecuencia causan infecciones latentes en ganglios sensoriales y su DNA tiene un peso molecular aproximado de 100×10^6 d. (30, 35) Los herpesvirus beta tienen un estrecho espectro de huéspedes y un ciclo de replicación relativamente largo, causan un efecto citopático en células cultivadas menos grave que el ocasionado por los herpesvirus alfa. Con frecuencia originan infecciones latentes en glándulas salivales y otros tejidos y posee dos tipos de DNA, uno corto de 100×10^6 d. y uno largo de 150×10^6 d aproximadamente. (24, 30, 36, 51, 55) Los herpesvirus gamma tienen también un estrecho espectro de huéspedes, una predilección por células linfoblásticas a las cuales pueden transformar en tumorales y su DNA tiene un peso molecular de 100×10^6 d. (30, 35)

2.2. MORFOLOGIA

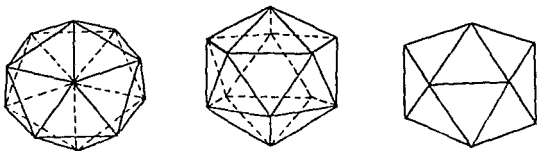
El CMV es de forma esférica y consta de una nucleocápside icosaédrica de 110 nm de diámetro y 162 capsómeros, (31, 64) la cual puede o no incluir un core de 64 nm formado por subunidades agregadas. (FIGURA 1.)



A



B



C

FIG. 1. A) ESTRUCTURA DEL CMV MOSTRANDO LA NUCLEOCAPSIDE ICOSAEDRICA ENVUELTA POR LA MEMBRANA LIPOPROTEICA. B) NUCLEOCAPSIDE DESNUDA: PRESENTA 5 CAPSOMEROS EN CADA BORDE, 102 EN TOTAL SIENDO 150 HEXONES EN FORMA DE PRISMA Y 12 PENTONES (UNO POR VERTICE) C) ICOSAEDRO CON EJES DE ROTACION EN 5, 3 Y 2 PLIEGUES DE IZQUIERDA A DERECHA. EL ICOSAEDRO POSEE 12 VERTICES, 20 CARAS TRIANGULARES Y 30 BORDES.

Esta nucleocápside se encuentra envuelta por una membrana lipoproteica de 120 a 200 nm de diámetro, (6, 24, 35) teniendo ésta de 23 a 33 proteínas estructurales con pesos moleculares que van de 11,000 a 290,000 d., (31) quince de estas proteínas o polipéptidos estructurales se encuentran glicosilados, como veremos más adelante al hablar de las características bioquímicas. Los capsómeros son prismas elongados, hexagonales o pentagonales, con un hueco central axial. De éstos, 150 se sitúan a lo largo de los bordes y en las caras del icosaedro; cada uno de éstos tiene seis capsómeros vecinos por lo que se les conoce como hexones. Los 12 restantes están situados en los vértices y cada uno tiene cinco capsómeros vecinos por lo que se denominan como pentones. (31)

Se ha encontrado en vacuolas citoplásmicas de células infectadas por CMV una estructura de naturaleza viral llamada cuerpo denso, la cual es una esfera con diámetro de 250 a 500 nm, encerrada en una doble membrana idéntica a la del virus, derivada de la vacuola misma y que carece de DNA. (20, 37)

2.3. REACTIVIDAD A AGENTES FISICOS Y QUIMICOS

El CMV es inactivado en una solución de éter al 20 % durante dos horas, a un pH menor de 5.0 durante 30 minutos o por la exposición a la luz ultravioleta por un lapso de cinco minutos. Este virus es estable a 37°C en suero humano diluido al 5 o 10 % ;

no así a 4°C. La temperatura a la cual es inactivado es variable, dependiendo de la cepa de CMV, sin embargo esta variación es muy pequeña, por lo que aquí sólo se ha referido a la cepa AD-169. Este virus no resiste el congelamiento y descongelamiento sucesivos o el almacenamiento a -20°C sin estabilizador. Paradójicamente, en presencia de solución salina isotónica con bicarbonato de sodio, el virus es inactivado más rápidamente a 4°C que a 37°C, por lo que su poder infectante es preservado de mejor manera cuando el virus es suspendido en agua destilada o en medios sin bicarbonato de sodio. Las células infectadas con CMV suspendidas en Medio Esencial Mínimo (MEM) de Eagle con 10-20 % de suero humano y 10 % de dimetilsulfóxido pueden ser conservadas indefinidamente en nitrógeno líquido a -190°C con una mínima pérdida de la infectividad del virus. (51)

La propagación del CMV en células susceptibles es inhibida por todos los compuestos que actúan a nivel de síntesis de DNA como la rifampicina (55), el ácido fosfonoacético (PAA) a una concentración de 50 mg/ml (28). La colchicina y el interferón pueden también inactivarlo (36, 51), así como los derivados purínicos y pirimidínicos (36, 44) y el fosfonoformato de sodio.

(43)

2.4. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

La caracterización de polipéptidos estructurales del CMV ha

sido demostrada recientemente. En 1975 Honess y colaboradores encontraron en la cepa AD-169 veinte polipéptidos cuyos pesos moleculares variaban entre 22,000 y 230,000 d utilizando la técnica de electroforesis en gel de dodecil-sulfato de sodio poliacrilamida (SDS-acrilamida). Ellos caracterizaron además de estos polipéptidos, los pertenecientes a los cuerpos densos, encontrando que de estos 20 polipéptidos seis fueron predominante o exclusivamente de los viriones y cuatro de los cuerpos densos, mientras que los restantes fueron comunes para ambas partículas. Cuatro de estos veinte polipéptidos se encontraron glicosilados y tres de éstos fueron compartidos por el virión y cuerpo denso. Uno fv. de designación no determinada. (TABLA 1)

Sarov y Abady observaron en el mismo año y en la misma cepa 23 polipéptidos con pesos moleculares que van de 24,000 a 170,000 d. Estudios posteriores realizados por Stinsky en el departamento de microbiología de la Universidad de Iowa en Marzo de 1976 demostraron y caracterizaron las glicoproteínas asociadas al virión y al cuerpo denso utilizando su movilidad relativa, porcentaje de incorporación de glucosamina y su peso molecular. Ocasionalmente se detectaron ocho proteínas de alto peso molecular, con niveles bajos de incorporación de glucosamina. Estas proteínas pueden ser bien precursores o bien agregados de las glicoproteínas de más bajos pesos moleculares.

TABLA 1. CARACTERIZACION DE POLIPEPTIDOS ESTRUCTURALES DEL CMV CEPA AD-169 SEGUN HONESS Y COLABORADORES.

PESO MOLECULAR X 10 ⁻³ d	GLICOSILACION	DESIGNACION
290	-	COMPARTIDO
240	+	NO DETERMINADA
150	-	VIRAL
100	+	COMPARTIDO
98	-	COMPARTIDO
90	-	CUERPO DENSO
85	-	CUERPO DENSO
82	-	CUERPO DENSO
70	-	VIRAL
68	-	CUERPO DENSO
62	+	COMPARTIDO
57	+	COMPARTIDO
55	-	COMPARTIDO
52	-	COMPARTIDO
40	-	VIRAL
38	-	COMPARTIDO
35	-	VIRAL
29	-	VIRAL
26	-	VIRAL
22	-	COMPARTIDO

En julio de 1976 Kim y Sapienza utilizando la electroforesis en gel de poli(acrilamida) encontraron que existen en la cepa C-87 al menos 33 polipéptidos estructurales (VPS) con pesos moleculares entre 11,000 y 290,000 d. De éstos, cuatro se encontraron glicosilados. Realizando estudios más profundos encontraron que el polipéptido más abundante fue el llamado VP-17 el cual se encontraba glicosilado y presentaba un peso molecular de 66,000 d. y que quince VPS eran glicosilados. (TABLA 2)

TABLA 2. PESO MOLECULAR Y OLICOSILACION DE LOS PEPTIDOS DEL CMV
CEPA C-87 SEGUN KIM Y SAPIENZA.

DESIGNACION DEL PEPTIDO	PESO MOLECULAR EN DALTONES	OLICOSILACION
1	290,000	
2	220,000	
3	210,000	
4	195,000	
5	185,000	
6	175,000	+ GP 1
7	165,000	+ GP 1
8	155,000	
9	140,000	+ GP 2
10	135,000	+ GP 2
11	130,000	+ GP 2
12	105,000	+ GP 3
13	98,000	+ GP 3
14	90,000	+ GP 3
15	84,000	+ GP 3
16	78,000	
17	66,000	+ GP 4
18	52,000	+ GP 5
19	50,000	+ GP 5
20	48,000	+ GP 5
21	44,000	+ GP 5
22	42,000	
23	38,000	
24	35,000	
25	30,000	
26	28,000	
27	22,000	+ GP 6
28	19,000	
29	17,000	
30	15,000	
31	14,000	
32	12,000	
33	11,000	

La suma de los pesos moleculares de estos 33 VPS es de 2,998,000 d. Tomando en cuenta que el peso molecular del DNA del CMV es de 100×10^6 d. tenemos que aproximadamente un 62 % del DNA está involucrado en la síntesis de VPS. (33)

2.5. CARACTERISTICAS ANTIGENICAS

Una vez que el periodo de infección ha pasado, se pueden detectar anticuerpos de las clases IgG, IgM e IgA. Los antígenos responsables de inducir estos anticuerpos no han sido aún bien definidos. Sin embargo, se han reportado ya dos antígenos capaces de fijar complemento; uno de estos es un antígeno soluble y el otro forma parte del virión. El antígeno soluble contiene por lo menos dos polipéptidos con peso molecular entre 66,000 y 140,000 d y una pequeña porción está glicosilada. El suero hiperinmune preparado contra este antígeno, no neutraliza la infectividad del virus. Este antígeno es estable a 4°C y resiste varios ciclos de congelamiento y descongelamiento pero pierde su potencial patógeno a 37°C. Con respecto al antígeno asociado al virus, se ha visto que su antigenicidad se deriva principalmente de la nucleocápside. Ambos antígenos se detectan principalmente después de la replicación del DNA viral y se encuentran en mayor proporción asociados a la célula, es decir, en los sobrenadantes de células infectadas se encuentran cantidades mínimas de estos antígenos. Los antígenos responsables de la producción de anticuerpos

neutralizantes son encontrados en envolturas de viriones maduros y de cuerpos densos y se cree que son glicoproteínas. (51).

