

Estándarización de un método de ELISA para citomegalovirus humano

Martín R. Correa, Ana E. Arango, Jorge E. Ossa.

En este informe se presenta la caracterización de un método de ELISA para la detección de IgG específica mediante un antígeno obtenido a partir de un sonicado de cultivos celulares infectados con CMV. La prueba se estandarizó con base en un ELISA comercial, encontrándose un coeficiente de correlación de 93 y 95 %. Se practicaron 290 determinaciones con los sueros de 188 personas.

El punto de corte para establecer la seroreactividad se determinó como la media aritmética (x) de los delta de densidad óptica de los seronegativos (considerados así por los sueros de referencia y los controles) más tres desviaciones estándar (S), correspondiendo a 0.3 con lo cual se obtiene un 99% de confiabilidad.

El impacto de esta técnica se basa en la posibilidad de ampliar el diagnóstico y la investigación de la infección y la enfermedad por CMV a menor costo, a la vez que se adaptan tecnologías para hacer más factible el desarrollo sistemático y continuado de la investigación.

INTRODUCCION

El citomegalovirus humano (CMVH), miembro de la subfamilia de los Betaherpesvirinae, se encuentra ampliamente distribuido en la población y es responsable de graves infecciones, especialmente cuando se presenta en forma congénita o en pacientes inmunosuprimidos (1-3).

En los últimos años el CMVH se ha hecho más importante debido a varias circunstancias: prime-

ro, el control de muchas otras enfermedades infecciosas congénitas y del recién nacido y muy particularmente el advenimiento de la vacuna contra la rubéola; en segundo lugar, el apogeo de las guarderías por la presión laboral de las madres; tercero la generalización, cada día mayor de la práctica de los trasplantes y; finalmente, la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). En términos más específicos, el CMVH es el responsable de por lo menos 3.000 a 4.000 casos nuevos de enfermedad congénita en EE. UU. y en las guarderías de ese país se informan índices de prevalencia de hasta el 57%. En los trasplantados el CMVH es el principal agente viral causante de morbimortalidad ("gnomo de los trasplantes") y en los pacientes con SIDA la neumonía intersticial por CMV es una de las principales causas de muerte, además de estar asociado con la etiología del sarcoma de Kaposi que es la neoplasia más común en este tipo de pacientes (1-11).

A pesar de la amplia distribución y creciente importancia del CMVH como problema médico, se sabe poco de la epidemiología de la infección y menos aún de los mecanismos de reactivación de la infección latente (1,2).

Para el diagnóstico de la infección y enfermedad por CMVH se dispone de métodos virológicos, citológicos, serológicos y de biología molecular, ninguno de ellos perfecto. El aislamiento del virus es el método de referencia pero es muy demorado (hasta cuatro semanas de cultivo) y no es específico por cuanto un aislamiento positivo no indica que sea el agente etiológico del cuadro clínico en cuestión, por lo que no tiene mucha importancia como criterio para orientar la terapia; la citología, en la que se pueden detectar cuerpos de inclusión, no es un método sensible ni específi-

Drs. Martín R. Correa C., Ana E. Arango, Jorge E. Ossa: Sección de Virología, Facultad de Medicina Universidad de Antioquia.

Solicitud de separatas al Dr. Correa.

co; la serología puede ser sensible (según el método utilizado), rápida y específica, pero generalmente un hallazgo positivo no es diagnóstico de un síndrome clínico actual, sino simplemente de un contacto previo con el virus. Recientemente se han ensayado, aparentemente con éxito, técnicas que combinan métodos serológicos y virológicos, la detección de antígeno temprano en células infectadas mediante anticuerpos fluorescentes y la detección de antígeno viral temprano sobre leucocitos de sangre periférica, con mejores resultados. Finalmente, la hibridación molecular no ha demostrado ser muy sensible para el diagnóstico del CMVH y en la actualidad las esperanzas están puestas en la reacción de polimerasa en cadena (RPC) que es definitivamente más rápida, más sensible y más específica, pero a la vez la más costosa por la inversión inicial en equipo y el costo de los materiales absolutamente no reutilizables (13-18).

