

## **DIAGNÓSTICO DE LA MONONUCLEOSIS INFECCIOSA CAUSADA POR EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR**

**David Navarro Ortega**

**Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario. Valencia**

La mononucleosis infecciosa (MI) es una enfermedad aguda que cursa habitualmente con fiebre, odinofagia y adenopatías laterocervicales; más de un 80% de los casos están causados por el virus de Epstein-Barr (VEB) y son consecuencia de la primoinfección viral. Aunque su devenir es generalmente benigno, conviene diagnosticarla rápida y certeramente puesto que otras enfermedades susceptibles de ser tratadas o investigadas más exhaustivamente, como la toxoplasmosis aguda, algunas hepatitis víricas agudas, la primoinfección por el VIH-1 e, incluso, determinados procesos linfoproliferativos, pueden manifestarse de modo similar.

El diagnóstico de la MI causada por el VEB es estrictamente serológico: se dispone de técnicas que detectan una especie particular de anticuerpos heterófilos, cuya aparición es común en el transcurso de la enfermedad, y de otras que ponen de manifiesto la presencia de anticuerpos específicos frente a determinadas proteínas del virus. El uso de cada una de ellas tiene indicaciones concretas, como después se verá. Son propósitos de la siguiente revisión: sintetizar la información disponible en la literatura en relación con las pruebas serológicas comercializadas para el diagnóstico de la MI por el VEB y proponer un protocolo de actuación ante la presencia de un síndrome de MI de probable vinculación a este virus.

Los anticuerpos heterófilos que se detectan en la MI causada por el VEB tienen un perfil característico: son mayoritariamente de la clase IgM, se fijan a antígenos localizados en la membrana de los hematíes de varios mamíferos, son absorbidos por un extracto de estroma de eritrocitos bovinos, pero no por un extracto de riñón de cobaya –a diferencia de otros anticuerpos heterófilos, como los de de Forssman (prueba clásica de Paul-Bunnell y Davidsohn)– y no reaccionan con los antígenos del VEB. Aparecen en un 80-90% de los pacientes con MI mayores de 10 años, son ya objetivables en la fase aguda de la enfermedad, rara vez persisten más de dos meses (de hecho, son un marcador excelente de la fase aguda de la enfermedad), y no aparecen en los síndromes mononucleósicos de otro origen. En los pacientes menores de 10 años, sin embargo, se detectan en menos de un 50% de los casos.

Existe en el mercado una amplia variedad de pruebas para la detección de anticuerpos heterófilos, entre las que se incluye una versión de la técnica clásica de Paul-Bunnell (Sanofi Diagnostics): aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con antígeno purificado a partir de membranas de eritrocitos bovinos u ovinos, aglutinación de hematíes equinos, enzoinmunoensayos y técnicas inmunocromatográficas (Tabla 1). En general, no hay grandes diferencias de sensibilidad y especificidad entre las distintas pruebas disponibles en el mercado por lo que, en principio, la elección de cualquiera ellas es una opción correcta. Es destacable que la especificidad de estas pruebas está, en todos los casos, alrededor del 100%, aun no detectando anticuerpos específicos anti-VEB; de hecho, los falsos positivos vinculados clásicamente a estos procedimientos (no más de un 2-3%, en

todo caso) son, casi siempre, positivos verdaderos debidos a la persistencia de niveles residuales de esta variedad de anticuerpos heterófilos tras una MI. Conviene subrayar que la sensibilidad de las técnicas de detección de anticuerpos heterófilos varía en gran medida en función del grupo de población objeto de estudio: en el mejor de los casos, esto es, cuando la población no incluye a niños menores de 10 años, la sensibilidad es de 80-95% dependiendo de la técnica comercial considerada y del estudio consultado.

**Tabla. 1 Pruebas comercializadas de detección de anticuerpos heterófilos.**

<b>Fundamento técnico</b>	<b>Pruebas comercializadas</b>
Aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con antígeno purificado de eritrocitos bovinos. Sin absorción previa de los sueros	Monolates (Biokit) Avitex-IM (Omega Diagnostics) Mono-Lex (Trinity Laboratories) Dry spot IM kit (Oxoid Ltd.)
Aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con antígeno purificado a partir de eritrocitos de caballo y oveja. Los sueros deben ser absorbidos con un extracto de riñón de cobaya.	Monosticon Dri-Dot (OrganonTechnica)
Aglutinación de hematíes de caballo. Absorción diferencial con hematíes bovinos y con extracto de riñón de cobaya.	IM Absortion kit (Microgen) Monospot (Meridian) Monoslide (bioMérieux)
Enzimoinmunoanálisis con antígeno purificado de eritrocitos bovinos	ImmunoCard-mono (Meridian)
Ensayo inmunocromatográfico con antígenos purificados.	Card-OS Mono (PaciBiotech) BIFA-MI-Tira (Bifa Kit, Sumilab)

La detección de anticuerpos que reconocen antígenos del VEB es una posibilidad diagnóstica con indicaciones específicas a las que se hará mención más adelante. Son potencialmente útiles para el diagnóstico de la MI las determinaciones de anticuerpos de las subclases IgG e IgM frente a los complejos antigénicos VCA (integrado por proteínas de la cápside del virus), EA (proteínas no estructurales en su mayoría que intervienen en la replicación del ácido nucleico viral) y EBNA (integrado por proteínas reguladoras multifuncionales no estructurales de localización nuclear).

