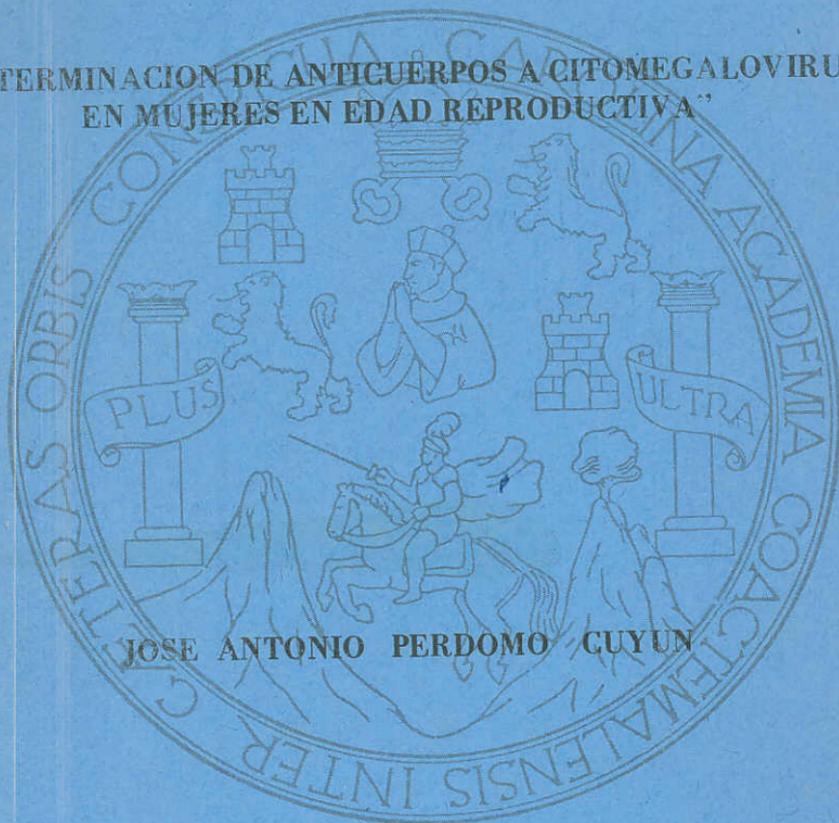


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

“DETERMINACION DE ANTICUERPOS A CITOMEGALOVIRUS
EN MUJERES EN EDAD REPRODUCTIVA”



JOSE ANTONIO PERDOMO CUYUN

GUATEMALA, AGOSTO DE 1,985

PLAN DE TESIS

	<i>Página</i>
	1
I. INTRODUCCION	
II. DEFINICION Y ANALISIS DEL PROBLEMA	3
III. REVISION BIBLIOGRAFICA	5
IV. MATERIAL Y METODOS	19
V. PRESENTACION DE RESULTADOS	23
VI. ANALISIS	25
VII. CONCLUSIONES	27
VIII. RECOMENDACIONES	29
IX. RESUMEN	31
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	33

INTRODUCCION

Es bien conocido el papel que desempeña el citomegalovirus (CMV) en la producción de enfermedad congénita y sus secuelas en forma de daño neurológico.

Por mucho, es el agente que causa mayor infección intrauterina con una prevalencia que va de 1 a 20/o de todos los nacimientos, aunque no todos los recién nacidos afectados se van a presentar de manera sintomática.

El hecho de que se presente en forma inaparente bien de manera agresiva va a depender básicamente de si la madre antes del embarazo halla estado en contacto con el virus o no.

La inmunidad resultante si estuvo en contacto con el CMV no es del todo efectiva como en el caso de la rubeola pero si protege contra la forma grave de la enfermedad y sus secuelas.

Es así que conociendo estos aspectos y continuando con la investigación serológica del CMV en Guatemala, se decidió realizar el presente estudio en el cual se comprobó la presencia o ausencia de anticuerpos entre una muestra de la población femenina en edad reproductiva del Instituto experimental Carlos Martínez Durán.

Esta investigación además de contribuir al conocimiento sero-epidemiológico del virus es una forma indirecta de investigar el riesgo al cual está sometida la futura descendencia de infectarse gravemente con el virus.

DEFINICION Y ANALISIS DEL PROBLEMA

Los citomegalovirus, debido a su amplia distribución en la población mundial y a sus efectos descritos de citopatogenicidad viene a constituir un agente de infección importante, la que la mayoría de los seres humanos van a adquirir en algún momento determinado.

Gran porcentaje de la población es infectada de manera asintomática siendo adultos en su mayoría, pero cuando afecta al feto sus efectos no son del todo benignos, reportándose daño neurológico permanente y aún la muerte. Su manera agresiva de comportamiento también se observa en pacientes inmunodeficiente.

La frecuencia de infección al feto y sus secuelas van a ser determinadas básicamente por el estado inmunitario de la madre.

Estudios serológicos han demostrado que en poblaciones inmunes la infección se va a presentar, pero en menor escala y el riesgo va a ser significativamente menor de sus secuelas o daño.

De esta manera al determinarse el estado inmunitario mediante un estudio serológico de mujeres en edad fértil se podrá conocer el riesgo al cual está sometida la futura descendencia.

Esto último es lo que se plantea en esta investigación en nuestra población guatemalteca, estudio que se realizó en mujeres en edad reproductiva del Instituto experimental Carlos Martínez Durán. Además reporta mayores datos para el conocimiento sero-epidemiológico de la infección por citomegalovirus en Guatemala.

REVISION BIBLIOGRAFICA

HISTORIA

A principios de siglo varios patólogos reportaron la presencia de células extrañas en el hígado, riñón y pulmones de infantes con sifilis congénita.

