

Original

Carga viral y antigenemia de citomegalovirus en la monitorización de la profilaxis con valganciclovir en pacientes con trasplante renal

A. Bordils¹, J.M. Molina², J. Córdoba², D. Ramos¹, I. Beneyto¹, V. Mascarós² y J. Sánchez Plumed¹

¹Servicio de Nefrología y ²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Fe, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia

RESUMEN

La enfermedad por citomegalovirus (CMV) es una de las complicaciones infecciosas más importantes en el trasplante de órgano sólido, por lo que es necesario realizar una correcta profilaxis de ella. El objetivo del estudio es ver la eficacia de la profilaxis con valganciclovir en pacientes receptores de riñón durante el primer trimestre postrasplante, mediante la determinación de antigenemia (pp65), cultivo en Shell-vial de orina y carga viral cuantitativa por PCR del CMV. En el estudio se incluyen cien pacientes con trasplante renal. Se analizan los resultados de 36 de ellos reclutados entre noviembre de 2003 y julio de 2004, que estaban recibiendo profilaxis con valganciclovir oral y habían cumplido los 90 días de seguimiento. Las tres pruebas mencionadas se hicieron los días 7, 15, 30, 45, 60, 75 y 90. No se detectó ninguna antigenemia positiva, en una muestra de orina se cultivó el virus y tres determinaciones de carga viral en suero fueron positivas, todas ellas del mismo paciente. Con los resultados preliminares del estudio se puede apuntar que la quimioprofilaxis universal con valganciclovir resulta útil para la prevención de la infección por CMV en pacientes con trasplante renal y, aunque las tres técnicas descritas son válidas, la determinación de la carga viral del CMV parece ser la más adecuada para la monitorización de estos pacientes.

Palabras clave: Citomegalovirus - Trasplante renal - Valganciclovir - Carga viral

Cytomegalovirus viral load and antigenemia in the monitorization of prophylactic treatment with valganciclovir in renal transplant recipients

SUMMARY

Cytomegalovirus (CMV) disease is one of the most relevant infectious complications in solid organ transplant, and we must perform an appropriate prophylactic intervention. The goal of this study was to evaluate the effectiveness of prophylactic treatment with valganciclovir in renal transplant recipients in the first three months post transplantation by shell vial urine culture assay, and by measuring antigenemia (pp65) and CMV viral load, the latter by PCR. The population of the study included 100 renal transplant recipients. We analyzed the results of 36 patients recruited between November 2003 and July 2004 who were receiving a prophylactic oral treatment with valganciclovir, and who had finished the follow-up period of 90 days. The three tests mentioned above were performed on days 7, 15, 30, 45, 60, 75 and 90. No positive antigenemia was detected, the virus was cultured in a urine specimen and, in one patient, three measurements of viral load in serum were positive. Preliminary results of the study suggest that universal chemoprophylaxis with valganciclovir is effective for the prevention of CMV infection in renal transplant recipients and that, although all three tests used were useful, the measurement of CMV viral load seems to be the most appropriate method for monitoring these patients.

Key words: Cytomegalovirus - Renal transplant - Valganciclovir - Viral load

INTRODUCCIÓN

La enfermedad por citomegalovirus (CMV) es la infección más importante tras el trasplante de órgano sólido, tanto por su alta prevalencia (hasta dos tercios de los pacientes receptores de órganos ha tenido contacto con el virus) como por sus implicaciones pronósticas. En la población general el virus permanece latente, o se manifiesta como un síndrome mononucleósico autolimitado. En los pacientes inmunodeprimidos, la forma de presentación varía desde un cuadro viral inespecífico hasta una neumonitis grave que puede ser mortal (1-4).

La mayor incidencia de la infección se produce durante los tres primeros meses postrasplante (3), secundaria a la intensidad de la inmunosupresión. Se asocia a una menor supervivencia del injerto debido a que aumenta el rechazo agudo, a una mayor expresión de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II que conduce a nefropatía crónica, y como en caso de infección grave se reduce más la inmunosupresión como parte del tratamiento, aumenta, en consecuencia, el riesgo de rechazo (5-7). En las series históricas sin profilaxis, la tasa de infección varía según el estado serológico del donante y del receptor.

Dependiendo del estado serológico del donante y del receptor del injerto renal, existen dos formas de presentación clínica: infección primaria, en la cual el donante transmite la infección a través del injerto renal o los leucocitos, siendo el receptor serológicamente negativo (70% a 88% infectados); e infección secundaria, por reactivación del CMV latente del receptor, pudiendo ser en este caso el receptor positivo y el donante positivo (70% infectados) o negativo (0 a 20% infectados), o presencia de una cepa de CMV distinta (4, 8).

