

## UTILIDAD DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN EL MONITOREO DE INFECCION POR CITOMEGALOVIRUS HUMANO (CMV) EN EL PERIODO INMEDIATO POST TRASPLANTE RENAL.

### RESUMEN

En trasplante renal (Tx) la infección asintomática por CMV ha sido demostrada en 60 a 80 % de los pacientes (ptes) y la infección sintomática aumenta su morbi-mortalidad. Se investigó en forma prospectiva la viremia por CMV en linfocitos de sangre periférica (PBL) por la técnica de PCR en el período inmediato post-trasplante y los hallazgos fueron relacionados con otros parámetros de laboratorio y clínicos. Fueron estudiados semanalmente 51 ptes con trasplante renal, no seleccionados, desde el día cero a la cuarta semana post-trasplante y en caso de reinternación. Todos los pacientes recibieron inmunosupresión con esquema triple. Los hallazgos sugieren: <sup>(1)</sup> La detección de ADN de CMV en PBL al tiempo del Tx es elevada y sin asociación clínica. <sup>(2)</sup> Ningún pte con PCR negativa pre Tx desarrolló enfermedad por CMV post Tx. <sup>(3)</sup> La IgM anti CMV sería de poca utilidad en la reactivación de enfermedad por CMV en ptes Tx renales. <sup>(4)</sup> La presentación de enfermedad por CMV antes del primer mes post Tx podría asociarse a mal pronóstico. <sup>(5)</sup> La simple detección de ADN-CMV en PBL en el período post Tx renal inmediato no sería la técnica adecuada para el diagnóstico de enfermedad por CMV.

Palabras clave: Trasplante renal - Citomegalovirus - Reacción en cadena de la polimerasa.

Dra. Teresita de Alvarellos <sup>(1)</sup> - Bioq. Valeria Mas <sup>(2)</sup> - Bioq. Susana Albano <sup>(3)</sup> - Dr. Constancio Giraudo <sup>(4)</sup> - Dr. Pablo Massari <sup>(5)</sup> - Dra. Graciela de Boccardo <sup>(6)</sup>  
Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética.  
Hospital Privado.

### SUMMARY

Asymptomatic CMV infection has been demonstrated in 60 % to 80 % of renal transplant and the symptomatic infection has been correlated with increased morbidity and mortality. Several new techniques have been developed for early detection of CMV. We have prospectively search for CMV viremia in peripheral blood lymphocytes (PBL) by the polymerase chain reaction technique (PCR), in the early post transplant periodo and tried to correlate it with other clinical and laboratory parameters. Fifty one consecutive non selected renal allograft recipients, were studied at weekly intervals form day 0 up to 4 weeks. Triple immunosuppression was the standard treatment.

The findings suggest: a) Detection of CMV DNA by PCR from PBL had a high positivyety at transplant time without clinical implications. b) May be a relationship between replication of CMV and T cell activation which is suggested by higher SB in CMV DNA positive patient in the absence of clinical rejection. c) Detection of CMV DNA by PCR techniques in PBL in Early Renal post transplant does not seem to be a useful technique for and accurate diagnosis of CMV disease.

Key words: Renal transplantation - Cytomegalovirus

Polymerase Chain Reaction.

1 - Jefa de Departamento de Laboratorios - Hospital Privado.

2 y 3 - Bioquímicas Adjuntas de Histocompatibilidad - Hospital Privado.

4 - Jefe del Servicio de Histocompatibilidad - Hospital Privado.

5 - Jefe del Servicio de Nefrología - Hospital Privado.

6 - Jefa del Programa de Trasplante Renal - Hospital Privado.

## INTRODUCCION

El virus citomegalovirus (CMV) está ampliamente distribuido en humanos (Gol and Nankervis, 1989). Sin embargo, la mayoría de los individuos padecen la infección de manera asintomática. Los pacientes inmunosuprimidos, contrariamente, pueden presentar clínica severa e incluso a veces ésta puede ser fatal <sup>(1, 2, 3)</sup>.

La infección por CMV ha sido demostrada en el 60-80 % de pacientes trasplantados renales y la infección asintomática ha sido asociada con incremento de la morbimortalidad. <sup>(4)</sup> Con el advenimiento de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento, se han desarrollado técnicas diagnósticas rápidas y más sensibles. <sup>(5, 6, 7)</sup> Las técnicas de cultivo rápido poseen menor sensibilidad comparadas con el cultivo estándar de muestras sanguíneas (Gleaves et al, 1985). La detección de antígenos virales usando enzimoimmunoensayos son poco sensibles y la técnica tiene muchos interferentes (Griffiths, 1989).