Se han hecho estudios en los que antisueros contra las glicoproteínas de membrana de ambas partículas neutralizan la infectividad y reaccionan con membranas y citoplasma de células infectadas, detectándose esto por pruebas de inmunofluorescencia, no localizándose fluorescencia en células no infectadas. Por esto es dudoso que los antígenos de membrana de células huésped sean incorporados dentro de la envoltura viral. (51, 57)

2.6. GENETICA Y CICLO REPLICATIVO

2.6.1. CEPAS

Actualmente existe una gran variedad de cepas, las cuales han sido estudiadas por diversos investigadores. Por lo general, los trabajos de cada uno de ellos se centran sobre una misma cepa. Tenemos por ejemplo los trabajos realizados por Mark F. Stinsky sobre la cepa Towne, DeMarchi y Kaplan se han centrado sobre la cepa Davis, K. S. Kim ha trabajado con la cepa C-87. Sin embargo la cepa AD-169 ha sido utilizada con preferencia por todos ellos ya que es la más común y fácil de conseguir. El Dr. J.E. Calderón del Instituto Nacional de Perinatología hace mención de la cepa Kerr y la cepa Espaillat entre otras anteriores.

2.6.2. DESCRIPCION DEL GENOMA

La cepa AD-169, posee un DNA de doble cadena lineal de 56 a

76 nm con 240 kilobases (kb). (34) Este, está constituido por dos componentes unidos covalentemente, designados como la región corta (s) y la región larga (l). Cada una de estas regiones, está flanqueada por secuencias terminales repetidas (TR) en forma invertida. El segmento largo que está compuesto de 174 kb y las secuencias terminales largas (TRl) adyacentes compuestas cada una de 12 kb aproximadamente, comprenden el 83 % del genoma, mientras que el segmento corto que consta de 38 kb y las secuencias terminales cortas (TRs) adyacentes formadas cada una por 2 kb comprenden el restante 17 %. Las secuencias terminales TRs y TRl están incluidas donde se enlazan las regiones s y l del genoma. Mc. Donough y colaboradores mapearon una clona con tres fragmentos terminales EcoRI, designados como W, L y N. El fragmento W está contenido en las TRl comprendidas entre 0.000 y 0.018 unidades de mapa (um) de un extremo del segmento corto y entre 0.804 y 0.822 del otro extremo. El fragmento L está en el fragmento corto en las TR incluidas entre 0.962 y 1.000 um. El fragmento N está contenido en una sección aislada del segmento corto en las TR que están entre 0.827 y 0.854 um. Esta clona contiene también un fragmento H en la unión l-s. Los fragmentos W y N pueden estar unidos formando un solo fragmento EcoRI pero con la información de ambos segmentos. Cuando el segmento corto no se encuentra en dicha configuración se produce una nueva fusión W-L y su producto es llamado fragmento F. En total se han mapeado 34 sitios incluyendo dos fragmentos de unión. (FIGURA 4) (34, 58)

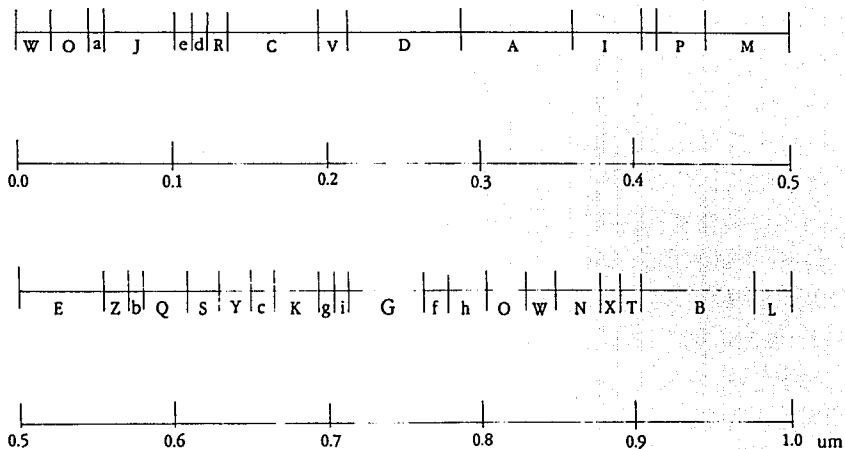


Fig. 4: Mapeo del material genético del CMV según Mc. Donough y Col's donde se muestran los fragmentos terminales EcoRI denominados W, L y N.

2.6.3. CICLO REPLICATIVO

Referente a su ciclo replicativo se ha logrado ya conocer una secuencia en los pasos esenciales en la multiplicación del CMV, los cuales son los siguientes:

- * Adherencia.
- * Penetración.
- * Pérdida de la envoltura.
- * Transcripción del DNA parenteral viral.
y formación de RNAm.
- * Traducción del RNAm en enzimas virales.
- * Replicación del DNA viral.
- * Transcripción de más DNA viral (transcripción tardía)
- * Traducción de este RNAm tardío en proteínas
estructurales y otras proteínas virales codificadas
para función reguladora.
- * Ensamblaje.
- * Liberación.

1) ADSORCIÓN: La adsorción de los viriones a la membrana plasmática depende de fuerzas electrostáticas y es el resultado de la colisión entre viriones y células. Esta etapa es independiente de la temperatura, pero sí influye el movimiento browniano. Esta adsorción firme se logra gracias a ciertas áreas de la membrana celular llamadas receptores virales y los cuales presentan afinidad por algunos viriones.

2) PENETRACION: Esta fase se lleva a cabo por la difusión del virión en la membrana plasmática de la célula liberando la nucleocápside directamente al citoplasma.

3) DENUDACION: Implica la liberación del ácido nucleico viral de su envoltura.

4) TRANSCRIPCION: Con esta fase se inicia el ciclo del eclipse viral, y se puede dividir en tres etapas. (aunque McDonough y Spector mencionan cuatro) (34) El primer gene viral constituido por 2.8 kb (0.739 - 0.751 μ m) se expresa después de la infección primaria o de la reactivación y presumiblemente codifica para una proteína IE de función reguladora, de 68 a 75 kb (34, 38) la cual es transportada al núcleo, probablemente para ayudar a que la transcripción del segmento largo se lleve a cabo en menor tiempo. Esta proteína controla los pasos siguientes a la expresión del gene, por lo que un bloqueo en la síntesis de la proteína IE evita toda transcripción del genoma viral. Estos genes IE son expresados independientemente de cualquier síntesis de proteínas virales. (14, 58)

El RNA resultante de la expresión del gene IE es transcrito a parti de tres porciones restringidas del genoma a tres regiones del segmento largo localizadas en las secciones comprendidas entre 0.061 - 0.110, 0.117 - 0.142 y 0.588 - 0.616 μ m. Posteriormente

ocurre la fase de expresión del gene para la producción del RNA temprano que sucede 4 a 6 horas después de la infección, antes de la replicación viral. (58) Aquí McDonough y Spector mencionan una fase intermedia de expresión de un gene llamado gene 1 (intermedio) el cual estará encargado de la producción del RNA intermedio y que ocurre al tiempo de la replicación del DNA (94) 16 a 24 horas después de que la infección ha ocurrido. Finalmente se realiza la transcripción del RNA tardío, el cual es sintetizado en abundancia después de la replicación del DNA viral. (34)

5) TRADUCCION: Los RNAm son traducidos en los polirribosomas citoplásmicos celulares. Las proteínas sintetizadas incluyen a los antígenos virales y enzimas específicas del virus. (15)

6) REPLICACION: Estando ya las enzimas en concentraciones adecuadas, el DNA viral comienza a replicarse siguiendo el modelo semiconservativo descrito por Watson y Crick. (15) J.H. DeMarchi y A.S. Kaplan han hecho experimentos en células de pulmón de embrión humano y han demostrado que la síntesis de macromoléculas virales ocurre en aquellas células que no sintetizan DNA celular al tiempo de la infección y que la síntesis del DNA viral ocurre independientemente de la síntesis del DNA celular. Esto explica el hecho de que una infección productiva es

retrasada o inhibida en aquellas células que fueron estimuladas por el CMV a sintetizar DNA propio y que sólo unas pocas funciones virales se expresan. (14)

7) ENSAMBLAJE Y LIBERACION: El CMV al igual que los demás herpesvirus es ensamblado en el núcleo, después de que las proteínas estructurales sintetizadas en el citoplasma han emigrado hacia el núcleo en donde la réplica y la transcripción del DNA han ocurrido. Una vez ensamblado el virión, éste emerge a través de la membrana celular que ha sido modificada por la incorporación de proteínas virales, principalmente glicoproteínas, adquiriendo así su membrana lipoproteica. (15)

La liberación de los primeros viriones en el líquido sobrenadante marca el final del período de incubación. Así, de cada célula infectada serán liberados los viriones que al diseminarse y adherirse a células adyacentes cierran el ciclo de replicación.

2.6.4. PERIODO DE LATENCIA

El virus persiste en el huésped como parásito intracelular y evade los anticuerpos circulantes contra él, pasando de una célula a otra. El virus puede estar latente en los linfocitos B, unido covalente al DNA celular. La reactivación tiene lugar cuando existe una alteración en los mecanismos que regulan el equilibrio

entre el DNA celular y el DNA viral, o bien cuando la inmunidad celular se ve comprometida, tal es el caso de homosexuales, desnutridos, los que reciben radioterapia, terapéutica inmunodepresora, transfusiones de donadores múltiples, enfermos de cáncer, el mismo embarazo y las condiciones de inmunocompetencia del individuo en estado fetal o recién nacido.

2.7. CELULAS SUSCEPTIBLES DE INFECCIÓN IN VITRO

El CMV humano no ha podido replicarse todavía en animales de experimentación, sin embargo, esto se logra fácilmente en fibroblastos diploides humanos, ya que es importante mencionar que el CMV sólo crece en fibroblastos homólogos; es decir, los virus humanos no crecen en fibroblastos de ratón y viceversa. Por lo que el virus no puede hacerse replicar en células HeLa ni en células VeRo. (5) Existen reportes de trabajos en los cuales se han utilizado varias líneas fibroblásticas. (14, 34, 58) Las más comunes en el laboratorio son las líneas de fibroblastos de pulmón de embrión humano (HEL). (14, 58) También se usan con gran éxito cultivos de células de prepucio de recién nacido circuncidado (HFF) y células amigdalinas fetales humanas. (14, 17)

Las células que son susceptibles a este virus presentan in vitro un efecto citopático (ECP) característico. Este se

distingue por la producción de células refringentes, redondas ya sea ensanchadas o alargadas. La diseminación del ECP sobre la monocapa celular es lenta y se lleva a cabo infectando de manera gradual a las células circundantes; en algunos casos se observan inclusiones intranucleares y además presencia de células gigantes.