En nuestro laboratorio estamos interesados en problema de CMVH en el contexto del trasplante renal, en el que uno de los factores cruciales es el apareamiento serológico para CMVH de donantes y receptores, de tal suerte que se procure no trasplantar riñones de donantes seropositivos a pacientes seronegativos para evitar la reactivación viral; por esta razón nos dimos a la tarea de estandarizar un método de ELISA que nos permitiera ofrecer este servicio en forma más amplia y con menores costos; para el efecto seguimos los métodos recomendados por el CDC de Atlanta y utilizamos una prueba comercial como base para la estandarización.

MATERIAL Y METODOS

Sujetos de estudio

Se estudiaron 549 personas que incluían pacientes del programa de trasplantes del Hospital Universitario San Vicente de Paul (HUSVP), candidatos, donantes intrafamiliares, cadáveres y personas normales.

ELISA comercial

Siguiendo las instrucciones de la casa productora (Behringwerke) se practicaron 361 determi-

naciones de inmunoglobulina G (IgG) específica contra CMVH a igual número de personas del programa de trasplantes: candidatos, donantes intrafamiliares, cadáveres e individuos normales.

ELISA local (Laboratorio de Virología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia).

Con la prueba estandarizada en el laboratorio, siguiendo el protocolo que se indica más adelante, se hicieron 290 determinaciones de IgG específica contra CMV con los sueros de 188 personas: candidatos, donantes intrafamiliares, cadáveres e individuos normales.

Para estudiar el grado de correlación entre las dos pruebas, se estudiaron 29 sueros con las dos técnicas en dos ocasiones diferentes, incluidos tres sueros de alto, mediano y bajo título donados gentilmente por el Dr. Y. Pervikov de la OMS (Ginebra).

Protocolo para el ELISA local

Preparación de antígeno: 1. Se infectó una monocapa de fibroblastos (HLF) y se incubó a 37°C en cámara húmeda con CO₂ al 5%, hasta que se presentó 50% de efecto citopatogénico. Luego se desprendieron las células con un policía de caucho sin descartar el medio y se lavó el sedimento celular con PBS dos veces. 2. Al sedimento se le agregó buffer de glicina (0.05 M, pH 9, 40 mL de buffer por cada centímetro de sedimento) y se congeló a -70°C. 3. El material se sometió a sonicación dos veces durante cinco segundos cada vez y luego se centrifugó a 2.400 rpm por cinco minutos. 4. Se descartó el sedimento y el sobrenadante se almacenó y congeló en alícuotas a -70°C.

Titulación del antígeno: se descongeló y diluyó 1:100, 1:200 y 1:250 y se utilizaron estas diluciones para sensibilizar platos y determinar así la mejor dilución de trabajo.

Cubrimiento de platos (NUNC immuno plate U1): 1. Se descongeló el antígeno y se preparó la dilución recomendada en buffer de carbonatos (pH 9). 2. Se colocaron 100 µL en pozos marcados como positivos. Como control negativo, se utilizó un sonificado de fibroblastos (HLF) no infectados, que habían sido sometidos al mismo procedimien-

to descrito para las células infectadas. Se colocaron 100 μL en pozos marcados como negativos. 3. Se incubó por 16 horas a 4°C . 4. Se lavó una vez con PBS-1% de albúmina bovina. 5. Se fijó con 150 μL de formalina tamponada, por 10 minutos a temperatura ambiente. 6. Se lavó tres veces con PBS. 7. Se agregaron 150 μL de PBS-1% de albúmina bovina se incubó 30 minutos a temperatura ambiente; se descartó el líquido y se dejó secar. 8. Los platos sensibilizados se almacenaron a -70°C , en bolsas plásticas selladas.