Estas células por su apariencia, se pensó que podrían representar amebas invasivas más que células alteradas del huésped. Por 1910 "ameba" entonces había sido clasificada y nombrada *Entamoeba M. tinatium*.

Fue hasta 1921 que Goodpasture y Talbot y Lipschutz, reconocieron que estas células eran vistas en algunas infecciones virales. Esos autores reconocieron correctamente las células como de origen endógeno. Goodpasture y Talbot estaban impresionados por lo masivo de células infectadas por lo que le llamaron citomegalia.

Subsecuentemente similares células con inclusiones fueron vistas en glándulas salivales de varias variedades de animales de laboratorio. Al haber sido reconocido en este tejido se les designó "virus de glándulas salivales". (27)

En 1932, Faber y Wolbach demostraron típicas inclusiones citoplásmicas en glándulas salivales de 120/o de niños a los cuales, al morir por cualquier causa se les había practicado la autopsia; esto sugiere una gran prevalencia de la infección. (31)

Fue reconocido que en algunos infantes infectados ocasiona una distribución extensa de células características por lo que estos infantes fueron llamados a tener enfermedad de inclusión citomegálica.

Para prevenir confusión con otros virus de glándulas salivales

reconocido su potencial de diseminación a muchos órganos el virus fue llamado citomegalovirus.

En 1956, casi simultáneamente tres laboratorios reportaron el aislamiento del virus de cultivo de células, lo cual se demostró al haberse comparado los agentes aislados que eran similares. (31)

Posteriormente fue reconocida la presencia de varios tipos antigénicos y más tarde fue comenzada a usar la técnica de fijación de complemento, para diagnóstico serológico de la enfermedad.

En los años siguientes se multiplicaron los estudios del CMV (citomegalovirus) y la enfermedad producida, reconociéndose su distribución mundial y sus efectos en el feto y pacientes con trastornos de la inmunidad.

En años recientes se han ideado vacunas y aún tratamiento antiviral que se encuentran en fase de experimentación con diversos resultados.

A pesar de lo anterior, el desconocimiento del CMV es casi completo por lo que es necesario continuar la investigación.

EL VIRUS

Los CMV pertenecen junto al virus de la varicela-zoster, al herpes-virus y al Epstein-Barr virus a la familia de los Herpes-virus, siendo indistinguibles de los 2 primeros cuando son examinados con microscopía electrónica.

Son virus de tamaño medio que contiene DNA con doble tira. La nucleocápside viral de cerca de 100 nm de diámetro posee simetría cúbica con 102 capsómeros y está rodeada por una cubierta que contiene lípidos. (19)

Los criterios empleados por los virologistas para hacer una identificación presuntiva del virus son el resultado de los atributos biológicos observados tanto in vitro como in vivo. Estos atributos incluyen inducción de citomegalia, formación de cuerpos de inclusión intranucleares y citoplásmicos, tendencia a citopatogenicidad focal debido a asociación celular de material infectado y un marcado grado de especificidad al huésped. A pesar de los criterios anteriores estas dan una base incierta para su clasificación taxonómica. (43)

PATOGENESIS

Al igual que otros herpes-virus, los CMV permanecen latentes en el huésped luego que ha ocurrido la infección primaria, reactivándose y excretándose periódicamente. Tal recurrencia no se asocia a elevación de anticuerpos y es asintomática excepto en pacientes inmunosuprimidos, particularmente en los que reciben alguna clase de trasplantes de órganos en los que puede ocurrir enfermedad grave. (29) Los CMV infectan tanto huéspedes inmunológicamente comprometidos como normales, encontrándose en orina, lágrimas, semen, leche materna y en el cérvix de sujetos infectados. (7,16,20,26). Es razonable suponer que la ruta de infección sea el contacto directo con estas secreciones o a través de fómites. (39)

Aunque se ha demostrado la presencia de CMV en semen y en cérvix lo cual es posiblemente secundario a la infección del tracto genital de manera asintomática nos indica que es posible la transmisión por contacto sexual. (22,26)

Se ha sugerido que la transmisión venérea sea importante tanto médica como epidemiológicamente; sin embargo varios hechos sugieren que no es así.

Es el que esté ampliamente aceptado otros modos alternativos de transmisión que juegan el papel fundamental en el manteni-

miento del CMV en la población humana. En segundo lugar la higiene no parece jugar un papel determinante como con otras enfermedades de transmisión sexual. Y en tercer lugar la infección activa y posiblemente la transmisión está influenciada por el estado hormonal independiente de la actividad sexual. (22).

Por otro lado es posible la transmisión por vía de transfusiones sanguíneas lo cual se ha demostrado en recién nacidos (45) y en adultos. El riesgo de infección va a ser directamente relacionado al número de donadores y la cantidad de sangre transfundida. (39)

Existen evidencias que muestran que una ruta de transmisión directa es a través de trasplantes de órganos. (17)

En la gran mayoría de casos la infección en adultos se va a presentar de manera asintomática y cuando esta se hace evidente regularmente la infección es autolimitante. (31,43). En casos, en pacientes con trastornos de la inmunidad como los que reciben trasplantes de órganos (riñón, médula ósea, etc.) y que están en tratamiento con citotóxicos o bien para otras entidades se va a presentar de manera agresiva con afección multisistémica.

Se ha postulado que esto va a ser consecuencia de la reactivación de virus en estado de latencia aunque el mecanismo exacto no se conoce. Obviamente la inmunidad celular deprimida va a jugar un papel importante en su génesis.