(24, 51)

CAPITULO 3

PATOGENIA

- 3.1. *Infección congénita y perinatal.*
- 3.2. *Retinitis.*
- 3.3. *Gastroenteropatías.*
- 3.4. *Neumonía*
- 3.5. *Infección en trasplantes*
- 3.6. *Infección en pacientes con el Síndrome de
Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).*
- 3.7. *Potencial Oncógeno*

CAPITULO 3

PATOGENIA

3.1. INFECCIÓN CONGÉNITA Y PERINATAL.

Los neonatos son huéspedes muy susceptibles a varias infecciones, además son inmunológicamente incompetentes y la respuesta inmune humoral contra el virus depende del traspaso pasivo de anticuerpos maternos. Las rutas posibles por las que puede surgir una infección por CMV en neonatos son cuatro. Puede ser por vía transplacentaria, vía tracto genital al momento del alumbramiento, vía leche materna y por transfusión sanguínea.

El criterio que debe ser utilizado para la distinción entre la infección congénita o intrauterina y la perinatal se basa en cultivos del virus a partir de orina obtenidos durante las primeras semanas de vida; así, si un cultivo que ha sido obtenido durante las dos o cuatro primeras semanas de vida del neonato es positivo para CMV se diagnosticará como una infección congénita. Ahora bien, si el primer cultivo diera resultados negativos, pero los cultivos subsecuentes fueran positivos, se estaría hablando de una infección perinatal. Esta distinción entre la infección congénita y la perinatal tiene una importancia muy significativa, ya que de esto depende el pronóstico en términos de secuelas y por lo tanto, su importancia médica. (40)

El CMV es hoy en día la causa más común de infección congénita; la incidencia a nivel mundial de esta infección es del 0.2 al 2.2 % de los nacidos vivos, a lo sumo el 10 % de los neonatos infectados congénitamente son sintomáticos al nacer.

(48)

La gravedad de la enfermedad puede depender del tiempo de embarazo que lleva la madre al presentarse la infección congénita. Esto es, mientras más temprano ocurra la infección, el daño al feto suele ser mayor, en tanto que la infección posnatal rara vez se complica. (24, 26)

Estas infecciones son más frecuentes en niños nacidos de madres que han tenido infección primaria durante el embarazo. Se ha indicado que el 61 % de 23 neonatos que contrajeron CMV in útero presentan infección primaria en el periodo perinatal. Se ha estimado que un 10 % de la mujeres norteamericanas que son seropositivas a CMV, excretan a éste en tracto genital al momento del parto. (48)

Aproximadamente un 50 % de los niños que no son alimentados con leche materna y que a su vez, son hijos de madres con CMV en el tracto genital, adquieren la infección e inician a excretar el virus entre las tres y cuatro semanas de edad. Se estima que cerca del 30 % de los niños amamantados por madres seropositivas a CMV, contraen la infección. En efecto, esta infección ha sido observada

más comúnmente en niños cuyas madres excretan al CMV en orina o leche y cuya alimentación a base de leche materna es continua por lo menos durante un mes. Ha sido observado que el rango de infección congénita y perinatal es mayor en ciudades donde existe una alta seropositividad y un alto índice de alimentación con leche materna.

Los niños prematuros son de alto riesgo para adquirir una infección sintomática ya que no adquirieron los suficientes anticuerpos de la madre y los que fueron obtenidos, son eliminados rápidamente. Aunque en base a esto, hay que tomar en consideración que los anticuerpos maternos no pueden impedir la infección por CMV; aparentemente esto es contradictorio, pero tenemos que tomar en cuenta que aunque estos anticuerpos no impiden la infección en el niño, su transferencia transplacentaria sí puede influir y restringir el grado de lesión inducido por el virus. (48)

La infección es más común y más grave si se adquiere por ruta no materna por niños nacidos de madres seronegativas. La morbilidad asociada a este tipo de infecciones es casi exclusiva de niños nacidos con pesos muy bajos, presentando varias disfunciones múltiples (respiratorias, vasculares y neurológicas)

La infección perinatal debida a transfusiones sanguíneas presenta alto índice de niños muertos. Alrededor del 50 % de los niños transfundidos al nacer prematuramente que son infectados por CMV sufren de una infección muy severa o mueren. (48)

Tipicamente el niño con infección congénita manifiesta por CMV es pequeño a la fecha del parto. Presenta hepatoesplenomegalia y anomalías asociadas a la función hepática. Es común la erupción petequial asociada con una moderada trombocitopenia y anemia hemolítica. Las lesiones y anomalías más comunes y devastadoras son aquellas del SNC incluyendo coriorretinitis, convulsiones, calcificaciones intracerebrales y ocasionalmente necrosis masiva del cerebro. Los niños infectados pueden ser microcéfalos o, menos comúnmente, hidrocefalos. Se han informado casos de sordera así como de microoftalmía, cataratas y glaucoma. Además de un desarrollo detenido y anormal, en algunos órganos se observan evidencias de lesión. Así, puede hallarse estasis biliar asociada con infiltrados inflamatorios periportales, hepatitis de células gigantes, fibrosis pancreática focal e infiltrados en riñones y pulmones. (24, 36, 48, 65)

Las infecciones adquiridas por CMV en neonatos, pueden ser prevenidas; las adquiridas vía leche materna pueden prevenirse evitando que las madres seropositivas alimenten a sus hijos con esta leche. Los hijos de madres seronegativas alimentados con leche de mujeres seropositivas pueden cursar con más facilidad una infección sintomática por este virus, especialmente, si se trata de niños prematuros. Se sugiere que durante la transfusión se usen paquetes de glóbulos rojos desglícerolizados, así se

eliminarán leucocitos viables en los cuales se mantiene latente el virus. (48)

3.2. RETINITIS

La retinitis es usualmente una manifestación de la infección por CMV en pacientes transplantados o tratados con inmunosupresores y es ahora una afección común en pacientes con infección por el VIH. Por lo general esta afección cursa asintomática y a veces sólo es descubierta por autopsia. La infección ocular por CMV se desarrolla con una frecuencia mayor en la retina posterior y se elimina a lo largo de las arcadas vasculares; sin embargo el sitio de daño es variable. La dilatación de la pupila y la inspección exhaustiva y cuidadosa de la periferia de la retina en busca de las lesiones típicas, es de primordial importancia y obligatoria. Es importante observar que no existe correlación absoluta entre la presencia de infección por CMV sistémica y la retinitis que éste causa. Incluso se han realizado observaciones de títulos negativos de anticuerpos séricos en pacientes con infección por CMV declarada. (10, 52)

Las lesiones iniciales en el fondo del ojo tienen un aspecto granuloso blanquecino afectando todo el espesor de la retina; los focos de necrosis retiniana se juntan gradualmente y aparece hemorragia concomitante. Después de varios meses la retina

presenta una necrosis completa. Una característica importante de la retinitis causada por CMV que la diferencia de la causada por *Toxoplasma* o *Candida* es la ausencia frecuente de respuesta inflamatoria del vítreo. (10) El mecanismo por el que esta retinitis se inicia y se generaliza, no está claro; en pacientes con SIDA en donde en un gran porcentaje se presenta esta afección ocular, se ha comprobado infección de las células endoteliales de los capilares. Se ha pensado que la vía de acceso del CMV a la retina es la afección microvascular con colapso concomitante de la barrera hematorretiniana. No se ha demostrado que los cuerpos citoides, la afección clásica a nivel capilar, puedan servir como foco infeccioso. En los pacientes con SIDA el examen histopatológico microscópico de esta retinitis revela una clara diferencia entre la retina afectada y la no afectada. La necrosis retiniana en todo su espesor es la regla general en las células de inclusión de CMV así como la observación de partículas virales en el microscopio electrónico. La membrana de Bruch parece ser una barrera bastante potente que limita la diseminación de la infección ya que la coroides vecina subyacente no muestra necrosis o presencia del virus. Se ha comprobado la presencia de antígenos virales en la coroides pero en raras ocasiones, y sin estar relacionada con una zona de retinitis activa suprayacente. Se observan también infiltrados neutrófilos aproximadamente en el 50% de los ojos con necrosis, esto contrasta con los pacientes

enfermos de SIDA, en los que la retinitis rara vez presenta células inflamatorias agudas. En un 50 % de casos se presenta hemorragia y desprendimiento de la retina. En la mayor parte de casos, la afección del nervio óptico es poco frecuente (10, 52)

3.3. GASTROENTEROPATIAS

Se han reportado lesiones por CMV en todo el sistema digestivo, (11, 12, 16, 35, 58) ésto incluye esófago, estómago, intestino delgado, colon y recto. Algunas veces los resultados de la lesión son de apariencia inflamatoria normal (esofagitis, gastritis, ileitis, colitis, etc.). Sin embargo pueden ocurrir complicaciones como perforaciones o hemorragias. (16)

Aunque estos padecimientos gastrointestinales por CMV son comunes en pacientes inmunocomprometidos (causa primaria) o transplantados, pueden ocurrir en personas cuyo sistema inmune se encuentre en condiciones normales. En el primer caso son generalmente infecciones oportunistas, suelen ser más severas y a menudo cursar con complicaciones; en el segundo caso las lesiones sanan espontáneamente por lo general. Como en cualquier trastorno causado por CMV no hay tratamiento satisfactorio, por lo que la prevención de esta enfermedad constituye el método más eficaz para su erradicación. (16)

3.4. NEUMONIA

La neumonía causada por CMV es una manifestación común tanto

en pacientes transplantados como en pacientes inmunocomprometidos. (19, 39, 42) Se ha observado que de un 20 a un 90 % de los enfermos que reciben trasplante alogénico de médula ósea como tratamiento para la leucemia, mueren por este tipo de neumonía y más del 90 % de los enfermos con SIDA que presentan infección por CMV, mueren también por esta causa. (30, 39) Debido a que el CMV permanece latente en los leucocitos de personas sensibilizadas como se había indicado en capítulos anteriores, algunos centros de salud han iniciado ya la transfusión de sangre negativa anti-CMV. (39)

La neumonía también puede ser adquirida, ya sea en forma congénita, durante el nacimiento o bien de forma posnatal. (7) Esta neumonía neonatal presenta una signología difusa; puede adoptar cualquier síndrome de insuficiencia respiratoria del recién nacido con o sin apnea, traqueopnea transitoria, displasias broncopulmonares y el Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR). (7, 8) La neumonía congénita por CMV es adquirida en forma transplacentaria, es rara y por lo general los productos son mortinatos o mueren durante las primeras 24 horas de vida; presentan datos de asfixia, apnea y dificultad al respirar en el momento de la reanimación. (7, 8) La inflamación de los pulmones es difusa y uniforme, se cree que la infección es ascendente, pero no se conoce con precisión la patogenia. (7) Stagno y

colaboradores sugieren que el CMV es causante del 20 % de las neumonías de las cuales menos del 1 % son adquiridas congénitamente y puede ser única o asociada a *Chlamydia trachomatis*. (5)

La neumonía adquirida al momento del parto desarrolla signos clínicos durante los primeros días de vida. Los pulmones contienen áreas de exudado celular, congestión vascular, hemorragia y necrosis. (7)

Los pacientes que adquieren la neumonía durante el nacimiento o en forma posnatal presentan datos de enfermedad sistémica, como somnolencia, irritabilidad, rechazo a los alimentos, datos de insuficiencia respiratoria grave, insuficiencia cardíaca, crisis convulsivas, llegando inclusive al estado de choque. (7)

Como medida preventiva se ha venido utilizando la inmunoglobulina hiperinmune a CMV, la cual puede reducir el riesgo de una enfermedad grave y su uso es tal vez una alternativa para impedir la problemática de las transfusiones.