La cinética de la respuesta de anticuerpos frente a estos complejos antigénicos durante la primoinfección por el VEB es característica: durante la fase aguda de la enfermedad se detectan anticuerpos IgM frente al VCA y EA-D (éstos no en todos los casos); poco después, se produce la seroconversión IgG anti-VCA (la aparición de estos anticuerpos es prácticamente simultánea a la de las IgM anti-VCA) y anti-EA-D; los anticuerpos IgM anti-EBNA aparecen durante el primer mes tras la infección, pero no son detectables en muchos casos; los anticuerpos IgG anti-EBNA tardan entre dos y seis meses en ser detectables pero, una vez lo son, permanecen de por vida. Los anticuerpos IgG anti-EA-D y las IgM anti-VCA desaparecen en la fase de convalecencia (rara vez persisten más de 6 meses), mientras que las IgG anti-VCA son detectables de por vida. Cuando el virus se reactiva, los niveles séricos de anticuerpos anti-VCA se incrementan notablemente, reaparecen los anticuerpos anti-EA-D, pero rara vez lo hacen las IgM anti-VCA. Es posible, aunque no habitual, detectar IgM anti-VCA en ausencia de una primoinfección por el VEB; por ejemplo, en algunas primoinfecciones sintomáticas producidas por el citomegalovirus (CMV) y otros  $\beta$ -herpesvirus.

Aún hoy, las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y anticomplementaria (IFAC) son los procedimientos de referencia para la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-VCA, anti-EA y anti-EBNA, respectivamente; estos métodos han sido comercializados por distintas empresas (Gull, Serifluor-Institute Virion, Vircell etc.); no hay diferencias reseñables

entre ellos en cuanto a sensibilidad y especificidad, por cuanto los substratos antigénicos empleados son comparables. Para la detección de los anticuerpos anti-VCA se emplean células productoras de viriones (P3HR-1 o B-95) estimuladas con TPA (éster del formol). Para la determinación de los anticuerpos anti-EA-D (patrón difuso del complejo antigénico precoz) se utilizan células Raji (no productoras de viriones) estimuladas con butirato sódico y para la de anticuerpos anti-EBNA células Raji sin estimular.

Los problemas de estas técnicas son los inherentes a cualquier método de inmunofluorescencia: imposibilidad de automatización –sólo es un verdadero problema cuando se maneja un gran número de muestras–y subjetividad en la lectura (problema que se minimiza con entrenamiento). No es extraño, por lo tanto, que de un tiempo a esta parte hayamos asistido a la comercialización de un gran número de enzimoimmunoensayos (ELISA) para la detección de los anticuerpos anti-VEB específicos mencionados anteriormente. Unos emplean extractos crudos de células infectadas por el VEB (Immunowell de GeneBio) o proteínas virales purificadas mediante cromatografía de afinidad [gp 125 del complejo VCA (ELISA-VCA de Gull)] como antígenos de la reacción, y otros proteínas recombinantes o péptidos sintéticos [p72 EBNA-1 (ELISA-EBNA de Gull, Immunowell-EBNA de GeneBio, ELISA-EBNA de Biotest Diagnostics); p18 VCA (ELISA Wampole, Captia-VCA de Centocor Inc, Vironostika EBV-VCA de Organon Teknika); p54 de EA (ELISA-EA de Biotest diagnostics)]. La mayoría detecta de forma individualizada las distintas especificidades de anticuerpos anti-VEB; unos pocos, sin embargo, detectan simultáneamente anticuerpos contra diversas proteínas pertenecientes a varios complejos antigénicos del VEB (Enzygnost anti-EBV, Behringwerke). La mayor parte de los que detectan IgM son ELISA indirectos, por lo que es necesario tratar previamente los sueros para evitar la interferencia del factor reumatoide; sólo unos pocos emplean métodos ELISA de inmunocaptura (Vironostika VCA IgM de Organon Teknika, Captia Select VCA-M de Centocor Inc.).

