



Antigenemia y reacción de polimerasa en cadena en tiempo real en el diagnóstico de enfermedad por citomegalovirus en adultos con virus de inmunodeficiencia adquirida

Vivian Luchsinger, Patricia Vásquez, Matías Silva, M. José Bruno, Izkia Siches, Javier Villarroel, M. Luisa Garmendía y Carmen Larrañaga

Antigenemia and real time polymerase chain reaction for diagnosis of cytomegalovirus disease in HIV infected adults

Background: Cytomegalovirus (CMV) infection is frequent in HIV adults. It is unknown usefulness of quantitative methods for diagnosing the CMV disease in Chilean patients. **Aim:** To determine the performance of antigenemia and real time polymerase chain reaction (rtPCR) in the diagnosis of CMV disease in Chilean HIV adults. **Method:** Detection of CMV by viral isolation (AVR), antigenemia and quantitative rtPCR in HIV adults. **Results:** The 102 adults with suspected CMV disease had lower LTCD4 count and higher HIV viral load than 77 patients without suspicion ($p < 0.05$). Antigenemia and PCR were positive in 47 (46.1%) and 37 (36.3%) adults with clinical suspicion and in 2 (2.6%) and 4 (5.2%) of 77 without suspicion. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive value of antigenemia and RPCtr were 92%, 80%, 72% and 95% and 72%, 95%, 92% and 80%, respectively. The cutoff values were ≥ 1 cell (+) and $\geq 5.5 \log_{10}$ copies/ 2×10^6 cells. CMV was isolated in 6/179 patients (3.4%), all symptomatic. **Conclusion:** Positivity of antigenemia and rtPCR are similar for diagnosing CMV disease in Chilean HIV adults. AVR is inappropriate as a gold standard for its low performance.

Key words: Cytomegalovirus, antigenemia, real time polymerase chain reaction, HIV.

Palabras clave: Citomegalovirus, antigenemia, reacción de polimerasa en cadena en tiempo real, VIH.

Facultad de Medicina,
Universidad de Chile.

Instituto de Ciencias Biomédicas
(ICBM). Programa de Virología,
ICBM (VL, MS, MJB, CL).

Hospital San Juan de Dios,
Santiago (PV, IS).

Fundación Arriarán,
Santiago (JV).

Instituto de Nutrición y

Tecnología de Alimentos (INTA),
Universidad de Chile (MLG).

Conflictos de interés: Ninguno.

Financiado por Proyecto FONIS
SA1112227.

Recibido: 29 de diciembre de 2014

Aceptado: 8 de octubre de 2015

Correspondencia a:

Vivian Luchsinger Fariás
vluchsins@med.uchile.cl

Introducción

Más de 90% de los adultos chilenos portadores del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) está infectado con citomegalovirus (CMV)¹. Este herpesvirus persiste latente de por vida en el individuo, pudiendo reactivarse, en especial cuando la respuesta inmune celular está disminuida, por lo que constituye una complicación infecciosa y de muerte frecuente en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)^{2,3}, aún en la época de terapia antirretroviral (TARV)^{4,6}.

Las enfermedades citomegálicas más graves se desarrollan en pacientes leucopénicos (con menos de $50-100$ linfocitos T helper $CD4^+/\text{mm}^3$)²⁻⁷, entre las cuales se incluye la retinitis y la enfermedad gastrointestinal (EGI). La primera es la manifestación única más común, representa 85% de los casos de enfermedad por CMV^{2,3,5-8} y es indicadora de SIDA⁸. La EGI es la segunda en frecuencia, representando 15% de las enfermedades por CMV, y puede afectar todo el tracto digestivo^{5,6}. La neumonía es menos frecuente y el cuadro clínico es inespecífico^{5,6}.

Ganciclovir es el antiviral de elección para CMV y por su alta toxicidad y costo, su aplicación requiere el

diagnóstico específico de enfermedad citomegálica. Sólo las técnicas de laboratorio que demuestran infección activa pueden confirmar la enfermedad, incluyendo el aislamiento viral rápido (AVR), la antigenemia o la cuantificación de la carga viral en una reacción de la polimerasa en cadena en tiempo real (RPC-TR)^{2,3,9}. El AVR combina el cultivo celular y la detección de antígenos virales por inmunofluorescencia (IF) alcanzando una especificidad superior a 99%^{2,9}. Aunque es el método de referencia^{2,9}, su sensibilidad es baja y varía según el paciente, el tipo y condiciones de la muestra estudiada⁹, pudiendo llegar hasta 3% en sangre. La escasez de laboratorios nacionales con cultivos celulares y la necesidad de preservar la capacidad del virus de infectar mediante el transporte de la muestra rápidamente y en frío al laboratorio limitan su uso.

La técnica más utilizada en Chile para el diagnóstico de enfermedad por CMV es la antigenemia, método rápido que detecta la proteína pp65 del tegumento viral en leucocitos polimorfonucleares (LPMN) de sangre periférica mediante IF indirecta³. Su interpretación depende del observador y su positividad disminuye cuando la muestra de sangre es procesada después de cinco horas desde su obtención y en pacientes leucopénicos (< 100 LT $CD4^+/\text{mm}^3$)^{4,9,10}, lo que ocurre en 45% de los pacientes chilenos



infectados por VIH, sin TARV, y en 11% de los tratados con TARV¹¹. La sensibilidad (33-100%), los valores predictores positivo y negativo (26-100%) y los valores umbrales (2-13 céls positivas/ 2×10^5) utilizados para predecir una enfermedad por CMV e indicar terapia antiviral^{9,10,12,13} varían en los distintos estudios internacionales y se desconocen en pacientes chilenos portadores de VIH.