3.5. INFECCIÓN EN TRANSPLANTES

CMV es un agente infeccioso muy común después de que se ha llevado a cabo un transplante ya sea de médula ósea, riñón, corazón, hígado e inclusive de páncreas. Esta infección ha cobrado ya una gran importancia en Estados Unidos y ha llegado a ser ya un

problema mayor en trasplantes de riñón en donde se ha convertido en causa de alta morbilidad. La incidencia reportada de infección por CMV post-trasplante renal gira alrededor del 17 al 25 % en pacientes que fueron tratados con azatioprina y del 2 al 23 % en pacientes tratados con ciclosporina A. Del 1 al 3 % de los casos de infección post-trasplante renal por CMV son mortales. (37)

En los pacientes con trasplantes renales que han recibido tratamiento con inmunosupresores para contrarrestar el rechazo, CMV suele ser el agente infeccioso oportunista más importante. Según nos revela el estudio que Mayer y colaboradores realizaron; de 120 pacientes que recibieron trasplante de riñón y que fueron tratados con esteroides en dosis bajas y con ciclosporina A, el 33 % (40 pacientes) mostraron evidencia de infección reciente por CMV y el 17 % (21 pacientes) desarrollaron una infección sintomática. (40)

Un estudio realizado en Francia, en 12 pacientes con trasplante de riñón o riñón-páncreas el 41.6 % presentaron infección primaria, obteniéndose cultivos positivos a partir de sangre en cinco pacientes, uno a partir de médula ósea, nueve a partir de orina, dos de lavados broncoalveolares y tres pacientes presentaron neumonía por CMV. (22) Marsano reportó que el 83.3 % de 42 pacientes que habían recibido trasplante de riñón y/o hígado presentaron infección por CMV. (30)

La manifestación más comúnmente observada en pacientes con

esta infección post-transplante renal es de tipo gastroduodenal. (12, 37) Tenemos por ejemplo que el 60 % de las úlceras gástricas post-transplante renal son debidas a CMV. (12)

Se ha llegado a detectar DNA de este virus en preparaciones purificadas de túbulo renal lo que sugiere que éste puede ser un sitio de latencia del CMV durante el transplante y un foco infeccioso importante. (35)

Estudios relacionados con trasplantes de hígado, indican que del 30 al 69 % de los pacientes con títulos seronegativos presentaron infección primaria por CMV con complicación en un 10 a un 15 % de los casos. (18) En los trasplantes de corazón y corazón-pulmón, la manifestación más evidente de esta infección es también de tipo gastroduodenal. (32) Wreghitt reportó que de 250 trasplantes de corazón y 41 de corazón-pulmón (en total 291), el 83.8 % (244 pacientes) presentaron infección por CMV, siendo el 17.6 % infección primaria y el 31.1 % reactivación o reinfección. (37) En el transplante de médula ósea también el CMV ocupa un sitio relevante; la incidencia de infección por este virus después del transplante es del 22.5 % en pacientes seronegativos y del 61.1 % en pacientes seropositivos. (30) En este caso la manifestación que se encuentra con más frecuencia es la neumonía por CMV . (32)

CMV juega también un papel importante en los padecimientos de

rechazo; tenemos por ejemplo que en Italia, de 169 pacientes transplantados, con talasemia grave y con infección por CMV, el 1.7 % murieron por esta infección y fue además el responsable final de la muerte de todos los que presentaron rechazo injerto contra huésped. (3) Los pacientes con rechazo que son tratados con alfa-linfocitoglobulina presentan una infección tres o cuatro veces más frecuente que los que no llevan este tratamiento. (4)

Todos estos datos nos indican que los pacientes receptores de transplantes y los tratados con inmunosupresores son factores de riesgo importantes y más aún si se trata de receptores seronegativos y donadores seropositivos. (5) Es entonces de primordial importancia la prevención de la infección en cualquier tipo de transplante, esto se ha logrado hacer utilizando donadores seronegativos a CMV y administrando gammaglobulina anti-CMV y ganciclovir, el cual tiene efecto antiviral.

3.6. INFECCIÓN EN PACIENTES CON EL SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (SIDA).

En más del 95 % de pacientes con SIDA se ha encontrado anticuerpos a CMV y este virus puede replicarse in vitro a partir del semen de la mayoría de los homosexuales con este síndrome. Algunos estudios han revelado DNA de CMV en el tejido de Sarcoma de Kaposi obtenido de este tipo de pacientes. A pesar de la estrecha relación entre CMV y este síndrome, se considera que esta infección es oportunista al síndrome en cuestión. (6)

Como ya se indicó, la infección por CMV es generalmente asintomática aún en pacientes con SIDA, aunque pueden presentar manifestaciones clínicas. Un síndrome heterófilo negativo similar mononucleosis e indistinguible del padecimiento en el inmunocompetente, aparece como signo clínico más común. En algunos pacientes se involucran más órganos; la hepatitis, neumonía no alveolar (intersticial), artralgias, retinitis y signos de infección generalizada suelen aparecer. Se ha observado también en estos pacientes, evidencias de infección gastrointestinal ocasionada por CMV, (11, 16, 29, 42, 59) así como casos de encefalitis. (38, 60, 62, 66) Después de la fiebre y del síndrome similar mononucleosis, el signo más común es la neumonía, durante la cual hay disnea asociada a hipoxia, lo cual da un mal pronóstico al paciente, ya que más del 90 % de los pacientes con SIDA que presentan infección por CMV mueren por esta causa. (49, 58)

Aproximadamente el 50 % de los pacientes con este síndrome presentan alteraciones oftálmicas siendo la más común la retinitis ocasionada por CMV, que presenta como adición alteraciones del nervio óptico y los pares craneales SK, cambios microvasculares y herpes zóster oftálmico. (10, 47)

Tomita y Chiga encontraron también al CMV relacionado con el SNC; este virus fue observado en 10 de 12 autopsias de pacientes

fallecidos por causa del SIDA y fue el agente viral más común en ellos. En los 10 casos, las glándulas adrenales se afectaron por CMV y se observó necrosis de la médula adrenal en 6 casos. (38) También en cerebro se ha encontrado a este virus; según el estudio de Wiley y Nelson, el 33 % de 93 pacientes con SIDA presentaron infección por CMV en cerebro; de este 33 % (31 pacientes), el 71 % (22 pacientes) mostraron en cerebro además del CMV al HIV. El CMV presentó diseminación vía hematológica hacia el SNC afectando así células de la glia, neuronas y células endoteliales. (39)

En los pacientes con SIDA, la infección por CMV, confirmada por títulos de anticuerpos presentes contra este virus, presenta a CMV en fluidos corporales como orina y líquido seminal. (17) Es difícil localizar todas las anomalías observadas durante la infección por este virus en este tipo de pacientes.

3.7. POTENCIAL ONCÓGENO

Como los otros miembros de la familia Herpesviridae, el CMV ha demostrado tener un potencial oncogénico. Tanto las células susceptibles como las no susceptibles del huésped, son estimuladas a incrementar la síntesis de DNA y RNA. La luz ultravioleta irradiada sobre el CMV humano provoca que este transforme los fibroblastos de embrión de hámster recién destetados, al ser estos inoculados. (36, 31) Un aislamiento clínico a partir de tejido de próstata de un niño de 3 años indujo la transformación de

fibroblastos humanos; siendo oncogénicos para ratones atímicos recién destetados. (31) Se ha demostrado también en humanos de raza negra principalmente, casos esporádicos de cáncer de próstata. En células humanas se ha notado en algunos casos que estas adquieren transitoriamente algunas características de células transformadas. (32)

Otro hecho que apoya el poder oncogénico de este virus es el demostrado por Boldogh y colaboradores, quienes encontraron que después de una infección por CMV, se detecta un incremento rápido en los niveles de RNA de los protooncogenes c-fos, c-sun y c-myc. (14)

Ni la inactivación de la infectividad viral con luz ultravioleta, ni la inhibición de la traducción con cicloheximida, sirvieron para contrarrestar la expresión de los oncogenes, pero estos tratamientos redujeron sustancialmente la detección de antígeno viral IE. Los niveles elevados de RNA de protooncogenes, fueron disminuidos con actinomicina D; es entonces que la expresión de los oncogenes ocurre después de la síntesis proteica viral. (4)

CAPITULO 4

METODOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO DEL CMV

- 4.1. *Aislamiento del CMV en cultivos celulares.*
- 4.2. *Neutralización.*
- 4.3. *Fijación de complemento.*
- 4.4. *Inmunofluorescencia.*
 - 4.4.1. *Inmunofluorescencia directa.*
 - 4.4.2. *Inmunofluorescencia indirecta.*
 - 4.4.3. *Sistema biotina-avidina.*
 - 4.4.4. *Aplicación de anticuerpos monoclonales en la
Inmunofluorescencia.*
 - 4.4.5. *Inmunofluorescencia anticomplementaria.*
- 4.5. *Método de ELISA*
- 4.6. *Reacción de Polimerasas en Cadena.*

C A P I T U L O 4

MÉTODOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CMV

4.1. AISLAMIENTO DEL CMV EN CULTIVOS CELULARES.

Para el aislamiento o propagación del CMV humano en el laboratorio, deben utilizarse fibroblastos de origen humano. (5, 31) Los cultivos deben mantenerse por periodos prolongados de tiempo (4 a 6 semanas) ya que, como se indicó en el capítulo 2, CMV posee un periodo de incubación relativamente largo. Para lograr esto, el medio en el que se está propagando el virus debe ser reemplazado por lo menos una vez por semana. (31)

Las líneas celulares fibroblásticas se logran a partir de tejidos fetales y embriones humanos. (24, 31) Las líneas más utilizadas son las de fibroblastos de pulmón de embrión humano como la WI-38, IHR-90 y la MRC-5 o las de prepucios de recién nacido (HFF) frescos y recién circuncidados. Estos últimos son colocados en proporción de un prepucio por cada tres ml de anfotericina (0.25 mg/ml) y gentamicina (0.5 mg/ml) en Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM). (24)

El método de cultivos celulares se considera el más sensible en el laboratorio, para confirmación de la infección por CMV. Se ha observado que éste es aislado con gran éxito en las líneas celulares mencionadas pero debe tomarse en cuenta que cuando se

utilizan este tipo de células con alto número de pases, se puede reducir la sensibilidad de éstas al CMV.

