

## DIAGNOSTICO RAPIDO DE CITOMEGALOVIRUS (CMV) EN PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE RECONOCEN PROTEINAS PRECOCES VIRALES

MARITZA ALVAREZ, MIGUEL MARRERO, MARITZA SOLER, LISSETTE PUIG, DARIO MORENO\*, LEONARDO REYES\*, AIDA CASTILLO

Instituto Medicina Tropical "Pedro Kouri", Departamento de Virología, Apartado postal 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba \* Instituto de Nefrología, C. Habana, Cuba

**Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients by using monoclonal antibodies against early viral antigens** – *A technique was applied to detect early fluorescent antigens (DEFA) of cytomegalovirus (CMV) using the E13 monoclonal antibodies in 52 immunocompromised patients hospitalized in the Nephrology Institute of Havana. Of the 75 urine or blood (buffy coat) samples taken, 15 were found positive to CMV. Using classical diploide human fibroblast isolation technique, 12 CMV strains were isolation of previously detected positive samples by DEFA. In addition, CMV was isolated from one sample reported to be negative by DEFA. A coincidence of 80% was found between both techniques. With the ELISA test, all the sample studied have IgG antibodies to CMV.*

Key words: cytomegalovirus – monoclonal antibodies – rapid diagnose – immunocompromised

Las infecciones por Citomegalovirus (CMV) se encuentran ampliamente difundidas en todas las regiones del planeta, afectando tanto a las comunidades mas subdesarrolladas como a las poblaciones de los países industrializados. Este agente viral, perteneciente a la familia de los Herpesvirus, comparte con ellos la característica de provocar infecciones latentes que pueden presentar recurrencias periódicas cuyos mecanismos desencadenantes aún no son bien conocidos.

En los receptores de transplantes renales alrededor del 25% de las muertes y aproximadamente el 20% de todos los rechazos al transplante están asociados a las infecciones por CMV (Glenn, 1981).

Convencionalmente el diagnóstico de las infecciones por CMV se realiza mediante el aislamiento viral en células fibroblásticas humanas, proceso que puede requerir hasta 30 días para su terminación haciéndose cada vez mas imperiosa la necesidad de contar con técnicas que permitan un diagnóstico rápido y preciso. En los últimos tiempos se han obtenido anticuerpos monoclonales capaces de detectar glicoproteínas precoces virales que aparecen en

las etapas mas tempranas del ciclo de multiplicación viral, localizándose en el núcleo celular. La utilización de este tipo de anticuerpo ha permitido desarrollar una técnica de diagnóstico rápido que combina el aislamiento viral y la inmunofluorescencia indirecta (Gleaves et al., 1984).

En el presente trabajo se describe la utilización de esta metodología para el diagnóstico de la infección por CMV en pacientes con alteraciones renales, sometidos a transplantes, hemodiálisis y diálisis peritoneal, comparando su efectividad con los sistemas clásicos de aislamiento viral en cultivos fibroblásticos humanos.

### MATERIALES Y METODOS

Fueron estudiados un total de 52 pacientes con padecimientos renales que se encontraban sometidos a diferentes tratamientos en el Instituto de Nefrología, Ciudad Habana. De ellos 10 eran transplantados, 38 se realizaban hemodiálisis dos veces por semana y 4 diálisis peritoneal con igual frecuencia; 24 correspondieron al sexo femenino y 28 al masculino. Las edades límites fueron 16 y 60, para un promedio de edad de 37 años.

10 sólo orina; para un total de 75 muestras, las cuales fueron colectadas de forma aséptica y enviadas a 4 °C al laboratorio de Virología.

El "buffy coat" (linfocitos) y las orinas fueron procesadas por los métodos previamente descritos (Reynolds et al., 1979).

*Células:* como sistema celular fue utilizada la línea de fibroblastos humanos diploides MRC-5 obtenida a partir de tejido de pulmón de feto que contaban entre 30-35 pases en el momento de su utilización. Las células se mantuvieron en Medio Mínimo Esencial con base Eagle (MEM), al cual se adicionaron 1% de glutamina, 0,5% de penicilina-estreptomicina y suero de ternero fetal en concentración de 10% para la multiplicación de las células y de 2% para el medio de mantenimiento.

*Virus:* como control positivo fue utilizada la cepa patrón de referencia CMV AD-169.