La RPC-TR cuantitativa es una técnica rápida; su sensibilidad y especificidad varían según la condición del paciente y la técnica de referencia que se utilice, entre 61-100% y 80-99%, respectivamente^{4,10,12,14}. Altas cargas sistémicas de CMV en portadores de VIH^{3,2,15} se han asociado con enfermedad; sin embargo, aún no se ha establecido un valor de corte predictor universal, variando entre 2.645 y $1,6 \times 10^5$ copias/ml según el protocolo aplicado, el tipo de muestra y el paciente estudiado^{5,10,13,15}.

A diferencia de la antigenemia, la RPC-TR requiere un menor volumen de sangre (100 μ L vs 5 ml para la antigenemia), el resultado se obtiene en menor tiempo y es menos dependiente del recuento leucocitario de los pacientes, de las condiciones de obtención y transporte de la muestra y de la subjetividad de quien interpreta los resultados. Sin embargo, su costo es mayor y en muchos laboratorios nacionales aún no se dispone del equipamiento requerido.

En nuestro conocimiento, en nuestro país sólo se han comparado ambas técnicas en receptores de trasplantes, con resultados disímiles y en algunos pacientes incluso discordantes¹⁶⁻¹⁸, lo que también ha sido reportado en el exterior en enfermos con infección por VIH¹³.

Aunque la infección por VIH está incorporada en el plan estatal de Garantías Explícitas de Salud-GES⁸, y que la mayoría de los 40.000 chilenos estimados como portadores del VIH está infectado con CMV, las guías clínicas nacionales no incluyen métodos diagnósticos de enfermedad citomegálica. Como se desconoce la utilidad de la antigenemia y de la RPC-TR en el diagnóstico de esta enfermedad, el objetivo de este estudio fue determinar el rendimiento de ambas técnicas y sus valores umbrales predictores de enfermedad por CMV en adultos chilenos con infección por VIH.

Material y Métodos

Diseño del estudio

Transversal, de evaluación de pruebas diagnósticas.

Población estudiada

Ciento setenta y nueve portadores de VIH, mayores de 18 años, atendidos entre marzo de 2012 y septiembre de 2013 en el Hospital San Juan de Dios y en la Fundación Arriarán, seleccionados aleatoriamente. Se incluyeron 77 de quienes acudieron a un control rutinario y no presen-

taban cuadro clínico sugerente de CMV (denominados *asintomáticos*) y 102 adultos hospitalizados o ambulatorios con sospecha clínica de enfermedad por CMV (referidos como *sintomáticos*); estos casos correspondían a síndrome febril de etiología no precisada, enfermedad gastrointestinal o hepatitis; retinitis y/o neumonía¹⁹. Por cada paciente se completó una ficha con los antecedentes de edad, género, recuento de LT CD4, TARV, tiempo de diagnóstico y carga plasmática de VIH, y de los enfermos se registraron antecedentes clínicos del episodio en curso (síntomatología, signología, parámetros de laboratorio, evolución clínica, diagnóstico etiológico y terapia con ganciclovir).

Muestras

De todos los individuos se obtuvo 4 ml de sangre venosa periférica que fue depositada en un tubo con EDTA y transportada de inmediato tras su obtención al laboratorio en hielo.

Técnicas de laboratorio

Se realizó aislamiento viral rápido (AVR), antigenemia y RPC-TR cuantitativa en paralelo a cada muestra.

AVR: 0,2 ml de sangre se inocularon en un vial con células MRC-5, centrifugándose por 15 min a 2.490 g en centrífuga U-32R Boeco®. Tras 24 h de incubación con 1 ml de medio MEM y 1% de suero fetal de bovino, a 37°C con CO₂, se fijó con 1 ml de metanol por 5 min y un 1 ml de acetona por 10 min a temperatura ambiente. La detección de antígenos virales se realizó por inmunofluorescencia indirecta (IFI) con el kit Light Diagnostics™, según instrucciones del fabricante. Los preparados se observaron al microscopio de fluorescencia Nikon® con un aumento de 20X. La observación de ≥ 1 núcleo fluorescente se informó como muestra positiva.

Antigenemia: Se separaron los leucocitos con dextrán y se detectó la proteína pp65 mediante IFI con CINAKit (Argene®), según instrucciones del productor. Por cada paciente se observaron 400.000 céls a 40X en un microscopio Nikon®. La muestra se consideró positiva con la presencia de ≥ 1 núcleo polilobulado fluorescente y los resultados se informaron como recuento de céls positivas/400.000 observadas.

RPC-TR cuantitativa: En 40 μ L de la fracción de leucocitos utilizada para la antigenemia (concentración de 2×10^6 céls/ml), se realizó la extracción de ADN mediante el kit High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche®), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El ADN extraído fue almacenado a -80°C y para su posterior análisis se agregaron 2 μ l a 18 μ l de la mezcla formada por 4 μ L de Master Hybridization Probe (Roche®); 0,7 μ M de cada partidor (gB-F y gB-R); 0,25 μ M de cada sonda (gB-FL y gB-LC)¹⁴; 0,5 μ L de uracil ADN glicosilasa y 9,7 μ L de agua estéril. En un termociclador Light Cycler 2.0® se



amplificó un fragmento del gen de la glicoproteína B de CMV incubando a 10°C por 10 min, a 95°C por 10 min y con 45 ciclos de 10 seg a 95°C, 15 seg a 58°C y 12 seg a 72°C; seguidos por 1 min a 50°C y 2 min a 40°C¹⁴. En cada corrida se incluyó un control negativo y como control positivo el plásmido pCMV- KS- T 3214 bp (Roche®). Para estimar el número de copias de ADN de CMV de cada muestra se construyó una curva con concentraciones del plásmido de 1 x 10²; 1 x 10³; 1 x 10⁴; 1 x 10⁵; 1 x 10⁶, 1 x 10⁷ y 1 x 10⁸ copias de ADN/μL. El umbral de detección fue de 25 copias/μL. Para los análisis cuantitativos se excluyeron las muestras con < 100 copias/μL. Se repitió la amplificación en diluciones de las muestras con valores superiores a la concentración máxima utilizada y posteriormente se calculó la concentración ajustando por el factor de dilución utilizado. Los resultados obtenidos de cada muestra se expresaron como log₁₀ copias de ADN de CMV/2 x 10⁶ céls.

