



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Técnicas de monitorización de la infección por citomegalovirus en los trasplantados de órgano sólido

José L. Pérez

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, España

RESUMEN

Palabras clave:

Citomegalovirus humano
Diagnóstico de laboratorio
Monitorización de la infección
Carga viral
Antigenemia
ADNemia

La introducción de los antivirales y los avances diagnósticos han atenuado sustancialmente los efectos negativos de la infección por el citomegalovirus humano (CMV), aunque continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad de origen infeccioso en los trasplantados de órgano sólido. La monitorización virológica ocupa un papel central. Hay muchas técnicas diagnósticas, pero no todas son aplicables al trasplante, ni todas se adaptan igualmente a las distintas situaciones clínicas. La elección de una u otra dependerá del objetivo que se persigue, de las características técnicas de la prueba y de las posibilidades del laboratorio. Las pruebas serológicas son fundamentales durante la evaluación pretrasplante de donante y receptor, siendo recomendable utilizar pruebas que detecten anticuerpos IgG. Una vez producido el trasplante, el protagonismo recae sobre los métodos de determinación de carga viral aplicados con fines diagnósticos, pronósticos (como guía del tratamiento anticipado), para la monitorización del tratamiento antiviral y como primera alerta de selección de mutantes resistentes. Aunque la prueba de antigenemia pp65 sigue siendo útil como medida de la carga viral, la mayor parte de laboratorios están adoptando los nuevos métodos de amplificación *real time* por sus ventajas técnicas. A pesar de los avances en la estandarización metodológica, no disponemos de valores de referencia con validez universal, y cada centro deberá obtenerlos a partir de su propia experiencia.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Monitoring techniques in cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients

ABSTRACT

Keywords:

Human cytomegalovirus
Laboratory diagnosis
Infection monitoring
Viral load
Antigenemia
DNAemia

The availability of antiviral drugs for cytomegalovirus (CMV) in clinical practice, along with advances in methods of laboratory diagnosis, has substantially alleviated the negative effects of CMV infection in solid organ transplant recipients. Nevertheless, CMV continues to be a significant cause of morbidity and mortality in these patients. Virological monitoring plays a crucial role in controlling these negative consequences. Several diagnostic techniques are now available but not all are applicable in the transplant setting, nor are they all suitable for different clinical situations. Selection of a particular method depends on the clinical objective, the technical profile of the test and the possibilities of the laboratory. Serological tests are useful during pretransplant evaluation of both donor and candidates, the most suitable for this purpose being those that detect IgG antibodies. After transplantation, methods for determining CMV viral load are the cornerstone of diagnosis, prognosis (e.g., as a guide for preemptive therapy), and antiviral treatment monitoring, as well as a first alert on the emergence of drug resistant mutants. The pp65 antigenemia test remains useful as a measure of CMV viral load, but molecular assays are progressively replacing antigenemia in most laboratories because of technical issues. Despite advances in methodological standardization, no reference breakpoint values for viral load interpretation are available, and each center should obtain these values based on their own experience.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Objetivos de la monitorización virológica

La infección por el citomegalovirus humano (CMV) continúa siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad de origen infeccioso en los trasplantados de órgano sólido (TOS). La experiencia acumulada en este campo a lo largo de muchos años ha permitido delimitar factores de riesgo que nos permiten prever esta complicación y, ante una determinada sintomatología, establecer el diagnóstico de sospecha, aunque las manifestaciones clínicas sean relativamente inespecíficas y deban ser confirmadas, en última instancia, mediante pruebas de laboratorio. Además, el conocimiento de algunos factores de riesgo de la infección por el CMV y, por lo tanto, la posibilidad de prevenirla o de atenuar sus consecuencias se apoyan en la realización de determinadas pruebas virológicas aplicadas durante la evaluación de donante y receptor, así como una vez producida la donación del órgano.

Por otra parte, disponemos también, desde hace tiempo, de antivirales específicos anti-CMV que, con el curso del tiempo, han permitido simplificar y perfeccionar tanto el tratamiento como la profilaxis, pero que no están exentos de efectos secundarios, de ahí la necesidad de utilizarlos racionalmente. Otra razón que avala su uso prudente es la posibilidad de desarrollo de mutantes de resistencia por parte del virus, lo que ha podido comprobarse también en los paciente TOS (para más detalle, referimos al lector al artículo de Marcos que se publica en el presente número extraordinario de ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA). Por último, más allá de los efectos directos atribuibles a la replicación activa del CMV en el paciente, muchos autores han descrito efectos patológicos debidos al carácter inmunomodulador que tiene el propio virus, los llamados efectos indirectos. Aunque la extensión e importancia que estos efectos tienen sobre la viabilidad del injerto, la supervivencia del paciente a más largo plazo o incluso su calidad de vida, no han quedado completamente establecidas, esta posibilidad abre nuevas perspectivas a las pruebas diagnósticas de laboratorio.

