

DETECCION DE CITOMEGALOVIRUS MEDIANTE LA TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA Y AISLAMIENTO VIRAL.

Maritza ALVAREZ(1), Miguel MARRERO(1), Angel VALDIVIA(1), Serafina GARCIA(1), Odalys VALDES(1)
& Luis MORIER(1).

RESUMEN

En el presente estudio se comparó la técnica de inmunoperoxidasa para la detección de citomegalovirus (IPCMV) utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen proteínas precoces virales con el método convencional de aislamiento viral en fibroblastos humanos. Un total de 150 muestras de orina fueron examinadas encontrando una sensibilidad de un 89.8% y una especificidad de 91.3% de la técnica de IPCMV comparada con el aislamiento viral. Una de las ventajas que presentó la IPCMV fue la rapidez con que fueron obtenidos los resultados (48 horas) mientras que el aislamiento viral fue como promedio 14 días.

UNITERMOS: Citomegalovirus; Inmunoperoxidasa; Aislamiento viral.

INTRODUCCION

Las infecciones por citomegalovirus (CMV) están ampliamente diseminadas, calculándose que aproximadamente 3/4 partes de la población adulta ha estado en contacto con este agente, manteniendo niveles detectables de anticuerpos⁸. La infección en personas inmunocompetentes es generalmente sub-clínica, aunque puede estar asociada a un síndrome similar a la mononucleosis infecciosa o a un cuadro de hepatitis aguda. Sin embargo el virus es especialmente agresivo en neonatos e inmunosuprimidos. En los primeros, la infección por CMV presenta variadas formas clínicas observándose desde cuadros muy graves de enfermedad por inclusión citomegálica hasta formas silentes que provocan secuelas neurológicas a largo plazo¹⁹. En los inmunosuprimidos (transplantados o pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)) esta infección constituye causa frecuente de complicaciones y en no pocas ocasiones puede provocar la muerte^{6,10}.

cultivos de fibroblastos humanos constituye el método más sensible y específico para el diagnóstico de esta virosis, pero tiene como principal inconveniente la lentitud con que los virus de esta familia se desarrollan en los cultivos celulares^{9,14}.

En los últimos años se han normalizado procedimientos que combinan el uso de cultivos celulares con técnicas inmunológicas lo que permite la detección de CMV en menos de 72 horas^{1,2} el mayor éxito de estas técnicas ha estado en el uso de anticuerpos monoclonales que detectan proteínas virales precoces con alta sensibilidad. Otros autores han desarrollado diferentes métodos ELISA para la detección de antígenos en orina¹², tinción por Inmunoperoxidasa¹⁶, detección directa del virus en linfocitos¹⁸, hibridización de ácidos nucleicos¹⁵ y más recientemente la utilización de la amplificación en cadenas de la polimerasa⁵.

El aislamiento e identificación del virus en

En el presente trabajo se compara la técnica clásica de aislamiento e identificación de CMV

(1) Departamento de Virología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Siboney, Ciudad Habana, Cuba.

Dirección para correspondencia: Dra. M. Alvarez, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" Apartado Postal N° 601, Marianao, C. Habana, Cuba.

con la técnica de inmunoperoxidasa mediante la utilización de anticuerpos monoclonales que detectan proteínas virales precoces de multiplicación viral en cultivos de fibroblastos humanos donde han sido inoculadas muestras de orina.

MATERIALES Y METODOS

Fueron estudiadas muestras de orina de 150 pacientes enviadas al laboratorio para el diagnóstico de infección por CMV, 100 de ellos presentaban el antecedente de infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en diferentes estadios clínicos; el resto de las muestras provenían de pacientes con sospecha clínica de infección por CMV (transplantados, hemodializados o recién nacidos). Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Virología del IPK a 4°C donde fueron conservadas a esta temperatura hasta su procesamiento (menos de 48 horas). Las muestras fueron centrifugadas a 4°C por 10' a 1000 rpm el sobrenadante fue separado tratándose con antibióticos (penicilina 100U/ml y neomicina 100 ug/ml de concentración final).