Análisis estadístico

Se describieron las variables de interés a través de estadísticas descriptivas (medianas, porcentajes) y de dispersión (rango intercuartílico), según correspondiera. Se compararon diferencias entre pacientes, con y sin sospecha de CMV, mediante las pruebas χ² y exacta de

Fisher para las variables cualitativas y t de Student con corrección de Welch, Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para las cuantitativas. En base a tablas de contingencia 2 x 2, se determinó la sensibilidad, especificidad y los valores predictores positivos (VPP) y negativos (VPN). Se establecieron los puntos de corte, según los valores de sensibilidad y especificidad más altos, y el área bajo la curva de la RPC-TR respecto a la antigenemia. La concordancia entre ambas técnicas se determinó mediante el coeficiente kappa e intervalos de confianza a 95%. De acuerdo a lo publicado²⁰, se consideró concordancia leve con κ < 0,2; aceptable con κ entre 0,21-0,4; moderada entre 0,41-0,6; considerable entre 0,61-0,8 y casi perfecta si κ ≥ 0,81. La correlación entre los núcleos positivos de la antigenemia y las copias de ADN de CMV determinadas por la RPC-TR se determinó por la prueba de Spearman. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Stata 11.0 considerando significativo un valor de p < 0,05.

Aspectos éticos: Todos los pacientes aceptaron participar en el estudio voluntariamente a través de la firma de un consentimiento informado. El proyecto fue aprobado por los Comités de Ética de Investigación en Seres Humanos del Servicio de Salud Metropolitano Occidente y Central y de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Resultados

Población estudiada

Los 102 adultos portadores de VIH con sospecha clínica de enfermedad por CMV y los 77 casos sin cuadro clínico sólo se diferenciaron en la carga plasmática de VIH, el recuento de LT CD4 y la proporción con TARV (Tabla 1), siendo similar el recuento de leucocitos sanguíneos establecido en la fracción utilizada para la antigenemia (mediana en los dos grupos = 8,3 x 10³/μL; rangos: 1,5-43,2 x 10³/μL y 2,4-47,8 x 10³/μL, respectivamente; p > 0,05).

Entre los 102 enfermos, 66 (63,5%) estaban hospitalizados, con una mediana de 13 días de hospitalización (RIC: 7-60) y de 30 días de evolución de la enfermedad (RIC: 14-180). La enfermedad gastrointestinal o hepatitis fue el diagnóstico más frecuente con 56 casos (54,9%), seguido de 35 (34,3%) con neumonía, 18 (17,6%) con síndrome febril, 9 (8,7%) con retinitis, uno con shock séptico (0,95%) y uno con úlcera perianal (0,95%). El seguimiento clínico a la semana pos enrolamiento fue posible en 82 de los pacientes (80,4%): 13 de ellos (15,5%) estaba recibiendo terapia con ganciclovir (GCV), 27 estaban asintomáticos (32,9%) y dos habían fallecido (2,4%). Los 57 (74,0%) adultos sin enfermedad por CMV controlados a la semana permanecían asintomáticos y ninguno había recibido GCV.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de 179 adultos infectados con VIH, con y sin sospecha de enfermedad por CMV

Características*	Con sospecha de enfermedad por CMV n = 102	Sin sospecha de enfermedad por CMV n = 77	Valor p
Edad: mediana (RICp25-p75)	36 (30-56)	34 (21-58)	0,1
Género: masculino n (%)	81 (79,4%)	53 (68,8%)	0,07
Procedencia			
Hospital San Juan de Dios	68 (66,6%)	64 (83,1%)	0,008
Fundación Arriarán	34 (33,3%)	13 (16,9%)	
Diagnóstico de infección por VIH (meses)			
Mediana (RICp25-p75)	24,5 (1,75-156)	15 (2-118)	0,1
Carga plasmática de VIH			
Copias x 10 ³ /ml			
Mediana (RICp25-p75)	120 (22-2.650)	9,9 (46-485)	< 0,001
Recuento LT CD4 céls./ml			
Mediana (RICp25-p75)	40 (10-270)	182 (85-379)	< 0,001
% LT CD4			
Mediana (RICp25-95)	6 (3-22)	13 (8,5-26,3)	< 0,001
Con terapia antirretroviral, n (%)	43 (42,2%)	54 (70,1%)	< 0,001
Terapia antirretroviral (meses)			
Mediana (RICp25-p75)	1 (1-54)	1 (0,6-48)	0,1

*RIC: rango intercuartílico; VIH: virus de inmunodeficiencia humana; LT: linfocito T; LT CD4: linfocito T ayudador.