*Anticuerpos monoclonales:* fue utilizado el anticuerpo monoclonal anti-CMV clono E-13 (Biosoft, Francia), el cual está dirigido contra un antígeno intranuclear precoz producido en las células infectadas por el virus entre las 24 y 48 horas después de la inoculación (Mazeron et al., 1984).

*Conjugado:* se utilizaron inmunoglobulinas de carnero anti-inmunoglobulinas de ratón conjugadas con isotiocianato de fluoresceína ("Diagnostic Pasteur").

*Procedimiento:* cada muestra fue inoculada por duplicado en el sistema celular utilizado persiguiendo dos objetivos: detección del virus mediante la observación del efecto citopático (ECP) y la detección de los antígenos virales precoces mediante el empleo de anticuerpos monoclonales en la técnica de inmunofluorescencia indirecta. El aislamiento viral se realizó en tubos convencionales sobre un cultivo rotatorio de acuerdo a lo descrito por Gleaves et al. (1985). Los tubos se observaron dos veces por semana en búsqueda del ECP de CMV; después de 15 días de incubación los cultivos negativos fueron tripsinizados y reinoculados y se completó la observación por otros 15 días.

La detección de antígenos virales precoces se llevó a cabo siguiendo los principios aplicados por Mazeron et al. (1984) con tres

variaciones: a) se utilizan tubos Leighton en lugar de viales de fondo plano; b) no se aplicó centrifugación a baja velocidad; c) la inmunofluorescencia se realizó a los tres días de inoculación.

Para la observación se utilizó un microscopio Leitz, Diaplan utilizando objetivo 20X para la observación inicial y 40X para la confirmación. Se consideraron positivas las muestras en la cuales se observaron dos o más núcleos celulares fluorescentes. Para eliminar la posibilidad de falsos positivos por artefactos fluorescentes, las células fueron también observadas alternativamente con luz blanca.

La observación del ECP y la inmunofluorescencia fueron realizadas por dos observadores de forma independiente y las muestras fueron codificadas al azar realizando la lectura a doble ciego.

Para el estudio serológico se utilizó un juego comercial (Enzygnost-Cytomegalie, Behring) para la detección de anticuerpos Ig G anti CMV por la técnica de microanálisis inmunoenzimático de tipo indirecto, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las lecturas fueron realizadas en un espectrofotómetro Titertek Multiskan (Flow Laboratories).

## RESULTADOS

Utilizando la prueba DAPF fue posible establecer el diagnóstico de la infección por CMV en 15 pacientes de los 52 estudiados, para un 28,8%; mientras que por las técnicas clásicas de cultivos celulares fue posible realizar el diagnóstico en 13 de los 52 pacientes (25%); todos los cuales fueron previamente positivos por DAPF, al menos en una de las muestras (sangre u orina) (Tabla).

De 42 muestras de sangre, 8 fueron positivas por la técnica de DAPF (19%) y en 6 de ellas fue posible aislar el virus (14,2%). En 33 orinas investigadas, se obtuvieron 7 muestras positivas por DAPF (21,2%), de las cuales en 6 fue posible aislar el virus; además se realizó un aislamiento viral en una muestra negativa por DAPF, obteniéndose un total de 7 aislamientos (21,2%) a partir de las 33 muestras de orina estudiadas. La sensibilidad y la especificidad de DAPF con respecto al aislamiento viral fue de



92,3% y 95,16% respectivamente, el aislamiento viral se produjo, en general, entre los 7 y los 24 días postinoculación, necesitándose un promedio de 14,8 días para aislar el virus. La coincidencia entre ambas técnicas fue de un 80%. Hubo un solo caso en que pudo detectarse la excreción del virus simultáneamente en la sangre y en la orina.

Se procesaron 42 muestras de plasma de diferentes pacientes, los cuales presentaron todos anticuerpos a CMV de tipo Ig G determinados por la técnica ELISA.