Prueba de los sueros. 1- Con platos y reactivos a temperatura ambiente, se procedió a hidratar los pozos con 100 μL de PBS-1% albúmina bovina por 10 minutos a temperatura ambiente. 3. Se diluyeron sueros 1:500 (en buffer de dilución). 4. Se colocaron 100 μL de la dilución de suero en los pozos respectivos (cuatro pozos por cada muestra; dos con antígeno y dos controles). 5. Se cubrió el plato con plástico adherente y se incubó en baño María (sobrenadando) por 60 minutos a 37°C . 6. Se lavó tres veces con solución de lavado (PBS-tween). 7. Se agregaron 100 μL del conjugado (anticuerpos de conejo específico de cadena pesada, acoplados a fosfatasa alcalina), diluido en PBS-tween, y se incubó nuevamente por 60 minutos en baño María. 8. Se lavó tres veces con PBS-tween. 9. Se agregó el substrato (p-nitrofenilfosfato, 100 μL de la solución) y se incubó por 45 minutos protegido de la luz, a temperatura ambiente. 10. Se agregaron 50 μL de NaOH (2N) para parar la reacción. 11. Se leyó a 405 nm en un lector de ELISA (Dinatek II).

Análisis estadístico

Se realizó análisis de regresión lineal para el estudio de correlación de las pruebas. Se utilizó un computador APC IV NEC con impresora EPSON FX-1050 y el programa estadístico STATGRAPHICS versión 2.6.

RESULTADOS

Se practicaron 651 determinaciones de IgG específica contra CMV: 361 con el ELISA comercial, 290 con el ELISA local, 29 con ambas técnicas.

La Figura 1 muestra la distribución de los delta de densidad óptica (DO) de 361 determinaciones (361 personas) con el ELISA comercial para CMV; se observan cuatro grupos correspondientes a negativos y positivos altos, medianos y bajos.

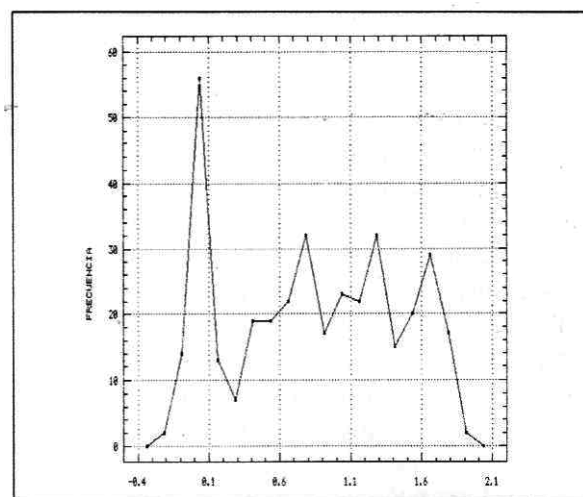


Figura 1. Polígono de frecuencias de los delta de densidad óptica (DO) en la determinación de IgG en candidatos y donantes para trasplante renal mediante ELISA comercial.

En la Figura 2 vemos la distribución de los delta de DO de 290 determinaciones (188 personas) con el ELISA local. Como puede verse este patrón es semejante al observado con el ELISA comercial.

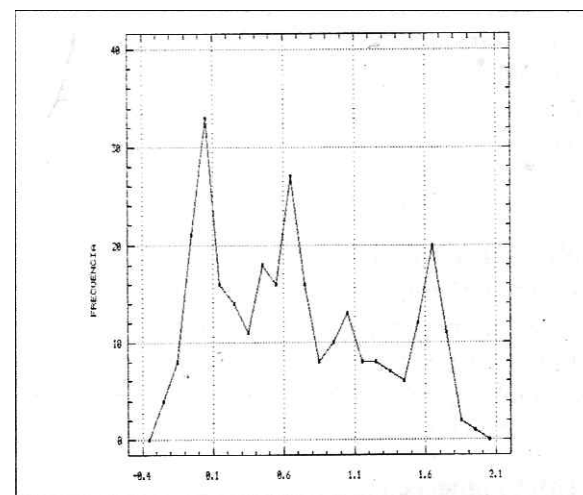


Figura 2. Polígono de frecuencias de los delta de densidad óptica (DO) en la determinación de IgG en candidatos y donantes para trasplante renal mediante ELISA local.

