

## INVESTIGACION POR VIRUS DE LA HEPATITIS B Y CITOMEGALOVIRUS EN DONADORES DE SANGRE

Luis Fuentes L.\*, Alvaro Gutiérrez\*, Teresita Somogyi\*

### RESUMEN

*En un estudio de 783 donadores altruistas, se realizó el análisis de transaminasas séricas y la determinación del antígeno de superficie para la hepatitis tipo B (HBsAg). En 83 donadores, (10.6%) se demostró elevaciones de los valores de las transaminasas séricas, que oscilaron entre 1.3 y 3.8 veces lo normal, y únicamente se demostró positividad para el HBsAg en dos (0.25%) del total de las muestras analizadas, lo que concuerda con lo reportado en la literatura.*

*A 198 personas del estudio se les practicó cultivos para citomegalovirus (CMV) en la orina, secreción faríngea y en un concentrado de leucocitos, no lográndose el aislamiento del virus en ningún caso; sin embargo, se demostró la presencia de virus herpes tipo I en el cultivo faríngeo de 4 de estos donadores [Rev. Cost. Cienc. Med. 1987; 8(2):61-64].*

### INTRODUCCION

Las infecciones por citomegalovirus (CMV) pueden dar lugar a diversas manifestaciones que dependen de la edad, el estado físico del paciente, así como si se trata de una infección primaria o latente (22). Inicialmente, sólo se diagnosticaba esta enfermedad de manera retrospectiva, por el hallazgo de grandes células epiteliales, en las autopsias con inclusiones nucleares y citoplasmáticas en las glándulas salivales, el hígado, el bazo, los pulmones, los riñones, a veces en el cerebro, y también por los resultados de las encuestas seroepidemiológicas (2, 6, 8, 9, 15, 19). Actualmente, se dispone de recursos que permiten diagnosticar la enfermedad "in vivo", lo que ha adquirido gran importancia por su relación con las transfusiones masivas de sangre, la terapéutica inmunosupresora, las infecciones congénitas y los trasplantes de riñón (3, 7, 10, 13, 17, 21, 22). La infección oculta es común durante la infancia y la adolescencia, pero la mayor parte de las defunciones se presentan en niños menores de dos años (15).

La hepatitis viral aguda es una de las enfermedades transmisibles más importantes. Sus agentes etiológicos más frecuentes son los virus A y B (11, 18). El hígado puede infectarse por otros virus en algunas enfermedades generalizadas (12). En este grupo se puede incluir el citomegalovirus (23), el cual se aísla con frecuencia de niños, a veces con enfermedad hepática, demostrándose también un aumento en los títulos de anticuerpos fijadores de complemento. Asimismo, se ha demostrado una frecuencia elevada de problemas hepáticos en pacientes asintomáticos con viruria por citomegalovirus (14). En algunos pacientes con hepatitis colestásica o anictérica, de los que se aísla el citomegalovirus de la orina, se asocia un aumento de anticuerpos fijadores de complemento contra citomegalovirus. Por otro lado, las pruebas funcionales hepáticas anormales e ictericia, son los signos presentes en la "mononucleosis por citomegalovirus". Así se ha establecido entonces, una relación causal entre el citomegalovirus y ciertas enfermedades del hígado (4).

La incidencia de hepatitis postransfusional en pacientes con transaminasa glutámico pirúvica (TSGP) aumentada, ha sido demostrada, a pesar de ser éste un marcador no específico, y se ha relacionado con la transmisión del virus de la hepatitis no-A no-B (1, 16), en aquellos casos en que se ha descartado la infección por virus B. Aproximadamente un 40 por ciento de estas hepatitis no-A no-B se asocia con sangre proveniente de donadores que han presentado valores de TSGP mayores de 45 UI/l (1, 5, 16). Al existir portadores asintomáticos de citomegalovirus que producen hepatitis en pacientes politransfundidos o sometidos a cirugía extensa y voluminosas transfusiones de sangre: se hace necesario demostrar su presencia en estos portadores, a través del cultivo de secreciones nasofaríngeas y orales, o, descartar el riesgo demostrando anticuerpos circulantes contra el virus.

### MATERIAL Y METODOS

El estudio incluyó 783 donantes voluntarios de

\* Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

sangre, aparentemente sanos, con edades que oscilaron entre 23 y 36 años; anictéricos, sin historia de hepatitis viral clínica y asintomáticos al momento de la toma de la muestra. De todos se obtuvo una muestra de sangre y a 198 de ellos se les recogió muestras de orina y frotis faríngeo para el estudio virológico.

