

DESPISTAJE DE INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS EN NIÑOS VIH POSITIVOS MEDIANTE PCR: RELACIÓN CON SEROLOGÍA Y EVOLUCIÓN CLÍNICA.

María de los Reyes, Chacón de Petrola (*), Olga Teresa, Castillo de Febres (**), Mirian de Naveda (**), Liliana Castro (*) (***), Ladys Casanova de Escalona (**), María Elisa Flores Chavéz. (*) (***)

RESUMEN:

Introducción: En pacientes VIH positivos es fundamental diagnosticar infección por CMV. La relación entre serología, detección viral y evolución clínica no está plenamente establecida.

Objetivos: Detectar la presencia de CMV por PCR en sangre periférica en pacientes pediátricos, sin síntomas de infección, VIH positivos; relacionar estos resultados con la serología y la evolución clínica durante un año de seguimiento.

Métodos: Criterios de inclusión: Niños menores de 12 años, ambos sexos, infección diagnosticada por VIH, recibiendo terapia antirretroviral altamente efectiva (TARAE), consentimiento informado por escrito, firmado. La serología anti CMV se realizó mediante el método ELISA, la semicuantificación de CMV en sangre periférica, mediante PCR, y el inmunofenotipaje por citometría de flujo. Aquellos niños con carga viral inicial detectable para CMV fueron evaluados un año después (valoración cualitativa y oftalmológica).

Estadística: Correlación de Pearson, t Student.

Resultados: Se estudiaron 23 niños, 17 menores de 6 años; 21 de ellos (82.6%): IgG CMV +. Dos pacientes (8.7%): IgM CMV+ y promedio de carga viral: 11920 VID, dos IgM- IgG+, promedio de carga de 23129 VID; el resto, negativos; todos con linfocitos CD4+ por encima del 25%. 50% de los niños con carga viral negativa para CMV, con conteos de CD4+ inferiores al 25%. El análisis de correlación de Pearson no mostró correlación entre la carga viral del VIH y los valores de VID para CMV ($R^2=0.13$). Linfocitos CD8+: $32,3 \pm 6,8$ % en los pacientes con carga para CMV, estadísticamente inferior al promedio del grupo sin cargas virales CMV: $49,1 \pm 8,8$. (t Student = 3,508; g.l: 17. $P < 0,003$). Ningún niño presentó evidencia de enfermedad órgano específica (EOE), incluyendo retinitis.

Conclusión: Independientemente de la presencia o no de IgM positiva para CMV, 4 pacientes tuvieron carga viral detectable. No hay correlación entre las cargas virales de ambos virus. Ningún niño con carga viral detectable para CMV desarrolló enfermedad órgano específica, probablemente debido al tratamiento antirretroviral de alta eficacia. Se recomienda cuantificar la carga viral para CMV en pacientes VIH +, independientemente del resultado de IgM específica. *Arch Venez Pueric Pediatr 70 (3): 76 - 80*

Palabras Clave: Citomegalovirus, Virus de la Inmunodeficiencia Humana, Serología anti CMV, PCR / CMV

SUMMARY:

Introduction: In HIV-positive patients the diagnosis of CMV infection is essential. The relationship between serology, viral detection and clinical evolution has not been fully established.

Objectives: To detect the presence of CMV in peripheral blood by PCR testing in HIV positive pediatric patients with no infection symptoms, and to relate the results with serology and clinical evolution during a year follow up.

Methods: Inclusion criteria: Children under twelve years of age, both genders, with a diagnosis of HIV infection, and receiving HAART therapy, written consent signed by parents. Anti CMV serology was performed by ELISA, semi-quantification of CMV in peripheral blood by PCR and immunophenotyping by flow-cytometry. Children with detectable initial viral load for CMV were submitted to a qualitative and ophthalmologic assessment one year later. Statistics: Pearson's Correlation, Student's t.

Results: 23 children, both genders, 17 under 6 years of age; 21 (82.6%): IgG CMV+. Two patients (8.7%): IgM CMV+ and viral load average: 11920 IDV, two with IgM- IgG+, viral load average: 23129 IDV. The rest of the children were negative, all with lymphocytes CD4+ above 25%. 50% of the children had a negative viral load for CMV with CD4+ counts under 25%. There was no correlation between the HIV viral load and IDV values for CMV ($r^2=0.13$). Lymphocytes CD8+ 32.3 ± 6.8 % in patients with viral load for CMV. This is statistically lower than the average for the group without viral loads CMV: 49.1 ± 8.8 (Student's t = 3.508; g.l: 17. $p < 0.003$). No child showed evidence of specific organ disease (SOD), including retinitis.

