



APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA A LA INFECCIÓN POR CMV

Martín Peinador, Y. Grupo de Patología Infecciosa AEPap. Aproximación diagnóstica a la infección por citomegalovirus. Junio de 2014. Disponible <https://aepap.org/grupos/grupo-de-patologia-infecciosa/contenido/documentos-del-gpi>

INTRODUCCIÓN

El citomegalovirus (CMV) es un virus ubicuo que habitualmente infecta a personas de cualquier edad, raza y grupo étnico y especialmente a grupos socialmente desfavorecidos. Aunque la mayoría de las infecciones por CMV son asintomáticas o causan una enfermedad leve, el virus puede causar enfermedad grave en recién nacidos y pacientes inmunocomprometidos. Es la causa más común de infección congénita en los países desarrollados.

El CMV es miembro de la familia Herpesviridae, junto con virus Epstein-Barr, herpes simplex, varicela-zoster y herpes virus tipo 6, 7 y 8. Todos estos virus comparten propiedades incluido genoma de ADN de doble cadena lineal, cápside icosaédrica y envoltura. Se replica lentamente, tarda 24 horas en producir nuevos virus en la célula infectada y varios días y hasta semanas en producir efecto citopático visible en las líneas celulares en el laboratorio (1).

Puede transmitirse por saliva, leche materna, secreciones cervicales y vaginales, orina, semen, heces, sangre y trasplantes de tejidos o de órganos. La diseminación del virus requiere un contacto muy estrecho o íntimo porque el virus es muy lábil. La transmisión sucede por contacto directo entre personas aunque es posible la transmisión indirecta a través de fómites contaminados. El CMV puede sobrevivir en saliva y en superficies ambientales durante períodos de tiempo variables dependiendo de la superficie: metal y madera durante 1 hora, cristal y plástico 3 horas, y en goma, tejidos y galletas 6 horas. Tras la infección la excreción viral, por saliva y orina, puede ser prolongada incluso varios años.

El espectro de la enfermedad causada por CMV es diverso y mayoritariamente depende del huésped (2).

- Infección congénita por CMV, con una prevalencia que oscila entre el 0,3 y el 2,4% con cifras más bajas en Europa. La infección del recién nacido puede ocurrir como resultado de una primoinfección materna durante el embarazo (1-4%) ó también puede ocurrir por reactivación o reinfección viral en mujeres previamente inmunes. En la primoinfección se infectan el 40% de los fetos de los que un 5-15% tendrán síntomas al nacimiento, mientras que en caso de reinfección o reactivación solo el 1-2% de los fetos se infecta y la gran mayoría de éstos están asintomáticos al nacimiento (3,4).

- Infección postnatal por CMV. Incidencia entre un 10-60% en los primeros 6 meses de vida. La principal vía de contagio es a través de la leche materna (viro lactia). Otras vías de contagio pueden ser por secreciones vaginales contaminadas y por transfusiones sanguíneas no controladas para este virus. La infección adquirida casi nunca se asocia a enfermedad significativa en el recién nacido a término (RNT) porque suele resultar de una reactivación materna y el niño nace con anticuerpos protectores adquiridos pasivamente. Son los recién nacidos prematuros de muy bajo peso los que pueden presentar un curso sintomático y en ocasiones grave, debido a la inmadurez de su sistema inmunitario y al hecho de nacer antes de la transferencia de las inmunoglobulinas maternas que ocurre principalmente después de la 28 semana de gestación (5,6).

- Infecciones adquiridas por CMV después del primer año de vida. Los lactantes y preescolares se pueden infectar en guarderías y centros de educación infantil. La prevalencia de la infección depende de las actividades en grupo, con tasas de infección entre un 50-80% (7). La adolescencia es otro período de rápida adquisición del CMV. La mayoría de las infecciones son asintomáticas en población sana y solo en un 10% se presentan síntomas. El riesgo de infección para la población general es de 1-3% siendo mayor para trabajadores de centros infantiles y padres de niños pequeños. Los profesionales sanitarios no presentan mayor riesgo.

