

Estudio comparativo de tres técnicas de detección del citomegalovirus en la orina de pacientes trasplantados renales

P. Sánchez Pérez, D. Ferrer*, L. M. Pallardó, M. Gobernado*, B. Acosta*, J. Sánchez Plumed, E. Orero, J. M. Cruz
Servicios de Nefrología y *Microbiología. Hospital Universitario La Fe, de Valencia.

SUMMARY

The purpose of the study was to compare the sensibility of three methods for the detection of cytomegalovirus (CMV) in the urine of kidney transplant recipients: viral isolation in conventional cell culture (CC), identification of CMV early antigens by monoclonal antibodies in shell-vial culture (SV), and detection of viral DNA by means of the polimerase chain reaction assay (PCR).

We processed 419 urine samples obtained from 60 kidney transplant patients by CC and by SV. CMV was detected in 115 of the samples (27.4%): In 15 the diagnosis was made only by SV, in 52 only by CC and in 48 by both methods. CC was not positive until the fourth week in 22 cases.

Seventy samples were also processed for the PCR assay. CMV was detected in 29 samples at least by one of the three methods: 12 were positive by SV, 15 by CC and 35 by PRC.

We conclude that CC is a more sensitive method than SV for the detection of CMV in the urine, but with SV the diagnosis can be obtained in 24-48 hours, so both techniques should be used simultaneously. PCR is the most sensitive and useful method for the early detection of CMV in the urine.

Introducción

El cultivo celular (CC) es el método de referencia para la detección del citomegalovirus en muestras biológicas. La técnica se basa en la capacidad del virus para infectar líneas celulares diploides de fibroblastos humanos. El diagnóstico se establece por la presencia en las mismas de un característico efecto citopático que puede manifestarse entre tres días hasta seis semanas después de la siembra¹. La utilidad clínica de la técnica de detección del CMV mediante el cultivo celular es limitada, pues con frecuencia no permite un diagnóstico rápido de la infección por CMV en situaciones que requieren la instauración de medidas terapéuticas específicas.

Mediante la tinción con anticuerpos monoclonales es posible detectar la presencia de antígenos precoces del CVM tras 16-48 horas de incubación en cultivo de monocapa de fibroblastos en shell-vial (SV)^{2,3}.

Por otra parte, las técnicas de amplificación enzimática del ADN mediante la reacción en cadena de la polimeriza-

sa (PCR)⁴ se han aplicado a la detección de CMV en pacientes trasplantados renales en muestras de orina⁵, sangre⁶ y biopsia renal⁷, con excelentes resultados en cuanto a su sensibilidad, especificidad y rapidez.

Para conocer la utilidad de estas técnicas de detección del CMV en la práctica clínica diaria hemos efectuado un estudio comparativo en pacientes trasplantados renales, basado en el procesamiento simultáneo de muestras de orina por los tres métodos mencionados.

Material y métodos

El estudio se efectuó sobre muestras de orina procedentes de 60 pacientes que recibieron un injerto renal entre el mes de abril de 1990 y abril de 1991. Las muestras se recogieron con periodicidad quincenal durante los primeros tres meses postrasplante y posteriormente cada mes, hasta el sexto.

El cultivo del virus se efectuó en monocapa de fibro-

blastos de línea celular MRC-5 procedente de pulmón de feto humano. Los tubos de shell-vial y los tubos destinados al cultivo convencional se prepararon en tubos estériles con 1 y 2 ml, respectivamente, de la dilución celular para obtención de la monocapa de fibroblastos.

Todas las muestras se sembraron en cuatro tubos de SV para el diagnóstico rápido: dos tubos se sembraron con 0,5 ml de orina diluida 1:1 en medio de transporte «cellmatics» (Difco) y los otros dos con 0,5 ml de orina no diluida. Del mismo modo, 0,5 ml de orina diluida y 0,5 ml de orina no diluida se inocularon en sendos tubos de CC. La identificación de CMV en los tubos de SV se efectuó tras 24-48 horas de la inoculación, mediante un análisis de fluorescencia indirecta que utiliza anticuerpos monoclonales específicos para dos antígenos distintos: un antígeno inmediato precoz (PM = 72.000) y un antígeno precoz (PM = 50.000) (Syva Microtrak).

Los tubos de CC se mantuvieron durante 30 días; se observaron diariamente durante los tres primeros días y posteriormente dos veces por semana para detectar la aparición de efecto citopático.