Conclusion: Regardless of serology for IgM, 4 patients had detectable viral loads. There was no correlation between the viral loads of the two viruses. No child with detectable viral load for CMV developed a specific organ disease, probably due to a highly efficient antiretroviral treatment. Viral load quantification for CMV in HIV + patients is recommended, regardless of specific IgM result. *Arch Venez Pueric Pediatr 70 (3): 76 - 80*

Key Words: Cytomegalovirus, Human Immunodeficiency Virus, anti CMV serology, PCR/CMV.

INTRODUCCIÓN:

El Citomegalovirus (CMV) es un virus de la familia herpética, capaz de producir infección primaria o secundaria. A pesar de la enérgica respuesta inmune inducida por el CMV

en el huésped, el genoma viral es capaz de persistir en varios tipos celulares en forma latente, dando lugar a infecciones secundarias por reactivación del virus, aun cuando pueden ocurrir reinfecciones en personas seropositivas (1).

En los países subdesarrollados y en los estratos sociales más bajos de los países desarrollados, la primoinfección se presenta en los primeros años de vida, mientras que las comunidades socioeconómicamente más favorecidas permanecen sin infectarse hasta la adolescencia. En un estudio realizado en Valencia, Venezuela, alrededor del 83% de los niños sanos, menores de 4 años, tuvieron anticuerpos IgG anti CMV(1, 2).

(*) Unidad de Investigaciones en Inmunología Clínica. Universidad de Carabobo.

(**) Unidad de Infectología Pediátrica. Universidad de Carabobo.

(***) Unidad de Inmunología Clínica. Ciudad Hospitalaria Enrique Tejera. Valencia – Estado Carabobo – Venezuela.

Correspondencia: Dra. María de los Reyes Chacón de Petrola:

Urbanización Prebo II; calle 134. N° 113-50. Valencia.

Teléfono: 0241-8220059 – 0414-4211384.

e-mail: mchacon@postgrado.uc.edu.ve / petrola49@cantv.net

En los pacientes inmunocomprometidos, el virus produce enfermedad severa; en el caso de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), el CMV es prácticamente ubicuo, considerándose como un contribuyente importante a la progresión de la infección hacia SIDA; adicionalmente puede dar lugar a una enfermedad órgano específica (EOE), frecuentemente mortal (3,4).

En la era previa a la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARAE), 40% de los pacientes desarrollaban enfermedad por CMV, predominantemente de tipo retinitis. Se ha demostrado que el uso de TARAE puede reducir hasta 1,8% la incidencia de EOE, aun en pacientes con SIDA con menos de 200 linfocitos CD4+ /mm³ (5,6).

Por lo tanto, es esencial establecer el diagnóstico de infección por CMV en este grupo de pacientes. La alta seroprevalencia de anticuerpos anti CMV entre la población sana cuestiona su utilidad como medida de actividad de la infección, tanto en ese grupo como en pacientes con inmunosupresión, siendo fundamental verificar la presencia del virus, así como su concentración, hecho posible desde hace poco tiempo, por técnicas de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

En la actualidad el diagnóstico de infección por CMV en pacientes VIH positivos asintomáticos ha permitido un mejor conocimiento del comportamiento viral, abriendo el camino para el empleo de terapia específica, con la finalidad de impedir el desarrollo de EOE por CMV. La retinitis es una manifestación común de este cuadro en pacientes con inmunosupresión; generalmente es asintomática en sus estadios tempranos, pero más tardíamente puede conducir a pérdida de la visión, por lo que es importante, o bien realizar su diagnóstico en forma temprana o determinar los individuos a riesgo de desarrollarla, con la finalidad de administrar tratamiento lo más precozmente posible (7).

El objetivo del estudio fue detectar infección por CMV por PCR en sangre periférica, en pacientes pediátricos sin síntomas sugestivos de infección por dicho virus, VIH positivos, en tratamiento con HAART, y relacionar estos resultados con la serología y la evolución clínica durante un año de seguimiento.

MÉTODOS:

Es un estudio de diseño transversal. Se incluyeron todos los niños de ambos sexos, con infección diagnosticada por VIH, recibiendo terapia antirretroviral de alta efectividad (TARAE), controlados en la Unidad de Infectología Pediátrica de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo – Ciudad Hospitalaria Enrique Tejera, quienes cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: 1.- Diagnóstico confirmado de infección por VIH. 2.- Cuantificación de linfocitos CD4+ - CD8+ y carga viral de VIH realizado en el momento de la inclusión en el estudio. 3.- Ausencia de sospecha clínica de infección por CMV.

