

Comparación de dos técnicas de extracción de ADN para la cuantificación de CMV en sangre

Sr. Editor: A propósito del Documento de Consenso “Recomendaciones GESITRA-SEIMC y RESITRA sobre prevención y tratamiento de la infección por citomegalovirus (CMV) en pacientes trasplantados”¹, en el que se recomienda que para la monitorización virológica de CMV se debe utilizar una técnica “sensible, cuantificable, rápida y reproducible”, queremos hacer los siguientes comentarios. Hemos realizado un estudio comparando dos técnicas de extracción de ADN de CMV, manual y automática, con el objetivo de determinar la más adecuada para la cuantificación de CMV en muestras de sangre. Se han estudiado 121 muestras de sangre (plasma) pertenecientes a 73 pacientes (26 mujeres, 47 varones). En 98 muestras (57 pertenecientes a receptores de TOS y 41 muestras de pacientes receptores de TPH) la cuantificación se hizo como monitorización virológica para tratamiento anticipado o para valoración de la respuesta al tratamiento. En el resto de muestras (23) la técnica se realizó como diagnóstico de primoinfección o reactivación en enfermos inmunodeprimidos. Para la cuantificación del ADN de CMV se ha utilizado el reactivo COBAS Amplicor CMV Monitor (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). El rango lineal de la prueba es de 400 a 1×10^5 copias/ml. La extracción del ADN del CMV se ha realizado por dos métodos: manual y automático. Para el método manual se han utilizado los reactivos incluidos en el kit comercial anteriormente mencionado y se han seguido las instrucciones del fabricante. Para la extracción automática se han utilizado los reactivos Total Nucleic Acid Isolation (TNAI, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) en el aparato automático COBAS AmpliPrep según Gartner et al². En ambos métodos se ha incluido un control positivo además del propio control interno en cada muestra. Para la amplificación y detección automáticas se ha utilizado el COBAS Amplicor siguiendo las instrucciones del fabricante. La concordancia de resultados se ha estudiado con el índice kappa y la gráfica de Bland y Altman³. Se ha considerado una muestra como positiva cualquier número de copias/ml de

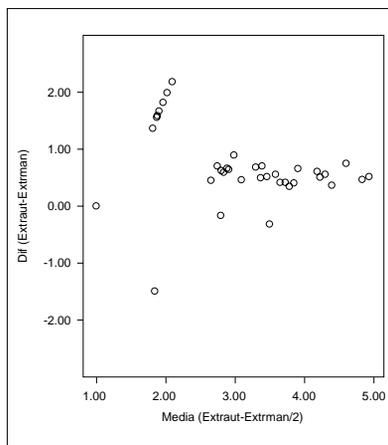


Figura 1. Análisis gráfico de los 121 resultados por el método de Bland y Altman. Los resultados están representados en log copias/ml.

ADN de CMV detectado. Las muestras que tienen un resultado con una diferencia mayor de 0,5 log copias/ml se han considerado como discordantes. De un total de 121 muestras estudiadas, 27 muestras han resultado positivas por los dos métodos, 86 muestras han resultado negativas en ambos métodos y 12 muestras tienen resultados discordantes. De estas últimas, 4/12 son positivas en ambos métodos pero con una diferencia mayor de 0,5 log, siete han sido positivas con el método automático y negativa con el manual y una ha sido positiva en el manual y negativa en la automática.

El índice kappa obtenido es 0,827, es decir, el grado de concordancia entre los dos métodos de extracción es “excelente” (rango: 0,81-1,00) según Landis y Koch⁴. En la figura 1 se representa el análisis de los datos por el método de Bland y Altman. Esta gráfica nos indica que los dos métodos son muy similares porque la mayoría de los valores obtenidos están en torno a 0. Otra observación interesante es que para rangos menores de 10^3 copias/ml, el método automático es más adecuado porque la diferencia entre las dos resultados contra su media están por encima del valor 0.

Los resultados obtenidos con los dos métodos de extracción estudiados son similares ($\kappa > 0,8$). El rango dinámico también se puede considerar similar con los dos métodos (límite inferior 286 copias/ml y 323 copias/ml, límite superior $6,03 \times 10^5$ y $2,87 \times 10^5$ copias/ml). Hay que destacar que se

han obtenido mayor número de resultados positivos cuando se ha utilizado la extracción automática (34 muestras positivas/121 con extracción automática y 28 muestras positivas/121 con la manual).

En resumen, se pueden utilizar ambos métodos de extracción de ADN de CMV para la cuantificación en plasma. Sin embargo, la PCR convencional con extracción manual es un método laborioso cuyos resultados dependen muchas veces de la experiencia del personal y factores extrínsecos difíciles de controlar. Todos estos inconvenientes se evitan con la extracción automática pues sus principales ventajas son la facilidad de realización, escaso aparataje utilizado y que no requiere experiencia del personal en técnicas de biología molecular. También es importante considerar que la extracción automática detecta mejor los valores inferiores a 10^3 de copias/ml. Por tanto, recomendamos la total automatización de la cuantificación de ADN de CMV en sangre para el diagnóstico, prevención y tratamiento de la enfermedad por CMV.

Agradecemos a la Unidad de Apoyo a la Investigación del Hospital Ramón y Cajal la ayuda prestada en el análisis estadístico de los datos.

*Thuy-Huong Ta Tang,
María Auxiliadora Molina
y Marisa Mateos*
Servicio de Microbiología.
Hospital Ramón y Cajal.
Madrid, España.

Bibliografía

1. Torre-Cisneros J, Fortín J, Aguado JM, De la Cámara R, Cisneros JM, Gavaldá J, et al. Recomendaciones GESITRA-SEIMC y RESITRA sobre prevención y tratamiento de la infección por citomegalovirus en pacientes trasplantados. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23:424-37.
2. Gartner BC, Fischinger JM, Litwicki A, Roemer K, Mueller-Lantzsch N. Evaluation of a New Automated, Standardized Generic Nucleic Acid extraction Method (Total Nucleic Acid Isolation Kit) Used in Combination with Cytomegalovirus DNA Quantification by COBAS AMPLICOR CMV MONITOR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3881-2.
3. Latour J, Abraira V, Cabello JB, López Sánchez J. Las mediciones clínicas en cardiología: validez y errores de medición. *Rev Esp Cardiol.* 1997;50:117-28.
4. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33:159-74.