El CMV puede ser aislado de varios fluidos corporales, sin embargo, los más usuales para dicho diagnóstico son la saliva y la orina. En el caso de los paciente inmunodeficientes el cultivo linfocítico es de gran valor, ya que en algunos casos la presencia de CMV en leucocitos es el mejor indicador de una infección sintomática por CMV y no el estar excretándolo por orina o saliva. Los especímenes de biopsia y necropsia son utilizados para el aislamiento del virus, así como la leche materna. La muestra por analizar es inoculada en el medio y se corre un control positivo y uno negativo. Estas muestras se incuban a 37 °C. A las 24 horas se hace cambio del medio por uno fresco y se incuban 28 días más. Las lecturas se hacen tres veces por semana o por lo menos 1 ó 2 veces por semana en microscopio óptico. (24)

El ECP característico fue tratado en la sección 2.7. Las células infectadas contienen numerosos núcleos, con grandes inclusiones acidófilas, asombrosamente regulares, compuestas por agregados de viriones y lisosomas. (es) Este ECP puede observarse a las 24 horas o bien hasta los 28 días dependiendo de la cantidad de partículas virales presentes en cada espécimen. El CMV además de causar ECP en los fibroblastos humanos se caracteriza por no producirlo en la línea celular HEP-2c. Esta característica es útil, porque es una alternativa a la

confirmación por la prueba clásica de la neutralización, la cual se verá a continuación.

4.2. NEUTRALIZACIÓN.

La prueba de neutralización es considerada una de las más específicas de las técnicas para el diagnóstico del CMV. (5) En esta técnica se trata de medir la cantidad de anticuerpos que logran neutralizar la infectividad del CMV, es decir se mide inhibición del ECP.

Esta técnica cuenta con la gran ventaja de que únicamente se detectan anticuerpos dirigidos contra los antígenos de superficie del CMV, en particular los involucrados en la adsorción. Estos antígenos son de cepa viral, por lo que muestra una muy limitada reacción cruzada con virus de la misma familia. Sin embargo ha caído en desuso por las desventajas encontradas, como son:

- + La interacción CMV- Ac puede ser reversible dependiendo del tiempo y temperatura de incubación, volumen del líquido en el que se realiza la reacción y tiempo de lectura del ECP. Esto hace que solamente se puedan comprobar confiablemente, ensayos de títulos dentro de un mismo laboratorio.
- + La probable existencia de virus no típicables es otra desventaja. Esto se debe con frecuencia a que la preparación puede contener agregados del virus, quizá

asociados a restos celulares, que no todos son accesibles a los anticuerpos. (es)

- * El tiempo que se requiere para observar el ECP es otra variable que deja a este método en desventaja con respecto a otros métodos que no requieren de mucho tiempo de proceso.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes son expresados como la máxima dilución del suero problema que ocasiona el 60 % de la inhibición del ECP. Los títulos mayores o iguales a 1:2 se consideran positivos para estos anticuerpos.

4.3. FIJACIÓN DE COMPLEMENTO

En esta prueba se va a medir indirectamente la cantidad de anticuerpos anti-CMV, midiendo la actividad lítica del complemento que no fue fijado por el complejo CMV-Ac sobre glóbulos rojos sensibilizados con hemolisina o ansoceptor eritrocítico. La prueba depende de un sistema de reacciones en dos etapas. En la primera etapa, el antígeno y el anticuerpo reaccionan en presencia de una cantidad conocida de complemento (c') y éste es consumido o fijado por el complejo antígeno-anticuerpo formado. En la etapa siguiente, la actividad hemolítica del complemento es medida, para así determinar la cantidad de complemento que fue fijado y por lo tanto la cantidad de anticuerpos presentes en la mezcla inicial.

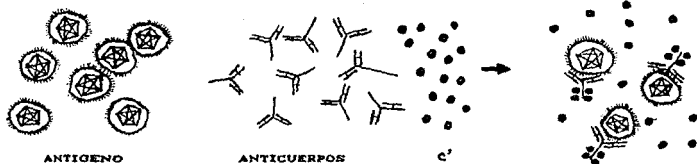
Los resultados son expresados en base a la dilución más alta del suero que muestra fijación de complemento, es decir aquella dilución que no presenta hemólisis. (51, 50, 05) Esta prueba requiere de correrse con varios controles, para asegurar su confiabilidad, ya que existen fuentes de error importantes, las cuales se tratan a continuación:

1) El suero del paciente puede presentar actividad anticomplementaria, es decir, puede fijar complemento aún en ausencia del antígeno viral. Esto puede deberse a hemólisis o a contaminación bacteriana en sueros colectados inadecuadamente o al uso de sueros lipídicos. Esto puede a veces suprimirse por calor, por absorción con caolin, o por absorción con exceso de complemento seguido de calentamiento.

2) La preparación del antígeno viral puede ser anticomplementaria, aunque esto no es muy común y puede ser causado por lípidos contaminantes, los cuales pueden ser eliminados con acetona o fluorocarbón.

3) La preparación del antígeno viral puede fijar complemento inespecíficamente como resultado de la interacción entre antígenos celulares y los anticuerpos anticelulares presentes en el suero. Esto puede eliminarse con exceso de complemento.

ETAPA 1)



ETAPA 2)

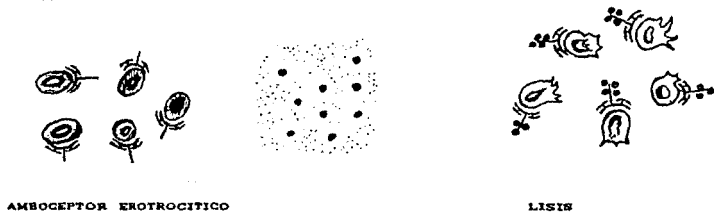


FIG. 2. FIJACION DE COMPLEMENTO: ETAPA 1) REACCION ANTIGENO ANTICUERPO EN PRESENCIA DE COMPLEMENTO (C₁), DONDE PARTE DE ESTE ES FIJADO Y PARTE QUEDA LIBRE. ETAPA 2) EL COMPLEMENTO RESIDUAL ES MEDIDO POR LA ADICION DE GLOBULOS ROJOS SENSIBILIZADOS (AMBOCEPTOR EROTROCITICO) LOS CUALES SON LISADOS DEBIDO A LA FIJACION DEL COMPLEMENTO RESIDUAL.

4) Por otra parte, la actividad anticomplementaria de los sueros puede indicar la presencia de complejos inmunes en la sangre circulante, los cuales pueden combinarse al complemento in vivo. Puesto que estos complejos pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis (recordemos que CMV causa viremias persistentes asociadas al plasma y se multiplica en tejido linfoide, de esta manera induce la formación de anticuerpos neutralizantes; estos se combinan con antígenos virales y con viriones en el suero para formar complejos inmunes que pueden en algún momento bloquear la citólisis inmune de las células blanco infectadas por virus, por linfocitos T o por anticuerpos fijadores de complemento) es necesario diferenciar su presencia, de la actividad anticomplementaria inespecífica.

5) Las preparaciones no purificadas de virus como por ejemplo los sobrenadantes de cultivos celulares, contienen antígenos solubles correspondientes a partes virales que no fueron ensambladas e incluso proteínas no virales con código viral. Los anticuerpos a todos estos antígenos se presentan en sueros de los pacientes que se encuentran en fase de convalecencia y se registrarán por fijación de complemento. Por esta razón habrá reacción cruzada entre virus de la misma familia. Por consiguiente no se trata de una prueba altamente específica. (os)

Esta prueba tampoco es muy sensible, ya que está demostrado que los títulos de anticuerpos obtenidos por otros métodos como neutralización o inmunofluorescencia resultan más elevados. (8)

4.4. INMUNOFLUORESCENCIA (IFA)

La inmunofluorescencia es una técnica inmunohistoquímica en la cual un anticuerpo anti-CMV es acoplado a compuestos fluorescentes tales como el isotiocianato de fluoresceína o la rodamina. El resultado de esto, es un antisuero fluorescente con función de " marcador " que localizará al antígeno, demostrado en un microscopio de fluorescencia.

4.4.1. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

El conjugado o " marcador " mencionado, es añadido a la muestra que consiste en células de tejido infectadas, con las cuales se forma un complejo inmunitario estable. Las proteínas contaminantes son eliminadas por lavado y así se tendrá entonces el antígeno unido al anticuerpo específico marcado con el compuesto fluorescente. Finalmente la muestra se observa en el microscopio de fluorescencia.

4.4.2. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Esta técnica utiliza una fase sólida con antígeno, sobre la

cual se agrega el suero problema conteniendo anticuerpos anti-CMV. Los anticuerpos no fijados a la fase sólida son removidos mediante lavados y se agrega entonces suero antigammaglobulina humana conjugada a fluoresceína. Dependiendo de la cantidad de anticuerpos anti-CMV que presente la muestra problema será la cantidad de anticuerpos marcados los que se fijan. (59, 65) Se ha estimado que este método posee una sensibilidad de hasta 1 pg/dl y una especificidad entre 70 y 90 % . (29, 68)

Esta prueba presenta varias modalidades, las cuales aumentan su sensibilidad y/o especificidad. Tal es el caso del sistema biotina avidina, o la prueba de inmunofluorescencia anticomplementaria (IFAC) o utilizando anticuerpos monoclonales. (68)

4.4.3. SISTEMA BIOTINA AVIDINA

El sistema biotina-avidina utiliza la gran afinidad que tiene la avidina (glucoproteína básica derivada de la albúmina) por la biotina (vitamina que fácilmente se acopla covalentemente a un anticuerpo anti-CMV) Si la avidina es marcada con fluoresceína o rodamina servirá como " marcador " y puesto que varias moléculas de biotina pueden acoplarse a un anticuerpo, la adición subsiguiente de avidina marcada con fluorocromo produce una

fluorescencia aumentada. (59) Este sistema tiene como ventaja que evita la fijación inespecífica de otros sustratos, pero esto obviamente hace que su costo sea más elevado. Además del aumento de especificidad por esta modalidad, el aumento en la fluorescencia facilita de manera importante la lectura.