En lo que a la mujer embarazada respecta, es de importancia conocer la forma que la afecta por el peligro del feto a infectarse. No hay evidencia todavía de que el embarazo per sé incremente el riesgo de adquirir una infección con CMV, pero durante la gestación se producen profundas modificaciones en la relación virus-huésped que resulta en reactivación de CMV endógenos. (39)

Respecto a esto, se han realizado varias investigaciones para

tratar de conocer cual es la forma en que se infecta el feto, ya sea por infección primaria en el embarazo o bien por reactivación de virus latentes.

En poblaciones inmunes, o sea las que han presentado infección anterior, se ha encontrado una frecuencia de infección congénita de 1.80/o; es claro que estos casos no han sido resultado de infección primaria por lo que la transmisión intrauterina ha sido atribuida a reactivación de virus endógenos aunque no puede ser excluida la posibilidad de reinfección por virus exógenos. Aunque la inmunidad materna no puede eliminar completamente la transmisión del CMV al feto, todavía va a ejercer un efecto benéfico al reducir la virulencia de la infección al neonato. (28,39)

En poblaciones seronegativas la frecuencia de seroconversión durante el embarazo es de 0.7 a 4.10/o o sea que estas pacientes se infectan durante el embarazo. (14,42)

Es obvio entonces que la ruta de infección va a depender del estado inmunitario de la madre, aunque la mayoría va a ser por reactivación de virus endógenos. (14,42).

Los factores que controlan o influyen la reactivación de virus latentes no son conocidos aunque se ha supuesto que juegan algún papel la raza, la edad de adquisición del CMV, tiempo de embarazo y talvez factores genéticos del huésped que controlen la respuesta inmune. (39)

PATOLOGIA:

La infección por CMV es reconocida por la presencia de células de 25 a 40 micras de diámetro con núcleo agrandado, pleomórfico que albergan inclusiones acidófilas intracelulares.

La inclusión puede tener diámetro que excede de 15 micras las cuales están rodeadas por un halo claro característico que las separa de la membrana nuclear.

Estudios con microscopio electrónico han comprobado que la inclusión consiste en una masa reticular de material cromatínico finamente granular y bastante compacto en la cual están esparcidas partículas de virus. Además de las características inclusiones intranucleares se pueden observar múltiples inclusiones citoplásmicas, basofílicas. En algunas, las inclusiones citoplásmicas no pueden ser demostrables.

Las formas congénitas e infantil tienden a ser graves y difusas. Los órganos más a menudo atacados en orden de frecuencia son: glándulas salivales, riñones, hígado, pulmones, páncreas, tiroides, suprarrenales y cerebro.

En el hígado, lo característico y que contribuye a la hepatomegalia es la persistencia de tejido hematopoyético. Usualmente hay destrucción diseminada de parénquima y la arquitectura hepática se distorsiona. Raramente en enfermedad generalizada el hígado es normal. Los cuerpos de inclusión usualmente se encuentran esparcidos en el hígado y se confinan a células epiteliales de los ductos biliares lobulares.

Los riñones, son densamente infiltrados por mononucleares particularmente en la corteza. La fuerte tendencia de células epiteliales a descamar hacia el lumen tubular hace el examen citológico del sedimento urinario un procedimiento diagnóstico bastante usado.

Histológicamente la afección pulmonar es común y consiste en una neumonía focal intersticial con una reacción inflamatoria mononuclear en septum alveolar e intra-alveolar.

En el cerebro, las lesiones son comunes; uno de los cambios morfológicos y radiográficos de la infección intrauterina son la des-

trucción de tejido cerebral y calcificaciones distróficas particularmente en el epéndimo de los ventrículos cerebrales laterales. El paso del cerebro es usualmente significativo menor que el normal, y el desarrollo de convulsiones cerebrales es retardado relativo a la edad gestacional del infante. En algunos mortinatos, estas lesiones se acompañan de gliosis y microcefalia intensas.

El bazo, siempre agrandado usualmente muestra solo hematopoyesis extramedular. En raras ocasiones, son demostrables inclusiones. (21,36)

En el adulto debilitado, la enfermedad puede ser generalizada aunque por lo regular se limita a neumonitis intersticial, quizás con células citomegálicas ampliamente esparcidas en otras visceras. (36)

EPIDEMIOLOGIA:

La infección por citomegalovirus prácticamente se encuentra en todo el mundo siendo pocos los individuos que durante su vida escapan a ella (39) siendo el estado socio-económico, el nivel educacional y la raza factores de importancia para su diseminación como lo demuestra trabajos realizados. (4) los factores climáticos no van a jugar un papel importante. (23)

Se han realizado múltiples estudios sero-epidemiológicos que muestran grandes variaciones de anticuerpos a citomegalovirus en diferentes poblaciones. Se efectuó un estudio entre donadores de sangre que mostró niveles de 40o/o en una población francesa (Lyon), 81o/o en Buenos Aires y 100o/o en Manila. (23) Un estudio similar se hizo en donadores guatemaltecos que mostró que el 42o/o representaban anticuerpos a CMV. (34)

La edad de adquisición de la enfermedad es muy variable dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

Se considera que los CMV causan infección intraterina en 0.7o/o a 1.8o/o de todos los niños (13,20) con un promedio de 1o/o. (39)

Un estudio finlandés mostró que la infección perinatal se presenta en 32-38o/o de niños; (13) en una población guatemalteca (Sta. María Cauqué) se encontró un 25o/o de niños con excreción del virus durante el primer año de vida. (7)

Se podría generalizar que al primer año de vida 10-40o/o de niños se encuentran infectados, que durante la pubertad es de 40-80o/o y que en la sexta década es del 100o/o. (22)

Estudios guatemaltecos recientes han reportado resultados similares que los hallados en otras latitudes. Se determinó anticuerpos en recién nacidos encontrándose 1.66o/o de seropositividad. (5) Otro estudio con niños de 6-36 meses de edad mostró que el 17o/o se encontraban con seropositividad a CMV. (12)

MANIFESTACIONES CLINICAS

Las manifestaciones de la infección producida por CMV van a depender ampliamente del estado inmunitario del huésped, de la edad del paciente, del período en que se adquirió y posiblemente de las características virulentas del virus, la mayoría de infecciones adquiridas van a ser asintomáticas.