Células y virus

Fue utilizado, como sistema celular, una línea de fibroblasto humano diploide de pulmón fetal (Ph) obtenida en el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" la cual fue utilizada entre los pases 10 y 20. Los cultivos se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM) con base Eagle, contenido 20 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 ug/ml de estreptomycin y suero de ternero fetal en concentración del 10% para la multiplicación de las células y de 2% para el medio de mantenimiento.

La cepa CMV AD169 con alto título viral obtenido en fibroblastos humanos, fue sometida a 3 ciclos de sonicación y almacenada en alícuotas a -70°C para su utilización como control positivo.

Aislamiento viral

Cada muestra fue inoculada por duplicado en tubos de cultivo cuando la monocapa celular estuvo confluyente, según el procedimiento descrito¹⁴. Los cultivos fueron examinados dos veces por semana en búsqueda de efecto citopático (ECP) de CMV. Después de 15 días de incubación los cultivos negativos fueron tripsinizados, reinoculados y

se completo la observación durante otros 15 días y si no hubo evidencias de ECP fueron informados como negativos.

Identificación de los aislamientos

Estos fueron identificados por la aparición del ECP característico de CMV y por inmunofluorescencia indirecta utilizando una gammaglobulina hiperinmune anti CMV.

Detección de CMV por Inmunoperoxidasa (IPCMV)

Fueron preparadas placas de 24 pocillos con la línea celular (Ph) a una concentración de 100000 células por ml en medio MEM al 10% de suero de ternero fetal (STF). Cuando la monocapa estuvo confluyente, las orinas fueron inoculadas 0,2 ml por duplicado a 0,2 ml por pocillo; la incubación de las muestras se realizó por centrifugación 1 hora a 30°C con el objetivo de aumentar la infectividad del HCMV¹¹. Después de la centrifugación, los inoculos fueron eliminados volteando la placa, y se añadió 1 ml de medio al 2% de STF. Seguidamente las placas fueron incubadas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 48 horas.

Posteriormente las células fueron fijadas con metanol y se procedió a realizar la técnica de IPCMV. El anticuerpo monoclonal E13 (Biosoft) dirigido contra proteínas precoces del virus, fue diluido 1:40 en solución fosfato tamponada (PBS ph 7,4) y aplicado en cada pocillo de la placa, la cual fue incubada por 1 hora a 37°C en cámara húmeda, posteriormente se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS ph 7,4 y se añadió una antiinmunoglobulina de ratón en carnero conjugada con peroxidasa (IPK, C. Habana) diluida 1:500 en PBS ph 7,4, incubándose también por 1 hora, después se realizaron los lavados como se describió anteriormente y se añadió el sustrato insoluble diaminobencidina (Sigma EU) con H₂O₂. Las placas fueron examinadas utilizando un Microscopio óptico invertido con objetivos 20X y 40X. La positividad fue constatada por la aparición de núcleos celulares teñidos de color marrón que se distinguen fácilmente de los controles no infectados (Fig. 1).

Las muestras fueron codificadas al azar realizándose la lectura por dos observadores independientes.