Técnicas virológicas aplicables a la monitorización

Por todas estas razones, los pacientes TOS deben ser monitorizados virológicamente para detectar la infección por el CMV, tanto desde el punto de vista pronóstico y diagnóstico de la enfermedad por CMV como para comprobar la eficacia del tratamiento y de las medidas de control. En los últimos años se han producido grandes avances en este campo, especialmente en el ámbito de las pruebas moleculares. Sin embargo, ninguna de las técnicas virológicas actualmente existentes tiene validez para todas las situaciones que pueden presentarse en el contexto de la infección por el CMV y de sus consecuencias clínicas^{1,2}. La elección de una u otra deberá basarse en el objetivo perseguido, en las características del paciente, en las especificaciones técnicas del método e, incluso, en las posibilidades del laboratorio.

Hay muchas técnicas para el diagnóstico de la infección por el CMV²⁻⁴, aunque no todas ellas tienen el mismo interés ni pueden aplicarse en todos los contextos. El aislamiento en cultivo es lento (7-21 días), poco sensible y no está al alcance de todos los laboratorios. La variante rápida de cultivo *shell vial* acorta significativamente el tiempo y mejora algo la sensibilidad. Tanto uno como otro no permiten la cuantificación rápida de la carga viral, algo que, como veremos, es fundamental en la monitorización. En su momento sirvieron para diagnosticar la infección por CMV en los TOS y controlar parte de sus efectos negativos, pero hace tiempo que han quedado superados. Sus aplicaciones, hoy en día, son muy reducidas. Las pruebas histopatológicas también tienen limitaciones (falta de sensibilidad, entre otras), aunque son la referencia para la afectación orgánica (enfermedad focal). Por último, las pruebas serológicas encuentran su aplicación en la evaluación de donantes y receptores, pero su utilidad en el seguimiento postrasplante es reducida. En conjunto, son las

Tabla 1

Recomendaciones prácticas para la realización de la prueba de antigenemia

	Recomendación	Grado de recomendación
Urgencia de procesamiento	2-4 h	++
Extracción de leucocitos	MacroDEX®	+++
Realización de las preparaciones	Citocentrifugación	++
Fijación del antígeno	Formaldehído	+++ /++++
Monoclonal anti-CMV	Anti-pp65	++++
Procedimiento de tinción	Inmunofluorescencia	+++

CMV: citomegalovirus.

pruebas que nos permiten estimar la carga viral (antigenemia, métodos moleculares) las que más interés tienen hoy en día, razón por la que nos extenderemos en su descripción y, sobre todo, en su interpretación.

Prueba de antigenemia pp65

La prueba de antigenemia consiste en la detección directa de antígenos de CMV en leucocitos de sangre periférica y, en su día, supuso un gran avance en el seguimiento de los pacientes trasplantados, especialmente TOS. La prueba es, por definición, rápida, técnicamente sencilla y cuantificable. Se basa en que el virus replica en los leucocitos polimorfonucleares (PMN) con una elevada expresión de proteínas virales. La fosfoproteína pp65 del tegumento del CMV es la más abundante en los PMN, los cuales no serían meros portadores pasivos, sino que la sintetizarían. Esto es importante porque su detección se correlacionaría con la replicación viral activa en las células sanguíneas y, en consecuencia, sería una medida indirecta de la carga viral.

Desde el punto de vista técnico, la antigenemia se lleva a cabo mediante la extracción de los leucocitos de la sangre del paciente, su recuento, la realización de preparaciones, y la fijación y tinción de éstas por técnicas inmunofluorescentes o inmunoenzimáticas. En consecuencia, es una técnica poco sofisticada, al alcance de cualquier laboratorio microbiológico. Sin embargo, a pesar de su aparente simplicidad, está sometida a una notable variabilidad, derivada esencialmente de la labilidad del antígeno y de otros factores técnicos, de manera que su punto más débil sería la dificultad de estandarización. Esta necesidad ha sido subrayada en numerosas publicaciones²⁻⁵ y condiciona su aplicación en el seguimiento de los TOS. En la tabla 1 se resumen algunas recomendaciones prácticas para la realización de la prueba. Tres son los aspectos clave: el tipo de monoclonal anti-pp65, el procedimiento de fijación y la demora en el procesamiento. Respecto al primero, la mayoría de productos comerciales funcionan razonablemente, aunque eso no significa equivalencia (por tanto, fuente de variabilidad). En cuanto al fijador, es mejor el formaldehído que la acetona⁴. La tercera causa importante de variabilidad es la demora en el procesamiento, ya que la proteína pp65 es lábil, lo que obliga a realizar la prueba antes de 6-8 h de haber extraído la muestra de sangre. A pesar de los esfuerzos, no ha sido posible estandarizar la prueba. Además, aun en el caso de haberse logrado, siempre quedaría la variabilidad asociada al tipo de paciente y su manejo, algo que es dependiente de cada centro de trasplante. Por todas estas razones, la interpretación de la prueba siempre estará sujeta a la experiencia propia de cada centro.