INFECCION CONGENITA

La infección durante el embarazo es la causa de la enfermedad congénita; esta bien puede deberse a infección primaria o bien a reactivación de un virus latente. En la mayoría de casos esto último es lo que ocurre.

En estratos económicos superiores la probabilidad de infección

primaria va a ser más alto durante el embarazo por la falta de contacto con el virus y de formación de anticuerpos. Durante algún tiempo se discutió si estos anticuerpos formados disminuían la posibilidad de infección al feto. Varios estudios han demostrado que no protegen contra los CMV, pero si juegan un papel de protección contra los efectos devastadores del virus. (28,38,39)

Lo anterior ha sido probado al observar que niños con las formas graves de la enfermedad y sus secuelas van a ser producto de madres con infección primaria durante el embarazo.

Madres con reactivación de virus latentes van a tener probabilidades mayores de tener niños con infección congénita pero no de presentar formas graves de la enfermedad.

El período de embarazo en el cual el feto es más susceptible o está en riesgo, no se ha definido claramente. (31) No hay datos estadísticos significativos de transmisión en algún trimestre siendo los actuales variados. Estudios con animales de experimentación han mostrado que es en el tercer trimestre cuando hay mayores riesgos de infección congénita, pero esto no está plenamente demostrado en el hombre. Lo que si se ha demostrado es aumento de pérdidas fetales con la infección temprana. (22,25)

Se ha calculado que en mujeres embarazadas se produce una seroconversión que va de 0.7o/o a 4o/o; de estas pacientes el 42o/o de los fetos serán infectados. El riesgo al adquirir la infección primaria a tener un niño con infección severa que dejará secuelas puede ser considerado bajo, probablemente en el orden de 2, a 4o/o. (39)

Infantes con la enfermedad se presentarán con un cuadro similar a la rubeola congénita. Bajo peso al nacer, hepatoesplenomegalia, ictericia, petequias, trombocitopenia, coriorretinitis y calcificaciones intracraneanas son prominentes. (18,31,39,40,43) Es bastante común la muerte por enfermedad diseminada. En los que sobreviven, son encon-

trados microcefalia y varias anomalías como sordera sensoroneural, coriorretinitis, atrofia óptica, retardo mental y defectos dentales. (44) De los que al nacer no manifiestan signos de enfermedad es necesario un seguimiento pediátrico ya que problemas visuales, auditivos y retraso psicomotor se harán evidentes más adelante. (4,15,37)

INFECCION PERINATAL

La infección perinatal es muy común y así como la forma congénita la excreción de virus en orina y saliva es prolongada por meses o años. (31)

La importancia de la madre como origen de la infección es obvia según Granstrom y colaboradores ya que en su estudio ninguno de los niños de madres seronegativas adquirió la infección durante el primer año de vida. La transmisión de virus es posible que se halle dada por el canal del parto ya que se ha encontrado CMV en cérvix de mujeres embarazadas. Además en niños nacidos de cesareas la infección no es prevenida por membranas fetales por lo que existen otros medios. Otras posibles rutas de infección son por ex-sanguinotransfusión y transfusiones sanguíneas (45) y por leche materna infectada. (16) Se considera que el consumo de leche infectada es el origen de infección más importante en este grupo de edad. (9,24)

Aunque la mayoría de infantes experimentan infección subclínica, la forma sintomática es más frecuente que en adultos. El tiempo de incubación va de 4 a 12 semanas con promedio de 8 semanas. (28) Aproximadamente 5-10o/o de infantes infectados por esta ruta van a desarrollar neumonitis intersticial (39) que aunque es importante considerando la morbilidad y gastos que ocasiona no tiene casi mortalidad o secuelas.

Además se ha reportado linfadenopatía, hepatoesplenomegalia y rash. No hay evidencia de daño neurológico en estos pacientes indi-

cando que se desarrollan normalmente. (31)

INFECCIONES EN NIÑOS Y ADULTOS

La mayoría de infecciones en este grupo de edad van a presentarse de manera asintomática. La enfermedad mejor definida en adultos jóvenes es un tipo de mononucleosis heterófila negativa la cual fue descrita inicialmente en 1965.

Se caracteriza por fiebre, leucocitosis con linfocitosis absoluta y linfocitos atípicos. Test específicos y no específicos para virus Epstein-Barr son negativos. Se acompaña de malestar, mialgias; la faringitis exudativa y amigdalitis son mínimas o ausentes y la afección hepática y linfadenopatía son menos prominentes que la vista en mononucleosis infecciosa por EBV. Se puede presentar rash similar a la rubeola.