Previo a la inclusión en el estudio se obtuvo el consentimiento informado escrito firmado por los representantes legales del menor.

Se obtuvieron muestras de sangre para realizar los siguientes procedimientos:

- Serología anti CMV – IgM /IgG – se realizó mediante la técnica de ELISA, utilizando el ensayo comercial World Diagnostic, inc. Lab. Systems.
- Para la obtención de ADN de CMV según protocolo de Wizard Genomic DNA Purification Kit, se procedió a lisar los glóbulos rojos y blancos del paciente mediante la adición, en un primer paso de solución de lisis celular y, posterior al descarte del sobrenadante, una solución de lisis nuclear para liberar el ADN, el cual se obtuvo por precipitación con isopropanol, con descarte del sobrenadante; el resto se colocó en un bloque térmico para ser secado a 55° por 10 minutos, y posteriormente hidratado con buffer, para agitarlos en un vortex. Para verificar la calidad del ADN de cada muestra, las mismas se corrieron en un gel de agarosa al 1% preparado en solución 0.045 M Tris-Borato; 0,001M EDTA pH 8,0 (TBE 1X) más 0,5 ug/ml de bromuro de etidio, por 45 minutos a 100v, observándose las bandas de ADN a través de la luz ultravioleta, considerándose de buena calidad cuando estaban bien definidas y uniformes. Para la semi-cuantificación del virus mediante PCR se utilizó el protocolo descrito por Casa I y col. en 1999 con modificaciones. Los resultados se expresaron en valor Integrado de Densidad (VID), siendo positivas todas las lecturas por encima de 7500 VID, no existiendo en la bibliografía relación entre la VID y la existencia de enfermedad activa por CMV en estos pacientes (8).

En los niños con carga viral inicial positiva para CMV, la misma se evaluó nuevamente, en forma cualitativa, un año después. Todos los pacientes fueron examinados clínicamente en forma periódica durante el lapso de un año. Adicionalmente, aquéllos con carga viral positiva para CMV fueron sometidos a valoración oftalmológica.

Para el procesamiento y análisis de la información se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 11.0 en español. Las técnicas usadas fueron las descriptivas (análisis de frecuencias y porcentajes, así como promedios aritméticos) Se utilizó el análisis de diferencias de medias para muestras independientes con la prueba “t de Student”. Para medir la correlación entre las cargas virales de CMV y HIV se determinó el coeficiente de Pearson.

RESULTADOS:

Se evaluaron 23 niños de ambos sexos, 9 menores de 3 años (39,1%), 8 entre 4 y 6 años (34,8%) y 6 entre 7 y 11

años (26,1%). De ellos 17 (73,9%) tenían evidencia de infección pasada por CMV (IgG+ IgM-) y dos, 8,7% infección aguda (IgM e IgG +) (Figura 1). El promedio de edad de los

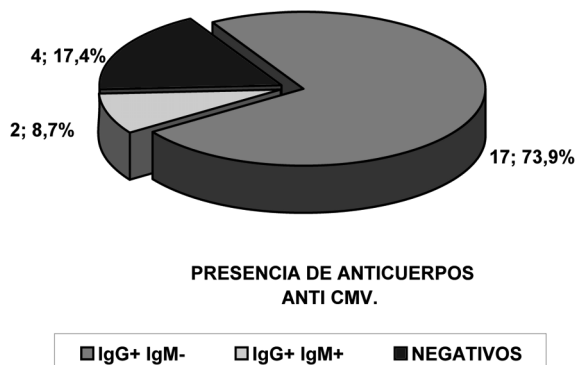


Figura 1. Distribución de los pacientes según presencia de anticuerpos anti CMV.

niños con infección aguda fue de dos años, mientras que en los niños que tenían únicamente IgG + fue de $4,6 \pm 2,6$ años de edad. El 77,7% (7 de 9), 87,5% (7 de 8) y 83,3% (6 de 5) respectivamente de los niños menores de tres años, de 4 a 6 años y de 7 a 11 años tuvieron IgG+ para el virus (Figura 2). En los niños con infección aguda (IgM anti CMV+) el promedio de carga viral inicial fue de 11920 VID. Dos pacientes IgM - IgG+ mostraron un promedio de carga viral de 23429 VID; en el resto, fue indetectable (Cuadro 1). La sensibilidad