Setenta muestras de orina diluida fueron además preparadas para la amplificación del DNA por PCR, siguiendo el procedimiento descrito por Demmler⁸, utilizando como par de oligonucleótidos cebadores los MIE 4 y MIE 5, para la amplificación de una cadena de 435 pares de bases de la secuencia de DNA, que codifica una porción de antígeno precoz inmediato de CMV. La detección del producto amplificado se efectuó por electroforesis en gel de agarosa (BioRad).

Resultados

1. Comparación entre el número de aislamientos de CMV realizados por cultivo convencional y shell-vial.

En la tabla I se muestra el resultado total de aislamientos obtenidos por cada técnica. De las 419 muestras de orina procesadas por SV y CC, se demostró la presencia de CMV en 115 (27,4 %), por uno o ambos métodos a la vez. El diagnóstico se obtuvo en 15 de las muestras (13 %) sólo por SV; en 52 muestras (45,2 %), por CC, y en 48 (41,7 %), por ambos métodos a la vez.

De las 100 muestras de orina positivas por CC, en nueve se detectó CMV en los primeros 0-8 días; en 40, entre los días 9-15; en 29, entre los días 16-21, y en 22 (22 %), entre los días 22-30. En la tabla II se muestra la corres-

Tabla I. Comparación del número de aislamientos de CMV en cultivo convencional con la detección de antígeno precoz en shell-vial

	Shell-vial	Cultivo convencional
Casos + por un solo método	15 (13 %)	52 (54,2 %)
Casos + por ambos métodos		48 (41,7 %)
Total casos +	63 (54,7 %)	100 (85,4 %)

Tabla II. Comparación del número de aislamientos de CMV por cultivo convencional, distribuidos en función del día postcultivo en que se positivizó, con los resultados obtenidos por shell-vial

Días de cultivo	N.º de CC + (%)	N.º de SV + (%)	N.º de SV - (%)
0-8	9 (9)	6 (66,6)	3 (33,3)
9-15	40 (40)	24 (60)	16 (40)
16-21	29 (29)	14 (48,2)	15 (51,8)
22-30	22 (22)	4 (18,2)	18 (18,9)
Total	100	48	52

pondencia de los aislamientos por CC y SV en función del tiempo de cultivo.

2. Resultados obtenidos en el estudio comparativo entre shell-vial, cultivo convencional y reacción en cadena de la polimerasa:

Setenta muestras de orina estudiadas fueron procesadas por tres métodos diagnósticos: SV, CC y PCR. Se detectó la presencia de CMV en 29 muestras; por los PCR, en 25 casos (36,7 %); por el CC, en 15 casos (21,4 %), y por SV, en 12 casos (17,1 %). La PCR fue el único método diagnóstico en 11 casos (37,9 %), sólo por CC se aisló CMV en cuatro (13,7 %) y en ningún caso se detectó exclusivamente por SV. Por PCR y CC se detectó CMV en 11 muestras (37,9 %) y por PCR y SV en 12 (41,3 %).

Discusión

1. Comparación de los resultados obtenidos por shell-vial y cultivo convencional:

Se han involucrado distintos factores que pueden afectar la sensibilidad de ambos métodos, como variaciones en la edad o en la calidad de la monocapa celular, distintos métodos de inoculación, procedencia de la muestra, número de viales empleados y tiempo de observación del cultivo convencional.

Los trabajos iniciales de Gleaves^{2,9} mostraron una mayor sensibilidad para el método de SV respecto al CC, manteniendo éste durante un promedio de tres semanas. Nuestros resultados difieren, ya que obtuvimos una mayor sensibilidad para el CC que para el SV (85 vs 54,7 %). Esta diferencia puede ser atribuida en gran medida al tiempo en el cual fueron mantenidos los cultivos, dado que en nuestro estudio no se descartaron como negativos hasta los 30 días después de la siembra. Según se refleja en la tabla II, durante los días 22-30 del cultivo se detectaron un 22 % de los casos positivos. Estos resultados concuerdan con los de otros autores¹⁰⁻¹³, que mantienen el cultivo durante al menos cuatro semanas, y sugiere la conveniencia de prolongar el tiempo de observación del CC para aumentar la sensibilidad de la técnica.

Por otra parte, hallamos que en 48 de las 100 muestras de orina en las que se aisló CMV por CC se detectó también por SV. De estas muestras, seis se detectaron por

SV en la primera semana de cultivo, 24 en la segunda, 14 en la tercera y cuatro en la cuarta. El porcentaje de aislamientos de CMV por SV disminuye en las muestras que son positivas por CC a partir de la tercera semana de cultivo, aumentando el número de falsos negativos por SV. Ashley y cols.¹⁰ concluyen a este respecto que existen CMV de crecimiento más lento, que no pueden ser detectados por SV.