Métodos moleculares

La mayor estabilidad del ADN viral en la muestra, así como su menor variabilidad técnica, confiere a los métodos moleculares una ma-

Tabla 2Características técnicas de los métodos moleculares comerciales para la cuantificación del citomegalovirus (CMV)^a

Producto	Fabricante o distribuidor	Método	Gen diana	Plataforma instrumental	Límite inferior de detección (copias/ml) ^a	Intervalo dinámico de cuantificación (copias/ml) ^a
COBAS Amplicor CMV	Roche Diagnostics	PCR punto final	UL54 (DNA pol)	Cobas® Amplicor	600 ^b	600-1,0×10 ⁵
COBAS TaqMan CMV	Roche Diagnostics	PCR <i>real time</i>	UL54 (DNA pol)	Cobas TaqMan® 48/96	100 ^c	150-1,0×10 ⁷
LightCycler CMV	Roche Diagnostics	PCR <i>real time</i>	UL54 (DNA pol)	LightCycler®	392 ^d	1.000-1,0×10 ⁷
CMV PCR kit	Qiagen/Abbott	PCR <i>real time</i>	UL123 (MIE)	m2000rt	65 ^e	65-2,7×10 ⁷
Abbott Real Time CMV	Abbott Molecular	PCR <i>real time</i>	UL34 + UL80.5	m2000rt	20 ^b	20-1,0×10 ⁸
artus®-CMV QS RSQ ^f	Qiagen GmbH	PCR <i>real time</i>	UL123 (MIE)	QIAsimphony® RGQ ^f	43 ^b	80-1,0×10 ⁸
CMV Elite MGB	Nanogen Diagnostics	PCR <i>real time</i>	UL123 (MIE)	ABI Prism®	279 ^d	316-2,7×10 ⁷
Smart CMV Trender	Cepheid	PCR <i>real time</i>	No especificado	Smart Cycler®	357 ^g	400-2,0×10 ⁷

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

^aSegún especificaciones del fabricante publicadas en el folleto técnico o accesibles en páginas web oficiales (se han ajustado decimales cuando procede).^bCalculado a partir de 500 µl de plasma.^cCalculado a partir de 350 µl de plasma.^dCalculado a partir de 200 µl de sangre total.^eCalculado a partir de 500 µl de solución patrón.^fHay adaptaciones para las siguientes plataformas: ABI Prism® (series 7000, 7700 y 7900HT), RotorGene® y LightCycler® (series 1 y 2.0), con límites de detección < 100 copias/ml.^gCalculado a partir de 200 µl de plasma.

yor robustez y los hace más apropiados para el seguimiento ambulatorio de los pacientes o para remitir muestras a laboratorios de referencia. También, al menos sobre el papel, son más fáciles de estandarizar. La cuantificación del ADN del CMV en muestras de sangre (ADNemia) permite una estimación más directa de la carga viral que la antigenemia, aunque en ausencia de tratamiento exista una correlación aceptable entre los valores obtenidos con ambas técnicas^{2,4,6}.

En los últimos años se ha comercializado una gran cantidad de métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) *real time*, con sus innegables ventajas técnicas (sensibilidad, rapidez, amplio intervalo de linealidad y riesgo reducido de contaminación). Aunque el coste es notable, probablemente dichas ventajas compensan hoy en día el sobreprecio. No es extraño que la mayoría de centros con programa de trasplante se hayan pasado a las técnicas de PCR *real time*. En la tabla 2 se resumen algunas de las características técnicas de los métodos comerciales más utilizados. Todos ellos tienen una especificidad, precisión e intervalo dinámico de cuantificación aceptables. Un aspecto importante de los métodos comerciales a efectos de seguimiento de los TOS es su sensibilidad analítica, especialmente para la monitorización del tratamiento y predicción de recaídas. Los datos publicados por las empresas fabricantes son difíciles de comparar, ya que se han obtenido con diferentes tipos de muestra (plasma, sangre total, diluciones de patrones), diferente volumen de partida y distintos métodos de extracción. En general, los métodos *real time* permiten detectar del orden de 2 unidades logarítmicas de genoma/ml, lo que se ha demostrado suficiente cuando se aplican a muestras clínicas en estudios comparativos⁷⁻¹⁰.