La profilaxis de la infección por CMV consiste en la administración de un fármaco con acción frente al virus a aquellos pacientes con alto riesgo de infección, con el fin de evitarla. Los pacientes de mayor riesgo son los que reciben un injerto de un donante serológicamente positivo, siendo ellos CMV negativo (9, 10). Asimismo, también son de riesgo los receptores de un injerto de donante positivo, siendo ellos también CMV positivos, y aquellos pacientes que aun recibiendo un injerto de un donante negativo y siendo el receptor positivo, han recibido una pauta de inmunosupresión de inducción con anticuerpos antilinfocitarios, por el riesgo de activación del virus latente.

En la actualidad se dispone de varios fármacos antivirales para la infección por CMV. El ganciclovir, de amplio uso en la práctica clínica por vía intravenosa, dada su escasa biodisponibilidad por vía oral está siendo relegado por otras moléculas. El valganciclovir, profármaco del ganciclovir, con mayor biodisponibilidad por vía oral, es el fár-

maco más usado ahora, como terapéutica, profilaxis y tratamiento anticipado. Esta última modalidad de tratamiento consiste en la detección del virus en la fase replicativa, cuando todavía no hay manifestaciones clínicas, administrando el tratamiento de forma precoz únicamente a aquellos pacientes en que se detecte, al contrario que la profilaxis universal, que se administra de forma generalizada a todos los pacientes considerados de riesgo (10-12).

Es importante hacer un diagnóstico precoz de la infección para su adecuado tratamiento, así como una monitorización de la correcta profilaxis con el fármaco empleado. Para tal fin, las técnicas de detección del virus mediante determinación del antígeno pp65 en sangre, orina u otros fluidos orgánicos, así como los métodos de detección de DNA del virus en sangre, tanto cualitativos como cuantitativos, han desplazado a los cultivos clásicos y a otros métodos histológicos (12).

Numerosos estudios han demostrado que la cantidad de CMV se asocia con el desarrollo de enfermedad. Actualmente se utiliza la concentración de antígeno pp65 como indicador de la carga viral (13-16), pero es una técnica muy laboriosa, el tiempo entre la toma de la muestra y su procesamiento debe ser menor de tres horas y su interpretación requiere de personal experimentado. Ahora, para el diagnóstico precoz, es posible determinar la carga viral, en términos cuantitativos, mediante amplificación del DNA del CMV, lo que permite un diagnóstico con alta sensibilidad, especificidad y precocidad, anticipándose incluso a las manifestaciones clínicas, por lo que resulta útil en el tratamiento anticipado (9, 14, 17-22). La carga viral del CMV nos permite, asimismo, una monitorización de la profilaxis y del tratamiento (23, 24).

El propósito de nuestro estudio fue establecer la eficacia de la profilaxis con valganciclovir en los pacientes receptores de riñón durante el primer trimestre postrasplante, mediante la determinación de la antigenemia (pp65), cultivo en Shell-vial de orina y carga viral cuantitativa por PCR del CMV.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

El estudio, prospectivo, iniciado en noviembre de 2003, incluye cien pacientes con trasplante renal. En el momento del ingreso se realizó detección de IgM e IgG en suero, y antigenemia (pp65) en sangre y orina, y determinación de la carga viral del CMV a los 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 y 360 días.

Hasta junio de 2004 disponíamos de 36 pacientes que habían alcanzado los 90 días de observación, y son los que se valoran en este informe inicial. La edad media era de 47,6 años ($\pm 12,5$). Todos presentaban títulos anti-CMV IgG positivos e IgM negativos en el momento de su inclusión y recibieron valganciclovir de forma profiláctica, a dosis ajustada al aclaramiento de creatinina conforme la siguiente pauta:

- 10-24 ml/min: 450 mg dos veces por semana.
- 25-39 ml/min: 450 mg cada 48 horas.
- 40-59 ml/min: 450 mg al día.
- >60 ml/min: 900 mg al día.

