

Comparación de la PCR cuantitativa y la antigenemia en la infección por citomegalovirus en el trasplante renal

Antoni Bordils¹, Jaime Sánchez Plumed¹, Isabel Beneyto¹, David Ramos¹, Victoria Mascarós¹, José Miguel Molina², Juan Córdoba², Javier García¹, José Miguel Cruz¹

¹ Servicio de Nefrología, ² Servicio de Microbiología.
Hospital Universitario La Fé. Valencia. Spain

RESUMEN

Introducción: La carga viral de citomegalovirus (CMV) se relaciona con el desarrollo de enfermedades por el mismo. La concentración de antígeno pp65 se utiliza como indicador de la carga viral, aunque presenta numerosos inconvenientes en su realización e interpretación. La PCR cuantitativa podría tener una alta sensibilidad y un valor predictivo de las enfermedades por CMV.

Métodos: El estudio incluye 100 trasplantes renales. En el momento del ingreso se

realiza una detección de IgM e IgG y en los días 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 y 360 se realiza una antigenemia en sangre (pp65) y orina (AO) y una PCR cuantitativa en sangre (PCR). Entre noviembre de 2003 y julio de 2004 se han incluido 55 pacientes que han alcanzado los 90 días de observación. La edad media (\pm DT) de los pacientes fue 51,1 años (\pm 13,2). El 91% de los pacientes presentaban títulos anti-IgG positivos y todos tenían títulos anti-IgM negativos en el momento basal. **Resultados:** De total de 392 visitas se encontraron 3 (1%) muestras positivas con AO, 7 (2,5%) con PCR y 1 (0,3%) con pp65. El 97,6% de las muestras fueron PCR y pp65 negativas y 1 (0,3%) fue PCR y pp65 positiva (una concordancia del 98%). La discordancia entre ambos métodos fue del 2% (6 muestras PCR positiva y pp65

Recibido em: 12/04/2005

Aceite em: 17/06/2005

negativa). Se vio un caso de fiebre compatible con infección, con una PCR positiva (749 copias/mL) y pp65 y AO negativas. El 96,6% de las muestras fueron AO y PCR negativas y el 0,3% fueron positivas para ambos métodos (una concordancia del 97%). No coincidieron en el 3% de las muestras.

Conclusión: Los resultados preliminares de este estudio demuestran que el método PCR cuantitativo puede ser una herramienta útil y rápida en la valoración de la infección por CMV.

Palabras clave: Trasplante renal, Antígeno pp65, citomegalovirus, cultivo shell-vial, PCR.

SUMMARY

COMPARISON OF QUANTITATIVE PCR AND ANTIGENEMIA IN CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN RENAL TRANSPLANTION RECIPIENTS

Introduction: Cytomegalovirus infection is a highly common complication in renal transplantation. Viral load of cytomegalovirus is related to the infection. Antigen pp65 levels are used as an indicator of cytomegalovirus viral load, although the technique is difficult to perform and interpret. Quantitative polymerase chain reaction could have a high sensitivity and predictive value in cytomegalovirus infection.

Methods: The study includes 100 renal transplant recipients. At the time of admission, IgM and IgG screening were performed. On days 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 and 360, antigenemia tests in blood and urine were conducted, and a quantitative polymerase chain reaction in blood. A total of 55 patients were recruited between November 2003 and July 2004 (age: 51.1 ±13.2 years) and were all monitored for a mini-

mum of 90 days. 91% of the patients presented positive anti-IgG titres and all of them presented negative anti-IgM titres at baseline. All patients were given Valganciclovir as prophylaxis throughout the study.

Results: Out of a total of 392 visits, 3 samples (1%) were found to be positive with urine antigen, 7 (2.5%) with polymerase chain reaction and one (0.3%) with antigenemia. A total of 97.6% of the samples were both polymerase chain reaction and antigenemia negative and one (0.3%) was polymerase chain reaction and antigenemia positive (98% concordance). Discordance between both methods was 2% (6 samples were polymerase chain reaction positive and antigenemia negative). One case presented fever compatible with infection, and had a positive polymerase chain reaction (749 copies/mL) and negative antigenemia and urine antigen. A total of 96.6% of samples were urine antigen and polymerase chain reaction negative, and 0.3% were positive using both techniques (97% concordance). 3% of the samples showed no agreement.