Detección de CMV

En los 179 casos totales estudiados, la antigenemia fue positiva en 49 (27,4%), la RPC-TR en 41 (22,9%) ($p: 0,3$) y en seis (3,4%) se aisló CMV en sangre ($p < 0,0001$). Estos seis pacientes eran hombres entre 31 y 53 años de edad (mediana: 52 años) y sintomáticos: uno con retinitis; otro con neumonía y perforación intestinal con biopsia sugerente de infección por CMV y los otros cuatro con diarrea, tres de los cuales además tenían un síndrome febril. Sólo dos recibieron ganciclovir y otros dos fallecieron; cuatro estaban hospitalizados y cuatro recibían TARV. Las cargas plasmáticas de VIH variaron entre 53 y 1.600.000 copias/mL (mediana: 8.400 copias/mL) y los recuentos de LTCD4 entre 9 y 61 células/mm³ (mediana: 18). En todos ellos fueron positivas la antigenemia, con una mediana de 64,5 núcleos/400.000 células observadas (rango: 4-338), y la RPC-TR, con una mediana de 5,4 log₁₀ copias de ADN de CMV/2 x 10⁶ células (rango: 4,5 y 6,8).

Comparación de la antigenemia y la RPC-TR

En 157/179 adultos estudiados (88%), fue concordante el resultado entre la antigenemia y la RPC-TR (coeficiente $\kappa = 0,67$; IC 95%: 0,54-0,79). En base a la detección en enfermos y no enfermos, la sensibilidad, especificidad, el VPP y VPN de la antigenemia fue 46%, 97%, 96% y 58% y de la RPC-TR 36%, 95%, 90% y 53%, respectivamente.

Utilizando la antigenemia como referencia, la sensibilidad de la RPC-TR fue 71%, la especificidad 95%, el VPP 83%, el VPN 89% y la exactitud 88%. Por la ausencia de una técnica de referencia apropiada, estos parámetros se determinaron respecto a un estándar ampliado definido como paciente con sospecha clínica de enfermedad por CMV y una de las técnicas positivas, aumentando la sensibilidad y el VPN de la antigenemia a 92 y 95% y de la RPC-TR a 72% y 80%, respectivamente. La especificidad de la antigenemia disminuyó a 80% y el VPP a 72%, mientras la RPC-TR mantuvo su especificidad y el VPP aumentó levemente a 92%.

El área bajo la curva ROC (AUC) de la antigenemia fue 0,71 (IC 95%: 0,64-0,77) respecto a todos los casos sintomáticos y de 0,90 (IC 95%: 0,85-0,94) considerando los enfermos con RPC-TR positiva. El valor de corte fue ≥ 1 núcleo positivo, con 46,1% de sensibilidad; 97,4% de especificidad; 17,7 de LR (+); 0,55 de LR (-) y 68,2% de clasificación correcta. El AUC de la RPC-TR fue regular, con un valor de 0,65 (IC 95%: 0,58-0,72) respecto a todos los enfermos y de 0,83 (IC 95%: 0,77-0,88) si se analizan los enfermos con antigenemia positiva. El valor de corte fue $\geq 5,5$ log₁₀ copias/2 x 10⁶ células (LR+: 2,27 y LR-: 0,42).

El coeficiente de correlación de Spearman entre las copias de ADN de CMV determinada por la RPC-TR y el número de núcleos positivos en la antigenemia de adultos con infección por VIH fue 0,36 ($p: 0,03$) (Figura 1). Las copias de CMV en los portadores de VIH con antigenemia positiva fueron similares a las de los pacientes con antigenemia negativa, con una mediana de 5,8 y 4,7 (RIC: 4,6-6,5 y 3,9-5,9 log₁₀ copias de ADN de CMV/2 x 10⁶ células, respectivamente) (prueba de Mann-Whitney, $p = 0,1$) (Figura 2).

Tanto la positividad de la antigenemia como de la RPC-TR fue mayor en los sintomáticos que en los asintomáticos, siendo 47 (46,1%) y 37 (36,3%) en los 102 enfermos y 2 (2,6%) y 4 (5,2%) en los 77 no enfermos, respectivamente ($p < 0,0001$). En ambos grupos de adultos, la detección por las dos técnicas fue similar ($p \geq 0,2$). La antigenemia tuvo una mediana de 10 núcleos

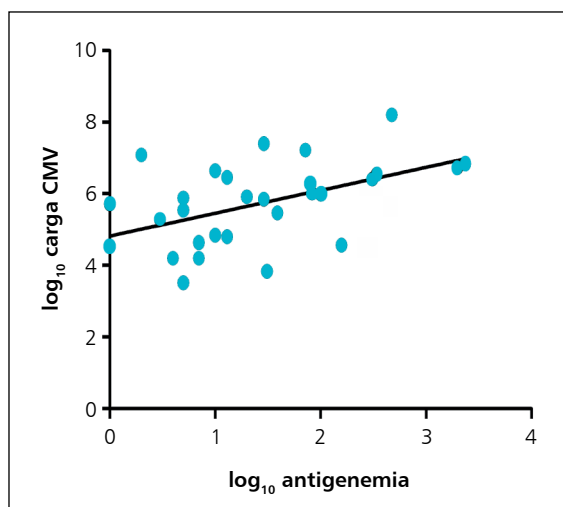


Figura 1. Correlación de copias de ADN de CMV por RPC-TR en leucocitos y núcleos positivos en antigenemia en 30 adultos con infección por VIH. Coeficiente de Spearman = 0,36 ($p = 0,03$).