A pesar de la mayor robustez de la ADNemia, la carga viral así medida muestra una variabilidad biológica notable, por lo que aumentos de 3-5 veces la cifra inicial (0,5-0,7 unidades logarítmicas) pueden no ser significativos⁷. Además, los distintos sistemas comerciales rinden valores muy diferentes entre sí, lo que ha impedido su estandarización y la obtención de valores de referencia comunes aplicables a los distintos escenarios clínicos, por lo que cualquier recomendación debe hacerse con cautela y a título meramente orientativo (ver más adelante). En algunos estudios con el sistema comercial Cobas Amplicor se establecieron valores orientativos de enfermedad por CMV, entre 1.000-5.000 copias/ml sobre muestra de plasma, pero se han publicado cifras tan altas como 300.000 copias/ml utilizando una técnica de desarrollo propio y sangre total^{2,8}. El método comercial TaqMan de PCR *real time* suele dar valores mayores (0,2-0,5 log) sobre plasma^{9,10}. Además, hay que tener en cuenta

que los valores de carga viral en sangre total son superiores a los obtenidos en plasma, en torno a 1 unidad logarítmica¹¹.

Por todas estas razones, el seguimiento de un determinado paciente se hará con una determinada técnica, sobre un mismo tipo de muestra (sangre total, plasma) y en un mismo laboratorio. Este planteamiento tiene una importancia relativa para el diagnóstico del síndrome viral, dados los altos valores de carga viral presentes en ese momento, pero es crucial en otras situaciones clínicas del trasplante, especialmente si se usa con fines pronósticos de desarrollo futuro de enfermedad, para la monitorización del tratamiento o para la vigilancia de las recaídas. La reciente introducción de un estándar internacional de referencia, como ya existe para los virus de las hepatitis B y C, representa un gran paso hacia la estandarización¹², pero no eliminará totalmente la variabilidad atribuible al propio paciente.

Evaluación pretrasplante

El objetivo en esta etapa es evaluar el riesgo de desarrollo futuro de complicaciones una vez producido el trasplante, esto es, delimitar factores de riesgo. Uno de los más importantes es el estado inmune respecto al virus, tanto del donante como del receptor, lo que condiciona la aparición de infección activa (replicación del virus en el hospedador) y de enfermedad por CMV (infección activa junto con la presencia de signos y síntomas atribuibles al microorganismo). Es bien conocido que los mayores problemas se producen en los pacientes que sufren la primoinfección por el virus una vez trasplantados, el cual puede ser transmitido a través del propio injerto (órgano de un donante seropositivo que se trasplanta a un receptor seronegativo [D+/R-]), de las transfusiones administradas como consecuencia de todo el proceso o, más raramente, por otras causas. Sin embargo, lo más habitual en nuestro medio es que el candidato a un trasplante esté previamente infectado por el CMV. Aunque esta situación conduzca a un menor riesgo, debe ser conocida.

Sea como fuere, las pruebas serológicas ocupan un papel central durante la evaluación pretrasplante. Se debe buscar siempre un método serológico altamente sensible y específico, basado en la detección de anticuerpos de la clase IgG, para lo que hay en el mercado muchos reactivos comerciales. También hay técnicas que permiten detectar simultáneamente anticuerpos de las clases IgG e IgM, o sólo IgM, si bien éstas no se recomiendan para el cribado serológico de donantes y receptores, ya que no añaden sensibilidad y, por el con-

trario, pueden ser fuente de resultados falsos positivos o de valores instrumentales equívocos^{3,4,13}. En general, las técnicas comerciales de inmunoanálisis aprobadas por las agencias reguladoras proporcionan buenos resultados, si bien no todas son equivalentes, y precisan de una validación y conocimiento previos por parte del laboratorio. Las técnicas de aglutinación con partículas de látex también eran válidas, pero han sido descatalogadas comercialmente en países como el nuestro. Se debe observar siempre las precauciones generales del cribado serológico en el caso de una transfusión reciente en el donante o en el receptor, bien por la posibilidad de hemodilución (falsos negativos) o de transferencia pasiva de anticuerpos (falsos positivos). Dado que la situación de más riesgo se produce en el binomio D+/R-, cuando el candidato sea seronegativo para el CMV, hay que repetir la determinación de anticuerpos en un momento lo más cercano posible al trasplante, y lo mismo podría aplicarse en caso de donantes vivos.