Conclusion: The preliminary results of this study demonstrate that quantitative polymerase chain reaction could be a useful and fast tool to diagnose and monitor CMV infection.

Key words: Antigenemia, cytomegalovirus, polymerase chain reaction, shell-vial culture, renal transplantation.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad por citomegalovirus (CMV) es la infección más importante en el trasplante de órgano sólido, tanto por su alta prevalencia (hasta dos tercios de los pacientes trasplantados ha tenido contacto con el virus), como

por sus implicaciones pronósticas, pudiendo presentarse desde un cuadro viral inespecífico, hasta una neumonitis grave y potencialmente mortal.¹⁻⁵

La mayor incidencia de la infección se produce durante los tres primeros meses postrasplante³, secundario a la mayor intensidad de la inmunosupresión. Se asocia a una menor supervivencia del injerto debido a que aumenta la incidencia de rechazo agudo, de nefropatía crónica del trasplante debido a una mayor expresión de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, y en caso de infección grave por CMV se reduce la inmunosupresión como parte del tratamiento, incrementando, en consecuencia, el riesgo de rechazo. Asimismo, aumenta el riesgo de infecciones por otros patógenos oportunistas⁶⁻⁸.

Desde el punto de vista diagnóstico es de importancia vital detectar y cuantificar la carga sistémica de CMV para predecir la enfermedad y monitorizar el tratamiento antiviral. Para tal fin, las técnicas de detección del virus mediante determinación del antígeno en sangre (pp65), orina u otros fluidos, así como los métodos de detección de DNA del virus en sangre, tanto cualitativos como cuantitativos, han desplazado a los cultivos clásicos y otros métodos histológicos⁹⁻¹¹. Numerosos estudios han demostrado que la carga viral de CMV se asocia con el desarrollo de enfermedad, utilizándose actualmente la concentración de antígeno pp65 como indicador de la carga viral^{3,12-14}. Sin embargo, esta técnica es muy laboriosa, el intervalo de tiempo entre la toma de la muestra y su procesamiento debe ser menor a tres horas y su interpretación requiere personal experimentado. Dado el gran avance en el diagnóstico precoz, actualmente, es posible determinar la carga viral, en términos cuantitativos, mediante amplificación del DNA del CMV, que nos permite un diagnóstico con una alta sensibilidad,

especificidad y precocidad, anticipándose incluso a las manifestaciones clínicas, siendo por lo tanto útil en el tratamiento anticipado o *preemptive*^{9,12,15-26}. La carga viral de CMV nos permite, asimismo, una monitorización de la profilaxis y del tratamiento^{27, 28}.

PACIENTES Y MÉTODOS

El estudio incluye 100 pacientes trasplantados renales. Los *criterios de inclusión* son: Pacientes ≥ 18 años con posibilidad de desarrollar infección por CMV. Los *criterios de exclusión*: Pacientes en diálisis; hipersensibilidad al Valganciclovir, Ganciclovir, Aciclovir y Valaciclovir; mujeres embarazadas o en periodo de lactancia o que no garanticen una contracepción eficaz; neutrófilos < 500 cel/ μ l, plaquetas $< 25.000/\mu$ l, hemoglobina < 8 gr/dl; y tratamiento concomitante con Imipenen-Cilastina. Los pacientes son evaluados en condiciones basales y a los 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 y 360 días del trasplante. Además los pacientes de riesgo reciben Valganciclovir ajustado a función renal durante los tres primeros meses postrasplante.

Características de los pacientes

Se han incluido 55 pacientes entre Noviembre 2003 y Julio 2004 que han alcanzado los 90 días de observación (4 pat., 7%), los 120 días (20 pat., 36%) o los 180 días (31 pat., 56%). La edad media (\pm DT) fue $51,1 \pm 13,2$ años, rango: 23-71 años). El 91% de los pacientes presentaba títulos anti-IgG CMV positivos y todos tenían títulos anti-IgM CMV negativos.