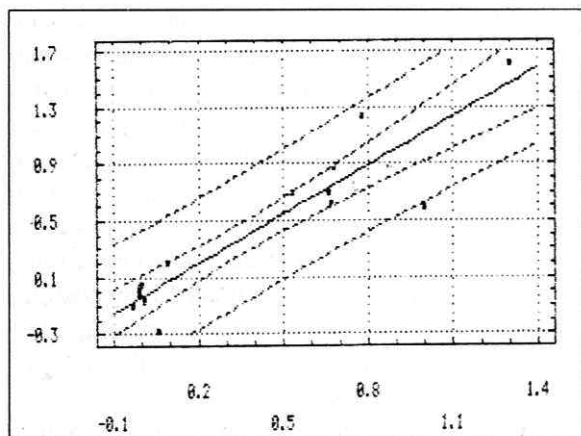


Figura 3. Análisis de regresión, modelo lineal, determinación de IgG en paralelo.

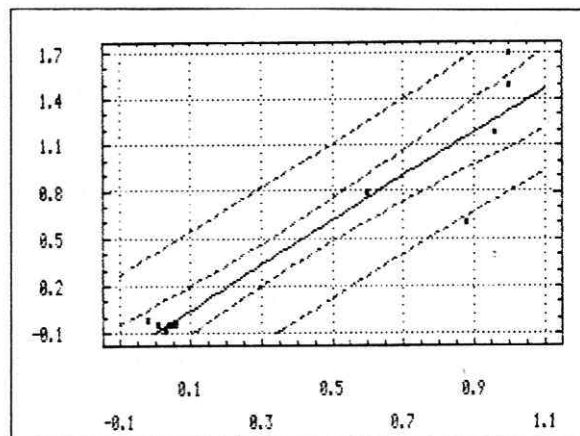


Figura 4. Análisis de regresión, modelo lineal, determinación de IgG en paralelo.

Al analizarla distribución de frecuencias de los delta de DO del ELISA comercial se observa gráficamente que el punto de corte para considerar como seronegativo un suero corresponde a un valor de 0.3 (Figura 1), mientras que con el ELISA local se desplaza a 0.35 (Figura 2).

En un análisis de regresión lineal simple se obtuvo un coeficiente de correlación de 93 y 95% entre los resultados de las dos técnicas (29 muestras en total), realizadas en dos fechas diferentes (Figuras 3 y 4). Se corroboró que las dos pruebas se comportaron en forma semejante al obtenerse valores de DO de 0.2 con el ELISA local, para el valor dado de 0.2 de DO del ELISA comercial, en las diferentes ocasiones.

El punto de corte del ELISA comercial, establecido por el laboratorio productor es de 0.2; lo cual es corroborado con los datos que mostramos en la Tabla 1. Se observa que las muestras consideradas negativas tienen una $X=0.02 \pm 0.07$; obteniéndose: $X + 3S = 0.2$.

Para el punto de corte del ELISA local, la X de

los sueros considerados negativos con la prueba comercial es 0.02 ± 0.07 . Obteniéndose: $X + 3S = 0.27$. Basados en estos resultados, establecimos el punto de corte del ELISA de nuestro laboratorio en 0.3 (Tabla 2), lo cual asegura un margen de confianza del 99%.