Otras manifestaciones incluyen neumonía intersticial, esplenomegalia, miocarditis, polineuritis, anemia hemolítica y púrpura trombocitopénica. Raramente se ha observado encefalitis, hepatitis granulomatosa y artritis. (43)

El diagnóstico diferencial incluye toxoplasmosis adquirida, hepatitis viral, infección con otros virus o micoplasma, anemia hemolítica auto-inmune o trombocitopenia y malignidades hematológicas. Se ha observado en algunas ocasiones enfermedad colónica ulcerativa y coriorretinitis. (29)

En pacientes con compromiso del sistema inmune como leucemias, linfomas, tumores sólidos, hipogamaglobulinemias, anemia crónica, insuficiencia renal, pacientes con tratamiento con citotóxicos para malignidades o para trasplante renal van a presentar una infección severa. (29)

Las principales manifestaciones clínicas van a consistir en fiebre,

malestar, náuseas, artralgias, artritis, retinitis, neumonía, hepatitis, leucopenia, linfocitosis, etc. La infección diseminada prácticamente involucra todos los órganos incluyendo el sistema nervioso central. El pronóstico es malo. (29,31)

DIAGNOSTICO

El diagnóstico no puede ser realizado clínicamente teniendo que demostrar el virus o bien evidenciando una respuesta inmune al CMV.

Se ha considerado que el cultivo de virus es el método más sensible; los cultivos no se deben de considerar negativos hasta 4 y 6 semanas de observarlos. Comúnmente el virus es hallado en orina, secreciones cervicales y seminales, garganta y difícilmente en sangre. El examen con microscopio de luz es usado para observar sus efectos citopáticos.

Se han examinado especímenes de orina de niños infectados, con microscopía electrónica pero el cultivo de virus es más sensible. (29) Por un nuevo método reportado de hibridación de DNA es posible detectar CMV humano en orina; aún no se ha aceptado para su uso general. (8)

La infección también puede demostrarse al observarse elevación de los niveles de anticuerpos. Hay varios métodos a disposición actualmente entre los cuales tenemos: técnica de valoración inmuno-absorbente con enzima ligada (ELISA), técnica de radio-inmuno-ensayo, fijación de complemento, inmunofluorescencia anticomplementémica y hemaglutinación pasiva. (3)

La técnica más usada es la de fijación de complemento a pesar de la relativa insensibilidad para detección de bajos niveles de anticuerpos, (31) pero investigaciones han demostrado que la técnica de ELISA

y radio-inmunoensayo van a ser de 10 a 100 veces más sensibles que las otras. (3,6)

Los 2 métodos anteriormente mencionados van a ser comparables en sensibilidad y especificidad. (3)

TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

El tratamiento de la infección activa, al igual que en otras de tipo viral aún se encuentra en fase de experimentación siendo relativamente remoto su uso general.

La atención actual está más bien dirigida a la prevención de la misma tanto de la infección congénita como de la afección sistémica en pacientes suprimidos inmunológicamente.

La inmunización pasiva a través de transfusión de inmunoglobulinas ha dado algunos resultados positivos en pacientes transplantados con médula ósea; aún actualmente el impacto clínico de las inmunoglobulinas permanece incierto. (1,32)

Otro prospecto para la prevención de la infección es el interferón. Se ha logrado, al haberse administrado retardo en la excreción del virus y disminución de la incidencia de la viremia luego de trasplante renal. (11,43) El interferón puede causar fiebre y leucopenia que son 2 hallazgos cardinales de enfermedad por CMV en el paciente con trasplante renal. Estos efectos secundarios pueden causar confusión para diferenciarlo de la infección. Aún quedan pruebas para garantizar su uso. (1)

La vacunación a CMV es una forma de profilaxia atractiva siendo apropiada para inmunizar a mujeres en edad reproductiva y de esta manera evitar sus secuelas entre ellas el retardo mental. (10) En 1981 se sugería la vacunación para grupos con grave riesgo de adquisición del

virus no así la población en general por lo costoso y por la baja frecuencia de infección. (33) Se ha desarrollado una vacuna de virus vivo atenuados de la cepa de Towne. Algunos de los problemas encontrados con las vacunas propuestas es que no tienen reacción cruzada contra otras cepas. Aparentemente la cepa de Towne no tiene estos inconvenientes brindando algún grado de protección contra la infección natural. (41) El problema es el de que el virus podría reactivarse en el futuro y causar una infección sistémica o transformar células en cáncer. (1) El potencial oncogénico del CMV es real asociándose a adenocarcinomas colónicos y ciertos tumores malignos de hombres homosexuales.

En lo que respecta a drogas antivirales que inhiben su replicación como el arabinósido de citosina y el arabinósido de adenina y otros fármacos aún no se ha aprobado su uso por sus efectos limitados.

Como se ve por lo anterior no hay medidas eficaces contra el virus por lo que se continúa con la experimentación.

MATERIAL Y METODOS

La presente investigación, de carácter prospectivo se realizó en el Instituto experimental Carlos Martínez Durán con una muestra que constó de 50 mujeres comprendidas entre las edades de 14 a 18 años.

Las características socioeconómicas son similares sin tener antecedentes de alguna afección previa ni de transfusiones anteriores. Además en el momento del estudio se encontraban sin patología alguna con el fin de que los resultados obtenidos no sufrieran alguna alteración.

A cada paciente bajo condiciones estériles se le extrajo 5 cc de sangre de la cual se le separó el suero; ya obtenido este se guardó a 20 C° hasta el momento del análisis.

Para el procedimiento además del equipo para la técnica de ELISA se utilizó jeringas, agujas, pipetas, tubos de ensayo y reactivos.

A continuación los detalles de la técnica de ELISA (valoración inmunabsorbente con enzima ligada)

COMPOSICION:

Placa para ELISA con 12 X 8 pozos.

El antígeno y el control negativo de antígenos se obtiene de células humanas infectadas y no infectadas con CMV respectivamente. Los antígenos son inactivados y ligados a la placa.