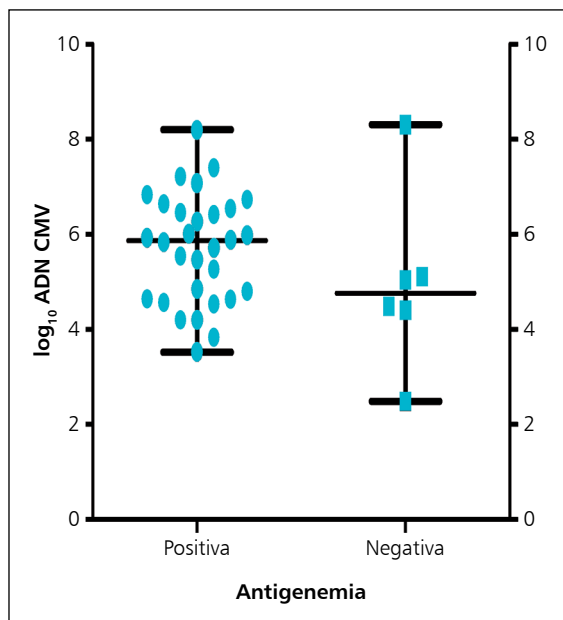


Figura 2. Copias de ADN de CMV en leucocitos de adultos con infección por VIH, con y sin antigenemia positiva. Líneas horizontales representan las medianas $p = 0,4$ con prueba de Mann-Whitney.



positivos/400.000 céls analizadas en los enfermos (rango: 4-80) y sólo se observó un núcleo fluorescente en cada asintomático. Las cargas de CMV detectadas por RPC-TR no fueron significativamente diferentes entre los pacientes (mediana: 6,7; rango: 4,6-66,7 log₁₀ copias de ADN de CMV/2 x 10⁶ céls) y los asintomáticos (mediana: 5,1; rango: 4,1-5,3) (prueba Mann-Whitney, p: 0,6).

Entre los enfermos, la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la RPC-TR respecto a la antigenemia fueron 72%, 95%, 92% y 80% (Tabla 2) y el área bajo la curva ROC 0,83 (IC 95%: 0,77-0,88). Considerando los enfermos con ambas técnicas positivas, el AUC de la antigenemia fue 0,84 (IC 95%: 0,78-0,89) y de la RPC-TR de 0,91 (IC 95%: 0,86-0,95).

Comparando los 47 enfermos con antigenemia positiva y los 55 con antigenemia negativa, la RPC-TR amplificó CMV en 35 (72,3%) y 3 (5,5%), respectivamente (p < 0,0001). En los primeros, los recuentos de LT CD4 fueron menores (mediana: 37 vs 49,5; rangos: 8,7-60,2 y 12,2-125,5 céls/ml; prueba t, p: 0,02). Ambos grupos tuvieron similares recuentos leucocitarios (medianas: 7,9 vs 8,3; rangos: 5,6-11,3 y 5,0-12,3 x 10³ leucocitos/μl), cargas plasmáticas de VIH (medianas: 98 vs 94; rangos: 26,5-380 y 40-460) y de CMV (medianas: 4,8 vs 4,7; rangos: 4,8-6,7 y 3,8-5,6 log₁₀ copias de ADN de CMV/2 x 10⁶ céls) (p > 0,1, prueba t). Síndrome febril fue el diag-

nóstico clínico en 10 (21,3%) pacientes con antigenemia positiva y en 6 (10,9%) de los negativos; neumonía en 17 (36,2%) y 19 (34,5%); enfermedad gastrointestinal y/o hepatitis en 25 (53,2%) y 30 (54,5%) y retinitis en 3 (6,4%) y 6 (10,5%), respectivamente (prueba de Fisher, p > 0,4).

Los 37 enfermos con RPC-TR positiva y los 65 con RPC-TR negativa tuvieron similar edad, carga plasmática de VIH, recuento de leucocitos sanguíneos (mediana: 8,3 x 10³ vs 8,4 x 10³ céls/μL; RIC: 5,4-12,9 y 5,8-12,3 x 10³ céls/μL), número de núcleos fluorescentes en la antigenemia (p > 0,1) y diagnósticos clínicos (p > 0,1) con síndrome febril en 9 casos de cada grupo (24,3% y 13,9%); neumonía en 15 (40,5%) y 21 (32,3%); compromiso GI en 20 (54,1%) y 21 (53,9%) y retinitis en dos (5,5%) y 7 (10,8%). Ambos grupos sólo se diferenciaron significativamente en el recuento de LT CD4: mediana: 21 y 54,0 céls/ml, respectivamente (p = 0,004 por prueba t).

La positividad de la antigenemia y de la RPC-TR (p > 0,1) no varió entre los pacientes con distinto cuadro clínico, siendo en ambas técnicas menor entre los pacientes con retinitis y mayor entre quienes presentaron un síndrome febril (p > 0,1) (Tabla 3). Los recuentos de leucocitos, de LT CD4, de cargas plasmáticas de VIH (datos no mostrados) y de CMV fueron similares entre los enfermos con distinto diagnóstico (ANOVA, p > 0,1) (Tabla 3).

Tabla 2. Detección de CMV mediante antigenemia y RPC-TR en 179 adultos con infección por VIH

Casos	(n)	Antigenemia/RPC-TR			
		+/+	+/-	-/+	-/-
Enfermos	(102)	34	13	3	52
Asintomáticos	(77)	0	2	4	71
Total	(179)	34	15	7	123

Discusión

Para diagnosticar una enfermedad por CMV se dispone de diversos métodos, cuya utilidad en la práctica clínica debe ser establecida en las diferentes poblaciones de inmunocomprometidos. En este estudio de 179 adultos portadores del VIH, la positividad de la antigenemia y de la RPC en tiempo real para el diagnóstico de enfermedad

Tabla 3. Detección de CMV según técnica y diagnóstico clínico en 102 adultos con infección por VIH con sospecha clínica de enfermedad por CMV