Cuadro 1. Distribución de los pacientes según serología y valores medios de carga viral (CMV)

Serología CMV	Promedio carga Viral CMV (VID)	Porcentaje
IgG+ IgM- (17)	Indetectable	15 (65,2)
	23429	2 (8,7)
IgG+ IgM+ (2)	11920	2 (8,7)
Negativa (4)	_____	4 (17,4)

de la IgM específica como prueba diagnóstica, en relación con la presencia de carga viral detectable para CMV, fue de 50%, con una especificidad del 100%, por cuanto todos los pacientes sin carga viral fueron IgM anti CMV negativos. El 50% de los niños sin evidencia serológica de infección aguda, tenían algún grado de compromiso del sistema inmune (CD4+ por debajo del 25%), mientras que el porcentaje de CD4+ fue normal en tres de los cuatro niños con carga viral detectable. En relación con los linfocitos CD8+ en los pacientes con carga viral para CMV, su promedio fue mucho

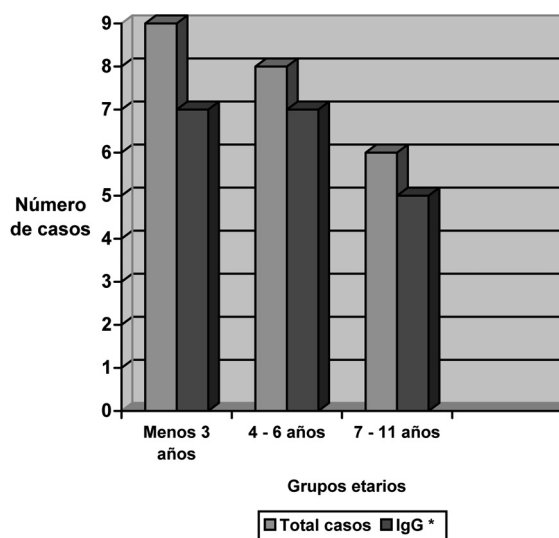


Figura 2. Distribución de los niños según grupo etario y presencia de IgG+ anti CMV

menor que en aquellos sin infección por el mencionado virus: 32,3 vs 49,1% ($p < 0,003$) (Cuadro 2)

Cuadro 2. Valores medios de linfocitos cd8+, expresados en porcentaje, según presencia de carga viral para CMV

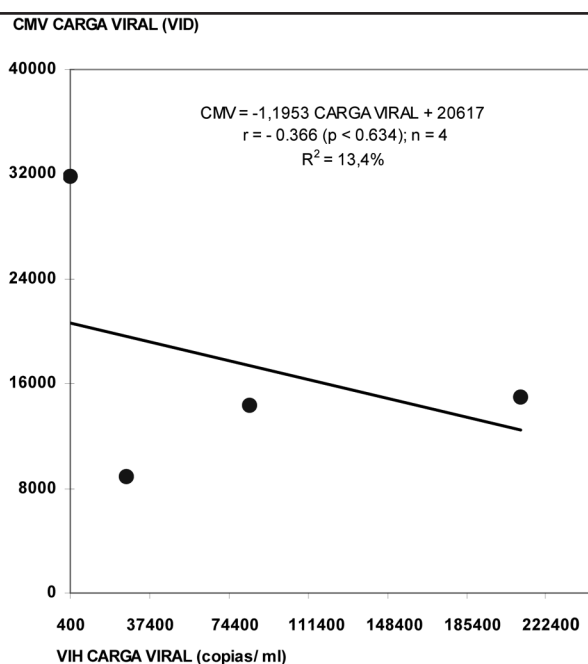
Carga viral CMV	CD8 (%)
	X ± S (n)
Ausente	49,1 ± 8,8 (15)
Presente	32,3 ± 6,8 (4)
Significación Estadística	t (Student) = 3,508; g. l. = 17 P < 0.003

Desde el punto de vista clínico, todos presentaron una evolución favorable, y ninguno deterioro virológico (VIH) franco, ya que un año más tarde, dos eran indetectables, y los otros dos experimentaron una disminución de la carga viral, significativa sólo para uno de ellos (Cuadro 3). Inicialmente, no existió correlación significativa entre la carga viral del VIH y los valores de carga de CMV, ya que el coeficiente de correlación de Pearson fue de $-0,336$ ($p > 0,05$) (Figura 3).