El 89% (49 pat.) padecía hipertensión arterial y el 17% (9 pat.) presentaba diabetes en el

momento del trasplante renal. Los tratamientos inmunosupresores estaban compuestos por: Micofenolato Mofetilo (55 pat., 100%), Corticoides (55 pat., 100%), Tacrolimus (34 pat., 62%) o Sirolimus (5 pat., 9%), Daclizumab (24 pat., 44%) o Basiliximab (8 pat., 15%) y Ciclosporina (15 pat., 27%). Todos ellos recibieron Valganciclovir.

PCR

Se estudiaron las muestras de suero mediante el equipo Amplicor™ CMV Monitor de Roche Diagnostics (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ 08876 USA). Se trata de una prueba cuantitativa de amplificación *in vitro* del ADN del Citomegalovirus (CMV) en plasma o suero humano.

La prueba Amplicor CMV Monitor se basa en cuatro procesos fundamentales: preparación de la muestra (extracción de ADN), amplificación del mismo por PCR usando iniciadores específicos (LC383 y LC342), hibridación con la sonda LC(359) y detección de los productos amplificados.

Se amplifica un fragmento de 365 nucleótidos del gen DNA polimerasa del CMV. La cuantificación se realiza mediante un proceso de amplificación competitiva entre el ADN de la muestra y un estándar interno. La prueba tiene un límite de sensibilidad de 400 copias/mL, y un rango dinámico entre 400 y 200.000 copias/mL.

Se tomaron 200 microlitros del suero de cada paciente y se procesaron siguiendo las instrucciones del fabricante^{29,30}.

Prueba de antigenemia de CMV

Se detectó la presencia de antígenos del CMV en leucocitos extraídos de sangre periférica,

mediante tinción inmunoenzimática (DiaSorin SA Salugia Italia) cuantificando la presencia de células que expresan el antígeno.

Shell vial

Se analizaron las muestras de orina mediante la técnica del Shell vial (Vircell SL Granada España) que detecta los antígenos inmediato-tempranos virales producidos en el cultivo mediante anticuerpos monoclonales con tinción enzimática.

RESULTADOS

El estudio ha generado hasta el momento 392 visitas con datos. La antigenuria ha presentado 3 (1%) muestras positivas, la PCR 7 (2,5%) muestras positivas y la antigenemia 1 (0,3%) muestra positiva. El 97,6% de las muestras fueron PCR y antigenemia (pp65) negativas y 1 (0,3%) fue PCR y pp65 positiva (una concordancia del 98%). La discordancia entre ambos métodos fue del 2% (6 muestras PCR positivas y pp65 negativas). Se vio un caso de fiebre compatible con infección, en el que una muestra de PCR fue positiva (749 copias/mL) y pp65 y antigenuria (AO) negativas. El 96,6% de las muestras fueron AO y PCR negativas y el 0,3% fueron positivas para ambos métodos (una concordancia del 97%). No coincidieron en el 3% de las muestras.

Otro de los objetivos era comprobar la precocidad de la PCR en el diagnóstico. Aunque en este momento no hay datos suficientes, se presenta el caso 19 de la figura 1, donde se comprueba que la PCR se hace positiva 13 días antes que la IgM y 28 días antes de la aparición de la antigenuria (Cultivo Shell vial CMV, orina).