DISCUSION

La técnica ELISA, descrita desde 1971 en Suecia y Holanda (19, 20), revolucionó el mundo de la serología y particularmente el diagnóstico de las infecciones virales, acercándose al ideal de un diagnóstico rápido, específico y sensible que es el punto crítico de la virología clínica. La versatilidad de esta prueba ha permitido a través de los años modificarla y mejorarla, permitiendo la detección cualitativa y cuantitativa de antígenos o anticuerpos. Igualmente se han variado los sistemas marcadores: enzimáticos, fluorescentes, luminiscentes, contribuyendo, todo esto a una expansión dramática de las aplicaciones de la prueba (21,22).

Tabla 1. Determinación del punto de corte de seronegativos para IgG-CMV con ELISA comercial

X	S	X + 1S	X + 2S	X + 3S
0.02	0.07	0.09	0.16	0.2
X= Media aritmética S= Desviación estándar Sueros considerados negativos				

Tabla 2. Determinación del punto de corte de seronegativos para IgG-CMV con ELISA local

X	S	X + 1S	X + 2S	X + 3S
0.01	0.09	0.09	0.18	0.27
X= Media aritmética S= Desviación estándar Sueros considerados negativos (por referencia)				

La prueba estandarizada en nuestro laboratorio para la determinación de IgG específica contra CMV, demostró un comportamiento similar al ELISA comercial utilizado, el cual, incidentalmente, resultó ser el de mayor confiabilidad entre otros cinco nombres comerciales comparados (23, 24).

La relación de los resultados fue más estrecha con los sueros negativos o de título bajo, mientras que a densidades ópticas mayores los resultados tuvieron la tendencia a estar más separados. Es de resaltar el hecho de que para el valor 0.2, punto de corte del ELISA comercial, también corresponde 0.2 en el ELISA de nuestro laboratorio, con los dos análisis de regresión lineal realizados.

El ELISA para el diagnóstico de CMV se considera 100% sensible y específico, excepto cuando se trata de detección de IgM, donde el factor reumatoideo puede ser una fuente de error y por lo tanto se recomienda la absorción de los sueros con proteína A estafilocócica o prueba de inmunocaptura para la detección de este isotipo (12,13, 25).

Si bien la serología para CMV sólo tiene importancia para el diagnóstico de una infección aguda en neonatos, donde un resultado positivo para IgM es indicativo de infección intrauterina, la prueba puede tener gran utilidad para realizar estudios epidemiológicos, en caso de sospecha de infección durante el embarazo, el apareamiento de candidatos y donantes de trasplantes y más recientemente en la selección de donantes de semen en programas de reproducción artificial (12, 26).

No se sabe cuál pueda ser el significado de las diferencias en niveles de anticuerpos IgG para CMV, que se encuentran en la población (altos, medianos y bajos). Podría especularse que un alto título en un paciente determinado podría ser una indicación de reactivaciones más frecuentes (aunque también podría indicar una infección reciente), y por lo tanto podría pensarse que este individuo tendría un mayor riesgo de ser transmisor de virus mediante la donación de órganos; a éste respecto Chou y Norman han informado que sólo 60% de los donantes seropositivos serían transmisores del virus; es decir serían infectantes (28).

Igualmente, en receptores con títulos bajos para IgG específica contra CMV podría pensarse que se trate de pacientes con menor experiencia inmunológica para el virus (aunque también puede ser un infección antigua), y por ende más susceptibles de reinfección. Si bien estas consideraciones tendrían que tener en cuenta el grado de inmunosupresión del paciente con insuficiencia renal crónica, el grado de histocompatibilidad con el posible donante y el tipo de terapia inmunosupresora, estas inquietudes podrían representar un productivo campo de investigación.

La IgM no es diagnóstica de infección reciente en adultos, pues existen casos en los que se presenta aumento de este isotipo y existen otras entidades, como el SIDA, que pueden presentar niveles persistentes de este anticuerpo. Adicionalmente en el caso de los trasplantados, por la inmunosupresión, no se espera una respuesta inmune muy conspicua (12).