4.4.4. APLICACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN LA INMUNOFLUORESCENCIA

El uso de anticuerpos monoclonales específicos producidos mediante la hibridación de células somáticas con células formadoras de anticuerpos ha sido bastante exitoso. Zweygherg y colaboradores produjeron un anticuerpo monoclonal llamado CCH2 y evaluaron su acción sobre la prueba de IFA. Los resultados revelaron que esta prueba mantuvo su sensibilidad promedio del 70 %, en cambio su especificidad mostró un incremento hasta el 99 %, esto hace de esta modalidad una herramienta muy útil para evitar reacciones cruzadas con otros herpesvirus. (29, 68)

4.4.5. INMUNOFLUORESCENCIA ANTICOMPLEMENTARIA

Estudios realizados recientemente demostraron ciertas desventajas al emplear estas modalidades de IFA incluyendo el método directo e indirecto, la más importante y decisiva es que la infección por CMV induce cambios morfológicos y bioquímicos en las células infectadas, las cuales constituyen el antígeno para la

prueba. Estas células van a presentar inclusiones nucleares y citoplásmicas con inducción de receptores de IgG. Es decir, la infección por CMV va a provocar la formación de receptores Fc que se unirán a la IgG no inmunitariamente, produciendo así fluorescencia citoplásmica y perinuclear inespecífica. (26 , 51) Este problema se elimina empleando la prueba de inmunofluorescencia anticomplementaria.

La prueba de IFAC es un ensayo de inmunofluorescencia aplicado al diagnóstico serológico del CMV por su alta sensibilidad, especificidad, rapidez y relativa simplicidad, además de que no presenta reacción cruzada con otros herpesvirus. Esta modificación de la IFA ha sido utilizada ampliamente ya que se ha aplicado para detectar antígeno nuclear específico del virus con notable éxito. La ventaja radica en que las IgG unidas a los receptores Fc inducidos en el citoplasma no fijan complemento por lo que no se teñirán con el conjugado, eliminándose así la fluorescencia citoplásmica inespecífica.

Debido a que los núcleos de fibroblastos humanos infectados con CMV son el mejor indicador en las pruebas de IFA, es conveniente utilizar un antígeno que sea nuclear y perfectamente purificado de células infectadas. Logrando eliminar teóricamente la fluorescencia inespecífica relacionada con el receptor Fc

Este método se basa en la capacidad del complejo antígeno

anticuerpo para fijar complemento lográndose la detección tanto de IgG como de IgM. Los pasos básicos de la prueba son los siguientes:

- 1) Fijación del antígeno a una laminita.
- 2) Adición del suero problema en el que pueden o no estar presentes los anticuerpos específicos.
- 3) Lavado de anticuerpos no unidos.
- 4) Agregar complemento, el cual será captado por el complejo antígeno-anticuerpo.
- 5) Remover el complejo libre.
- 6) Adicionar IgG o IgM anticomplemento conjugada a isotiocianato de fluoresceína.
- 7) Tefir con azul de Evans y eliminar el exceso de colorante.
- 8) Realizar la lectura en microscopio de fluorescencia.

Esta prueba se puede hacer cuantitativa adicionando a los pozos de la placa donde se llevará a cabo la reacción, diluciones seriadas del suero. El título de positividad corresponderá a la máxima dilución del suero que aún muestre fluorescencia. Los títulos mayores o iguales a 1:8 se consideran como evidencia de infección. (26, 51)

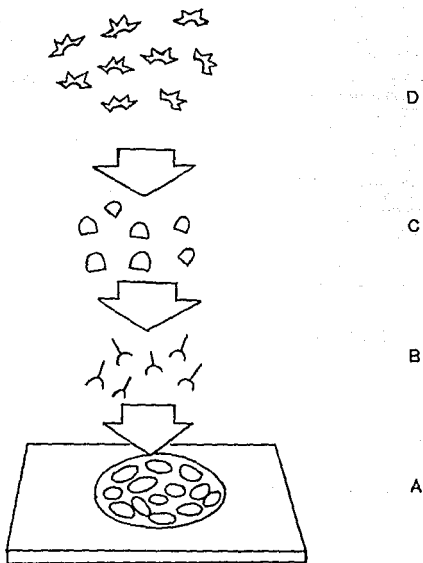


FIG. 3. ESQUEMA QUE MUESTRA LOS PASOS PARA LA REALIZACION DE LA PRUEBA DE IFAC. A) ANTIGENO NUCLEAR, B) SUERO PROBLEMA (anticuerpos), C) COMPLEMENTO, D) IgG o IgM ANTICOMPLEMENTO, CONJUGADA A ISOTIOCIANATO DE FLUORESCINA.

4.5. METODO DE ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

Este método inmunoenzimático emplea un indicador el cual es una enzima acoplada a un anticuerpo. Esta enzima cataliza una reacción química sobre su sustrato. La reacción de la enzima es medida cuantitativamente por espectrofotometría generalmente y la densidad óptica resultante es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo o antígeno presente en la muestra.

Para su realización, el antígeno es adherido a la superficie sólida (comúnmente microplacas de poliestireno) a la cual se adiciona el suero del paciente a investigar, en el que pueden o no estar presentes los anticuerpos específicos. Si éstos están presentes en la muestra, se unirán al antígeno previamente adherido y por medio de lavados serán removidos los anticuerpos no ligados. Así tendremos en la superficie sólida un complejo antígeno-anticuerpo adherido. Posteriormente se agrega anti-IgG conjugada a una enzima que se unirá al complejo y se remueve el conjugado enzimático no ligado por medio de lavado. Finalmente se adiciona el sustrato el cual será hidrolizado, y se lee espectrofotométricamente. Por lo tanto este método nos mide indirectamente los anticuerpos específicos en el suero del paciente.

Se han utilizado una gran variedad de superficies sólidas para llevar a cabo la adsorción del antígeno, dependiendo de esto.

la unión será por enlaces covalentes o bien interacciones no covalentes. En el caso del CMV la prueba de ELISA se utiliza principalmente para detectar IgG e IgM contra el virus. Esto no significa que el ensayo no pueda ser adaptado para cuantificar cualquier otra inmunoglobulina específica o inclusive subclases de IgG.

La metodología de ELISA constituye una herramienta importante para la investigación de la relación huésped parásito. Con respecto al CMV las aplicaciones pueden ser las siguientes:

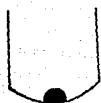
- * Conducción de estudios seroepidemiológicos en los diferentes niveles de la población.

- * Diagnóstico de infección primaria por CMV.

- * Escrutinio de donadores de sangre y órganos para prevención de riesgo de transmisión del CMV a los receptores.

- * Definición del estado de susceptibilidad a la infección por CMV, en las mujeres que se encuentran en edad reproductiva. La repercusión inmediata de esta acción estaría encaminada al consejo prenatal y perinatal.

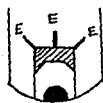
Los pasos esquemáticos se muestran a continuación.



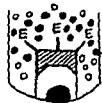
A



B



C



D

FIG. 4. REPRESENTACION DEL METODO INDIRECTO DEL ENSAYO DE ELISA PARA DETECCION Y MEDICION DE ANTICUERPOS. A) ANTIGENO VIRAL ADSORBIDO, B) CONJUGADO DE ANTICUERPOS PRESENTES EN LA MUESTRA Y ANTIGENO, C) CONJUGADO ENZIMATICO ANTI-IgG HUMANA, D) SUSTRATO SON HIDROLIZAR (*) Y SUSTRATO HIDROLIZADO (*).

4.6. REACCIÓN DE POLIMERASAS EN CADENA.

Actualmente se ha venido utilizando con increíble éxito un método de amplificación del ácido desoxirribonucleico (DNA) para establecer ensayos diagnósticos para la identificación de secuencias del gene IE de CMV en muestras clínicas. Este método como su nombre lo indica consiste en una amplificación del DNA de este virus por medio de reacciones en cadena, es decir se aumenta in vitro el número de cadenas de DNA presentes en la muestra clínica. Esto se logra induciendo la replicación de este DNA utilizando " primers " sintetizados in vitro y que son complementarios a una fracción determinada de uno de los fragmentos del genoma viral. A continuación se explican los pasos básicos para tener una mejor comprensión de la Reacción de Polimerasas en Cadena (PCR).

Inicialmente se requiere de un fragmento del genoma del CMV donde se encuentran incluidos los genes IE, ya que esto disminuye el tiempo de proceso debido a que estos genes se codifican tempranamente y por consiguiente la replicación se lleva más rápidamente. La secuencia nucleotídica de este fragmento del genoma debe ser perfectamente conocida. Posteriormente se escoge un par de secuencias nucleotídicas; una que contenga 130 bp y la otra con 152 bp. Estas secuencias deben estar en los extremos del fragmento indicado, y se les conoce con el nombre de " targets " o

blancos. De éstos se escogen oligonucleótidos y una vez conocida su composición se sintetizan in vitro, obteniéndose así los " primers ".

La muestra problema es desnaturalizada para abrir las cadenas del DNA y aquí se agregan los " primers" que fueron sintetizados, los cuales se unirán a su fragmento complementario de las cadenas del gene del CMV que fueron desnaturalizadas. A este proceso de unión se le conoce como " annealing " , y al producto formado de esta unión, se le ha denominado para fines de este trabajo con el nombre de molde. A los moldes obtenidos, se les agrega una polimerasa (taq-polimerasa) en presencia de nucleótidos y en un medio de reacción amortiguado. Esta polimerasa se encargará de desencadenar la replicación de las cadenas de DNA. Una vez terminada la replicación de las cadenas iniciales, se dice que se completó un ciclo, a este ciclo se le conoce como pase. Estas cadenas pueden ser reabiertas y sometidas al mismo procedimiento de amplificación explicado y así se tendrá otro pase. El número de cadenas aumentará por lo tanto de manera exponencial en función del número de pases efectuados.