TABLA

Resultados del aislamiento viral y la serología en los 15 pacientes positivos por "DAFP"

No.	Clasificación	Muestra	DAFP (72 horas)	ECP	Anticuerpos
1	Hemodiálisis	Sangre	+	+	+
2	Transplante	Orina	+	+	+
3	Transplante	Sangre	+	+	+
4	Transplante	Sangre	+	-	+
5	Transplante	Orina	+	+	+
6	Hemodiálisis	Orina	+	+	+
7	Hemodiálisis	Sangre	+	-	+
8	Hemodiálisis	Sangre	+	+	+
9	Transplante	Orina	+	+	+
10	Diálisis peritoneal	Orina	+	-	+
11	Hemodiálisis	Sangre	+	+	+
12	Hemodiálisis	Orina	+	+	+
13	Hemodiálisis	Sangre	+	+	+
14	Hemodiálisis	Orina	+	+	+
15	Hemodiálisis	Sangre	+	+	+
		Orina	-	+	+

DISCUSION

Debido a las dificultades en la interpretación de las pruebas serológicas en pacientes inmunocomprometidos (Griffiths & Kangro, 1984; Griffiths, 1987), el diagnóstico de la infección por citomegalovirus en estos casos implica la realización de al menos uno de los siguientes procedimientos: a) aislamiento viral; b) observación directa del virus en los fluidos corporales; c) demostración de los antígenos virales y/o d) detección de secuencias homólogas de ADN en las muestras estudiadas (Vonsover et al., 1987). La demostración de antígenos precoces de CMV constituye un método excelente para el diagnóstico, que aventaja al aislamiento viral por su rapidez y economía, permitiendo un diagnóstico acelerado que facilitaría una adecuada conducta en estos pacientes (Gleaves et al., 1984).

En el presente estudio se logró detectar la presencia de CMV en 15 de 52 pacientes inmunocomprometidos, para un 28,8% de positividad. Mazon et al. (1984) demostraron la presencia de CMV en la sangre de 8 de 51 pacientes sometidos a transplante de médula ósea. Swenson & Kaplan (1987) analizaron muestras de orina, lavados bronquioalveolares y linfocitos, encontraron que al aplicar la técnica de inmunoperoxidasa para la detección de antígenos precoces se detectaron 30 casos positivos de 200 muestras a las 24 horas de inoculación. En estos estudios los cultivos celulares fueron sometidos a una centrifugación a baja velocidad con el objetivo de facilitar los procesos de adsorción y penetración viral, lo cual hace posible una expresión mas temprana de las proteínas precoces que en ocasiones pueden ya detectarse a la 16 horas después de la inoculación (Hudson et al., 1976). No se utilizó la centrifugación y las células se fijaron a las 72 horas de inoculadas, lo cual no afecta la sensibilidad de la técnica de acuerdo a lo referido en la literatura (Thiele et al., 1987; Gleaves & Meyers, 1987).

De las 15 muestras positivas por la técnica DAFP, se logró aislar el virus en 12 de ellas para una coincidencia de un 80% entre ambos procedimientos, además se aisló una cepa de CMV de una muestra negativa por DAFP, cuyo cultivo requirió 24 días.

Mazon et al. (1984) encontraron una coincidencia de un 100% entre los casos detectados por DAFP y aquellos positivos por aislamiento viral; mientras que Swenson & Kaplan (1987) sólo lograron aislar 23 de 41 casos positivos por la técnica de detección de antígenos precoces, con una coincidencia del 56%, siendo en este caso la detección de antígenos precoces mas sensible que el aislamiento viral.

Griffiths & Kangro (1984) demostraron que la técnica DAFP tenía una especificidad de 100% y una sensibilidad del 80%, al compararse con las técnicas de cultivo convencionales. En otro estudio Gleaves et al. (1985) detectaron 124 casos positivos por DAFP de 770 muestras y lograron aislar 88 cepas de CMV (70,9% de coincidencia). Además encontraron que todos los casos en que se efectuó el aislamiento viral fueron positivos por inmunofluorescencia.

En el presente trabajo el aislamiento viral se produjo como promedio a los 14,8 días. Similar

a lo reportado por otros autores que utilizan el mismo sistema celular (Mazeron et al., 1984; Swenson & Kaplan, 1987).

De los 2 tipos de muestras que se colectaron para este trabajo, las de orina aportaron un mayor porcentaje de positividad (21,2%), lo cual coincide con lo referido en publicaciones recientes (Gleaves et al., 1984; 1985).

La necesidad de realizar un diagnóstico rápido de la infección por CMV en el paciente inmunocomprometido se acrecienta por el hecho de que una vez producido un daño tisular extenso, no cabe esperar el éxito de ninguna medida terapéutica. Aunque hasta estos momentos no se ha encontrado ningún fármaco antiviral específico contra CMV, el uso del ácido fosfonofórmico (Forcarnet), el IFN alfa y las gammaglobulinas humanas con altos títulos de anticuerpos a CMV han proporcionado resultados alentadores (Griffiths, 1987).