Algunos autores han sugerido que aquellas infecciones agudas que no están acompañadas de IgM podrían deberse a reactivación y en el caso contrario, se deban a reinfección; a este respecto es oportuno señalar que otros investigadores consideran que la reinfección puede ser más frecuente que la reactivación de la cepa del virus endógeno (28-30).

El efecto del diagnóstico serológico de infección por CMV mediante IgG en trasplante renal tiene su mayor impacto en el apareamiento donante/receptor, buscando siempre donantes negativos, pero particularmente tratando de buscar que un receptor negativo no reciba un trasplante de donante positivo. En la realidad este ideal se dificulta por las altas tasas de prevalencia de la infección en la población general, más alta aun para el grupo de receptores y donantes de trasplante renal.

Los anteriores conceptos están respaldados por múltiples informes de la literatura que indican que las tasas de infección, enfermedad y muerte son mayores en parejas donante positivo-receptor negativo, en las cuales la mortalidad varía entre 17% (31) y 29% (32). En parejas de doblemente negativos el receptor no tiene, lógicamente, ningún riesgo de sufrir una reactivación pero una infección

primaria en estas circunstancias puede resultar mucho más devastadora.

Como nos lo propusimos al iniciar el trabajo, hemos logrado estandarizar una prueba reproducible, sensible y específica, con la cual, en una forma mucho más económica, podremos seguir sirviendo a los pacientes del programa de trasplantes a la vez que podremos ampliar el rango de investigaciones para cubrir aspectos más generales de la epidemiología de la infección.

SUMMARY

This report describes the standardization of an ELISA technique for detecting Cytomegalovirus specific IgG. The antigen was obtained from a Cytomegalovirus infected tissue culture by glycine extraction and sonication. 290 determinations with serum samples from 188 persons were performed. The results obtained with the test were compared with the results of a commercial ELISA. The correlation coefficients between our test and the commercial ELISA test established at different moments were 93 and 95% respectively.

The cut-off value between a positive and a negative result was 0.3, with a confidence interval of 99%, determined as the arithmetic mean plus 3 standard deviations from the differences of optical density from reference negative sera. The technique that we developed is of great value because it is cheaper than others and allows to offer a broader and more systematic diagnostic and research tool in human cytomegalovirus infection and disease.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. John J. Estrada por su valiosa asesoría y colaboración; a COLCIENCIAS por su aporte económico a través del proyecto 1115-05-068-86.