-El síndrome mononucleósico like es la presentación clínica más frecuente en la infección sintomática por CMV en inmunocompetentes. La clásica mononucleosis es una enfermedad caracterizada por fiebre, astenia, faringitis, adenopatía (cervical) y hepatitis. Son frecuentes las manifestaciones dermatológicas con rash de diversas morfologías y al igual que con el virus de Epstein Barr puede ocurrir relacionado con la toma de antibióticos betalactámicos. La presencia de linfocitosis con >10% linfocitos atípicos es característica, aunque no todos la presentan. Además puede presentarse trombocitopenia, elevación de transaminasas y anemia leve o moderada.

La infección mononucleósica es más comúnmente causada por virus de Epstein-Barr (VEB) y diagnosticada por la presencia de Ac heterófilos. Aunque el síndrome clínico es similar podemos hacer hincapié en algunos rasgos clínicos diferenciales:

- En el síndrome de mononucleosis por CMV predominan los síntomas sistémicos y la fiebre. Los signos de aumento de tamaño ganglionar y la esplenomegalia son menos comunes que los vistos con VEB.
- A diferencia del VEB, el CMV pocas veces causa faringoamigdalitis exudativa.
- Los adultos con mononucleosis por CMV suelen tener mayor edad que aquellos con infección por VEB.

-Infección por CMV en el huésped inmunocomprometido. Causa importante morbilidad y mortalidad especialmente entre los receptores de trasplantes y aquellos con infección VIH pudiendo presentar síndromes febriles, neumonitis (la más común), hepatitis, retinitis, encefalitis, y enfermedad gastrointestinal. La infección puede resultar de reactivación de un virus endógeno, infección desde un órgano trasplantado o de transfusión de productos sanguíneos.

APROXIMACIÓN DIAGNÓSTICA

Infección y enfermedad por CMV no son términos sinónimos, no todo paciente con infección desarrolla enfermedad clínica.

- Infección por CMV: se define como la evidencia de replicación viral independientemente de síntomas o signos.
- Enfermedad por CMV: se define como la evidencia de infección por CMV con síntomas y signos atribuibles. Esta puede manifestarse tanto como un síndrome viral o como una enfermedad invasora.

Dado que los signos y síntomas de enfermedad por CMV a menudo se solapan con otros procesos infecciosos, el diagnóstico debe hacerse integrando información de la historia clínica, la presentación clínica y datos de laboratorio. Como el CMV produce infección latente a lo largo de la vida, distinguir enfermedad activa de infección latente o de reactivación asintomática supone un reto diagnóstico añadido.

Los diferentes métodos diagnósticos tienen sus ventajas y desventajas y deben ser interpretados en el contexto de la presentación clínica y otras valoraciones diagnósticas (8).

Los métodos de amplificación molecular (PCR) son ahora de elección para el diagnóstico de la infección por CMV. En el pasado los test serológicos y los cultivos virales fueron la piedra angular del diagnóstico (9).

Serología

Los test serológicos miden la presencia de anticuerpos (AC) anti CMV IgM e IgG. La serología aporta evidencia indirecta de una infección previa o reciente por CMV según los cambios en el título de AC en diferentes momentos durante la enfermedad clínica. La técnica de ELISA es la más comúnmente utilizada. Otros test utilizados son inmunofluorescencia, hemaglutinación indirecta y aglutinación en látex .



La IgM específica de CMV se detecta típicamente en las primeras dos semanas después del desarrollo de los síntomas y puede persistir hasta 4 a 6 meses después. Los AC IgG específicos de CMV a menudo no son detectables hasta 2 o 3 semanas después de la aparición de la clínica y persisten toda la vida.

La presencia de AC IgM para CMV puede indicar: 1) infección reciente, 2) reactivación de una infección adquirida en el pasado o 3) falso positivo. Por tanto la presencia de AC IgM CMV por sí sola no es diagnóstica de infección primaria por CMV.