De las 115 muestras positivas, la detección de CMV se realizó en 15 casos (13,1%) sólo por SV y en 52 casos (45,2%) sólo por CC. Un total del 54,7% de los diagnósticos pudieron efectuarse en 24-48 horas. De los resultados obtenidos se concluye la conveniencia de utilizar ambos métodos diagnósticos simultáneamente para una determinada muestra, pues sus cualidades son complementarias.

2. Estudio de los resultados obtenidos en la comparación de los tres métodos diagnósticos: cultivo convencional, shell-vial y reacción en cadena de la polimerasa:

El mayor porcentaje de resultados positivos cuando se analizaron las muestras por los tres métodos se obtuvo con la PCR, aunque esta técnica no diagnosticó todos los casos. Demmler y cols.⁸ señalaron que los enzimas inhibidores que contiene la orina podrían impedir la detección de CMV por la PCR, particularmente cuando la muestra no es diluida. Esto podría explicar los cuatro casos de detección de CMV por CC siendo la PCR negativa, aunque no se descartan errores técnicos.

En cinco de las muestras positivas sólo por PCR, el cultivo convencional se positivizó en muestras posteriores. Dos de estas muestras correspondían a pacientes que presentaron síntomas compatibles con enfermedad por CMV a los 2-5 días del diagnóstico.

Los resultados obtenidos sugieren, al igual que otros autores^{5,14}, una mayor sensibilidad de la PCR para la detección del CMV respecto al CC y SV. Posiblemente la PCR permite un diagnóstico precoz de la infección por CMV, cuando otras técnicas de detección del CMV son aún negativas.

Bibliografía

1. Ho M: Citomegalovirus. En: *Principles and the practice of infectious diseases*, Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE (eds.). Nueva York, Churchill Livingstone, 960-970, 1985.
2. Gleaves C, Smith T, Shuster A, Pearson R: Rapid detection of cytomegalovirus on MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody antigen. *J Clin Microbiol*, 19:917-919, 1984.
3. Alpert G, Mazon MC, Colimon R, Plotkin S: Rapid detection of human cytomegalovirus in the urine of humans. *J Infect Dis*, 152:631-633, 1985.
4. Mullis KB, Faloone FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzimol*, 155:335-350, 1987.
5. Olive DM, Simsek M, Al-Mufti S: Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol*, 27:1238-1242, 1989.
6. Rowley AH, Wolinsky SM, Sambol SP, Barkholt L, Ehrnst A, Anderson JP: Rapid detection of cytomegalovirus DNA and RNA in blood of renal transplant patients by in vitro enzymatic amplification. *Transplantation*, 51:1028-1033, 1991.
7. Cheh YT, Mercer GO, Cheigh JS, Mouradian JA: Cytomegalovirus infection of renal allografts. *Transplantation*, 53:99-102, 1992.
8. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor C, May R: Detection of cytomegalovirus in urine from newborn by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis*, 1157-1184, 1988.
9. Gleaves C, Smith T, Shuster A, Pearson R: Comparison of standard tube and shell-vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 21:217-221, 1985.
10. Ashley R, Peterson E, Abbo H, Gold D, Corey L: Comparison of monoclonal antibodies for rapid detection of cytomegalovirus in spin amplified plate cultures. *J Clin Microbiol*, 27:2858-2860, 1989.
11. Leland DS, Hansing RL, French MLV: Clinical experience with cytomegalovirus isolation using conventional cell cultures and early antigen detection in centrifugation-enhanced shell vial cultures. *J Clin Microbiol*, 27:1152-1163, 1989.
12. Marsano, Perillo R, Flyle M, Hanto D, Spitzer E, Thomas JR, Murray PR, Windus DW, Brunt EM, Storch GA: Comparison of culture and serology for the diagnosis of cytomegalovirus in kidney and liver transplant recipients. *J Infect Dis*, 161:454-461, 1990.
13. Rabella N, Drew L: Comparison of conventional and shell vial cultures for detection cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol*, 28:806-807, 1990.
14. Hsia K, Spector DH, Lawrie J, Spector SA: Enzymatic amplification of human cytomegalovirus by polimerasa chain reaction. *J Clin Microbiol*, 27:1802-1809, 1989.