BIBLIOGRAFIA

1. Forbes HA. Acquisition of cytomegalovirus infection: an update. *Clin Microbiol Rev* 1989; **2**: 204-216.
2. Griffiths PD, Grundy JE. Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *Biochem J* 1987; **241**: 313-324.
3. Preiksaitis JK. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Immunol Allerg Clin North Am* 1989; **9**: 137-151.
4. Yow MD. Congenital cytomegalovirus disease: a new problem. *J Infect Dis* 1989; **159**:163-167.
5. Pass RF, Hutto SC, Reynolds DW, Polhill RB. Increased frequency of cytomegalovirus infection in children group day care center. *Pediatrics* 1984; **74**: 121-126.
6. Ossa JE. Inmunobiología de la infección por citomegalovirus. *Act Med Col* 1987; **12**: 257-161.
7. Ossa JE, Arango AA, Arango AM, Builes M, Arbeláez M. Prevalencia de infección por citomegalovirus. En candidatos a trasplante renal y en sus donadores. *Act Med Col* 1988; **13**:125-128.
8. Ossa JE. Frecuencia de infección por herpesvirus en 129 niños de edad escolar, en Antioquia. Iatreia 1990. En prensa.
9. Rubin RH, Tolkoff-Rubin NE. Opportunistic infections in renal allograft recipients. *Transplant Proc* 1988; **21**:12-18.
10. Rubin RH, Tolkoff-Rubin NE. Infection: The new problems. *Transplant Proc* 1989; **21**: 1440-1445.
11. Grody WW, Lewin KJ, Naeim F. Detection of cytomegalovirus DNA in classic epidemic kaposi sarcoma by in situ hybridization. *Human Pathol* 1988; **19**: 524-528.
12. Drew LW. Diagnosis of cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 1988; **10**(s): 468-476.
13. Ardoín P. Cytomegalovirus. En: Virus et diagnostique virologique. Paris: Ed Maloine SA; 1983: 841-855.
14. Ardoín P. Methode ELISA et son application a la Virologie. En: Virus et diagnostique virologique. Paris: Ed Maloine SA; 1983: 841-855.
15. Meyer G, Enders G. Correlation of cytomegalovirus (CMV) detection in urine by tissue culture virus isolation, early antigen immunofluorescence test and nucleic acid hybridization. *Infection* 1988; **3**: 153-157.
16. Van Der Bij W, Torensma R, Van Son W, et al. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody of blood leucocytes. *J Med Virol* 1988; **25**:179-188.
17. 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**:1177-1192.
18. Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM, Arnheim N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988; **158**:1185-1192.
19. Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by using enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 1972; **109**: 129-131.
20. Vanweemen BK, Schuus Ahwm. Immunoassay using antigen enzyme conjugates. *FEDS Letter* 1971; **15**: 232-236.
21. Voller A, Bidwell D. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: Manual of Clinical laboratory Immunology. 3rd ed. Rose Nr, Friedman H, Ed. Washington DC: American Society Laboratory for Microbiology; 1986: 99-109.
22. Nieto A, Carbonatlo C. Enzimoimmunoensayo (ELISA). En: Inmunología. Cuarta Ed. Margni C., Ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana Sa; 1989:571-586.
23. Witte KH, Hanneman P, Dopatka HD and Giesendorf B. Technical improvements of a commercial ELISA to detect antibodies against bovine herpesvirus 1. *Med Microbiol Immunol* 1989; **178**: 9-20.
24. De Ory F, Pérez-Breña P, Echevarría JM. Serological diagnosis of cytomegalovirus infections: comparison of six commercial methods of ELISA. *Serodiag Immunoth Infect Dis* 1988; **2**:423-431.
25. Van Der Berg AP, Van Son WJ, Jiwa NM, Van Der Bij W, Schirm J. Recent advances in the diagnosis of active cytomegalovirus infection after organ transplantation. *Transplant Proc* 1990; **22**: 226-228.
26. ChauhanM, Barratt CH, Cookes, Cooke ID. Screening for cytomegalovirus antibody in a donor insemination program: difficulties in implementing the American Fertility guidelines. *Fertil Steril* 1989; **51**: 901-902.
27. Chou S. Neutralizing antibody responses to reinfecting strains of cytomegalovirus in transplant recipients. *J Infect Dis* 1989; **160**: 16-21.
28. Chou S, Norman DK. The influence of donor factors others than serologic status on transmission of cytomegalovirus to transplant recipients. *Transplantation*. 1988; **46**: 89-93.
29. Chou S. Reactivation and recombination of multiple cytomegalovirus

- strains from individual organ donors. *J Infect Dis* 1989; **160**:11-15.
30. **Kanesaki T, Baba K, Ishibashi I, Yabuchi H.** Characterization of cytomegalovirus isolates recovered during reated infection in renal transplant recipinets. *J Med Virol* 1989; **28**:140-143.
31. **Metselar HJ, Weimar W.** Cytomegalovirus infection and renal transplantation. *J Antimicrob Chemoth* 1989; 23(s): 37-47.
32. **Poutell-Noble C., El Yafi S, Piatti PM, Aymard M, Touraine JL, Betuel H, et al.** Virologic selection of the donor in renal transplantation influence upon viral infections in the recipient. *Transplant Proc* 1986; **18**: 1373-1374.