El hallazgo de AC IgG CMV positivo indica infección pasada en algún momento durante la vida de ese individuo no pudiendo determinar el momento. Recientemente los test de avidéz de IgG , que miden la madurez de los AC, pueden detectar de manera fiable la infección primaria por CMV. Cuando una persona se infecta por primera vez por CMV, los AC que se producen son de baja avidéz. Después de 2 a 4 meses los AC que se producen serán IgG anti CMV de alta avidéz. Por lo tanto según el resultado de estos test podemos inferir el momento de la infección.

Infección reciente o aguda por CMV

Se considera probable (que no confirmada) cuando:

- . Se detectan AC IgM específico anti-CMV (sugiriendo seroconversión reciente) muy útil en recién nacidos.
- . Aumento de 4 veces el título de IgG específica anti-CMV en muestras pareadas obtenidas con un intervalo de al menos 2 a 4 semanas.

Aunque la sensibilidad y especificidad de los test serológicos es adecuada, el requerimiento de muestras séricas pareadas limita la utilidad de estos test para establecer un diagnóstico en el momento.

Infección pasada

Ante una infección o exposición pasada a CMV cualquier valor de IgG por encima del punto de corte del test se considera positiva. El punto de corte varía dependiendo del test diagnóstico utilizado.



Los test serológicos tienen sus limitaciones:

- . El aumento x 4 de la IgG puede llevar varias semanas.
- . La IgM puede persistir varios meses después de la infección primaria, por lo que su detección no siempre nos permite saber si es una infección previa o actual.
- . No tienen ningún papel en el diagnóstico de enfermedad por CMV en el paciente inmunocomprometido.
- . Se utilizan pretransplante para establecer el estado serológico que puede predecir el riesgo de desarrollar enfermedad y guía para el uso profiláctico de la terapia antiviral.

Infección primaria versus infección recurrente.

La primoinfección se confirma por seroconversión o detección simultánea de AC IgM e IgG con avidéz funcional baja.

La infección recurrente se define por la reaparición de la excreción vírica en un paciente que ha sido seropositivo en el pasado. La distinción entre reactivación de virus endógenos y reinfección por una cepa diferente de CMV requiere un análisis con enzima de restricción del ADN vírico o una medición de AC contra epítomos específicos de cepa del CMV.

Pruebas moleculares (PCR)

PCR cualitativa (PCRc). Detección de ADN viral mediante técnica de amplificación y posterior visualización de una banda en geles de agarosa. Es una técnica ligeramente subjetiva y precisa de una carga viral mínima para poder ser observada (10). Presenta buena sensibilidad pero no puede distinguir entre ADN latente y replicación viral activa, disminuyendo así su especificidad. Tampoco permite diferenciar bajo nivel de alto nivel de replicación viral lo cual es importante para predecir el riesgo de enfermedad por CMV y para monitorizar la respuesta al tratamiento. Algunos centros utilizan PCR cualitativa y si ésta resulta positiva realizan **PCR cuantitativa en tiempo real (PCRq)**. Ésta se basa en un sistema automatizado comercial que permite cuantificar la

positividad de la muestra en copias de genoma/ml de muestra. La OMS estableció en el año 2010 un estándar internacional expresado en unidades internacionales UI/ml (11).

Estas técnicas se pueden realizar en muestras de orina, sangre completa y plasma. El ADN de CMV es estable hasta 5 días cuando se almacena a 4°C y durante 3-4 días a temperatura ambiente. En sangre se detecta mejor el ADN y a menudo da valores más altos de carga viral comparado con muestra de plasma porque detecta tanto virus intracelulares como libres. Es importante usar el mismo test y el mismo tipo de muestra para monitorizar a los pacientes en el tiempo (12).

Pruebas de antigenemia de CMV. pp65.

Detectan el antígeno viral (proteína pp65 de CMV) en leucocitos de sangre periférica. Esta técnica emplea AC monoclonales específicos marcados con fluorescencia. Un resultado positivo se informa como el número de células que tienen cadenas /por total de células contadas. Resultado disponible en 24 horas. Se puede aplicar a pacientes VIH y receptores de transplante donde la antigenemia se correlaciona bien con la viremia.