La detección de ADN por hibridización usando sondas específicas es sensible solamente en células con un alto número de copias de CMV (Augustin et al, 1987). La amplificación enzimática de ADN usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha mostrado ser una nueva alternativa en el diagnóstico de CMV <sup>(5, 6, 7, 8)</sup>.

PCR es un método de amplificación enzimática "in vitro" de una región de ADN de secuencia conocida mediante repetidos ciclos de denaturalización del ADN, unión de los oligonucleótidos específicos que delimitan la región a amplificar y extensión polimerasa dependiente del segmento de interés. (Mullis and Fallona, 1987) Después de cada ciclo de extensión y nueva desnaturalización los productos de PCR sirven de molde para una nueva amplificación.

La detección del producto amplificado (amplicón) puede ser realizado por diferentes técnicas. La más usada es la visualización en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz ultravioleta.

Nosotros hemos investigado en forma prospectiva la viremia por CMV en linfocitos de sangre periférica usando PCR en el período inmediato post trasplante. Nuestro objetivo fue valorar la utilidad de PCR cualitativa en el diagnóstico de infección por CMV en el período inmediato post trasplante renal.

## MATERIAL Y METODOS

Se monitorearon 51 pacientes receptores de trasplante renal no seleccionados, semanalmente, desde el día cero hasta el mes post trasplante. Todos los pacientes recibieron inmunosupresión con esquema triple. Los anticuerpos IgG e IgM fueron investigados en el momento pre trasplante en donantes y receptores.

Se consideró enfermedad por CMV cuando el paciente presentó fiebre ( $>38^{\circ}$  C durante dos días consecutivos), leucopenia, alteración en las enzimas hepáticas y daño histológico compatible con CMV. Todos los pacientes que desarrollaron enfermedad fueron tratados con ganciclovir.

El monitoreo inmunológico se realizó con la técnica de blastogénesis espontánea (BE) y PCR fueron realizados desde el día cero y semanalmente hasta el momento del alta y en caso de reinternación. Se analizaron factores de riesgo tales como número de transfusiones, número de trasplantes previos, serología pre trasplante de donante y receptor y tiempo en diálisis. Se valoraron datos clínicos y parámetros bioquímicos: número de plaquetas, número de glóbulos blancos, enzimas hepáticas, fiebre, hipoxemia, etc.

Parámetro	n	porcentaje
IgM	3/5	60%
leucopenia	4/5	80%
fiebre	4/5	80%
blastogénesis espontánea	3/5	60%

Tabla 1: Parámetros clínicos en pacientes con enfermedad por CMV

#### Extracción de ADN:

**Células de sangre periférica:** los linfocitos de sangre periférica estéril anticoagulada con EDTA fueron separados usando Ficoll-Hypaque. Luego de ser llevados a una concentración de un millón de células por mililitro, el ADN fue extraído mediante lisis alcalina y se usó 5 ul en la reacción de PCR.

**Plasma:** 400 ul de plasma de sangre periférica anticoagulada con EDTA fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet lavado en solución fisiológica. Luego el pellet fue resuspendido en 200 ul de buffer 10X de PCR con 0,1 % de NONIDET P40 y calentado a 100° C durante 10 minutos.

**Reacción de PCR:** los oligonucleótidos usados fueron sintetizados por Cyber-Cyn (Lenni P.A.). Las secuencias utilizadas fueron complementarias a una región del cuarto exón del gen inmediato temprano del citomegalovirus humano. Se utilizaron 32 ciclos formados por un minuto a 95° C, 3 minutos a 65 °C. El producto amplificado fue visualizado en gel de

agarosa al 2 % con 0.5 ug/ml de bromuro de etidio.

La banda esperada fue de 137 pb. Por cada reacción se utilizó control positivo (ADN de CMV extraído de cultivo viral), control negativo (ADN de placenta humana) y blanco de reacción.

**Análisis de sensibilidad:** la sensibilidad de la técnica fue valorada usando un control positivo de ADN de concentración conocida realizando diluciones seriadas en factor de diez.