DISCUSIÓN

Con los resultados preliminares de este estudio, la concordancia de la PCR cuantitativa y la antigenemia (Ag pp65) alcanza un 98% y entre a PCR cuantitativa y la antigenuria (cultivo Shell-vial) un 97%. Sin embargo, la PCR cuantitativa presenta más muestras positivas que la antigenemia o la antigenuria y esto, unido al caso descrito en la figura 1, nos hace pensar que la PCR cuantitativa puede anticiparse a la positividad de los antígenos en sangre y orina. Aunque no hay, por el momento, datos para estudiar la sensibilidad y especificidad de los métodos, los resultados obtenidos hasta ahora presentan una técnica, la PCR cuantitativa, que puede sustituir al Ag pp65 o el cultivo Shell-vial para demostrar la infección por citomegalovirus. Además puede tener la ventaja de un diagnóstico más precoz que la antigenemia, incluso anterior a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, que nos permitan, por lo tanto, un tratamiento anticipado o *preemptive*, en lugar de una profilaxis universal. El objetivo de la profilaxis de la infección por CMV es la administración de una droga a aquellos pacientes con alto riesgo de infección, con el fin de evitarla, siendo los pacientes de mayor riesgo los D+,R-³¹⁻³³. Asimismo, son de riesgo aquellos D+,R+, y aquellos pacientes que aun siendo D-, R+ han recibido una pauta de inmunosupresión de inducción con anticuerpos antilinfocitarios. Dependiendo del estado serológico del donante y receptor del injerto renal, existen dos formas de presentación clínica. Infección primaria, en la que el donante transmite la infección a través del injerto renal o leucocitos, siendo el receptor serológicamente negativo (R-). Infección secundaria, pudiendo presentarse como una reactivación del CMV latente del receptor, siendo en este caso el receptor positivo (R+), y el donante positivo (D+) o negativo (D-), o bien una

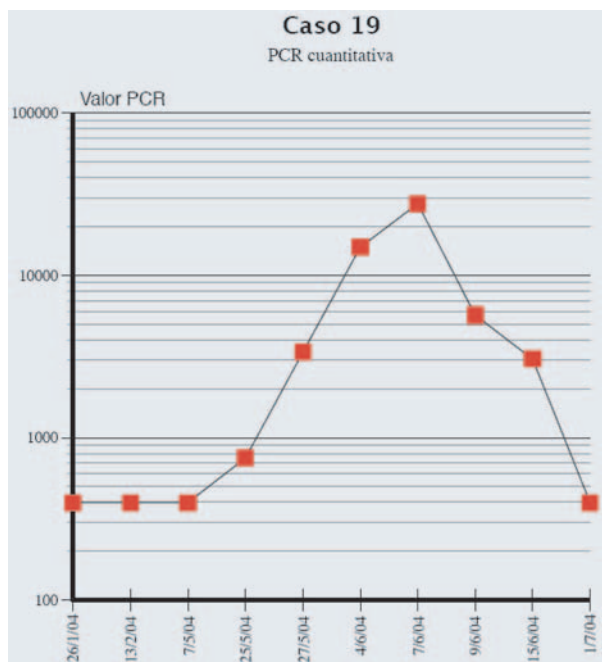


Fig. 1. Evolución de las determinaciones de PCR, Ag en orina e IgM. La línea de puntos señala la evolución de la PCR, indicándose en qué momento comienza su ascenso en sangre. Posteriormente, se indica en qué momento la determinación de la IgM y el cultivo shell-vial son positivos, respectivamente (como es un valor cualitativo, positivo/negativo, se indica sólo en qué momento son positivos, y no cifra numérica). El resto de determinaciones no se señalan, puesto que son negativos. La PCR se positiviza 13 días antes que la IgM, y 28 días antes que el cultivo shell-vial de orina.

reinfección o sobreinfección, donde ambos, donante y receptor, son positivos (D+, R+), y la infección es transmitida del donante al receptor por una cepa de CMV distinta al de este último. En nuestro centro hospitalario se realiza una profilaxis universal a aquellos pacientes considerados de riesgo como anteriormente indicado. El tratamiento anticipado o *preemptive* consiste en la administración del fármaco únicamente a aquellos pacientes en los que se detecte la presencia del virus (infección) antes del desarrollo de las manifestaciones clínicas. Para tal fin es necesario un seguimiento estrecho del paciente, con determinaciones

frecuentes, y con una prueba diagnóstica altamente sensible. En la actualidad, el patrón oro o *gold standard* es la antigenemia en sangre periférica de CMV (pp65). No obstante, dado que la PCR es una prueba altamente sensible, específica, precoz y cuantitativa podría sustituir a corto plazo a la antigenemia en su uso cotidiano a nivel clínico.

Aunque no era un objetivo del estudio, hay que resaltar la eficacia del Valganciclovir como profilaxis de la infección por el CMV, dado que solo existen 11 muestras de un total de 392 visitas donde alguno de los métodos estudiados presenta positividad.