De esta forma el número de moléculas de DNA presentes en la muestra pasa a ser mucho mayor y se puede entonces detectar por electroforesis con tinción normal de Bromuro de etidio o por autorradiografía con marcadores radioactivos. (27, 46) Este

último método de detección no es recomendable debido a su elevado costo y a que implica un riesgo para la persona que está procesando el estudio debido al uso de isótopos radioactivos.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

C A P I T U L O V

CONCLUSIONES

El CMV se caracteriza por producir infecciones crónicas permaneciendo latente en los linfocitos B, sin embargo cualquier disturbio del sistema inmune traerá por consecuencia una activación del virus, abandonando su estado de latencia y convirtiéndose en un oportunista, al que se le debe dar bastante consideración debido a las consecuencias que causa.

Es entonces cuando surge la problemática de la infección por CMV, la cual como se dijo, está directamente relacionada con estados de inmunosupresión o inmadurez inmunológica. Es por esto, que la infección por CMV se presenta con frecuencia durante el primer año de vida. Epidemiológicamente estas infecciones tempranas han estado ligadas en mayor grado a la madre que a cualquier otro miembro de la familia o a otras fuentes. Los neonatos por sí mismos son factores de riesgo importantes, ya que sólo han recibido anticuerpos maternos y no son éstos lo suficientemente competentes como para evitar la infección. El niño infectado en forma posnatal es considerado como un foco infeccioso de importancia, debido al cada vez mayor uso de guarderías. Aquí los niños están en un continuo cambio de fluidos como orina o saliva, donde se presenta el virus en niños infectados y existe

por tanto el riesgo de contagio. Las mujeres en edad reproductiva pueden ser susceptibles al CMV mientras existan evidencias de que un reservorio de infección se encuentra en alguno de sus hijos, quien a su vez asista a guardería. Las madres seroinmunes o no inmunes pueden transmitir al CMV a sus hijos via útero, sin embargo los bebés nacidos de mujeres que experimentan una infección primaria son más susceptibles de adquirir esta infección. El porcentaje de seropositividad en niños pequeños es mayor en países en desarrollo y en donde los niños acuden comúnmente a guarderías y que son alimentados con leche materna.

Los pacientes transplantados corren también un alto riesgo de adquirir la infección, especialmente si el órgano o tejido proviene de un donador seropositivo y el receptor es seronegativo. A parte de esto, en los pacientes transplantados se presenta la problemática del uso de inmunosupresores como medida preventiva a un rechazo del huésped contra el injerto, lo que aumenta el riesgo de adquirir la infección por estos pacientes.

El CMV es uno de los problemas más importantes a tratar en aquellos pacientes que sufren una infección por HIV, en donde en la mayoría de los casos la infección resulta fatal por esta causa.

Todo esto obliga a la elección de un método de diagnóstico, la cual se fundamentará tanto en su confiabilidad como en las

posibilidades y requerimientos de cada laboratorio. Se recomienda que la presencia de la infección se deduzca a partir de los datos serológicos, cualquiera que haya sido el método empleado y del cuadro clínico del paciente, pero que sea siempre confirmado por medio de un aislamiento viral en cultivo celular. La detección y medida de anticuerpos ha sido desarrollada básicamente por todos los métodos serológicos que se conocen y tanto unos como otros tienen sus ventajas y sus desventajas. La fijación de complemento invierte una labor pesada y tardada; esto es debido a la titulación previa y necesaria de hemolisina y complemento y a la preparación y mantenimiento cuidadoso de los glóbulos rojos. Además de requerir que se corran varios controles para asegurar su confiabilidad. En caso de que algunos controles no sean de resultados congruentes se tiene que eliminar la fuente de error que nos invertirá de nuevo tiempo extra. A su vez el método de neutralización del efecto citopático requiere de la espera del periodo de incubación del virus (por lo menos cuatro semanas), esto hace de este método una herramienta puramente confirmativa. Los métodos de radioinmunoensayo (RIA) o inmunofluorescencia o modalidades de esta, son altamente sensibles y confiables pero no son adecuados ni prácticos debido al costo de ambos y al riesgo del material radioactivo en el caso del RIA, por lo que no todos los centros de salud o laboratorios pueden contar con estas dos técnicas. Aunque la inmunofluorescencia anticomplementaria elimina

la posibilidad de una fluorescencia inespecífica, que es otro inconveniente de la IFA, reúne desventajas de esta misma prueba y además las del uso y cuidados del complemento. El método de ELISA es rápido y sencillo aunque no de muy bajo costo, pero con la gran ventaja de que se han desarrollado ya métodos basados en equipos comerciales y más aún existe ya la prueba de MICROELISA, la cual gasta cantidades de reactivos mucho menores reduciendo así su costo y haciendo más sencilla su labor. La prueba de PCR es el último adelanto en detección de enfermedades virales y posee una excelente sensibilidad, reproducibilidad y confiabilidad, desgraciadamente es un método poco costeable para el uso rutinario, además de encontrarse aún en fase de desarrollo

Existe una amplia variedad de métodos de diagnóstico de CMV, no así para su tratamiento. Una vez diagnosticada la infección la variedad de tratamientos es casi nula y ninguno de éstos es satisfactorio. Se acostumbra a utilizar el fosfonoformato trisódico (foscarnet), ganciclovir y derivados purínicos y pirimidínicos como la desoxiguanosina, pero su eficacia sigue en estudio. La única forma de evitar que CMV cause infección es utilizando medidas preventivas; sin embargo esto encuentra su limitación en las infecciones congénitas, las cuales no pueden ser evitadas, a menos (aunque suene obvio) que aquellas mujeres seropositivas a CMV se abstengan de entrar en un periodo de embarazo. La infección posnatal en niños se puede evitar.

suprimiendo la alimentación con leche materna a aquellos niños nacidos de madres seropositivas, evitando el ingreso de niños seropositivos a guarderías, transfundiendo sangre negativa a CMV o bien transfundiendo glóbulos rojos desglícerolizados. Las infecciones en adultos no tienen mayor importancia médica a menos que se trate de individuos transplantados o inmunosuprimidos. Para el caso de pacientes transplantados la mejor forma de erradicar al CMV es también la prevención. En estos casos debe someterse al donador a un estudio de anticuerpos a CMV, y si resulta positivo, el individuo no podrá ser donador. Actualmente esta medida no es bien aplicada en nuestro país, pero debe ser tomada en seria consideración en todos los centros de salud y hospitales donde se realicen transfusiones y trasplantes, y eventualmente ser considerada como obligatoria a través de la ley general de salud.

Todo esto es aún más importante y se hace más necesario el hecho de evitar la infección cuando tenemos en cuenta que la posibilidad de una vacuna se encuentra aún muy remota.

Es entonces, el CMV un agente oportunista que nos presenta una gran importancia médica y una gran complicación para encontrar un tratamiento. La identificación de personas seropositivas juega un papel importante para la erradicación de la infección.

Se espera que el presente trabajo haya mostrado la gran importancia que tiene este virus para médicos o personas que se dediquen a la realización de trasplantes y transfusiones, así como en hospitales donde se atiendan pacientes con SIDA

BIBLIOGRAFIA

1. Agha S.A., Mahmoud L.A., et al. Early Diagnosis of Cytomegalovirus Infection in Renal Transplants and Dialysis Patients by DNA / DNA Hybridization Assay. *J. Med. Virol.*, 27: 252-257, 1989.
2. Alford C.A., Hayes K. and Britt W., Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy: Comparison of Antibody Responses to Virus Encoded Proteins Between Women With and Without Intrauterine Infection. *J. Infect. Dis.*, 158: 917-924, 1988.
3. Baronciani D., Agelucci E., Lucarelli G., et al. Cytomegalovirus Infections in Thalassemic Patients after Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Trans.* 5: 167-172, 1990.
4. Boldogh I., Abu Bakar S. and Albrecht T. Activation of Protooncogenes: An Immediate Early Event in Human Cytomegalovirus Infection. *Science*, 247: 561/564, 1990.
5. Burrows W., (ed.). *Virus de las Enfermedades Exantemáticas y Virus Tumorales*. En: *Tratado de Microbiología*. 19a. ed., Ed Interamericana, S.A. Cap. 37: 851, 1970.
6. Calderón J.E., Karchmer K.S., *Espectro Clínico de la Infección por Citomegalovirus*. En: *Conceptos Actuales en Infectología Perinatal*. 27:297-307, 1988.
7. Calderón J.E., Solórzano F., Arredondo J.L., *Neumonía neonatal*. En: *Conceptos Actuales en Infectología Perinatal*. 27: 297-307, 1988.

8. Calderón J.E., Toribio E., Heredia H., et al. Deficiencia Respiratoria Contra Neumonía Neonatal. *Infect.*, 8: 505, 1982.
9. Cassol S.A., Poom M., Pal R., et al. Primer-mediated Enzymatic Amplification of Cytomegalovirus DNA. Application to the Early Diagnosis of Cytomegalovirus Infection in Marrow Transplant Recipients. *J. Clin. Invest.*, 83: 1109-1115, 1989.
10. Chess J., Fischer J., Manifestaciones Oftálmicas del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. *Infect.* 10: 83-86, 1990.
11. Clayton F., Klein E.B. and Kotler D.P.. Correlation of In Situ Hybridization With Histology and Viral Culture in Patients With Acquired Immunodeficiency Syndrome With Cytomegalovirus Colitis. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 113: 1124-1126, 1989.
12. Cohen E. B. , et al. Unexpectedly High Incidence of Cytomegalovirus Infection in Apparent Ulcers in Renal Transplants Recipients. *Surgery*, 97: 606-612, 1985.
13. De Cates C.R., Clifford R.N.R. and Walker J.R.. fatal Acquired Cytomegalovirus Infection in Neonate With Maternal Antibodies. *J. Infect.*, 17: 235-239, 1988.
14. De Marchi J.M., Kaplan A.S., Replication of Human Cytomegalovirus DNA: Lack of dependence on DNA Cell Synthesis. *J. Virol.* 18: 1063-1070, 1976.
15. Demmler G.J., Buffone G.J., Schimbor C.M. and may R.A.. Detection of Cytomegalovirus in urine From Newborns by Using

- Polymerase Chain Reaction DNA Amplification. *J. Infect. Dis.*, 158: 1177-1184, 1988.
16. Descol L., *Cytomegalovirus et Tobe Digestif. Med. Mal. Infect.* 18: 863-868, 1988.
 17. Drew W., Mintz L., Miner R.C., et al. Prevalence of Cytomegalovirus Infection in Homosexual Men. *J. Infect. Dis.* 143: 188, 1981.
 18. Dussaix E. And Wood C., Cytomegalovirus Infection In Pediatrics Liver Recipients. A Virological Survey and Prophylaxis With Cytomegalovirus Immune Globulin and Early DHPG Treatment. *Trans.*, 48: 272-274, 1989.
 19. Erce A., Hertz H.I., Snyder L.S., et al. Evaluation of Centrifugation Cultures of Bronchoalveolar Lavage Fluid for the Diagnosis of Cytomegalovirus Pneumonitis. *Diag. Microbiol. Dis.* 10: 205-212, 1988.
 20. Fiala M., Honess R.W., Heiner D.C., et al. Cytomegalovirus Proteins. I. - Polypeptides of Virions and Dense Bodies. *J. Virol.* 19: 243-354, 1976.
 21. Forbes B.A. Acquisition of Cytomegalovirus Infection: An Update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 204-216, 1989.
 22. Granier J.L., Deglisefavre, et al. DHPG Treatment in Kidney Transplant Recipients With Severe Cytomegalovirus Infection. *Med. Mal. Infect.* 19: 400-405, 1989.
 23. Henson D., Cytomegalovirus Inclusion Bodies in the Gastrointestinal Tract. *Arch. Pathol.* 93: 477, 1972.