**Blastogénesis espontánea:** Linfocitos de sangre periférica a una concentración de un millón de células por mililitro fueron resuspendidos en medio de cultivo RPMI, 20 % de suero bovino fetal y enriquecido con aminoácidos y vitaminas, y cultivados en presencia de 1 uC de timidina tritiada durante 24 hs a 37° C, 5 % de CO2. Las cuentas fueron leídas en contador de centelleo beta y los resultados expresados en cuentas por minuto (cpm).

**Grupo control negativo:** se monitorearon 10 pacientes no trasplantados, con sero-

logía positiva para CMV.

**Grupo control inmunosuprimido:** 10 pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) con serología positiva para CMV.

## RESULTADOS

La serología pre trasplante mostró 92.1 % de receptores positivos para CMV y 29.4 % de donantes. De los 51 pacientes que fueron estudiados con PCR en el pre trasplante, 23 (47.1 % - Grupo I) presentaron resultados positivos, mientras que los 28 restantes (54.9 % - Grupo II) fueron negativos. De los pacientes del grupo I, 16/23 (69.6 %) mantuvieron su positividad a lo largo del monitoreo, presentando síndrome CMV dos pacientes antes del mes post trasplante y uno dentro de los tres meses post trasplante. Los tres pacientes tuvieron mala evolución. Los mismos, presentaron compromiso pulmonar con muestras de lavado broncoalveolar positivas para CMV mediante PCR. Como hallazgo post mortem se observaron lesiones histológicas prominentes compatibles con CMV en pulmón.

De los 7/23 pacientes (30.4 %) pertenecientes al mismo grupo que en el post trasplante inmediato tuvieron PCR negativo, 2 pacientes presentaron CMV después del primer mes post trasplante, positivizando PCR en ese momento. Los pacientes fueron tratados y tuvieron buena evolución.

Los pacientes que presentaron síndrome CMV (5/51-9.8 %) eran seropositivos al momento de la infección y los valores de blastogénesis espontánea (BE) fueron elevados sin asociación a episodios de rechazo. (tabla 1)

De los 28/51 pacientes (54,9 %) que presentaron PCR negativa en el pre trasplante, 12 (42,8 %) se mantuvieron negativos durante

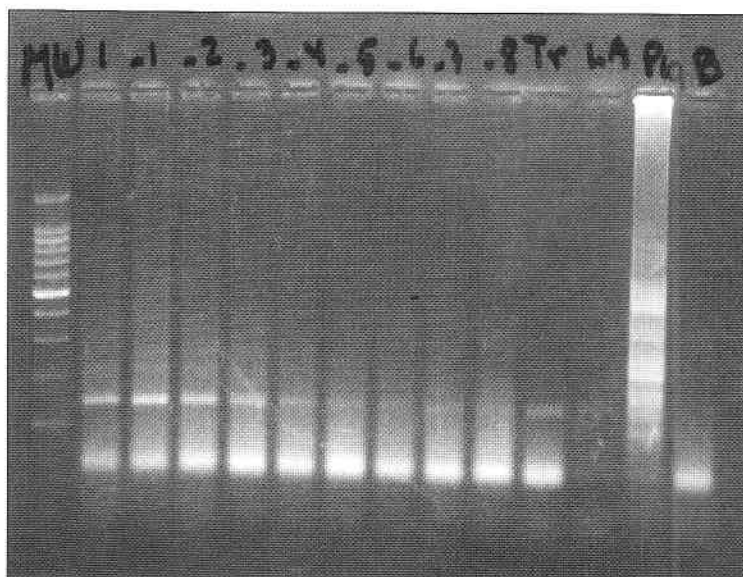


Fig. 1: Curva de sensibilidad (10 copias) de la reacción PCR para CMV usando ADN de CMV extraído de cultivo viral.

todo el monitoreo, mientras que 16 (57.2 %) alternaron con resultados positivos. En este último grupo 11/16 pacientes tuvieron otras complicaciones: 5 pacientes presentaron PCR positiva para virus de la hepatitis C (VHC), 5 infecciones urinarias y uno, neumonitis por hipersensibilidad a drogas. No hubo diferencias entre los grupos en el tiempo en diálisis, número de transfusiones, elevación de enzimas hepáticas, episodios de rechazo de alta. El análisis de BE no mostró diferencias entre grupos. El monitoreo de CMV en plasma ha incluido 20 pacientes, pero sólo observamos positividad en uno que presentó síndrome CMV. En el grupo control inmunosuprimido (pacientes con LES) el hallazgo de presencia de ADN de CMV fue elevado (82 %) sin asociación a clínica.

