

## Original

---

# Estudio de la sensibilidad de citomegalovirus a ganciclovir y foscarnet mediante el cultivo *shell-vial* de sangre periférica

J. Reina, M. Munar e I. Blanco

Unidad de Virología, Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario Son Dureta, 07014 Palma de Mallorca.

### RESUMEN

Se presenta un estudio sobre la sensibilidad a ganciclovir y foscarnet in vitro de 10 cepas de citomegalovirus aisladas en sangre periférica de pacientes inmunodeprimidos (6 VIH+ y 4 receptores de trasplantes renales). La técnica utilizada ha sido la reducción del número de focos infectivos a partir de la siembra de los polimorfonucleares en la línea MRC-5. Todas las cepas se han mostrado sensibles a los dos fármacos antivirales, con unos porcentajes de reducción de focos infectivos situados entre el 92,6% y el 100% para ganciclovir y del 95,1% al 100% para foscarnet. Uno de los principales inconvenientes de esta técnica es la dificultad para predecir el número de focos infectivos que aparecerán en los viales control a partir de los valores de la antigenemia pp65. Por el contrario, es muy sencilla de realizar y tan sólo requiere una incubación corta, de 4 a 5 días, con lo cual se obtienen resultados con rapidez. La técnica de reducción de focos infectivos puede ser útil como método de screening en pacientes con tratamiento prolongado con alguno de los antivirales y mala evolución clínica.

**Palabras clave:** Citomegalovirus - Ganciclovir - Foscarnet - Sensibilidad - Reducción de focos infectivos

## *Study of cytomegalovirus sensitivity to ganciclovir and foscarnet with the shell-vial culture of peripheral blood*

### SUMMARY

We report an in vitro susceptibility study of 10 cytomegalovirus strains isolated in peripheral blood of immunosuppressed patients (6 HIV-positive and 4 renal transplant recipients). The technique used has been the infectious foci reduction assay with the inoculation of peripheral polymorphonuclear leukocytes in the MRC-5 cell line and ganciclovir (20  $\mu$ M) and foscarnet (415  $\mu$ M) as the antivirals studied. All the analyzed strains were susceptible to the two antivirals with a percentage of foci reduction situated between 92.6% and 100% for ganciclovir and 95.1% and 100% for foscarnet. One of the greatest practical difficulties of this technique is to predict the number of infectious foci that would appear in the control vials utilizing the values of pp65 antigenemia. In spite of this the technique is very easy to do and only needs 4-5 days of incubation to obtain the susceptibility results. The technique of infectious foci reduction would be used as a screening method in patients with prolonged antiviral therapy and with inadequate clinical evolution.

**Key words:** Cytomegalovirus - Ganciclovir - Foscarnet - Susceptibility - Infectious foci reduction assay

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones localizadas y sistémicas por citomegalovirus (CMV) constituyen en la actualidad una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en la población inmunodeprimida, especialmente en los pacientes sometidos a trasplantes de órgano sólido y los enfermos de SIDA (1, 2). Debido a ello, es preciso disponer de técnicas rápidas de diagnóstico que permitan iniciar un tratamiento específico, en ocasiones de tipo preventivo, que impida el paso de infección a enfermedad sintomática. La técnica de la antigenemia pp65, realizada sobre los polimorfonucleares (PMN) de sangre periférica, y el cultivo celular de esta misma fracción celular (viremia) han demostrado ser las que presentan un mejor valor predictivo positivo frente al desarrollo de enfermedad por CMV (3, 4).

La existencia de algunos fármacos con demostrada actividad anti-CMV (ganciclovir y foscarnet) permite realizar tratamientos tanto profilácticos como terapéuticos en este grupo de enfermos. Sin embargo, la utilización continuada de ellos, preferentemente de ganciclovir, ha determinado la aparición lenta, aunque progresiva, de cepas de CMV resistentes a este fármaco (5, 6). Este tipo de resistencia ya fue descrito en 1989 (7) y desde entonces su incidencia ha ido incrementándose con el número y tiempo de tratamiento de los pacientes (5, 6, 8). Por otro lado, la resistencia del CMV al foscarnet es una entidad, todavía, poco frecuente (9). En los últimos años ya se han descrito cepas de CMV resistentes a ambos fármacos (9, 10), lo cual empieza a dificultar el tratamiento correcto de los pacientes.