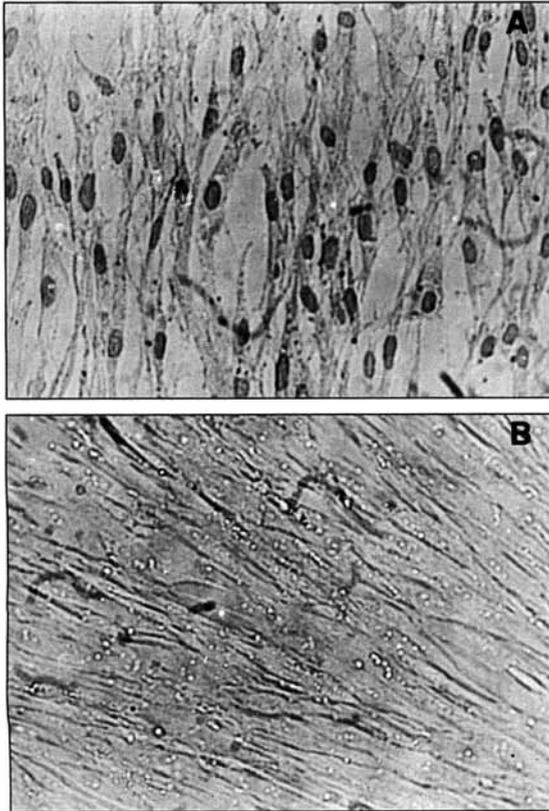


Fig. 1 - A. fibroblastos no infectados, B. fibroblastos infectados con CMV; se observan los núcleos marrón por la tinción de la peroxidasa.

RESULTADOS

De un total de 150 muestras estudiadas se hallaron 69 positivas por IPCMV (46%) y 69 muestras positivas por aislamiento viral (46%). De las 69 muestras positivas por IPCMV el virus fue aislado en 62 (especificidad 91,3%), mientras que en las 69 muestras positivas por aislamiento viral el virus fue detectado en 62 (sensibilidad 89,8%). Se observó además que ambas técnicas arrojaron resultados similares en 136/150 muestras para una coincidencia del 90,6%. El análisis de la IPCMV como prueba diagnóstica demostró que posee un valor predictivo positivo de un 89,8% y un valor predictivo negativo de un 91,3% (Tabla 1).

Al estudiar a los pacientes con antecedentes de infección por VIH se observó que el aislamiento viral fue positivo en 51/100 (51%) mientras que la IPCMV fue positiva en 53/100 (53%). En las mues-

tras de orina provenientes de otros pacientes sospechosos clínicamente de la infección por CMV se observó que el aislamiento viral fue positivo en 18/50 (36%) y la prueba IPCMV fue positiva en 16/50 (32%) (Tabla 2). Los aislamientos se obtuvieron entre 10-28 días para un promedio de 14 días.

Tabla 1 - Comparación de los resultados obtenidos por la IPCMV y el aislamiento viral.

		Aislamiento viral	
		+	-
I P C M V	+	62	7
	-	7	74

SENSIBILIDAD: 89,8%
ESPECIFICIDAD: 91,3%
COINCIDENCIA: 90,6%
(+: positivo -: negativo)

Tabla 2 - Detección de Citomegalovirus por IPCMV y aislamiento viral de acuerdo al origen de las muestras.

	IPCMV	Aislamiento Viral
Muestras de pacientes infectados con VIH	53/100 (53%)	51/100 (51%)
Muestras de pacientes sospechosos de infección por CMV	16/50 (32%)	18/50 (36%)
Total	69/150 (46%)	69/150 (46%)

DISCUSION

Debido a la importancia de disponer de un método rápido para la identificación de CMV en muestras clínicas se han desarrollado, en los últimos años, diferentes metodologías. Las técnicas basadas en la utilización de anticuerpos monoclonales que detectan proteínas virales precoces en los tejidos inoculados^{1,2}, manteniendo gran aceptación ya que permiten realizar el diagnóstico en solo 48 horas, mucho más rápido que el aislamiento viral que puede prolongarse hasta 30 días.

La técnica de inmunoperoxidasa ha sido utilizada con éxito para la detección de antígenos en

diferentes tejidos, presentando como principal ventaja su alta sensibilidad y el hecho de que la lectura puede realizarse con un Microscopio óptico⁴. Especialmente para la detección de CMV en muestras clínicas la técnica ha sido utilizada por diferentes autores con buenos resultados^{7,16}.