Cuadro clínico	Antigenemia (+)		RPC-TR (+)		p*
	Casos n (%)	Núcleos (+) Mediana (RIC)	Casos n (%)	log ₁₀ copias ADN de CMV/2 x 10 ⁶ céls Mediana (RIC)	
Síndrome febril (n = 18)	12 (66,6)	1 (0-17,5)	9 (50,0)	5,3 (4,6-6,3)	0,4
Neumonía (n = 35)	17 (48,6)	0 (0-11,5)	15 (42,9)	6,3 (4,8-8,0)	0,8
Enfermedad gastrointestinal y/o hepatitis (n = 56)	24 (42,9)	0 (0-9,2)	20 (35,7)	5,5 (4,6-6,5)	0,5
Retinitis (n = 9)	3 (33,3)	4 (2-80)	2 (22,2)	5,2 (4,2-6,2)	1,0

*valor de p obtenido por comparación de proporciones mediante la prueba de Fisher. RIC: rango intercuartílico 25% y 75%.



por CMV fue similar por lo que asociado a su menor costo, mayor accesibilidad y número de casos positivos, aunque sin significancia estadística, proponemos a la antigenemia como la primera opción para el diagnóstico de esta enfermedad viral en la población estudiada. La RPC-TR es una alternativa apropiada y, de acuerdo a la buena concordancia entre las dos técnicas, sería de elección en aquellos casos en los cuales no es posible realizar la antigenemia en condiciones óptimas, como la imposibilidad de procesar la muestra de sangre en menos de 5 h.

Por la infrecuente detección de CMV en sangre de adultos con VIH asintomáticos, aún en leucocitos, una antigenemia o RPC positiva plantea al CMV como probable agente etiológico en pacientes con sospecha de enfermedad citomegálica, independiente de la carga viral⁵. Así, con ≥ 1 núcleo positivo/400.000 céls en la antigenemia, 68,2% de los enfermos fueron clasificados como tales. Respecto a la RPC-TR, si se considera la carga de ADN de CMV mayor a la máxima detectada en asintomáticos como indicadora de infección activa, en 44% de los enfermos se habría descartado enfermedad por CMV, pese a que en 88% de ellos la antigenemia fue ≥ 1 núcleo positivo. Por las menores cargas de CMV detectadas^{5,21} en este estudio y por su relación más directa con replicación viral, es de interés verificar este valor de corte en plasma con una RPC-TR validada para uso clínico.

Por el alto VPN ($\geq 95\%$) de la antigenemia detectada en este estudio, coincidente con publicaciones extranjeras^{12,22}, un resultado negativo permitiría descartar a CMV como agente etiológico en un portador de VIH enfermo; por el contrario, dado el alto VPP (97,6%) en pacientes con un recuento de LT CD4 < 100 céls/ μ L, una antigenemia positiva confirmaría a CMV como agente en los casos con sospecha clínica de esta enfermedad.

Tanto la positividad de la antigenemia como de la RPC-TR detectadas en este estudio se incluyen en el rango de publicaciones extranjeras para el diagnóstico de enfermedad por CMV en portadores de VIH (33-100% de la antigenemia y 5,2-35% de la RPC)^{12,22-27}. A nivel nacional, nuestros resultados sólo pueden compararse con lo publicado en receptores de trasplantes¹⁶⁻¹⁸, en quienes la positividad de la antigenemia (40%) y de la RPC ($> 32\%$)^{17,18} fueron mayores, en especial en pacientes que recibieron un trasplante de órganos sólidos con sospecha clínica de enfermedad (58% de la antigenemia y 73% de la RPC)¹⁶, aunque la concordancia fue moderada ($\kappa = 0,57$) y menor a la de este estudio. Diferencias en los cuadros clínicos, recuentos de LT CD4 y TARV de los pacientes enrolados-factores que inciden en la frecuencia de enfermedad por este virus, técnicas de amplificación y valores umbrales aplicados para definir resultados positivos (entre 900 y $1,6 \times 10^5$ copias referidos a 10^5 o 10^6 céls o LPMN o por ml de LPMN o leucocitos)^{5,24-28}

dificultan las comparaciones y enfatiza la necesidad de establecer en nuestro país la positividad de las técnicas disponibles en cada población de inmunocomprometidos, idealmente utilizando RPC universales.

La concordancia aceptable entre la antigenemia y la RPC-TR en los enfermos concuerda con lo publicado a nivel internacional (κ entre 0,4 y 0,9)^{10,29}. Por el contrario, en asintomáticos fueron totalmente discordantes y complementarias, puesto que por la antigenemia negativa se podría descartar replicación viral activa en los cuatro casos con RPC positiva. La evolución de la carga viral permitiría definir si este resultado corresponde a ADN viral latente o replicación del virus^{2,7,9,10}.

Una RPC negativa en pacientes con antigenemia positiva -observada en 15 pacientes en este estudio- ha sido previamente reportada^{13,23}. Los casos con sólo un núcleo positivo podrían considerarse falsos positivos; algunos de los sin amplificación genómica viral podrían explicarse por la pérdida de ácidos nucleicos de los extractos, por la descongelación desde su almacenamiento a -80°C , y en otros, la discrepancia se explicaría por una replicación viral local que no se expresa a nivel sistémico, por lo que no aumenta la carga de CMV en la sangre^{9,10}. Como se ha demostrado, en estos casos la presencia de la proteína pp65 se debe a la transferencia pasiva desde células endoteliales infectadas a los polimorfonucleares²⁹⁻³². Como en ellas el virus no replica ni establece latencia, no se detecta el genoma viral, siendo éstas las células predominantes en la fracción que se obtiene con dextrán para la antigenemia y en la cual se aplicó la RPC en este estudio.