Aunque los métodos modernos están muy perfeccionados, ninguno está exento de resultados equívocos, incluso repetidos. Cuando esto ocurre, la interpretación debe hacerse con cautela, muy especialmente en el caso del trasplante infantil en niños de corta edad. En los adultos se aplicará una valoración por exceso, según se trate del donante (positivo) o el receptor (negativo). Teniendo en cuenta la epidemiología y patogenia de la infección por el CMV, el resto de pruebas virológicas de laboratorio (cultivos, detección de antígenos, amplificación de ácidos nucleicos) carecen de interés a efectos de la evaluación pretrasplante y no deben ser utilizadas salvo en situaciones muy excepcionales.

Diagnóstico virológico postrasplante

Una vez producido el trasplante, los objetivos que se persiguen con las pruebas de laboratorio son: a) la detección de la infección activa (replicación viral); b) el diagnóstico de la enfermedad por el CMV, esto es, la infección activa en presencia de síntomas compatibles; c) predecir su aparición con suficiente antelación para poder instaurar medidas terapéuticas (tratamiento anticipado), y d) monitorizar la respuesta al tratamiento con antivirales y la aparición de recaídas, incluidas las atribuibles a la selección de mutantes de resistencia. La prevención de los efectos indirectos puede constituir otro objetivo una vez que los estudios en curso aclaren dudas acerca de su importancia real.

Con todos estos objetivos, el protagonismo recae en las técnicas virológicas directas^{1,2,4,5}, como los cultivos, la detección de antígenos y los métodos moleculares, mientras que las pruebas serológicas carecen totalmente de interés y no deben utilizarse para la monitorización del paciente trasplantado. Dado que existe una relación entre la intensidad de la replicación con el desarrollo de sintomatología y el riesgo de recidiva, los métodos cuantitativos directos (carga viral) serán los recomendables durante el seguimiento postrasplante. La selección de la muestra adecuada también es crucial, y se hará mención más adelante en cada situación particular.

Diagnóstico de la enfermedad por CMV: síndrome viral

De los efectos directos producidos por el virus, el cuadro mononucleósico conocido como "síndrome viral" es la forma más frecuente de presentación de enfermedad por CMV. En presencia de síntomas compatibles, su diagnóstico podría hacerse mediante métodos cualitativos, pero se recomienda determinar la carga viral en sangre no sólo por las características técnicas señaladas antes (sensibilidad, rapidez, etc.), sino porque nos puede servir para controlar la eficacia de las medidas terapéuticas que hipotéticamente podrían instaurarse. En los primeros años del trasplante, era habitual realizar una monitorización sistemática del paciente mediante cultivos de orina o saliva, pero esta práctica no se recomienda en estos momentos, dado su bajo valor predictivo de enfermedad. Los cultivos de sangre, in-

cluida la variante rápida *shell vial*, tampoco tienen gran interés, ya que sus resultados se demoran más allá de lo clínicamente útil y su sensibilidad es insuficiente. El aislamiento en cultivo celular convencional mantiene como única indicación disponer de las cepas para su caracterización epidemiológica o para estudios fenotípicos de resistencias, lo que está restringido a laboratorios de investigación.

La prueba de antigenemia pp65 es una medida de la carga viral en sangre. La proporción de células que expresan dicho antígeno, referida a un total de 10^5 leucocitos, se correlaciona bien con la presencia de enfermedad por CMV, sobre todo con el síndrome viral, y en menor medida con la enfermedad focal⁷. En el primer caso, los recuentos de antigenemia suelen ser muy elevados, a veces incontables, coincidiendo con la presencia de síntomas compatibles. Estudios de cinética viral⁶ han puesto de manifiesto que, antes de que esto se produzca, se detecta un aumento brusco de la antigenemia, de ahí su interés para el tratamiento anticipado (ver más adelante). Las características técnicas de la antigenemia señaladas en apartados anteriores condicionan su aplicación práctica. Así, la labilidad del antígeno pp65 obliga a un procesamiento rápido de las muestras, lo que dificulta el seguimiento de los pacientes una vez abandonan el hospital. Tampoco es aplicable en situación de neutropenia (< 1.000 neutrófilos/ μ l). La falta de estandarización impide que los resultados entre laboratorios sean comparables y hace difícil establecer un valor de referencia de validez amplia. En consecuencia, no es posible hacer una recomendación acerca del valor umbral, que siempre debe ser particularizada para cada paciente. Este problema es menor a efectos de la confirmación etiológica del síndrome viral, pero crucial en otras formas de enfermedad. En algunos estudios se han citado cifras umbrales de 20-50 células CMV⁺/ 10^5 leucocitos pero es frecuente que los recuentos sean muy elevados, incluso incontables, cuando se presentan los síntomas característicos de síndrome viral. No obstante, a la hora de interpretar esos valores, se debe tener en cuenta el tipo de trasplante (más bajos para el trasplante de pulmón o intestinal, más altos en el cardíaco), así como consideraciones internas a cada centro, como la pauta de inmunosupresión empleada o la variabilidad técnica del laboratorio.