24. Hernández P., Demmler G. J., Diagnóstico por Cultivo de Tejidos del Citomegalovirus. *Infect.* 8: 205-213, 1988.
25. Hernández P., Demmler G. J., May R., Diagnóstico Serológico del Virus de Inclusión Citomegálica por ELISA., *Infect.* 6: 277-286, 1988.
26. Hernández P., May R., Demmler G. J., Serodiagnóstico de Citomegalovirus por la Prueba de Inmunofluorescencia Anticomplementaria. *Infect.* 12: 613-618, 1988.
27. Hsia K., Spector D.H., Lawrie J., Spector S.A., Enzymatic Amplification of Human Cytomegalovirus DNA sequences by Polymerase Chain Reaction. *J.Cli.Microbiol.* 27:1238-1242,1989.
28. Huang E.S., Human Cytomegalovirus. IV. Specific Inhibition of Virus-Induced DNA Polymerase Activity and Viral Replication by Phosphonoacetic Acid. *J. Virol.* 16: 1560-1565, 1975.
29. Hussain Q.S.H., Al-Ahdal H.N., Qadri S.G.H., Yasmeen K.G., Cytomegalovirus Detection by Biotinylated DNA Probes. *Microbiol. Immunol.* 178: 135-141, 1989.
30. Javetz E., Melnick J., Adelberg E. (Eds) Grupo Herpesvirus. En: *Manual de Microbiología Médica.* 4a. ed., Ed. Man. Mod. 38: 481-491, 1971.
31. Joklik W.K., Estructura, Componentes y Clasificación de los Virus. En: *Zinsser Microbiología.* 17a. ed. Joklik W.K., Willet H.P., Amos D.B. (Eds) Ed. Méd. Panam. S.A., B. Air. Arg. 62: 911-956, 1983.

32. Kaplan C.S., Petersen E.A., Icenogle T.B., et al. Gastrointestinal Cytomegalovirus Infection in Heart-Lung Transplant Recipients. *Arch. Inter. Med.* 149: 2095-2100, 1989
33. Kim K.S., Sapienza V.J., Carp R.I., Moon H.M. Analysis of Structural Polypeptides of Purified Human Cytomegalovirus. *J. Virol.*, 20: 604-611, 1976.
34. Mc.Donough S., Spector D.H. Transcription in Human Fibroblasts Permissively Infected by Human Cytomegalovirus AD-169. *Virol.*, 125: 31-46, 1983.
35. Klotman M.E., Henry S.C., Greene R.C. et al. Detection of Mouse Cytomegalovirus Nucleic Acid in Latently Infected Mice by In Vitro Enzymatic Amplification. *J. Infect. Dis.* 161: 220-225, 1990.
36. Lang D.J., Herpesvirus. En Zinsser Microbiologia, 17a. ed. Joklik W.K., Willet H.P., Amos D.B. (Eds) Ed. Méd. Panam. S.A., B. Atr. Arg., 73: 1113-1127, 1983.
37. Kodarra T., Fukuda S., Takino T., et al. Gastroduodenal Cytomegalovirus Infection After Renal Transplantation, Fiberscopic Observations. *Endoscopy*, 17: 157-158, 1985.
38. Mahieux F., Gray., Fenelon G., et al. Acute Myeloradiculitis due to Cytomegalovirus as the Initial Manifestations of AIDS. *52: 270-274, 1989.*
39. Marsano L., et al. Comparison of Culture and Serology for The Diagnosis of Cytomegalovirus Infection in Kidney and Liver Transplant Recipients.
40. Mayer G., Watschinger B., Pohanka E., et al. Cytomegalovirus

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- Infection After Kidney Transplantation Using Cyclosporine. A Low Dose Prednisolone Immunosuppression. Nephrol. Dial. Trans. 3: 464-468, 1988.*
41. Metselar H.J., and Weimar W.J. Cytomegalovirus Infection and Renal Transplantation. *J. Antimicrob. Chemother.* 23: 37-47, 1989.
42. Morris D.J., Is Human Immunodeficiency Virus Rather Than Cytomegalovirus the Cause of Retinitis and Colitis in HIV Infected Patients? *Rev. Infect. Dis.* 12: 557-559, 1990.
43. Oberg B. 5-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmetoxypropyl) cytosine, a Potential and Selective Inhibitor of Human Cytomegalovirus Replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1839-1844, 1988.
44. Oberg B. Antiviral Effect of Phosphonoformal. *Pharmacol. Ther.* 40: 213-285, 1989.
45. Ocampo P.H.H. Estudio Estadístico Sobre el Perfil TORCH. Datos Obtenidos en Los Laboratorios de Diagnóstico Clínico Atoyac S.A. de C.V., Méx., D.F., 1990.
46. Olive D.H., Simsek M., Al/Mufti S., Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Human Cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1238,1242, 1989.
47. Onto Ho. Cytomegalovirus. En: *Infectious Disease and Their Etiologic Agents. Part III.* 125: 960-970, 1989.
48. Powell K.F.H., Bellamy A.R., Catton H.G., et al. Cytomegalovirus Myocarditis in Heart Transplant Recipients. *J. Heart Trans.* 8: 465-470, 1989.

49. Prober C.G., Arvin A.M. Perinatal Viral Infections. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 3: 245-261, 1987.
50. Reusser P., Fisher L.D., Buckner C.D., et al. Cytomegalovirus Infection After Autologous Bone Marrow Transplantation. Occurrence of Cytomegalovirus Disease and Effect of Engraftment Blood. *75: 1884-1894, 1990.*
51. Reynolds D.W., Stagno S., Alford C.A. Laboratory Diagnosis of Cytomegalovirus. En: *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections.* 5th ed. Lennette E.H., Schmidt J., (Eds) APHA Washington D.C. 13:399-439, 1979.
52. Shibata D., Martin W.J., Appleman H.D., et al. Detection of Cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood of Patients Infected With Human Immunodeficiency Virus. *J. Infect. Dis.* 158: 1185-1192, 1988.
53. Skolnick P.R., Pomerantz R.J., De la Monte S.M., et al. Dual Infection of Retina With Human Immunodeficiency Virus Type I, and Cytomegalovirus. *Am. J. Ophthalmol.* 107: 361-372, 1989.
54. Spector S.A. Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. *Semin. Haemathol.*, 27/2 Suppl. 1: 11-16, 1990.
55. Stagno S., Brasfield P.H., Brown M.B., et al. Infant Pneumonitis Associated With Cytomegalovirus, Chlamydia trachomatis, Pneumocystis carinii and ureaplasma urealyticum. A Prospective Study. *Pediatrics.* 68: 322, 324. 1981.
56. Stagno S., Tinker H.K., et al. Immunoglobulin M Antibodies Detected by Enzyme Linked Immunosorbent Assay and Radio Immuno-Assay in the Diagnosis of Cytomegalovirus Infection in

- Preganant Women and Newborn Infants. *J. Clin. Microbiol.* 152: 1350, 1985.
57. Stinsky M.F., Human Cytomegalovirus: Glycoproteins Associated With virions and Dense Bodies. *J. Virol.* 19: 594-609, 1976.
 58. Stinsky M.F., Thomsen D.R., et al Organization and Expression of Immediate Early Genes of Human Cytomegalovirus. *J. Virol.* 46: 1-4, 1986.
 59. Stites D.P., Stobo J.D., Wells J.V., (Eds) Métodos de Laboratorio para la Detección de Antígenos y Anticuerpos. En: *Inmunología Básica y Clínica*. 6a. ed., Ed. Man. Mod. Méx. 17: 235-280, 1988.
 60. Tomita T., Chiga M., Lenahan M. and Balachandran N. Identification of Cytomegalovirus Infection in AIDS. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 416: 497-503, 1990.
 61. Tucker R.H., Swanson and Wenzel R.P. Cytomegalovirus and Appendiceal Perforation in a Patient With Acquired Immunodeficiency Syndrom. *South. Med. J.* 82: 1056-1057, 1988.
 62. Tyns A.S., Taylor D.L. and Parkin J.H. Cytomegalovirus and Acquired Immunodeficiency Virus. 23: 89-105, 1989.
 63. Van der Bij W., Schrim J. Comparison Between Viremia and Antigenemia for Detection of Cytomegalovirus in Blood. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2531-2535, 1988.
 64. White D.O., Fenner F., (Eds) Estructura y Clasificación de los Virus. En: *Virología Médica* 2a. ed., Ed. La Prensa Méd. Mex. S.A. 1: 3-25, 1983.
 65. White D.O., Fenner F., (Eds), Herpesvíruses. En: *Medical*

Virology. 3rd. ed. Orlando, Fl., Acc. Press. 16: 401-430.
1986.

66. Wiley C.A. and Nelson J.A. Role of Human Immunodeficiency Virus in AIDS Encephalitis. 133: 73-81, 1988.
67. Wreghitt T., Cytomegalovirus Infection in Heart and Heart Lung Transplant Recipients. J. Antimicrob. Chemother, 23: 49-60, 1989.
68. Zweyberg W.B., Landquist H., Hokeberg I., et al. Early Detection of Cytomegalovirus in Cell Culture By a New Monoclonal Antibody CCHz. J. Virol. Meth. 27: 211-220, 1990.