En general, son pocos los estudios que han evaluado la utilidad diagnóstica de estos ELISA y éstos ofrecen datos a menudo contradictorios, lo cual impide recomendar unos en detrimento de otros. Prueba concluyente de lo anterior es el resultado del análisis del Control de Calidad SEIMC S-1/01; no hay duda, a la vista de dichos resultados, de que la calidad de estos productos es manifiestamente mejorable. De los datos publicados en relación con la eficacia diagnóstica de estas pruebas puede inferirse lo siguiente: (i) los ELISA que utilizan extractos celulares como antígenos son más sensibles que aquéllos que emplean proteínas purificadas a partir de cultivos infectados, proteínas recombinantes o péptidos sintéticos, aunque son menos específicos; (ii) los ELISA que detectan anticuerpos anti-EBNA (proteínas recombinantes p72 o p58, que corresponden a EBNA-1) son relativamente homogéneos en cuanto a su sensibilidad (inferior no obstante a la IFAC) y especificidad; existe, de hecho, una correlación aceptable entre la IFAC y estos ELISA; (iii) los ELISA que detectan anticuerpos IgG anti-VCA se correlacionan aceptablemente con la IFI aunque, en general, son menos sensibles que ésta, mientras que los que detectan anticuerpos IgG frente al EA-D y, particularmente, los que determinan IgM anti-VCA ofrecen, en general, una eficacia diagnóstica muy inferior a lo deseable.

De acuerdo con lo anterior, ante la presencia de un cuadro clínico de MI, a cualquier edad, se recomienda practicar en primera instancia una prueba de anticuerpos heterófilos (Figura 1). Si ésta resulta positiva, el diagnóstico de mononucleosis por el VEB es un hecho y, por ser aquéllas suficientemente específicas, no es necesario recurrir a los métodos de detección de anticuerpos específicos para confirmar el diagnóstico. Si resulta negativa y la sospecha de MI por el VEB es firme, la determinación de los anticuerpos IgG anti-VCA, IgM anti-VCA y de IgG anti-EBNA (no es necesario practicar las determinaciones de IgG/IgM anti-EA-D e IgM anti-EBNA) conducirá al diagnóstico de más de un 90% de los casos que afectan a personas previamente sanas. El patrón serológico más común en esta situación es IgG anti-VCA (+/-), IgM-VCA (+) e IgG anti-EBNA (-). En los pacientes inmunodeprimidos,

sin embargo, se observan frecuentemente patrones atípicos. Dada la alta prevalencia de la infección por el VEB en nuestro entorno, la práctica de un ELISA anti-EBNA-1 como prueba de cribado resulta rentable económicamente: si es claramente positivo se descarta una MI, si es negativo o positivo débil se practican las determinaciones de anticuerpos IgG e IgM anti-VCA. La IFAC no puede sustituir al ELISA anti-EBNA-1 como prueba de cribado por cuanto aquélla detecta, entre otros, anticuerpos anti-EBNA-2, los cuales, a diferencia de los que reconocen EBNA-1, se generan relativamente pronto tras la infección. Alternativamente, si el factor económico no es limitante, pueden practicarse las tres determinaciones en cualquier caso. Por otra parte es necesario remarcar que no se debe diagnosticar una MI con la única base de una prueba de IgM anti-VCA positiva, por cuanto puede tratarse de un falso positivo ya se utilice la IFI o el ELISA.

En cuanto a qué método debe utilizarse para la determinación de los distintos anticuerpos específicos anti-VEB, por el momento, y de acuerdo con los datos disponibles, parece preferible el uso de la IFI al del ELISA para la detección de anticuerpos anti-VCA, especialmente de la subclase IgM; sin embargo, la detección de anticuerpos anti-EBNA puede llevarse a cabo con garantías mediante un ELISA (p72-EBNA-1).

## **BIBLIOGRAFÍA**

- ANÓNIMO. PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD SEIMC. Control de Calidad de Serología S-1/01. Boletín de Control de Calidad 2001; (en prensa).
- BRUU AL, HJETLAND R, HOLTER E, *et al.* Evaluation of 12 commercial tests for detection of Epstein-Barr virus-specific and heterophile antibodies. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7:451-456.
- GÓMEZ MC, NIETO JA, ESCRIBANO MA. Evaluation of two slide agglutination tests and a novel immunochromatographic assay for rapid diagnosis of infectious mononucleosis. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7:840-841.
- LENNETTE EJ. Epstein-Barr virus. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover F, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology, 7<sup>a</sup> ed. Washington: ASM Press, 1999; pp:912-918.
- LINDERHOLM M, BOMAN J, JUTO P, LINDE A. Comparative evaluation of nine kits for rapid diagnosis of infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus-specific serology. J Clin Microbiol 1994; 32:259-261.
- MENDOZA J, ROJAS A. Diagnóstico serológico de la infección por el virus de Epstein-Barr. Boletín de Control de Calidad 1999; 11(1):43-51.
- SVAHN A, MAGNUSSON M, JÄGDAHL L, SCHLOSS L, KAHLMETER G, LINDE A. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays and two latex agglutination assays for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection. J Clin Microbiol 1997; 35:2728-2732.
- WEBER R, BRENNER M, PREISER W, DOERR HW. Evaluation of 11 enzyme immunoassays for the detection of immunoglobulin M antibodies to Epstein-Barr virus. J Virol Methods 1996; 57:87-93.

**Figura 1. Esquema diagnóstico de la mononucleosis infecciosa (MI) por el virus de Epstein-Barr (VEB) en pacientes inmunocompetentes.**