En la actualidad se dispone de varios fármacos antivirales empleados en la infección por el CMV. El Ganciclovir, de amplio uso en la práctica clínica por vía intravenosa, está siendo relegado por otras moléculas dada su escasa biodisponibilidad por vía oral. El Valganciclovir, profármaco del Ganciclovir, con mayor biodisponibilidad por esta vía, es el fármaco de uso más extendido en la actualidad, tanto a nivel terapéutico, profiláctico o como tratamiento anticipado o *preemptive*³³⁻³⁵. Los autores prosiguen la inclusión de pacientes para completar el estudio.

Referencias

1. FISHMAN J A, RUBIN RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998; 338: 1741.
2. RUBIN RH. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplant Infect Dis* 2001; 3: 1-5.
3. SCHÖEDER R, MICHELON T, FAGUNDES I et al. Cytomegalovirus disease latent and active infection rates during the first trimester after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36: 896-898.
4. LJUNGMAN P, GRIFFITHS P, PAYA C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34:1094-7.
5. KETTELER M, PREUSCHOF L, MERTZ A, STOFFLER-MEILICKE M, SCHAFFER H, DISTLER A, OFFERMANN G. Fatal cytomegalovirus pneumonia after preemptive antiviral therapy in a renal transplant recipient. *Clin Nephrol.* 2000;54:418-24.
6. OPELZ G, DÖHLER B, RUHENSTROTH A. Cytomegalovirus prophylaxis and graft outcome in solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant* 2004; 4: 928-36.
7. BORCHERS AT, PEREZ R, KAYSER G, ANSARI A, GERSHWIN ME. Role of cytomegalovirus infection in allograft rejection: a review of possible mechanisms. *Transplant Immunol* 1999; 7:75-82.
8. SAGEDAL S, NORDAL KP, HARTMAN A et al. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2002;850-6.
9. RAZONABLE RR, BROWN RA, WILSON J, GROETTUM C, KREMERS W, ESPY M, SMITH TF, PAYA CV. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation* 2002;73: 968-73.
10. BHATIA J, SHAH BV, MEHTA AP, DESHMUKH M, SIRSAT RA, RODRIGUES C. Comparing serology, antigenemia assay and polymerase chain reaction for the diagnosis of cytomegalovirus infection in renal transplant patients. *J Assoc Physicians India.* 2004;52: 297-300.
11. HADAYA K, WUNDERLI W, DEFFERNEZ C, MARTIN PY, MENTHA G, BINET I, PERRIN L, KAISER L. Monitoring of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant recipients by an ultrasensitive plasma PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3757-64.
12. KALPOE JS, KROES AC, DE JONG MD et al. Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurements and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1498-504.
13. PANCHOLI P, WU F, DELLA-LATTA P. Rapid detection of cytomegalovirus infection in transplant patients. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4:231-42.
14. SIA IG, WILSON JA, GROETTUM CM, ESPY MJ, SMITH TF, PAYA CV. Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation. *J Infect Dis* 2000;181:717-20.
15. BOECKH et al. Optimization of quantitative detection of Cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42: 1142-8.
16. SCHÖEDER R, MICHELON T, FAGUNDES I et al. Comparison between RFLP-PCR and antigenemia for pp65 antigen for diagnosis of cytomegalovirus disease after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2004;36: 891-3.
17. MEYER-KOENIG U, WEIDMANN M, KIRSTE G, HUFTET FT. Cytomegalovirus infection in organ-transplant recipients: diagnostic value of pp65 antigen test, qualitative polymerase chain reaction (PCR) and quantitative Taqman PCR. *Transplantation* 2004;77:1692-8.
18. PIIPARINEN H, HOCKERSTEDT K, GRONHAGEN-RISKA C, LAUTENSCHLAGER I. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral

- loads from peripheral blood of organ transplant patients. *J Clin Virol* 2004;30:258-66.
19. MENGELLE C, PASQUIER C, ROSTAING L et al. Quantification of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplants by real-time quantitative PCR and pp65 antigenemia. *J Clin Microbiol* 2003;41:3840-5.
 20. GOUARIN S, VABRET A, GAULT et al. Quantification analysis of HCMV DNA load in whole blood of renal transplant patients using real-time PCR assay. *J Clin Virol* 2004;29:194-201.
 21. SZOKE K, SZLADEK G, SZARKA K, JUHASZ A, VERESS G, GERGELY L, KONYA J. Human cytomegalovirus load in the peripheral blood determined by quantitative competitive polymerase chain reaction. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2001;48:313-21.
 22. PIIPARINEN H, HOCKERSTEDT K, GRONHAGEN-RISKA C, LAPPALAINEN M, SUNI J, LAUTENSCHLAGER I. Comparison of plasma polymerase chain reaction and pp65-antigenemia assay in the quantification of cytomegalovirus in liver and kidney transplant patients. *J Clin Virol* 2001 ;22:111-6.
 23. XIAO Y, SHI K AND MAO X. Detection of cytomegalovirus antigens and virus DNA in the peripheral blood after organ transplantation. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 1999;13:287-90.
 24. GOOSSENS VJ, BLOK MJ, CHRISTIAANS MH, VAN HOOFF JP, SILLEKENS P, HOCKERSTEDT K, LAUTENSCHLAGER I, MIDDELDORP JM, BRUGGEMAN CA. Diagnostic value of nucleic-acid-sequence- based amplification for the detection of cytomegalovirus infection in renal and liver transplant recipients. *Intervirology*. 1999;42:373-81.
 25. GOOSSENS VJ, BLOK MJ, CHRISTIAANS MH, SILLEKENS P, MIDDELDORP JM, BRUGGEMAN CA. Early detection of cytomegalovirus in renal transplant recipients: comparison of PCR, NASBA, pp65 antigenemia, and viral culture. *Transplant Proc*. 2000; 32:155-8.
 26. SIENNICKA J, DURLIK M, LITWINSKA B, CHMURA A, LEWANDOWSKA D, LAO M, PACZEK L, KANTOCH M. Identification of cytomegalovirus (CMV) infection by different laboratory methods in renal transplant recipients undergoing triple-drug immunosuppressive treatment. *Acta Microbiol Pol* 1999;48:61-71.
 27. LI H, DUMMER JS, ESTES WR et al. Measurements of human cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2003; 41:187-91.
 28. KOUZARIDES T., BANKIER, A.T., SATCHWELL, S.C. et al 1987. Sequence and transcription analysis of the human Cytomegalovirus DNA Polymerase gene. *Journal of virology* 61:125-133.
 29. SAMBROOK J., FRISTH E.F., AND MANNIATIS T. 1989. "Molecular cloning: a laboratory manual", 2nd. Ed. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor laboratory, NY.
 30. LONGO M.C., BERNINGER M.S., AND HARTLEY J.S. Use of Uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction. *Gene* 1990; 93:125-128.
 31. HUMAR et al. Clinical utility of Cytomegalovirus viral load testing for predicting CMV disease in D+/R- solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 1-5.
 32. RAZONABLE RR, PAYA CV. Valganciclovir for prevention and treatment of cytomegalovirus disease in immunocompromised hosts. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004;2:27-41.
 33. SLAVICEK J, PURETIC Z, GLAVAS-BORAS S, SMALCELJ R, BARISIC I, VUKOVIC J, SESO-SIMIC D, SLAVICEK V, HUMAR I, KES P. Primary cytomegalovirus infection after combined cadaveric transplantation of the liver and kidney. *Acta Med Croatica* 2003; 57:87-90.
 34. BABEL N, GABDRAKHMANOV L, JUERGENSEN J, NERMIN E et al. Treatment of Cytomegalovirus Disease with Valganciclovir in Renal Transplant Recipients: A Single Center Experience. *Transplantation* 2004;78:283-85.
 35. CASILLO R, GRIMALDI M, RAGONE E et al. Efficacy and limitations of preemptive therapy against cytomegalovirus infections in heart transplant patients. *Transplant Proc* 2004; 36:651-3.