La principal alternativa a la antigenemia en el diagnóstico del síndrome viral la constituyen las pruebas moleculares de amplificación mediante la reacción en PCR. Las pruebas de PCR cualitativas no se recomiendan con este fin, por su gran sensibilidad analítica, ya que no permiten distinguir una infección activa asintomática de la verdadera enfermedad por CMV. Hoy en día, los métodos cuantitativos de amplificación *real time* son de elección, ya que a sus conocidas ventajas técnicas añaden su idoneidad para otras situaciones clínicas relacionadas con el TOS.

En general, la ADNemia se determina sobre muestras de plasma o de sangre total (siempre anticoagulada con EDTA, nunca con heparina) y se expresa en copias/ml. Hay una correlación muy buena entre los valores de carga viral obtenidos en plasma y en sangre, al igual que con las determinaciones en polimorfonucleares o en células mononucleares, por lo que prefiere uno de los dos primeros compartimentos por su mayor facilidad de manipulación. Al igual que con la antigenemia, el valor máximo de ADNemia suele coincidir en el tiempo con la presencia del síndrome viral, lo que facilita la interpretación de los valores, en general por encima de 5.000 copias/ml de plasma, e incluso tan altos como 300.000 copias/ml. Hay que tener presente todas las consideraciones que se han hecho anteriormente acerca de la variabilidad metodológica, según el tipo de muestra, la técnica utilizada, el tipo de trasplante, y el estado neto de inmunodepresión del paciente, entre otros factores.

Diagnóstico de la enfermedad focal

El diagnóstico de la enfermedad focal representa un reto para el laboratorio no sólo por las graves consecuencias que puede acarrear para el paciente, sino por la dificultad que entraña. A diferencia del

síndrome viral, que suele cursar con valores elevados de carga viral, la antigenemia o la ADNemia puede ser negativa o con valores bajos, especialmente en la afectación gastrointestinal, la retinitis o la neumonitis en trasplantados pulmonares. La detección en muestras "periféricas", como sangre o saliva, no es predictiva de enfermedad focal. Siempre que sea posible, se debe intentar realizar el diagnóstico sobre muestras tisulares¹⁴. El diagnóstico de certeza de la enfermedad focal se obtiene mediante examen histopatológico (observación de cuerpos de inclusión) en muestras de biopsia: se recomiendan las técnicas de inmunohistoquímica por su mayor sensibilidad y especificidad. La hepatitis suele cursar con valores de antigenemia o ADNemia altos, pero la confirmación final es también histopatológica. La detección de antígenos fluorescentes o por inmunohistoquímica en células de lavado broncoalveolar (LBA) aumenta la certeza de neumonitis en pacientes con cultivo positivo. Es importante señalar que la detección cualitativa de CMV mediante PCR en muestras tisulares no establece el diagnóstico de certeza, ya que podría deberse a la presencia de genoma viral transportado por la sangre, por lo que estos métodos no deben emplearse en la enfermedad focal¹⁴. La única excepción sería la afectación del sistema nervioso central (muestra de líquido cefalorraquídeo), pero esta situación es muy poco frecuente en el contexto del TOS. La retinitis es también muy infrecuente, a diferencia de lo que ocurría en los pacientes con sida antes de disponer de los modernos tratamientos antirretrovirales; en cualquier caso, las pruebas de laboratorio añadirían poco valor al diagnóstico por examen oftalmológico. Por razones similares, la PCR cualitativa sobre muestras respiratorias no es predictiva de neumonitis, pues no es infrecuente la excreción asintomática del virus, incluso intensa. Algunos estudios han descrito resultados prometedores con pruebas cuantitativas *real time* aplicadas a muestras de LBA, pero la experiencia es muy limitada y, en consecuencia, el establecimiento de valores umbrales predictivos de enfermedad parece todavía lejano.