De acuerdo con lo previamente descrito⁹ y confirmando su inutilidad como técnica de referencia, la positividad del aislamiento viral rápido en sangre fue muy baja. Sin embargo, aislar el virus indicaría enfermedad por CMV dado que todos eran pacientes sintomáticos y tuvieron antigenemia y RPC-TR positivas. Como el virus se aisló en 2/3 lavados bronquio-alveolares de pacientes con neumonía y fue el único método que detectó CMV en uno de ellos, el AVR es útil y recomendable en muestras biológicas obtenidas directamente del órgano blanco afectado³. Puesto que esto no será posible en la mayoría de los casos porque involucra procedimientos invasores (LBA, biopsia) de difícil acceso o porque no está definido el foco infeccioso (síndrome febril), se requiere establecer la sensibilidad de técnicas como la antigenemia y la RPC-TR en sangre, por ser la muestra que rutinariamente se obtiene en los enfermos.

Una limitación de este estudio es la clasificación de enfermos en base sólo a criterios clínicos. Para disminuir la subjetividad se aplicaron definiciones universales de enfermedad por CMV¹⁹ y se uniformaron criterios entre los médicos que enrolaron pacientes, todos con amplia experiencia en atención de enfermos con infección por VIH. Pese a lo anterior, la significativamente superior



positividad de las dos técnicas en los enfermos respecto a los sin sintomatología demuestra su utilidad en el diagnóstico de enfermedad por CMV en adultos con VIH.

La ausencia de diferencias significativas en la proporción de positivos por antigenemia o RPC-TR respecto a los distintos cuadros clínicos incluidos, debiera ser corroborada con un mayor número de pacientes en cada categoría, para confirmar si la menor positividad de la antigenemia en los pacientes con retinitis en relación a los con síndrome febril corresponde a una sensibilidad de la técnica o del cuadro clínico, puesto que una infección activa en un determinado compartimento, como es el ojo, podría no expresarse a nivel sistémico.

En conclusión, en adultos chilenos portadores de VIH con sospecha clínica de enfermedad por CMV, la positividad de la antigenemia y la RPC-TR cuantitativa para el diagnóstico de esta enfermedad es similar y complementario. Valores ≥ 1 núcleo (+)/400.000 céls en la antigenemia y $\geq 5,5 \log_{10}$ de copias de ADN de CMV/2 x 10⁶ leucocitos indicarían enfermedad por CMV. El aislamiento viral rápido en sangre no es una técnica apropiada como estándar debido a su baja positividad.

Agradecimientos. A Cristian Moreno, Dina Silva y Luis Torres por su valioso trabajo técnico; a Dr. Marcelo Wolff y al personal de la Fundación Arriarán y a las matronas Marisol Muñoz y Cecilia Vera del Hospital San Juan de Dios por su esencial colaboración en la toma y envío de muestras.

Resumen

Introducción: La infección por citomegalovirus (CMV) es frecuente en adultos con virus de inmunodeficiencia humana (VIH). No se ha establecido la utilidad de los métodos cuantitativos para diagnosticar enfermedad por CMV en pacientes chilenos. *Objetivo:* Determinar la positividad de antigenemia y reacción de polimerasa en cadena en tiempo real (RPC-TR) en el diagnóstico de enfermedad por CMV en adultos chilenos con infección por VIH. *Metodología:* Se detectó CMV mediante aislamiento viral rápido (AVR), antigenemia y reacción de polimerasa en cadena en tiempo real (RPC-TR) cuantitativa en adultos infectados por VIH, con y sin sospecha de enfermedad por CMV. *Resultados:* El recuento de LT CD4 fue menor y mayor la carga de VIH en 102 sintomáticos respecto a 77 asintomáticos ($p < 0,05$). La antigenemia y la RPC-TR fueron positivas en 46 y 36% de los enfermos y en 3 y 5% de los asintomáticos respectivamente. La sensibilidad, especificidad, valor predictor positivo y negativo de la antigenemia y la RPC-TR fueron 92%, 80%, 72% y 95% y 72%, 95%, 92% y 80%, respectivamente. Los valores de corte fueron ≥ 1 núcleo (+) y $\geq 5,5 \log_{10}$ copias/2 x 10⁶ céls. Se aisló CMV en 3,4%, todos los sintomáticos. *Conclusión:* La antigenemia y la RPC-TR tienen una positividad similar para diagnosticar enfermedad por CMV en adultos chilenos con infección por VIH. El AVR es inapropiado como referencia por su baja positividad.