Después de reconstruir con 0.5 ml de agua destilada estéril, el suero liofilizado da lugar a una dilución 1:5 que puede guardarse por al menos una semana a 4-6 C°. El título está indicado en la etiqueta.

Suero anti-IgG (cadena alfa) conjugado en fosfatasa alcalina. Este suero es producido a partir de anticuerpos con alta avidez de conejo. La dilución apropiada de cada uno se indica en la etiqueta.

El sustrato para fosfatasa alcalina consiste en 2 y 50 ml de buffer de sustrato y 20 tabletas de sustrato que se utilizan para preparar la solución de sustrato.

Medio suplementario para ELISA: 1 ml para preparar 100 ml de buffer para diluciones (PBS), pH 7.0-7.2 más 4 ml de Tween 20 (4o/o), el cual se usa para diluir los sueros y los anticuerpos conjugados. Otros reactivos que se necesitan son: PES 1o/o de Tween 20 pH 7.0-7.2 para lavar y 2 N NaOH.

Almacenamiento y estabilidad; Todos los reactivos deben de guardarse a 4-6°C y podrán utilizarse antes de la fecha de expiración que se indica en la etiqueta.

Uso para la determinación cualitativa y cuantitativa de anticuerpos (IgG), en sueros humanos.

METODO

Principio: Los anticuerpos que se determinan en las muestras de suero se unen al antígeno en la superficie de la placa formando así un complejo con el cual va a reaccionar el conjugado.

Luego de agregar la solución de sustrato, un color amarillo verdoso se forma al degradarse enzímicamente.

Los reactivos que no se unen se eliminan en el proceso de lavado.

1. Sacar la placa de su bolsa de aluminio y dejarla estar a tempera-

tura ambiente (20-25°C) por 5 minutos.

2. Agregar al menos 0.2 ml de la solución al lavado (PES + Tween) a cada pozo por 3 minutos y luego succionar. Repetir este paso 3 veces.
3. Agregar 0.15 ml de buffer de dilución a cada pozo.
4. Agregar 0.15 ml de suero pre-diluido 1:5 al primero de los pozos de las filas a usarse de antígeno positivo y antígeno negativo.
5. Transferir 0.05 ml de la dilución de suero a cada uno de los pozos siguientes y descartar 0.05 ml del último pozo. No se deben utilizar diluidores, sino pipetas.
6. Incubar en cámara húmeda a 37°C por 1-3 horas para anticuerpos IgG.
7. Sacar las diluciones de sueros y lavar 3 y 5 minutos con PBS-Tween.
8. Agregar 0.05 ml del conjugado en su dilución apropiada e incubar una hora a 37°C en cámara húmeda.
9. Quitar el conjugado y lavar 3 veces por 5 minutos.
10. Agregar 0.1 ml de la solución de sustrato a cada pozo e incubar por 30-45 minutos a 20-25°C.
11. Detener la reacción enzimática agregando 0.025 ml de 2 N NaOH a cada pozo.

EVALUACION

Esta se lleva a cabo visualmente. Para mayor precisión los valores se pueden leer fotométricamente.

A. Visual: El título será la dilución de suero más alta que tenga una reacción positiva comparable con el suero control que se indica como título de éste. Si la reacción es la misma en los pozos recubiertos con antígeno positivo y control de antígeno negativo, esto indica que no se puede demostrar la presencia de anticuerpos específicos.

B. Fotométrica: medir contra 0.1 ml de la solución de sustrato más 0.025 ml de 2 N NaOH como referencia a 405 nm.

Para la absorbencia (E) así encontrada evaluar así:

Para anticuerpos IgG: E antígeno menos E control 0.5=positivo.

Para anticuerpos IgM: E antígenos menos E control 1.0= Positivo.

E antígeno menos E control 0.5 pero 1.0 = dudoso. (2).

PRESENTACION Y ANALISIS DE RESULTADOS

CUADRO No. 1

PRESENCIA DE ANTICUERPOS A CMV EN MUJERES EN EDAD REPRODUCTIVA DEL INSTITUTO CARLOS MARTINEZ D.

	No. DE CASOS	PORCENTAJE
PRESENCIA DE ANTICUERPOS	34	68o/o
AUSENCIA DE ANTICUERPOS	16	32o/o
TOTAL	50	100o/o

Fuente: Lab. Multidisciplinario, Fac. de Medicina.

CUADRO No. 2

PRESENCIA DE ANTICUERPOS A CMV SEGUN EDAD EN LAS MUJERES EN EDAD REPRODUCTIVA DEL INSTITUTO CARLOS MARTINEZ DURAN

Edad en años	No. de casos	Casos con anticuerpos	o/o
14	8	5	62o/o
15	11	7	63o/o
16	13	9	69o/o
17	10	8	80o/o
18	8	5	62o/o

Fuente: Lab. Multidisciplinario, Fac. de Medicina.

ANALISIS

Si observamos los cuadros anteriores podemos determinar que el 68o/o de las pacientes estudiadas se presentan con anticuerpos séricos a citomegalovirus.

Esto nos indica que existe un 32o/o de las mismas que son susceptibles de adquirir la infección en forma primaria si en este momento se presentaran con un embarazo.

Estos datos son similares a los hallados en estudios sero-epidemiológicos realizados en el extranjero con población adolescente y en edad reproductiva. (10,22)

Estas mismas investigaciones al encontrar tan altos porcentajes de población seronegativa han sugerido la elaboración de una vacuna y evitar de esta manera que se presente la infección por primera vez durante el embarazo.