La técnica de PCR se utiliza más ampliamente que el test de antigenemia, ya que éste presenta algunas limitaciones (tabla 1) (13).

Cultivo

Cultivo convencional en fibroblastos humanos. El CMV puede ser aislado de diferentes tipos de muestras como sangre, LCR, exudado faríngeo, líquido de lavado broncoalveolar, orina y muestras de biopsia tisular. Presenta un crecimiento lento, dependiendo del nivel de virus presentes puede tardar de 1 a 6 semanas antes de observar los típicos efectos citopáticos. Es más útil en el diagnóstico de infección congénita (orina) y en la enfermedad invasora (muestras de biopsia tisular).

Cultivo "shell vial". Es un método de cultivo rápido basado en centrifugación a baja velocidad y detección de antígenos precoces de CMV antes del desarrollo de los efectos citopáticos característicos en los cultivos tisulares, adelantando por tanto el tiempo de

diagnóstico. Resultados disponibles en 2-3 días. La sensibilidad del test de cultivo shell varía con el tipo de muestra y es menor para las muestras de sangre comparado con otro tipo de fluidos orgánicos, como también ocurre con el cultivo convencional (14).

No todas las técnicas de amplificación genómica muestran la misma sensibilidad analítica. En el estudio realizado por J.Reina y colaboradores (15), comparan dos técnicas diagnósticas: cultivo celular y PCR en muestras de orina, unas con sospecha de infección congénita y otras de infección posnatal. En éstas últimas la PCRq mostró una sensibilidad de 100%, frente a un 75% para la PCRc y un 62,5 % para el cultivo shelll vial. Ellos concluyen que a la luz de sus resultados debería hacerse un estudio más amplio que avalara la utilización de la PCRq como prueba diagnóstica de elección en el estudio rutinario para la detección de CMV en las muestras pediátricas.

Histopatología

El estudio histológico de las muestras de biopsia tisular es útil en el diagnóstico de enfermedad invasora por CMV. El diagnóstico se basa en la presencia de cuerpos de inclusión, típicas inclusiones basófilas intranucleares, aunque también se pueden ver inclusiones citoplasmáticas eosinofílicas.

Tabla 1: Comparación entre pruebas diagnósticas empleadas en la infección por CMV.

Prueba diagnóstica	Serología	Técnicas Amplificación genómica (PCR)		Test Antigenemia	Cultivo	
		PRC ^c	PCR ^q		Cultivo convencional	Cultivo Shell vial
Técnica	Miden Ac anti CMV IgM e IgG Interpretación en un contexto clínico	----- Detección DNA viral, mediante amplificación y visualización banda en geles de agarosa	----- Detección DNA viral con sistema automatizado copias genoma/ml	Mide el Ag viral dentro neutrófilos (proteína pp65) Resultado en 24horas	----- En fibroblastos humanos	----- Centrifugación a baja velocidad y detección de antígenos precoces de CMV
Ventajas	- IgG + confirma infección pasada -Test de avidéz de Ac	-Buena S y E -Mejor S que cultivo	-Cuantifica carga viral: marcador pronóstico -Mejor S que PRC ^c y que cultivo		- Todo tipo de muestra. - Útil en inf.congénita y enf.invasora	- Resultados en 2-3 días
Desventajas	-Ac IgM: Falsos +/- persiste meses ¿Inf.previa o actual? - Ac IgG: ¿maternos? - Precisa muestras pareadas ↑x 4 - Poco útil Inmuno-deficientes	-Subjetiva. -No distingue ADN latente de replicación viral activa -NO cuantifica carga viral		-Menor estabilidad muestra -Precisa mayor volumen muestra - Carece S si leucocitos <1000 cel/μl	- Tarda 1 a 6 sem hasta observar efectos citopáticos - S varía con el tipo de muestra, menor en sangre -Interferencia en muestras orina* -Poco útil en Inmuno-deficientes	- S varía con el tipo de muestra, menor en sangre

PRC^c: PCR cualitativa, PRC^q: PCR cuantitativa

S: Sensibilidad, E: Especificidad

(*)En las muestras de orina podemos encontrar cristales de uratos, fosfatos que repercuten negativamente sobre la viabilidad de la línea celular. Las técnicas moleculares realizan



inicialmente un proceso de extracción de ácidos nucleicos que, generalmente, no se ve afectada por las características de la muestra.