Se recogió muestras de orina, previa una limpieza rigurosa, directamente en un frasco estéril. De inmediato se colocaron a 42° C, donde permanecieron unas dos horas antes de ser trasladadas en frío al laboratorio, para su procesamiento. Después de una centrifugación a 1000 r.p.m. por 10 minutos el infranadante suspendido fue ajustado a pH 7.0 con NaOH 0,1 N e inoculado a razón de 0,2 ml en capas preformadas de células WI, previamente drenadas de su medio de crecimiento. Después de 1 hora de adsorción, cada tubo recibió 1,5 ml de medio mínimo esencial de Eagle (MEM).

Se tomó un frotis faríngeo con ayuda de un hisopo de algodón no absorbente, el cual se humedeció y exprimió en 2 ml de medio de transporte constituido por solución salina de Hanks adicionada de gelatina al 0,5 por ciento y 800 unidades de penicilina y polimixina B, 50 u. de micostatín y 800 mg de streptomycin. Las muestras se mantuvieron a 4° C por dos horas antes de ser conducidas al laboratorio para su procesamiento. Después de ser sometidas a centrifugación por 10 mm. a 1000 r.p.m., el sobrenadante se inoculó a razón de 0,2 ml sobre capas preformadas de células WI crecidas en tubos de cultivo, que habían sido drenadas de su medio de crecimiento. El inóculo se adsorbió por 1 hora a temperatura ambiente y luego cada monocapa se realimentó con 1,5 ml de medio MEM de mantenimiento.

Se tomó 10 ml de sangre que se dividió en dos porciones: una en heparina y otra sin anticoagulante. Las sangres fueron mantenidas en frío durante la recolección y su transporte al laboratorio. La sangre heparinizada fue resuspendida y se trató con Ficol-Hypaque para la separación de leucocitos. Los leucocitos separados fueron tratados con Macrodex para la obtención de polimorfonucleares. Luego se lavaron dos veces en solución salina de Hanks y después de centrifugación a 3.000 r.p.m. en frío, se les resuspendió en 2 ml de medio MEM de mantenimiento. Se inoculó 1,5 ml de esa suspensión sobre células WI y el resto se congeló a -70°C. Sin adsorción previa, los tubos se incubaron a 37°C durante 18 horas. Al día siguiente se eliminó el medio y se realimentó con MEM de mantenimiento.

Una porción de la sangre heparinizada se utilizó para realizar el hemograma completo.

La sangre coagulada, después de una adecuada retracción del coágulo se centrifugó a 1000 r.p.m. por 10 minutos y el suero se separó inmediatamente. Una porción del suero se congeló a -30° C y la otra se empleó en las determinaciones de transaminasas. Los cultivos inoculados se incubaron a 37° C, realizando cambio de medio cada 45 días. Las monocapas se observaron con un microscopio invertido tres veces por semana. Los cultivos se descartaron si permanecían negativos por un efecto citopático al cabo de 6 semanas.

Los sueros fueron escrutados por anticuerpos contra antígeno asociado a la hepatitis B mediante el método de Reoforesis, CEP y ELISA.

**Células:** Se empleó la línea de células diploides WI-36 crecidas en medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM). Las últimas 50 muestras fueron inoculadas en células diploides HEL, crecidas en el mismo medio. Se prepararon monocapas de las células mencionadas sembrando 100.000 células suspendidas en 1 ml de medio de crecimiento en tubos de cultivo. Después de 2 a 3 días de incubación a 37° C se tenía una monocapa cerrada lista para inocular.

**Medios de Cultivo:** Se empleó durante el estudio el Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM de la casa Gibco). Para iniciar los cultivos el medio se complementó con suero fetal de ternero, a concentración final de 10 por ciento de bicarbonato de sodio al 0.11 por ciento, lo mismo que 100 unidades de penicilina y polimixina B, 25 u. de micostatín y 100 ug de streptomycin. El medio de mantenimiento redujo la concentración de suero a 2 por ciento y aumentó el bicarbonato a 0.22 por ciento manteniendo a la misma concentración los antibióticos y antimicóticos.

## RESULTADOS

De los 783 sueros estudiados dos (0.25%) fueron positivos por antígeno asociado a hepatitis B. En 69 de los pacientes (8.8%) hubo elevaciones de transaminasas que no pasaron de 49 unidades (1.7 veces lo normal). Únicamente 14 (1.78%) de los 783 sueros analizados presentaron valores de transaminasa más elevados, encontrándose para TSGP un promedio de 78.7 U (ámbito de 51-106) y para TSGO un promedio de 71.5 U (ámbito de 50-104 U). De estos 14

sueros con transaminasas elevadas uno fue positivo por antígeno de superficie para la hepatitis B (TSGP 84 U y TSGO 68 U). El otro donador positivo por HBs Ag presentó valores normales para las dos transaminasas.