Si los estudios para desarrollarla tienen éxito y se logra obtener una vacuna segura y eficaz, ese 32o/o de nuestra población de estudio sería la ideal para recibirla.

Estos esfuerzos para su producción se apoyan en el hecho plenamente demostrado de que si una paciente sero-negativa se llega a infectar con el virus por primera vez durante el embarazo, las probabilidades de infectar al feto es del 42o/o y de 2 a 4o/o de dar a luz un infante severamente enfermo. (38)

Por otro lado, a pesar que la inmunidad que presentan las mujeres que han entrado previamente en contacto con el virus, no va a evitar la infección congénita, si va a proteger al feto de daño grave y de sus secuelas neurológicas. (38,39)

Desafortunadamente, como en la mayoría de información científica los anteriores datos son provenientes de literatura extranjera no conociéndose en Guatemala el verdadero impacto del CMV en la producción de infección y anomalías congénitas.

En el cuadro No. 2 donde la población del estudio se dividió según edad, se observa que no existe mayor variación entre los distintos grupos siendo similares los resultados; esto seguramente por la estrecha diferencia entre ellos.

Si además de los datos obtenidos, los de los estudios recientes los comparamos con los obtenidos en otras comunidades podemos concluir que el comportamiento del virus es similar. (5,12,34)

CONCLUSIONES

1. De las mujeres en edad reproductiva estudiadas, en el 68o/o de las mismas se comprobó la presencia de anticuerpos tipo IgG contra el citomegalovirus por el método de valoración inmuno-absorbente con enzima ligada (ELISA).
2. Los hallazgos encontrados van a ser similares a los reportados para este grupo de edad en estudios de comunidades subdesarrolladas.
3. La población femenina de este estudio susceptible a sufrir infección de tipo primario durante el embarazo, es del 32o/o la cual corre el riesgo de dar a luz recién nacidos con la forma grave de la enfermedad.

RECOMENDACIONES

1. Continuar con el estudio sero-epidemiológico del citomegalovirus en Guatemala debido a la escasa información que se tiene de él.
2. Determinar el impacto que tiene el citomegalovirus en la producción de anomalías congénitas y de retardo mental en la población guatemalteca.

RESUMEN

El presente estudio consistió en la determinación de anticuerpos tipo IgG contra citomegalovirus en una muestra de 50 mujeres en edad reproductiva del Instituto experimental Carlos Martínez Durán.

La importancia del estudio serológico se debe al conocimiento que se tiene del virus de causar infección congénita y de graves secuelas como retardo mental, sordera, coriorretinitis, etc. en neonatos de mujeres que adquieren la infección primaria durante el embarazo.

Los resultados obtenidos fueron similares a los hallados para otras comunidades ya que se encontró que el 68o/o presenta anticuerpos contra el virus; es decir que el 32o/o de estas mujeres son susceptibles de adquirir la infección y si se presentan embarazadas con probabilidades de dar a luz un neonato con enfermedad congénita grave.

El método utilizado para la determinación de anticuerpos fue el de inmunoabsorbente con enzima ligada (ELISA) debido a su sensibilidad y especificidad.

Además de dar a conocer los anteriores aspectos, el estudio es un aporte al conocimiento del citomegalovirus en Guatemala siendo necesario la continuación de la investigación del mismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Balfour H.H. Cytomegalovirus disease: can it be prevented? *Ann Intern Med* 1983 Apr; 98(4):544-5
2. Behring Institute. Enzygnost anti-cytomegalovirus; reagents for antibody detection in the ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Marburg (West Germany), 1984 (prospecto)
3. Booth J.C. et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, radioimmunoassay, complement fixation, anticomplement immunofluorescence and passive haemagglutination techniques for detecting cytomegalovirus IgG antibodies. *J Clin Pathol* 1982 Dec; 35(12):1345-8
4. Cabau N. et al. Seroepidemiology of cytomegalovirus infection during the first year of life in urban communities. *Arch Dis Child* 1979 Apr; 54(4):286-90
5. Cabrera V. Héctor G. Detección de anticuerpos a toxoplasma y citomegalovirus en sangre de cordón umbilical. Tesis (Médico y Cirujano)-Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala, 1984. 67p.
6. Cappel R. et al. Rapid detection of IgG and IgM antibodies for cytomegalovirus by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Arch Virol* 1978; 58(3):253-8
7. Cruz J.R. et al. Citomegaloviruria durante el primer año de vida. Estudio prospectivo en una población indígena de Guatemala. *Bol Of Sanit Panam* 1977 Sep; 83(3):218-22
8. Cheu S. et al. Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization. *N Engl J*

9. Dworsky M. et al. Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics* 1983 Sep; 72(3):295-9
10. Elek S.D. et al. Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet* 1974 Jan 1; 1(7845):1-5
11. Emodi G. et al. Effect of human exogenous leukocyte interferon in cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 1976; 133(Suppl):A199-204
12. Girón P. Luis A. Titulación de anticuerpos contra citomegalovirus. Tesis (Médico y Cirujano)-Universidad de San Carlos. Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala, 1984. 39p
13. Granstrom M.L. et al. Perinatal cytomegalovirus infection in man. *Arch Dis Child* May 77; 52(5):354-9
14. Grant S.E. et al. A prospective study of cytomegalovirus infection in pregnancy: laboratory evidence of congenital infection following maternal primary and reactivated infection. *J Infect Dis* 1981 Mar; 3(1):24-31
15. Griffiths P.D. et al. A prospective study of primary cytomegalovirus infection during pregnancy: final report. *Br J Obstet Gynecol* 1984 Apr; 91(4):307-15
16. Hays, K. et al. Cytomegalovirus of human milk. *N Engl J Med* 1972 Jul 27; 287(4):177-8
17. Ho M. et al. The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 1975 Nov 27; 293(22):1109-11