De los 4 pacientes con carga viral inicial detectable para CMV, sólo uno de ellos persistió PCR positivo para dicho virus un año más tarde, a pesar de tener carga viral indetectable para el VIH. Durante el control clínico ningún niño, incluyendo este caso, presentó evidencia de EOE, descartándose retinitis en todos.

Cuadro 3. Caracterización de los pacientes con carga viral positiva para CMV.

	IgM Anti CMV	IgG Anti CMV	CMV-PCR VID inicial	CMV/PCR cualitativo, al año	CD4 inicial	CD4 al año	VIH CV inicial	VIH al año	Evolución Clínica	Presencia Retinitis
1	+	+	8858	Neg	37,4	51,7	296.585	Indetectable	Satisfactoria	No
2	-	+	31876	Pos	45,8	36,7	<400 c	Indetectable	Satisfactoria	No
3	+	+	14983	Neg	24	32	217.000	75000	Satisfactoria	No


Figura 3. Relación de cargas virales: VIH y CMV. Coeficiente de correlación de Pearson

DISCUSIÓN:

El diagnóstico en el laboratorio de infección por CMV se basa en la demostración de su presencia en muestras provenientes de líquidos o tejidos corporales a través de cultivos, o en la evidencia de los componentes del virión mediante ensayos de medición de la antigenemia pp65, o del ADN viral; para este último, la técnica de PCR, se considera un método sensitivo, que detecta pequeñas cantidades virales en cualquier líquido biológico; sin embargo, por ser métodos costosos y no disponibles en todos los servicios, a pesar de sus limitaciones, es frecuente realizar el diagnóstico en base a la presencia de anticuerpos Ig M en el suero de los pacientes. Cuando se trata de diagnosticar esta infección en pacientes inmunocomprometidos, el uso de anticuerpos como elemento diagnóstico se cuestiona aún más. En este estudio, aun cuando se trata de un

número reducido de pacientes, se observó que la ausencia de IgM anti CMV no descarta la infección en estos pacientes y la prueba de PCR resultó ser útil a pesar de no poder demostrar su sensibilidad y especificidad, ya que en este estudio no se pudo realizar el cultivo del virus.

La detección de viremia de CMV por PCR en pacientes con SIDA, particularmente en aquellos con contajes de linfocitos CD4+ francamente disminuidos, es un factor pronóstico de riesgo, puede ser usado cualitativamente para predecir enfermedad por CMV, y cuantitativamente, para un incremento de mortalidad; se ha demostrado que la probabilidad de desarrollar enfermedad órgano específica terminal, es más alta cuando los contajes de linfocitos CD4+ son inferiores a 50 cel/mm³, y es generalmente debida a reactivación de una infección latente (5)(9)(10). Otros autores señalan que la enfermedad por CMV está asociada con un riesgo elevado de muerte, independientemente de las cuentas de linfocitos CD4+ (11). Estudios similares al presente, realizados en adultos, con seguimientos de 334 días, demostraron que un 6% desarrolló enfermedad por CMV, a pesar de la terapia para el VIH (12). Los 4 niños estudiados en la presente investigación, con carga viral detectable, no presentaron durante su seguimiento, evidencia de EOE, ello podría atribuirse a que, desde el punto de vista inmunológico, no existió un franco deterioro de las cuentas de linfocitos CD4+ y todos recibían terapia antirretroviral de alta eficacia.

Es importante señalar, que los pacientes con presencia de CMV en sangre periférica, presentaron cifras porcentuales de linfocitos CD8+ significativamente menores, que los niños sin viremia para dicho patógeno. Hasta qué punto la disminución de esta subpoblación influye en la presencia de infección por este virus, es difícil de precisar, sin embargo, la función ejercida por este grupo de células en la defensa antiviral en general, lleva a pensar en el efecto protector de las mismas en la progresión de las infecciones por ambos virus, por lo que se podría inferir que el porcentaje significativamente menor de dichas células, podría ser uno de los factores propiciantes de esta situación (13)

Ninguno de los niños con cargas virales para CMV detectables desarrolló EOE, incluyendo retinitis, hecho probablemente asociado a cuentas normales de CD4, empleo de

TARAE y a que en los niños, específicamente la retinitis, se presenta con menor frecuencia que entre la población adulta (6)

La TARAE puede restaurar la respuesta inmune a una variedad de patógenos incluyendo el CMV. Un estudio de pacientes con viremia para este virus, asintomáticos al momento del inicio de la terapia, mostró que todos los pacientes se hicieron negativos aun en ausencia de terapia específica anti CMV, y más importante aún, ninguno desarrolló EOE, por consiguiente, se puede concluir que el valor protector de la terapia anti retroviral es mediada por la inhibición de la replicación del CMV secundaria a la reconstitución inmune, con normalización de las cuentas en subpoblaciones celulares, y aumento en la reactividad de los linfocitos CD8 para antígenos reconocidos previamente, incluyendo CMV (14).