Reacción en cadena de la polimerasa

Se estudiaron, en el periodo de 90 días, 152 muestras de suero o plasma sometidas a una prueba cuantitativa de amplificación *in vitro* del DNA del CMV mediante el equipo *Amplicor*[®] *CMV Monitor* de Roche Diagnostics (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA). Esta prueba consta de cuatro procesos: preparación de la muestra (extracción del DNA), amplificación del DNA por PCR usando iniciadores específicos (LC383 y LC342), hibridación con la sonda LC359 y posterior detección de los productos amplificados. La zona a amplificar es un fragmento de 365 nucleótidos del gen DNA polimerasa del CMV (25). La cuantificación se realiza mediante un proceso de amplificación competitiva entre el DNA de la muestra y un estándar interno. La prueba tiene un límite de sensibilidad de 400 copias/ml y un intervalo de detección entre 400 y 200.000 copias/ml. De cada muestra se tomaron 200 μ l y se procesaron siguiendo las instrucciones del fabricante (26, 27).

Antigenemia del CMV

Se detectó la presencia de antígenos del CMV en leucocitos extraídos de sangre periférica, mediante detección cualitativa de la proteína estructural pp65 en leucocitos de sangre periférica humana aislados de muestras de sangre completa recogida en EDTA mediante la técnica de detección con inmunoperoxidasa y visualización con microscopía óptica (DiaSorin S.A., Salugia, Italia), cuantificando la presencia de células que expresan el antígeno en un total de 170 muestras.

Shell-vial

Se analizaron 170 muestras de orina mediante cultivo celular en Shell-vial (Viracell S.L., Granada, España), detec-

tando los antígenos inmediato-tempranos virales producidos en el cultivo mediante anticuerpos monoclonales con tinción fluorescente (*Light diagnostics*[®], Chemicon International, Inc., Single Oak Bdrive Temecula, Ca, USA & Canada).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras el estudio de las muestras de los 36 enfermos, en los tres primeros meses de seguimiento no se detectó ninguna antigenemia (pp65) positiva. En cuanto a la determinación en orina (cultivo en Shell-vial), hubo una prueba positiva. Algunas de las muestras no se extrajeron en los plazos indicados, por lo que no se remitieron al laboratorio y por tanto no se incluyeron en el cómputo final.

Por lo que se refiere a los resultados de la carga viral del CMV, tres muestras fueron positivas (>400 partículas/ml), una de las cuales coincidió con la detección urinaria. Todos los resultados positivos de las distintas pruebas correspondieron al mismo paciente. Este paciente desarrolló una enfermedad por CMV diez días después del periodo de seguimiento, presentando antigenemia y carga viral positivas. Respecto a los acontecimientos adversos, se observaron 71 casos de leucocitopenia (25,5% de las visitas), de las cuales siete fueron neutropenia (3% de las visitas), y de éstas seis de grado 1 (≥ 1000 neutrófilos) y una de grado 3 (500 a 749 neutrófilos). Ninguno de los efectos adversos se relacionó con el valganciclovir, por lo que no hubo necesidad de retirar el fármaco en ningún enfermo.

Con estos resultados preliminares se puede decir que la profilaxis universal con valganciclovir es una práctica de gran utilidad para prevenir las infecciones producidas por CMV. En nuestra serie sólo hubo infección en el 2,8%, en comparación con un 70% a 88% de las series históricas. Las técnicas utilizadas permiten el diagnóstico precoz de la infección, siendo la detección de la carga viral del CMV la que apunta como la más sensible. No obstante, a nuestro juicio, para determinar con más precisión su sensibilidad y especificidad, sería necesario continuar con el seguimiento de los enfermos durante un periodo mínimo de un año, durante el cual, al retirar la profilaxis del primer trimestre, podrían aparecer infecciones. De hecho, y aunque no es el objetivo del presente estudio, estamos observando la presencia de infecciones por CMV en algunos pacientes que ya han superado el tiempo de profilaxis trimestral, con manifestaciones clínicas o sin ellas, en el intervalo entre el tercer y el sexto mes. En este sentido, nos planteamos si sería necesario prolongar la profilaxis universal hasta el sexto mes postrasplante o si sería más beneficioso, en lugar de realizar una profilaxis universal, anticiparnos a la infección