Referencias bibliográficas

- 1.- Luchsinger V, Luzoro A, Martínez M J. High seroprevalence of cytomegalovirus, herpes simplex type 1 virus and Epstein Barr virus infection among human immunodeficiency virus-infected adults. *Rev Med Chile* 2010; 138: 809-14.
- 2.- Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 2003; 98: 269-97.
- 3.- Sanbonmatsu S, Pérez M, Navarro J M. Infección por citomegalovirus humano. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2014, 32 (Supl 1): 15-22.
- 4.- Griffiths P. CMV as a cofactor enhancing progression of AIDS. *J Clin Virol* 2006; 35: 489-92.
- 5.- Steining C, Puchhammer-Stöckl E, Popow-Kraupp T. Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Clin Virol* 2006; 37 (1): 1-9.
- 6.- Steining C. Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13 (10): 953-63.
- 7.- Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol* 2002; 197: 65-73.
- 8.- Guía Clínica AUGÉ, MINSAL 2013.
- 9.- Razonable R. Management strategies for cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am* 2013; 27: 317-42.
- 10.- Mhiri L, Kaabi B, Houimel M, Arrouji Z, Slim A. Comparison of pp65 antigenemia, quantitative PCR and DNA hybrid capture for detection of cytomegalovirus in transplant recipients and AIDS patients. *J Virol Methods* 2007; 143 (1): 23-8.
- 11.- Wolff M, Álvarez P, Flores I, Northland R, Wolff C. Evolución de mortalidad y estado actual de una población infectada por VIH controlada en un centro multiprofesional. *Rev Med Chile* 2006; 134: 581-8.
- 12.- Nagata N, Kobayakawa M, Shimbo T, Hoshimoto K, Yada T, Gotoda T, et al. Diagnostic value of antigenemia assay for cytomegalovirus gastrointestinal disease in immunocompromised patients. *World J Gastroenterol* 2011; 17 (9): 1185-91.
- 13.- Cariani E, Pollara C, Valloncini B, Perandin F, Bonfanti C, Manca N. Relationship between pp65 antigenemia levels and real-time quantitative DNA PCR for human cytomegalovirus (HCMV) management in immunocompromised patients. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 138-43.
- 14.- Shaade L, Kockelkorn P, Ritter K, Kleines M. Detection of cytomegalovirus DNA in human specimens by Light Cycler. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (11): 4006-9.
- 15.- Chakraborty A, Mahapatra T, Mahapatra S, Ansari S, Siddhanta S, Banerjee S, et al. Distribution and determinants of cytomegalovirus induced end organ disease/s among people living with HIV/AIDS in a poor resource setting: observation from India. *PLOS One* 2015; 10 (2): e0117466.
- 16.- Fica A, Cervera C, Pérez N, Marcos M A, Ramírez J, Linares L, et al. Immunohistochemically proven cytomegalovirus end-organ disease in solid organ transplant patients: clinical features and usefulness of conventional diagnostic tests. *Transpl Infect Dis* 2007; 9 (3): 203-10.
- 17.- Farfán M, Torres J, Vergara A, Donoso G, Alba A, Paris C, et al. Comparación de las



- técnicas de reacción de polimerasa en cadena en tiempo real y antigenemia para la detección de citomegalovirus en sangre de niños sometidos a trasplantes. *Rev Chilena Infectol* 2011; 28: 113-7.
- 18.- Ceballos M E, Vizcaya C, Pavez D, Cerda J, Martínez-Valdebenito C, Montecinos L, Ferrés M. Detección precoz de infección por citomegalovirus en pacientes sometidos a trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos por reacción de polimerasa en cadena cuantitativa en tiempo real. *Rev Chilena Infectol* 2014; 31 (2): 153-9.
- 19.- Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094-7.
- 20.- Cerda J, Villarroel L. Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: coeficiente de κ . *Rev Chil Pediatr* 2008; 79 (1): 54-8.
- 21.- Wattanamano P, Clayton J, Kopicko J, Kissinger P, Elliot S, Jarrott C, et al. Comparison of three assays for cytomegalovirus detection in AIDS patients at risk for retinitis. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (2): 727-32.
- 22.- Hamada Y, Nagata N, Shimbo T, Igari T, Nakashima R, Asayama N, et al. Assessment of antigenemia assay for the diagnosis of cytomegalovirus gastrointestinal diseases in HIV-infected patients. *AIDS Patient Care and STDs* 2013; 27 (7): 387-91.
- 23.- Hardie D, Korsman S, Hsiao N. Cytomegalovirus load in whole blood is more reliable for predicting and assessing CMV disease than pp65 antigenaemia. *J Virol Methods* 2013; 193: 166-8.
- 24.- El Amari E, Combescure C, Yerly S, Calmy A, Kaiser L, Hasse B, et al. Clinical relevance of cytomegalovirus viraemia. *HIV Med* 2011; 12: 394-402.
- 25.- Durier N, Ananworanich J, Apornpong T, Ubolyam S, Kerr S, Mahanontharit A, et al. Cytomegalovirus viremia in Thai HIV-infected patients on antiretroviral therapy: prevalence and associated mortality. *Clin Infect Dis* 2013; 57 (1): 147-55.
- 26.- Fielding K, Koba A, Grant A, Charalambous S, Day J, Spak C, et al. Cytomegalovirus viremia as a risk factor for mortality prior to antiretroviral therapy among HIV-infected gold miners in South Africa. *Plos One* 2011; 6: e25571.
- 27.- Bek B, Boeckh M, Lepenies J, Bienek B, Arasteh K, Heise W, et al. High- level sensitivity of quantitative pp65 cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay for diagnosis of CMV disease in AIDS patients and follow-up. *J Clin Microbiol* 1996, 34 (2): 457-9.
- 28.- Yoshida A, Hitomi S, Fukui T, Endo H, Morisawa Y, Kazuyama Y, et al. Diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus diseases in patients with human immunodeficiency virus infection by use of a real-time PCR assay. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1756-61.
- 29.- Gourlain K, Salmon D, Gault E, Lepout C, Katlama C, Matheron S, et al. Quantitation of cytomegalovirus (CMV) DNA by real-time PCR for occurrence of CMV disease in HIV- infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Med Virol* 2003; 69: 401-7.
- 30.- Mengelle C, Pasquier C, Rostaing L, Sandres-Saune K, Puel J, Berges L, et al. Quantitation of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplants by real-time quantitative PCR and pp65 antigenemia. *J Med Virol* 2003, 69: 225-31.
- 31.- Gerna G, Percivalle E, Baldanti F, Sozzani S, Lanzarini P, Genini E, et al. Human cytomegalovirus replicates abortively in polymorphonuclear leukocytes after transfer from infected endothelial cells via transient microfusion events. *J Virol* 2000; 74 (12): 5629-38.
- 32.- Bego M G, St Jeor S. Human cytomegalovirus infection of cells of hematopoietic origin: HCMV-induced immunosuppression, immune evasion, and latency. *Experimental Hematol* 2006; 34: 555-70.