PRUEBAS BASADAS EN EL TIPO DE ENFERMEDAD

El diagnóstico de infección o enfermedad por CMV depende del cuadro clínico específico por CMV a consideración.

Infección perinatal

Al igual que en la infección congénita el diagnóstico se basa en:

- Aislamiento del virus : cultivo de muestras de orina o saliva ó
- Identificación de ADN viral mediante PRC en muestras biológicas

Los neonatos que han adquirido la infección congénita a menudo tienen altos títulos de virus y el cultivo se hace positivo dentro de los primeros tres días de incubación. La orina y la saliva son las mejores muestras para el cultivo. Realizado en la primeras dos semanas de vida permite hacer el diagnóstico de infección congénita, pues en la infección adquirida perinatal se requiere al menos dos semanas para detectar el virus en orina.

La detección del virus a partir de las dos semanas de vida puede deberse tanto a una infección congénita como adquirida pues la excreción viral es prolongada, incluso varios años. Aunque la excreción viral en la infección adquirida posnatalmente es raro encontrarla antes de la 4ª semana, el diagnóstico diferencial de ambas infecciones en ocasiones es complicado pues pueden tener manifestaciones clínicas superponibles. Sin embargo el diagnóstico correcto es muy importante, ya que la infección adquirida por CMV, a diferencia de la congénita, no parece suponer un riesgo de secuelas a largo plazo.

Para realizar el diagnóstico de seguridad de infección adquirida por CMV debemos contar al menos con alguno de estos tres supuestos (6):

1. Disponer de un cultivo o una PCR(-) en orina en las primeras 2 semanas de vida y una determinación positiva posterior. Esto hace muy recomendable el

cribado sistemático de CMV en orina en los primeros días de vida, sobre todo en RN prematuros menores de 32 semanas o bajo peso.

2. Si no disponemos de ello, podemos realizar una PCR para CMV en sangre seca del papel de filtro de la prueba del talón (Guthrie card) que se suele conservar largo tiempo (16). Prueba (+) confirmaría una infección congénita (E 99-100%) y un resultado (-) apoya una infección adquirida (S de 28-100%).
3. Si no disponemos de la muestra del talón, apoyaría el diagnóstico de infección posnatal el inicio de la sintomatología pasadas las primeras semanas de vida, la presencia de neumonitis o enteritis (raras en la infección congénita), la detección del virus en lavado broncoalveolar o material de biopsia intestinal en niños con síntomas compatibles y el aumento de la carga viral en sangre u orina (PCR) o de la antigenemia en 2 muestras sucesivas.

La investigación de una fuente de infección posnatal, por ejemplo leche materna, suele ser positiva.

La serología ayuda. La determinación de AC IgM puede ser útil pero su ausencia no descarta infección y su presencia no la confirma con seguridad pues la técnica puede tener falsos (-) y (+). La detección de AC IgG anti-CMV en los primeros 9-12 meses de vida habitualmente traduce transmisión transplacentaria de AC maternos. Un resultado (-) excluye infección por CMV.

En el **huésped inmunocompetente** la presentación clínica más frecuente es el Síndrome mononucleósico. El diagnóstico de la infección primaria por CMV habitualmente se realiza mediante test serológico tanto con la detección de IgM específica de CMV como por el aumento de cuatro veces el título de IgG específica. Estos test aportan un diagnóstico de presunción en el contexto clínico apropiado (17).