Monitorización virológica para el tratamiento anticipado

El tratamiento anticipado, también conocido como *preemptive therapy* en la literatura anglosajona, constituye una estrategia preventiva de gran importancia y ha sido adoptada por muchos grupos de trasplante frente a la profilaxis universal o la guiada por factores de riesgo. Se basa en la utilización de pruebas de laboratorio que nos permitan predecir con antelación la aparición de enfermedad por CMV, de manera que puedan introducirse precozmente medidas terapéuticas. Las ventajas que ofrece esta estrategia desde el punto de vista clínico son indudables y muy atractivas. Permite el desarrollo de la respuesta inmune celular específica, clave para el adecuado control de la infección por parte del paciente. Asimismo, el uso más restringido de antivirales anti-CMV reduce las complicaciones por toxicidad y el riesgo de selección de mutantes resistentes, a la vez que permite controlar los costes (referimos al lector al artículo de Cordero et al que se publica en este número monográfico para una mayor información).

Sin embargo, el tratamiento anticipado también tiene limitaciones. Conceptualmente, esta estrategia sólo debería realizarse en centros que dispongan de métodos de cuantificación de la carga viral. Tanto la antigenemia como la ADNemia son útiles con este propósito, aunque la tendencia actual es hacia la utilización de esta última prueba diagnóstica (métodos comerciales *real time*) por las razones técnicas apuntadas a lo largo de este artículo. Es fundamental que se lleve a cabo un seguimiento muy estrecho del paciente durante el período de riesgo, lo que es más fácil de llevar a cabo con los métodos moleculares que con la antigenemia, especialmente si el paciente se encuentra en su domicilio y deben derivarse las muestras al laboratorio de referencia. La secuencia temporal del muestreo es otro aspecto crucial del tratamiento anticipado, de manera que nos permita la observación de tendencias en los valores obtenidos en el curso del seguimiento. Durante el ingreso hospitalario o durante el período de

mayor riesgo se recomienda un mínimo de 2 determinaciones semanales. Pasado este tiempo, la estrategia podría relajarse.

Con independencia de la técnica a utilizar, los resultados deberían estar disponibles antes de 24 h, más aún en el período de mayor riesgo, ya que se pueden producir elevaciones bruscas de la carga viral en cortos intervalos de tiempo⁶. Este problema es más acusado para la antigenemia, siendo frecuente que coincidan en el tiempo la presencia de síntomas con la detección de valores significativos. La ADNemia predice con más antelación, dada su mayor sensibilidad analítica²⁻⁵. En cualquier caso, un valor cercano al *cut-off* debería poner en marcha una monitorización más estrecha del paciente^{2,4,6}. Como se ha señalado repetidamente, los valores umbrales de antigenemia y ADNemia deberán ser obtenidos por cada centro. Las cifras señaladas para el diagnóstico deben ser consideradas sólo a título orientativo, y todas las consideraciones hechas en los apartados anteriores sobre variabilidad biológica y técnica de los métodos de carga viral son de aplicación para guiar el tratamiento anticipado^{7,9-11}.

Vigilancia de la respuesta al tratamiento y de la aparición de recaídas

La monitorización de la respuesta al tratamiento sólo es posible con la utilización de pruebas cuantitativas de carga viral. Dadas las características de las técnicas diagnósticas, los métodos de amplificación *real time* son claramente más apropiados que la antigenemia en este contexto. Varios son los objetivos a perseguir con esta monitorización: confirmar la curación del proceso; ajustar adecuadamente la duración del tratamiento, evitando exposiciones prolongadas innecesarias a los antivirales; prevenir las recaídas, y detectar la posible aparición de resistencia a los antivirales. Se recomienda, al menos, una monitorización semanal mientras dure el tratamiento. Es importante señalar que el aumento de la cifra de antigenemia al cabo de 24-48 h de instaurado el tratamiento no debe considerarse necesariamente un dato negativo^{2,4}, y sólo si no se observa un descenso progresivo a partir de este tiempo podría ser motivo de preocupación. La ADNemia, que es un marcador más directo de la carga viral, suele bajar más rápidamente, en el transcurso de las primeras 24 h. Una vez que se produce el descenso, éste suele ser rápido y a los 3-5 días ya puede ser indetectable. En cualquier caso, y sea cual sea el método empleado, el objetivo virológico debe ser la negatividad de las pruebas. Una caída lenta de la carga viral es un signo de mal pronóstico y predice las recaídas, como han demostrado algunos estudios sobre cinética de replicación¹⁵. La experiencia con otros pacientes inmunodeprimidos sugiere que una carga viral mantenida alta o la aparición de un nuevo pico puede ser sugestivo de la selección de mutantes resistentes y, en consecuencia, una indicación para llevar a cabo pruebas de sensibilidad a los antivirales ("resistencia clínica"). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que, para que esto se produzca, deben concurrir 2 circunstancias: la utilización extensa de antivirales y un estado de profunda inmunodepresión en el paciente. Incluso así, no más del 15% de los casos de resistencia clínica son atribuibles a la selección de mutantes resistentes¹⁶. Sea como fuere, es evidente que la monitorización de la carga viral debe ser la primera señal de alarma.