18. Horstmann D.M. Viral infections. In: Burrow G.N. *Medical complications during pregnancy*. 2nd. ed. Philadelphia, Saunders, 1975. 570p. (pp. 333-348)
19. Jawetz E. et al. Familia de los herpes-virus. En su: *Manual de microbiología médica*. 8a ed. México, Manual Moderno, 1979. 650p (pp 517-529)
20. Jordan M.C. et al. Association of cervical cytomegalovirus with venereal disease. *N Engl J Med* 1973 May 8; 288(18):923
21. Kissane J.M. Viral and rickettsial infections. In your: *Pathology of infancy and childhood*. 2nd ed. St. Louis, Mosby, 1975. 1207p (pp 68-105)
22. Knox E.G. Los citomegalovirus: importancia de la transmisión sexual. *Clínicas Obstétricas y Ginecológicas* 1983 Mar; 26(1):203-8
23. Krech U. Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *WHO Bull* 1973; 49(1):103-6
24. Kuman M.L. et al. Congenital and postnatally acquired cytomegalovirus infection long-term follow-up. *J Pediatr* 1984 May; 104(5):674-9
25. Kuman M.L. et al. Experimental primary cytomegalovirus infection in pregnancy: timing and fetal outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1983 Jan 1; 145(1):56-60
26. Lang D.J. et al. Demonstration of cytomegalovirus in semen. *N Engl J Med* 1972 Oct 12; 287(15):756-8

27. Lang D.J. Herpes-virus. In: Wok J. et al. *Zinssen microbiology*. 15 ed. New York, Appleton-Century-Crofts, 1972. 650p (pp.517-29)
28. Medearis D.N. CMV inmunity: imperfect but protective. *N Engl J Med* 1982 Apr 22; 306(16):985-6
29. Meyer J.D. Cytomegalovirus infection (cytomegalic inclusion disease). In: Petersdorf R.G. et al. *Harrison's principles of internal medicine*. 10a ed. New York, Mc Grawhill, 1983 2212p. (pp.1167-70)
30. Nankervis G.A. et al. A prospective study of maternal cytomegalovirus infection and its effect on the fetus. *Am J Obstet Gynecol* 1984 Jun 15; 149(4):435-40
31. Nankervis G.A. et al. Diseases produced by cytomegalovirus. *Med Clin N Am* 1978 May; 68(5):1021-35
32. Nicholls A.J. et al. Hyperimmune immunoglobulin for cytomegalovirus infection (letter). *Lancet* 1983 Mar 5; 1(8523):532-3
33. Osborn J.E. Cytomegalovirus: pathogenicity, immunology and vaccine initiatives. *J Infect Dis* 1981 Apr; 143(4):618-30
34. Peralta M. Julio C. Investigación de anticuerpos a citomegalovirus en donadores de sangre para transfusión. Estudio prospectivo de respuesta inmunológica a citomegalovirus en 100 donadores de sangre, en el hospital general San Juan de Dios durante los meses de julio y agosto de 1984. Tesis (Médico y Cirujano)-Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala, 1984. 52p
35. Reynolds D.W. et al. Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N Engl J Med* 1973 Jul 5; 289(1):1-4
36. Robbins S.L. Enfermedades de la lactancia y la niñez. En su: *Patología estructural y funcional*. México, Interamericana, 1975. 1516p. (pp530-55)
37. Saigal S. et al. The outcome in children with congenital cytomegalovirus infection. A longitudinal follow-up study. *Am J Dis Child* 1982 Oct; 136(10):896-901
38. Stagno S. et al. Congenital cytomegalovirus infection, the relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N Engl J Med* 1982 Apr 22; 306(16):945-9
39. Stagno S. et al. Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. *Clin Obstet Gynecol* 1982 Sep; 25(3):563-76
40. Starr J. et al. Congenital cytomegalovirus infection associated with low birth with. *J Pediatr* 1968 May; 74(5):815-6
41. Starr S. et al. Specific celular and humoral inmunity after immunization with live Towne strain cytomegalovirus vaccine. *J Infect Dis* 1981 Apr; 143(4):585-9
42. Stern H. et al. Prospective study of cytomegalovirus infection in pregnancy. *Br Med J* 1973 Feb; 2(5861):268-70
43. Weller T.H. The cytomegalovirus: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. *N Engl J Med* 1971 Jul 22; 285(4):203-14

44. Williamson W.D. et al. Symptomatic congenital cytomegalovirus, disorders of language, learning and hearing. Am J Dis Child 1982 Oct; 136(10):902-5

45. Yeager A.S. Transfusion-acquired cytomegalovirus infection in newborn infants. Am J Dis Child 1974 Oct; 128(4): 478-86

Reporto
Epiloguado

Universidad de San Carlos de Guatemala
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
UNIDAD DE DOCUMENTACION

CENTRO DE INVESTIGACIONES DE LAS CIENCIAS
DE LA SALUD
(C I C S)

INFORME:

[Signature]
Dr. ASESOR. Col. 1781

SATISFECHO:

[Signature]
Dr.

REVISOR.

Dr. Julio R. Cabrera
MEDICO Y CIRUJANO
Colegiado 1527



PROBADO:

[Signature]
DIRECTOR DEL CICS



[Signature]
Dr. Mario René Moreno Cambará
DECANO
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS.
U S A C .

Guatemala, 13 de Agosto de 1985.

Los conceptos expresados en este trabajo son responsabilidad únicamente del Autor. (Reglamento de Tesis, Artículo 44).