Se ha publicado la ocurrencia de reactivación o replicación de CMV en pacientes con respuesta adecuada para el VIH (carga viral indetectable) - debido a una alteración en la función de linfocitos CD4, es decir por un defecto cualitativo en la reconstitución de la función inmune. Probablemente esta es la explicación para el único paciente que no negativizó la viremia para CMV (15).

En conclusión, a pesar del tamaño de la muestra y en base a los resultados obtenidos, se recomienda cuantificar la carga viral para CMV en todo paciente VIH +, independientemente del resultado de IgM específica. Ningún niño con carga viral detectable para CMV desarrolló enfermedad órgano específica, probablemente debido al tratamiento antirretroviral de alta eficacia.

REFERENCIAS:

- 1.- González Scarano F. Viral persistente. En: *Viral Patogénesis and Immunity*. Neal Nathanson. Lippincott Williams and Williams. Philadelphia. 2002. pp. 114-129
- 2.- Chacón de P, M. Naveda, O. Castillo de Febres, O. Flores, ME. Prevalencia de anticuerpos anti-citomegalovirus anti virus Epstein Barr en Valencia, estado Carabobo, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2002; 2:131-135.
- 3.- Whitley R.J, Holland GN. Citomegalovirus retinitis evolving therapy in a new era. *N Engl J Med*. 1999; 340: 1109-10.
- 4.- Erice A, Tierney C, Hirsch M, Caliendo A M, Weinberg A, Kendall M A, Plosky B. Cytomegalovirus (CMV) and Human Immunodeficiency Virus (HIV) burden, CMV End-Organ Disease, and survival in subjects with advanced HIV infection /AIDS clinical Trials Group Protocol 360). *HIV/AIDS. CID* 2003;67:567-578
- 5.- Yust I, Fox Z, Burke M, Jonson A, Turner D, Mocroft A, Katlama C, Ledergerber B. Retinal and extraocular CMV end organ disease in HIV infected patients in Europe: a EuroSIDASS study, 1994-2001. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004; 23(7): 550-9
- 6.- Gail J Demmler. Cytomegalovirus. En: Fegin R, Cherry J, Demmler G, Kaplan S. *Text Book of Pediatric Infectious Disease*. 5ta edición. Pennsylvania Saunders. pp: 1912-1931
- 7.- Clyde S Crumpacker. Cytomegalovirus. En: Mandell GL; Bennet J; Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5ta edición. Pennsylvania: Churchill Livingstone 2000. pp: 1586-1599
- 8.- Casas I, Tenorio A, Echeverria JM, Klapper PE, Cleator GM. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesvirus by multiplex genome amplification. *J Virol Methods* 1997; 66: 39-50.
- 9.- Chevret S, Scieux C, Garrait V, Dahel L, Morinet F, Modai J et all. Usefulness of the cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay for predicting the occurrence of CMV disease and death in patients with AIDS. *Clin Infect Dis*. 1999; 28: 758-63.
- 10.- Bowen EF. Cytomegalovirus reactivation in patients infected with HIV: the use of polymerase chain reaction in prediction and management. *Drugs* 1999; 57(5): 735-41
- 11.- Deayton J. Is cytomegalovirus viraemia a useful tool in managing CMV disease? *Sex Transm Inf*. 2000; 76: 342-344.
- 12.- Wohl DA, Zeng D, Stewart P, Glo N, Alcorn T, Jones S et all. Cytomegalovirus viremia, mortality, and end -organ disease among patients with AIDS receiving potent antiretroviral therapies. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005; 38: 538-44.
- 13.- Reus S, Portilla J, Gimeno A, Sanchez Paya J, Garcia Henarejas JA, Martinez Madris O et all. Predictores de progresión y muerte en pacientes con infección por el VIH en la era de los tratamientos antirretrovirales de gran actividad. *Enfer Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(3): 142 -9
- 14.- Deayton JR. Changing trends in cytomegalovirus disease in HIV-infected patients. *Herpes*, 2001; 8(2): 37-40.
- 15.- Deayton JR, Sabin CA, Johnson MA, Emery VC, Wilson P, Griffiths PD. Importance of cytomegalovirus viraemia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Lancet*, 2004; 363(9427):2101-2.