Pruebas virológicas y efectos indirectos de la infección por el CMV

El potente efecto inmunomodulador del CMV y la complejidad de la respuesta inmune han atraído recientemente la atención también sobre los efectos indirectos, como las disfunciones del injerto o la predisposición a infecciones oportunistas. Se han planteado numerosas hipótesis que explicarían la aparición de dichos efectos, muchos de ellos dependientes del propio paciente. Por esta razón, la monitorización virológica debe ser complementaria de la inmunológica. Algunos estudios han puesto de manifiesto que la replicación, incluso de bajo nivel, podría asociarse con el desarrollo de este tipo de complicaciones, de manera que no serían sólo importantes los valores

pico sino la estimulación antigénica continua por parte del CMV ("carga viral neta")¹⁷. Según este planteamiento, y también con el fin de ir avanzando en el conocimiento de este fenómeno, parecería adecuado recomendar un seguimiento virológico más estrecho de los pacientes trasplantados, incluso de los considerados de bajo riesgo para los efectos directos del virus (enfermedad por CMV). Por la misma razón, la supresión viral se debe considerar un objetivo del tratamiento antiviral. Sin embargo, es obvio que tal planteamiento complicaría más el ya de por sí complejo seguimiento de los pacientes TOS, por lo que parece prudente esperar datos más concluyentes. Se están produciendo avances; algunos estudios recientes sugieren que la utilización conjunta de marcadores virológicos e inmunológicos puede servir para medir la eficacia del tratamiento, modular la utilización de fármacos y evitar efectos indirectos a más largo plazo².

Conflicto de intereses

El autor declara no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Razonable RR, Payá CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2002;40:746-52.
2. Baldanti F, Lilleri D, Gerna GG. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. *J Clin Virol.* 2008;41:237-41.
3. Hodinka RL. Human cytomegalovirus. En: Verslovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of clinical microbiology*. 3rd ed. Washington DC: ASM Press; 2011. p. 1558-74.
4. Pérez JL, De Oña M, Gimeno C, Navarro D. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por herpesvirus. 2.ª ed. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Número 8a. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2005.
5. Pérez JL, Ayats J, Fortún J, De Oña M, Pumarola T. Microbiología del trasplante. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:683-90.
6. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet.* 2000;355:2032-6.
7. Wolff DJ, LaMarche Heaney D, Neuwald PD, Stellrecht KA, Press RD. Multi-site PCR-based CMV viral load assessment-assays demonstrate linearity and precision, but lack numeric standardization. *J Molec Pathol.* 2009;11:87-92.
8. Martín-Dávila P, Fortún J, Gutiérrez C, Martí-Belda P, Candelas A, Honrubia A, et al. Analysis of a quantitative PCR assay for CMV infection in liver transplant recipients: an intent to find the optimal cut-off value. *J Clin Virol.* 2005;33:138-44.
9. Meyer-Koenig U, Weidmann M, Kirste G, Hufert 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.
10. Piiparinen H, Höckerstedt K, Grönholm-Riska C, Lautenschlager I. Comparison of two quantitative CMV 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.
11. Garrigue I, Doussau A, Asselineau J, Bricout H, Couzi L, Rio C, et al. Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant patients. *J Clin Microbiol.* 2008;46:493-8.
12. Caliendo AM, Shahbazian MD, Schaper C, Ingersoll J, Abdul-Ali D, Boonyaratankornkit J, et al. A commutable cytomegalovirus calibrator is required to improve the agreement of viral load values between laboratories. *Clin Chem.* 2009;55:1701-10.
13. Seed CR, Piscitelli LM, Maine GT, Lazzarotto T, Doherty K, Stricker R. Validation of an automated immunoglobulin G-only cytomegalovirus antibody screening assay and an assessment of the risk of transfusion transmitted CMV from seronegative blood. *Transfusion.* 2009;49:134-45.
14. Ljungman P, Griffiths P, Payá C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002;34:1094-7.
15. Humar A, Kumar D, Boivin G, Caliendo AM. Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with CMV disease. *J Infect Dis.* 2002;186:829-33.
16. Lurain NS, Chou SW. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:689-712.
17. Regoes RR, Bowen EF, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Prentice HG, et al. Modelling cytomegalovirus replication patterns in the human host: factors important for pathogenesis. *Proc Biol Sci.* 2006;273:1961-7.