En este estudio se presenta la normalización de la (IPCMV) en muestras de orina, utilizando para ello cultivos en placas de 24 pocillos sobre las cuales las muestras fueron inoculadas y posteriormente centrifugadas para facilitar el contacto y por lo tanto la penetración y multiplicación del virus.

GLEAVES et al.⁷ hallaron una coincidencia de un 94,7% entre los sistemas de peroxidasa anti-peroxidasa para la detección de CMV y el aislamiento viral. Estos autores reportaron una mayor sensibilidad de la técnica peroxidasa anti-peroxidasa observando que en todos los casos en que el aislamiento viral fue positivo, el virus fue detectado previamente.

En el presente trabajo la sensibilidad de la IPCMV fue de un 89,8% encontrándose 7 muestras positivas por aislamiento viral en las cuales el virus no fue detectado por IPCMV. PAYA et al.¹³ describieron que estos falsos negativos por IPCMV podrían ser el resultado del bajo nivel de virus de la muestra, basándose en que el ECP del CMV aparece mucho más tardamente en los casos negativos por IPCMV que en los positivos; en nuestro estudio en estos 7 casos el ECP de CMV comenzó después de los 21 días (x=24 días).

La especificidad de la IPCMV (91,3%) en este trabajo estuvo afectada por la aparición de 5 casos positivos por IPCMV y negativos por ECP, como explicación de este fenómeno GOLSTEIN et al.⁹ señalan que la susceptibilidad de los fibroblastos humanos a la infección por CMV puede variar en un rango de 10 y por lo tanto la propagación de la infección a las células vecinas se retardaría y por consiguiente el ECP. Además la aparición del ECP puede depender de otros factores como la calidad de la muestra, la concentración de virus presente y la capacidad de las células de permitir el ciclo completo de la multiplicación viral. En nuestra experiencia y debido a la objetividad de la lectura (ver fig.) consideramos que estos casos podrían ser falsos negativos de los cultivos más que falsos positivos de la prueba IPCMV. Aunque no constituyó un objetivo fundamental del trabajo, es necesario

señalar la alta frecuencia con que la infección por CMV fue detectada en los pacientes infectados por VIH (51%). Se ha reportado que la infección por CMV constituye la causa más frecuente de infecciones oportunistas virales en estos pacientes¹⁷, BLASER et al.³ encontraron la presencia de infección activa por CMV en el 48% de una población de homo y bisexuales infectados por VIH.

El método IPCMV utilizado fue útil para la detección de CMV en orinas, siendo capaz de discriminar al 90% de las poblaciones positivas o negativas en aproximadamente 48 horas; la utilización de placas de 24 pocillos facilitó la lectura y el manejo simultáneo de un gran número de muestras.

SUMMARY

Cytomegalovirus detection by Immunoperoxidase assay and viral isolation

An Immunoperoxidase assay was applied to detect early antigens of cytomegalovirus (CMV) in 150 urine samples from immunocompromised patients, using the commercial available monoclonal antibody against CMV E13. The detection of early antigen by IP (IPCMV) is compared to the conventional cell culture isolation regarding specificity and sensitivity in order to evaluate its usefulness in the diagnostic of CMV infections. The IPCMV showed a sensitivity of 89.8% and a specificity of 91.3% when compared to the isolation method. The great advantage of the IPCMV is based on the shorter time results are achieved, since 48-72 Hs can be enough to provide evidence of CMV infection, while in the isolation technique cytopathogenic effect was present around 14 days after sample inoculation.

REFERENCIAS

1. ALPERT, G.; MAZERON M.C.; COLIMON, R. & PLOTKIN, S. - Rapid detection of human cytomegalovirus in the urine of humans. *J. infect. Dis.*, 152:631-633, 1985.
2. ANDERSON, C.H. & MICHAELS, R.H. - Cytomegalovirus infections detection by direct fluorescent-antibody technique. *Lancet*, 2:308-309, 1987.
3. BLASER, J.M. & COHN, D.L. - Opportunistic infections in patients with AIDS. Clues to the epidemiology of AIDS and the relative virulence of pathogens. *J. infect. Dis.*, 8:21-30, 1986.