En 198 de estas personas, potenciales donadores de sangre, se obtuvo muestras para estudio por citomegalovirus, utilizando la técnica de inoculación en capas preformadas de células Wi. Todos los cultivos fueron negativos por citomegalovirus pudiéndose detectar en 4 de los casos, la presencia de herpes virus tipo I a partir de los frotis faringeos.

## DISCUSION

Los valores obtenidos en las transaminasas y la positividad para el HBsAg son semejantes a los obtenidos para otras poblaciones en banco de sangre (E. Brilla, Comunicación personal) lo que demuestra que el grupo en estudio es típico y representativo de los donantes de sangre que se presentan a los hospitales, aunque tamizados a través de un detenido examen médico clínico. El utilizar en los bancos de sangre la determinación de TSGP como prueba de escrutinio para eliminar posibles donadores con hepatitis no-A no-B (1), hasta que se tenga una prueba serológica certera para el diagnóstico de este tipo de hepatitis, debe ser discutida, pues se conoce que un alto porcentaje de las hepatitis postransfusionales no pueden prevenirse usando la determinación de TSGP como guía, y también se sabe que un alto porcentaje de donadores con niveles de TSGP elevados, no resulta en hepatitis viral (18).

Debe evaluarse cuidadosamente si es conveniente eliminar a todos aquellos donadores con niveles de transaminasa elevadas, quitando así grupos de donadores potenciales o bien el aceptarlos tomando en cuenta el riesgo que representa. Un estudio más completo para investigar hepatitis B en donadores, debe incluir determinaciones de anticuerpo "core" de la hepatitis B (anti HBc) pues muchas veces este es el único marcador serológico que aparece en una sangre capaz de producir hepatitis postransfusional (5, 20, 24, 25, 26).

En virtud de los resultados obtenidos en los cultivos de muestras de orina, secreción faríngea y leucocitos, se concluye que para grupos de población como el descrito (edad y estado general de salud) la presencia de portadores asintomáticos es despreciable. Esto limita el interés del complejo procedimiento para aislar el citomegalovirus, a sangres de donadores muy cali-

ficados, ya que las posibilidades de aislamiento, o sea el riesgo de transmisión del virus por transfusión son mínimos y no justifica, según los resultados obtenidos, el elevado esfuerzo de su investigación.

## AGRADECIMIENTO

El presente estudio pudo llevarse a cabo gracias a la colaboración en la obtención de muestras de los Drs. Ezequiel Vieto y Maximiliano Gutiérrez, del Banco Nacional de Sangre y del Dr. Juan de Dios Cartín del Hospital Calderón Guardia.

## ABSTRACT

*Transfusion risk with hepatitis B and cytomegalovirus has been pointed out. At present, the blood bank routine includes laboratory tests to detect hepatitis B, but cytomegalovirus has been excluded because of its high cost and its performance time. In this study, the sera of 783 blood donors were analyzed for transaminases quantitation and type B hepatitis surface antigen (HBsAg) detection. Transaminase elevations from 1.3 to 3.8 times normal values were observed in 83 donors. Only 2 donors (0.25%) were HbsAg positive, as has been similarly reported for other donor groups.*

*Cultures of CMV in urine, pharyngeal secretions and in leukocyte concentrate were performed in 198 subjects, but the virus was not isolated from any sample. However, herpes type 1 virus was found in four of the pharyngeal smears.*

## BIBLIOGRAFIA

1. Aach, R.D., Szmunes, W., Mosley, J.W., Hollinger F.B., Kahn, R.A., Stevens C.E. The transfusion transmitted viruses study. Serum alanine aminotransferase of donors in relations to the risk of non B hepatitis in recipients. *New England Journal of Medicine* 1981; 304:889-894.
2. Bensez, R.W., ST., Geme, J.W., A. Seaach for the reservoir of cytomegalovirus in salivary gland tissue. *J. Pediat.* 1968; 72:479-482.
3. Craighead, J.E. Immunologic response to cytomegalovirus infection in renal allograft recipients. *Am. Jour. Epid.* 1969; 90:506-513.
4. Chiba, S., Hori, S., Kawamura, N., Nakao, K. Primary cytomegalovirus infection and liver involvement in early infancy. *Tohoku, J. Exp. Med.* 1975; 117:143-151.