## DISCUSION

En la mayoría de los estudios publicados en trasplantados renales, linfocitos de sangre periférica han sido usados como sustrato para la reacción de PCR. Esta reacción en este material es claramente más sensible (10 copias virales) que el cultivo para la detección de

CMV. Como consecuencia de esta elevada sensibilidad un resultado positivo puede predecir la clínica hasta en 3 semanas. Esto lleva a que la técnica posea un valor predictivo negativo del 100 %<sup>(5, 6, 7)</sup>. Pero al observar muchos pacientes que mostraron resultados positivos y nunca tuvieron síndrome CMV, creemos que en este grupo de pacientes, en los cuales probablemente existan períodos replicativos virales sin asociación a enfermedad, la PCR cualitativa para CMV es de escasa utilidad.<sup>(8)</sup>

Plasma y suero han sido también usados para la PCR. En éstos casos, un resultado positivo sería representativo de viremia y tendría mayor asociación con la clínica del paciente.

La elevación de IgM generalmente es tardía con respecto a los síntomas y la mayoría de los pacientes inmunosuprimidos no la producen en la reactivación de la enfermedad. La asociación de infección por CMV con infección bacteriana<sup>(9)</sup> ha sido observada por otros, aunque el mecanismo permanece aún desconocido.

Nosotros observamos positividad de PCR en pacientes que presentaron infecciones bacterianas y de otros virus, sin manifestar enfermedad por CMV. Ante una infección que es tan frecuente y de gran impacto en la morbimortalidad de este grupo de pacientes, creemos que se deben desarrollar otras técnicas moleculares tales como PCR cuantitativa (10, 11, 12) para poder discriminar entre pacientes que desarrollarán enfermedad de los que no la desarrollarán a pesar de tener ambos grupos ADN de CMV en circulación.

## BIBLIOGRAFIA

1. Umana J, P; Mutimer DJ; Shaw JC; et al; Cytomegalovirus surveillance following liver transplantation: does it allow pre symptomatic diagnosis of cytomegalovirus? *Transplant Proc* 1992; 24:2463.
2. Pillay D; Charman H; Burroughs AK; et al; Surveillance for CMV infection in orthopic liver transplantation. *Transplantation* 1993; 56:103.
3. Pillay D; Ali AA; Liu Sf; et al. The prognostic significance of positive CMV cultures during surveillance of renal transplant recipients. *Transplantation* 1993; 56:103.
4. Germa G; Zipeto D; Pare M et al; Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia and DNAemia. *J Infect Dis* 1991; 164:488.
5. Halwachs G; Zach R; Poggilsh H et al; Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood of organ -transplanted patients in clinical practice-. *Transplantatio* 1993; 56:338.
6. Schmidt CA; Oettle H; Peng R; et al; Comparison of polymerase chain reaction from plasma and buffy-coat with antigen detection occurrence of IgM for the detection of cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Transplantation* 1995, 1133.
7. Kidd IM; Fox JC; Pillay D; Charman H et al. Provision of prognostic information immunocompromised patients by routine application of the polymerase chain reaction. *Transplantation* 1993; 56:867.
8. Patel R; Smith TF; Espy M et al; A prospective comparison of molecular diagnostic techniques for the early detection of cytomegalovirus in liver transplant recipients. *J Inf Dis* 1995; 171:1010.
9. Paya CV; Wiemer RM; Hermans PE; et al. Risk factors for cytomegalovirus and severe bacterial infections following liver transplantation: a prospective multivariate time-dependent analysis. *J. Hepatol* 1993; 18:185.
10. Rasmuyssen L., Monis S; Zipeto Y; et al. Quantitation of human cytomegalovirus DNA from peripheral blood cells of human immunodeficiency virus-infected patients could predict cytomegalovirus retinitis. *J Infect Dis* 1995, 171:177.
11. Abecasis M; Koffron A.; Kaplan B; et al. The role of PCR in diagnosis and management for CMV in solid organ recipients. *Transplantation* 1997; 63:275.
12. Gallez-Hawkins G; Tegimeier B; Veer A, et al. Evaluation of Quantitative plasma PCR plate assay for detecting cytomegalovirus infection in marrow transplant recipients 1997;35:788.