El presente trabajo confirma el valor de la prueba DAPF para la detección de los CMV, ya que a las 72 horas fue posible establecer el diagnóstico en las condiciones empleadas. Aunque no hubo una tercera prueba confirmatoria que permitiera comparar la detección de antígenos precoces con el aislamiento viral, la DAPF, al presentar un patrón de inmunofluorescencia nuclear característico, tiene poca posibilidad de arrojar resultados falsos positivos (Gleaves et al., 1985; Swenson & Kaplan, 1987).

#### RESUMEN

**Diagnóstico rápido de Citomegalovirus (CMV) en pacientes inmunocomprometidos mediante anticuerpos monoclonales que reconocen proteínas precoces virales** – Se aplicó la técnica de detección de antígenos precoces fluorescentes (DAPF) usando el anticuerpo monoclonal E-13 McAb, mediante el cual se lograron detectar 15 casos positivos a CMV de 75 muestras de orina o sangre ("buffy coat") tomadas de 52 pacientes inmunocomprometidos, ingresados en el Instituto de Nefrología de Ciudad Habana. Aplicando las técnicas clásicas de aislamiento en fibroblastos humanos diploides (MRC-5), se lograron aislar 12 cepas de CMV de casos previamente positivos por DAPF; lográndose además un aislamiento en una muestra reportada negativa por fluorescencia. Se observó una coincidencia de un 80%

entre ambas técnicas. Se detectó la presencia de anticuerpos Ig G contra CMV en todos los casos estudiados, utilizando para ello la técnica ELISA.

Palabras claves: citomegalovirus – anticuerpos monoclonales – diagnóstico rápido – inmunocomprometidos

#### REFERENCIAS

- GLEAVES, C. A. & MEYERS, J. D., 1987. Comparison of MRC-5 and HFF cells for the identification of cytomegalovirus in centrifugation culture. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 6: 179-82.
- GLEAVES, C. A.; SMITH, T. F.; SHUSTER, E. A. & PEARSON, G. R., 1984. 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: 917-19.
- GLEAVES, C. A.; SMITH, T. F.; SHUSTER, E. A. & PEARSON, G. R., 1985. Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 21: 217-21.
- GLENN, J., 1981. Cytomegalovirus infections following renal transplantation. *Rev. Infect. Dis.*, 3: 151-78.
- GRIFFITHS, P. D., 1987. Cytomegalovirus. p. 75-109 En: A. J. Zuckerman, Eds. *Principles and practice of clinical virology*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester.
- GRIFFITHS, P. D. & KANGRO, H. O., 1984. A user's guide to the indirect solid-phase radioimmunoassay for the detection of cytomegalovirus specific Ig M antibodies. *J. Virol. Meth.*, 8: 271-82.
- HUDSON, J. B.; MISRA, V. & MOSMANN, T. R., 1976. Cytomegalovirus infectivity: analysis of the phenomenon of centrifugal enhancement of infectivity. *Virology*, 72: 235-43.
- MAZERON, M. C.; COLIMON, R. C.; ROSETO, A. & PEROL, Y., 1984. Detection of cytomegaloviremia using monoclonal antibodies. *Develop. Biol. Standard.*, 57: 287-291.
- REYNOLDS, D. W.; STAGNO, S. & ALFORD, CH. A., 1979. Laboratory diagnostic of cytomegalovirus infections. p. 415-416. En: E. H. Lennette, *Diagnostic procedure of viral, rickettsial and chlamydial infections*. Sta. Edición, American Public Health Association.
- SWENSON, P. D. & KAPLAN, M. H., 1987. Comparison of two rapid culture methods for detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 25: 2445-2446.
- THIELE, G. M.; BICAK, M. S.; YOUNG, A.; KINSEY, J.; WHITE, R. J. & PURTILO, D. T., 1987. Rapid detection of cytomegalovirus by tissue culture, centrifugation, and immunofluorescence with a monoclonal antibody in an early nuclear antigen. *J. Virol. Meth.*, 16: 327-38.
- VONSOVER, A.; GOTLIEB-STEMATSKY, T.; SAYAR, Y.; BARDOV, L.; MANOR, Y. & SIEGAL, B., 1987. Detection of CMV in urine: comparison between DNA-DNA hybridization, virus isolation, and immunoelectron microscopy. *J. Virol. Meth.*, 16: 29-37.