4. COREY, L.; DRAVAGON, J. & BENJAMIN, D. - Rapid methods and automation in microbiology. In: TILTON, R.C., ed - **Immunoperoxidase staining in the clinical virology laboratory**, Washington, American Society for Microbiology, p.246-253.
5. DEMMLER, G.J.; BUFFONE, G.J.; SCHIMBOR, C.M. & MAY, R.A. - Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J.infect.Dis.*, **158**:1177-1184, 1988.
6. FORBES, B.A. - Acquisition of cytomegalovirus infections. An update. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2**:202-261, 1989.
7. GLEAVES, C.A.; SMITH, T.F.; SHUSTER, E.A. & PEARSON, G.R. - Rapid detection of cytomegalovirus in MRC 5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J. clin. Microbiol.*, **19**:917-919, 1984.
8. GLENN, J. - Cytomegalovirus infections following renal transplantation. *Rev. infect. Dis.*, **3**:1151-1178, 1981.
9. GOLDSTEIN, L.C.; DOUGALL, J.K.; HACKMAN, R.C.; MIGERS, J.D.; THOMAS, E.D. & NOWINSKI, R.C. - Monoclonal antibodies to cytomegalovirus rapid identifications of clinical isolates and preliminary use in diagnosis of cytomegalovirus pneumonia. *Infect. Immun.*, **38**:273-281, 1982.
10. HO, M. - Cytomegalovirus biology and infection currents topics in infectious diseases. In: GREENOUGH, W.B. & MERIGAN, T.C., ed. **Human cytomegalovirus infections in immunocompromised patients**. New York, Plenum Publishing, 1982. p.171-204.
11. HUDSON, J.B., MISRA, V. & MOSMANN, T.R. - Cytomegalovirus infectivity: analysis of the phenomenon of centrifugal enhancement of infectivity. *Virology*, **72**:235-243, 1976.
12. NAQUI, S.H. & BLAIR, L.L. - Detection of cytomegalovirus antigen and antibodies in the urine in small infants and children. *J.med.Virol.*, **18**:139-147, 1986.
13. PAYA, C.V.; WOLD, D.A. & SMITH, T.F. - Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by shell vial assay and conventional tubes cell cultures. *J.clin.Microbiol.*, **25**:755-777, 1987.
14. REYNOLDS, D.W.; STAGNO, S. & ALFORD, C.A. - Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. In: LENNETTE, E.H. & SCHMIDT N.J., ed. - **Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections**. 5th. ed. Washington, American Public Health Association, 1979. p.399-439.
15. SPECTOR, S.A.; RUA, J.A.; SPECTOR, D.H. & MCMILLIAN, R. - Detection of human cytomegalovirus in clinical specimens by DNA DNA hybridisation. *J.infect.Dis.*, **150**:121-126, 1984.
16. SWENSON, P.D. & KAPLAN, N.H. - Rapid detection of cytomegalovirus in cell cultures by indirect immunoperoxidase staining with monoclonal antibodies to an early nuclear antigen. *J.clin.Microbiol.*, **21**:669-673, 1985.
17. TYMS, A.S.; TAYLOR, D.L. & PARKIN, J.M. - Cytomegalovirus and the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *J.Antimicrob. Chemother.*, **23**:89-105, 1989.
18. VANDERBY, W.; TORENSMA, R.; VANSON, W.J.; ANEMA, J.; SCHIRM, J.; TEGZESS, A.M. & THE, A.M. - Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibodies staining by blood leucocytes. *J.med.Virol.*, **25**:179-188, 1988.
19. YOW, M.D. - Congenital cytomegalovirus diseases. A new problem. *J.infect.Dis.*, **159**:163-167, 1989.

Recebido para publicação em 16/05/1990
Aceito para publicação em 18/03/1991