5. Deloris, E., Koziol, M.T., Holland, P.V., Alling, D.W., Melpolder, J.C., Solomón, R.E. et al. Antibody to hepatitis B core antigen as a paradoxical marker for non A, non B hepatitis agents in donated blood. *Ann Intern Med.* 1962; 104:488-495.
6. Dymont, P.G., Orlando, S.J., Isaacs, H., Wright, H.T. The incidence of cytomegalovirus and postmortem cytomegalic inclusions in children with acute leucemia. *J. Pediat.* 1961; 72:533-536.
7. Fiala, M., Edmodson, L., Guze, L.B. Simplified method for isolation of cytomegalovirus and demonstration of frequent viremia in renal transplant patients. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1973; 144-871.
8. Georges, J.C., Rio, Y., Lavergne, E. Etude de la Fréquence des anticorps. Fixant le complément anticytomegalovirus chez 339 Jutets. *SEM. Hop. Paris.* 1975; 51:1213-1218.
9. Golubjantnikov, R., Allen, V.D., Steadman, M., Olmos-Blancarte, M.P. In Horn, S.L. Prevalence of antibodies to E-B virus, cytomegalovirus and toxoplasma in a Mexican Highland community. *Am. Jour. of Epid.* 1973; 79:116-124.
10. Hildebrandt, R.J., Monif, G.R. Congenital cytomegalovirus infection. *Am. J. Obst. & Gynec.* 1969; 105:349-353.
11. Hollinger, F.B., Narayan, C.K., Definger, P.E., Yawn, D.H., Schmulen, A.C., Dreesman, J.L. Posttransfusion Hepatitis Type A. *JAMA* 1983; 250 :2313-2317.
12. Iwarson, S., Schaff, Z., Seto, B., Norkrous, G., Gerety, R.J. Retrovirus like particles in hepatocytes of patients with transfusion acquired non A, non B Hepatitis. *J. Med. Virol,* 1985; 16:37-45.
13. Joncas, J.M., Wills, A., McLaughlin, B. Congenital infection with cytomegalovirus and Epstein-Bar-virus. *CMA Journal* 1977; 117:1417-1418.
14. Klemola, G., Kaariainen, L., von ésen, R., Haltia, K., Koivuniemi, A., von Bondsdorff, C.H., further studies on cytomegalovirus Mononucleosis in previously health individuals. *Acta Med. Scandd.* 1967; 182:311-322.
15. Kohler, C., Gaillard, L., Gaudin, O. G., Jeddi, M., L' incidence du virus cytomegaloque chez les enfants d' una quinze ans. *Arch. Franc. Ped.* 1973; 30:751 - 759.
16. Koretz, R.L., Stone, O., Mousa, M., Gitnick, G.L. Non A, Non B posttransfusion hepatitis-A decade later. *Gastroenterology.* 1985; 88:1251-1254.
17. Melish, M., Hanshaw, J.E. Congenital cytomegalovirus infection. *A. J. Dis. Child.* 1973; 126:190-194.
18. Mintz, P.D. Strategies for the prevention of posttransfusion hepatitis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1984; 14:198-207.
19. PAL, S.R., DAS, K.C., Chitkara, N.L. Bhakoo, O.N. Cytomegalovirus. Infection of two neonates with Evidence of Lympho-Proliferation *Indian J. Med. Res.* 1972; 60:815-824.
20. Seghal, A., Arankalle, V., Dhoye, S.O., Ramamoorthy, C.L., Phule, D.M., Khorshed, M.P. Diagnostic significance of anti HBc-IgM in patents of acute viral hepatitis. *Indian J. Med. Res.* 1986; 83:547-549.
21. Siegel, M. Congenital Malformations Following Chikempox, Measles, Munps and Hepatitis. *JAMA* 1973; 226:1521-1524.
22. Stagno, S., Reyndds, D.W., Lakeman, A., Charamella, L.J., Alford, Ch. A. Congenital cytomegalovirus infection: consecutive occurrence due lo viruses with similar antigenic compositions. *Pediatrics,* 1973; 52:788-794.
23. Starr, S.E. Cytomegalovirus. *Pediat. Clin. North. Am.* 1979; 26:283-291.
24. Surrenti, C., Ambu, S., Patussi, V., Milani, S., Casini, A., Zachi, P., et al. Diagnostic significance of anti HBc IgM mn healty HBs Ag carriers and in chronic hepatitis B. *J. Med. Virol.* 1986; 18:229-234.
25. Tassopoulos, N.C., Papaevangelow, G., Sjorent, M.H., Roumeliotou, A., Purcell, R.H. IgM antibody to hepatitis B core antigen: a marker of infectivity. *N. Engl. J. Med.* 1985; 313:1659-1660.
26. Taswell, H.P., Czaja, A.J., Nelson, C.A. Viral hepatitis: Diagnostic test using anti HBc (IgM). *Mayo Clin. Proc.* 1985; 60:488-489.