y realizar un tratamiento anticipado. En este último caso, la determinación de la carga viral del CMV podría ser la técnica de elección. Todas estas consideraciones son de actualidad y es necesario comprobarlas en futuros estudios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fishman, J.A., Rubin, R.H. *Infection in organ-transplant recipients*. N Engl J Med 1998; 338: 1741-1751.
2. Rubin, R.H. *Cytomegalovirus in solid organ transplantation*. Transplant Infect Dis 2001; 3: 1-5.
3. Schöeder, R., Michelon, T., Fagundes, I. y cols. *Cytomegalovirus disease latent and active infection rates during the first trimester after kidney transplantation*. Transplant Proc 2004; 36: 896-898.
4. Ljungman, P., Griffiths, P., Paya, C. *Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients*. Clin Infect Dis 2002; 34: 1094-1097.
5. Opelz, G., Döhler, B., Ruhstroth, A. *Cytomegalovirus prophylaxis and graft outcome in solid organ transplantation: A collaborative transplant study report*. Am J Transplant 2004; 4: 928-936.
6. Borchers, A.T., Pérez, R., Kaysen, G., Ansari, A., Gershwin, M.E. *Role of cytomegalovirus infection in allograft rejection: A review of possible mechanisms*. Transplant Immunol 1999; 7: 75-82.
7. Sagedal, S., Nordal, K.P., Hartman, A. y cols. *The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients*. Am J Transplant 2002; 2: 850-856.
8. Danovich, G.M. *Handbook of kidney transplantation. Infections in kidney transplantation*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore 2005; 286-287.
9. Humar, A., Paya, C., Pescovitz, M.D. y cols. *Clinical utility of cytomegalovirus viral load testing for predicting CMV disease in D+/R- solid organ transplant recipients*. Am J Transplant 2004; 4: 644-649.
10. Razonable, R.R., Paya, C.V. *Valganciclovir for prevention and treatment of cytomegalovirus disease in immunocompromised hosts*. Expert Rev Anti Infect Ther 2004; 2: 27-41.
11. Babel, N., Gabdrakhmanov, L., Juergensen, J.S. y cols. *Treatment of cytomegalovirus disease with valganciclovir in renal transplant recipients: A single center experience*. Transplantation 2004; 78: 283-285.
12. Casillo, R., Grimaldi, M., Ragone, E. y cols. *Efficacy and limitations of preemptive therapy against cytomegalovirus infections in heart transplant patients*. Transplant Proc 2004; 36: 651-653.
13. Razonable, R.R., Brown, R.A., Wilson, J. y cols. *The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in transplant recipients with CMV disease*. Transplantation 2002; 73: 968-973.
14. Kalpoe, J.S., Kroes, A.C., de Jong, M.D. y cols. *Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurements and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection*. J Clin Microbiol 2004; 424: 1498-1504.
15. Pancholi, P., Wu, F., Della-Latta, P. *Rapid detection of cytomegalovirus infection in transplant patients*. Expert Rev Mol Diagn 2004; 4: 231-242.
16. Sia, I.G., Wilson, J.A., Groettum, C.M. y cols. *Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation*. J Infect Dis 2000; 181: 717-720.
17. Boeckh, M., Huang, M., Ferrenberg, J. y cols. *Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR*. J Clin Microbiol 2004; 42: 1142-1148.
18. Schöeder, R., Michelon, T., Fagundes, I. y cols. *Comparison between RFLP-PCR and antigenemia for pp65 antigen for diagnosis of cytomegalovirus disease after kidney transplantation*. Transplant Proc 2004; 36: 891-893.
19. Meyer-Koenig, U., Weidmann, M., Kirste, G., Hufter, F.T. *Cytomegalovirus infection in organ-transplant recipients: Diagnostic value of pp65 antigen test, qualitative polymerase chain reaction (PCR) and quantitative Taqman PCR*. Transplantation 2004; 77: 1692-1698.
20. Piiparinen, H., Hockerstedt, K., Gronhagen-Riska, C., Lautenschlager, I. *Comparison of two quantitative CMV PCR 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: 258-266.
21. Mengelle, C., Pasquier, C., Rostaing, L. y cols. *Quantification of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplants by real-time quantitative PCR and pp65 antigenemia*. J Clin Microbiol 2003; 41: 3840-3845.
22. Gouarin, S., Vabret, A., Gault, E. y cols. *Quantification analysis of HCMV DNA load in whole blood of renal transplant patients using real-time PCR assay*. J Clin Virol 2004; 29: 194-201.
23. Xiao, Y., Shi, K., Mao, X. *Detection of cytomegalovirus antigens and virus DNA in the peripheral blood after organ transplantation*. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 1999; 13: 287-290.
24. Li, H., Dummer, J.S., Estes, W.R. y cols. *Measurements of human cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients*. J Clin Microbiol 2003; 41: 187-191.
25. Kouzarides, T., Bankier, A.T., Satchwell, S.C. y cols. *Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene*. J Virol 1987; 61: 125-133.
26. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory, NY 1989.
27. Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.S. *Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction*. Gene 1990; 93: 125-128.