En la **enfermedad invasora** el gold estándar para el diagnóstico es la identificación de las inclusiones por CMV o tinción inmunohistoquímica positiva para CMV en las muestras a estudio. Un cultivo positivo de una muestra de biopsia también se considera prueba diagnóstica consistente. También debería realizarse PCR para CMV



en plasma o sangre completa porque a menudo el resultado está disponible antes que la biopsia y puede influir en la decisión de iniciar o no tratamiento antiviral.

En el **huesped inmunocomprometido** es esencial la interpretación de los test de laboratorio dentro del contexto clínico. La confirmación por laboratorio de que la infección por CMV es la causa de la enfermedad que ocurre en estos pacientes es difícil y habitualmente requiere la demostración de CMV en el último órgano afectado en combinación con viremia, antigenemia o un test PCR (+) para CMV en sangre. La serología y los cultivos en orina y saliva raramente son útiles en esta población porque la mayoría de los pacientes son seropositivos y albergan virus (18).

Bibliografía:

1. Harrison GJ. Cytomegalovirus. In: Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 7th, Cherry JD, Harrison GJ, Kaplan SL, et al. (Eds), Elsevier Saunders, Philadelphia 2014. p.1969.
2. Gail J Demmler-Harrison, MD. Cytomegalovirus infection and disease in newborns, infants, children and adolescents.
Last updated: feb 26, 2014. Literature review current through: Feb 2014
<http://www.uptodate.com>
3. Demmler GJ. Infectious Diseases Society of America and Centers for Disease Control. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. Rev Infect Dis 1991; 13:315.
4. F.Baquero-Artigao y Grupo de estudio de la infección congénita por citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus. An Pediatr(Barc).2009;71(6):535-547.
http://www.seipweb.es/images/site/pdf/docu_oficiales/4.pdf

5. Lanzieri TM, Dollard SC, Josephson CD, et al. Breast milk-acquired cytomegalovirus infection and disease in VLBW and premature infants. *Pediatrics* 2013; 131:e1937.
6. A. Alarcón Allen y F. Baquero-Artigao. Revisión y recomendaciones sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección posnatal por citomegalovirus. Grupo de estudio de la infección por citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. *An Pediatr (Barc)*. 2011;74(1):52.e1—52.e13
http://www.seipweb.es/images/site/pdf/docu_oficiales/3.pdf
7. Adler SP. Cytomegalovirus transmission among children in day care, their mothers and caretakers. *Pediatr Infect Dis J* 1988; 7:279.
8. Caliendo AM, MD, PhD. Approach to the diagnosis of cytomegalovirus infection. Last updated: ene 3, 2014. Literature review current through: Feb 2014.
<http://www.uptodate.com>
9. Caliendo AM, MD, PhD. Overview of diagnostic test for cytomegalovirus infection. Last updated: nov 19, 2013. Literature review current through: Feb 2014. <http://www.uptodate.com>
10. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis* 1988; 158:1177.
11. Caliendo AM. The long road toward standardization of viral load testing for cytomegalovirus. *Clin Infect Dis* 2013; 56:374.
12. Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clin Infect Dis* 2012; 54:1793.
13. Caliendo AM, St George K, Kao SY, et al. Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV antigenemia assay: clinical utility of the prototype AMPLICOR CMV MONITOR test in transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2000; 38:2122.

14. Wreghitt TG, Teare EL, Sule O, et al. Cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. Clin Infect Dis 2003; 37:1603.
15. Reina J, Weber I, Riera M, Busquets M y Morales C. Utilidad de una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real en el diagnóstico de infección congénita y posnatal por citomegalovirus. An Pediatr (Barc),2014;80(5):299-303.
16. Atkinson C, Emery VC, Griffiths PD. Development of a novel single tube nested PCR for enhanced detection of cytomegalovirus DNA from dried blood spots. J Virol Methods 2014; 196:40.
17. Navalpotro D, Gimeno C, Navarro D. PCR detection of viral DNA in serum as an ancillary analysis for the diagnosis of acute mononucleosis-like syndrome due to human cytomegalovirus (HCMV) in immunocompetent patients. J Clin Virol 2006; 35:193.
18. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. Transplantation 2013; 96:333.