Los estudios de sensibilidad *in vitro* a los fármacos antivirales son todavía complejos y laboriosos, de modo que no se recomienda su realización rutinaria. La técnica estándar de referencia para estos estudios es la denominada de reducción de placas (11); sin embargo, esta técnica y otras también aceptadas, como las de hibridación del DNA (12) y ELISA (13), precisan del aislamiento y la propagación del CMV, lo cual determina periodos de 4 a 6 semanas hasta finalizar el estudio completo de la sensibilidad.

Recientemente se ha descrito un método rápido de detección de resistencia del CMV a ganciclovir y foscarnet a partir de los PMN de sangre periférica utilizados normalmente para la realización de la prueba de la antigenemia y del cultivo viral tipo *shell-vial* (14). Debido a la buena correlación que ha demostrado con la técnica de referencia, nos ha parecido interesante realizar el estudio de la sensibilidad de las cepas de CMV aisladas en sangre periférica en pacientes inmunodeprimidos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

A un grupo de 25 pacientes inmunodeprimidos (19 VIH+ y 6 receptores de trasplantes renales) cuyas antigenemias pp65 fueron positivas con un valor  $>50$  PMN+  $\times 10^5$  PMN se les solicitó el mismo día una nueva muestra de sangre, previa al inicio del tratamiento, para la realización del estudio de sensibilidad.

Cada paciente aportó una muestra de 3 ml de sangre con ácido etilendiaminotetraacético, que fue utilizada para la extracción de los PMN mediante sedimentación en dextrano salino (14). Así, cada una de ellas se mezcló con 1 ml de dextrano salino y se dejó sedimentar durante 45 minutos a 36 °C. Transcurrido este tiempo se extrajo 1 ml del sobrenadante (capa con predominio de polimorfonucleares) y se transfirió a un tubo estéril al que se añadieron 4 ml de tampón fosfato salino (PBS, pH 7,2). Se realizó una centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos y el sedimento se resuspendió en 4 ml de PBS. Se repartieron 2 ml en un tubo para el cultivo celular tipo *shell-vial* y 2 ml para la antigenemia.

Al tubo para la antigenemia (Ag) se añadió 1 ml de cloruro amónico (solución lisante de hematíes), que se dejó actuar de 2 a 4 minutos; a continuación se añadieron 2 ml de PBS y se realizaron dos lavados con PBS y sus correspondientes centrifugaciones. El sedimento final se resuspendió en 1 ml de PBS. Con este volumen se realizó el recuento celular y se ajustó la concentración final a 200.000 PMN/ml; su volumen correspondiente se citocentrifugó (*Cytospin*, Shandon) sobre un porta a 700 rpm durante 10 minutos. Tras su secado, se fijaron los portas con formaldehído-sacarosa y se tiñeron por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal anti-pp65 (*lower matrix protein*, Monofluokit CMV, Pasteur Diagnostics). Se realizó el recuento de los PMN fluorescentes y se dio el resultado en número de PMN+  $\times 10^5$  PMN observados (antigenemia cuantitativa).

El tubo para el cultivo *shell-vial* fue centrifugado, lavado y resuspendido dos veces hasta que finalmente el sedimento se resuspendió en 1 ml de medio de mantenimiento para fibroblastos, realizándose después el recuento celular. Se sembraron 6 viales de la línea MRC-5 (*Vircell*, Ingelheim Diagnostica) a razón de unos 200.000 PMN/vial. Los viales se centrifugaron a 700 g durante 45 minutos y se dejaron reposar a 36 °C durante 30 minutos. Tras decantar el contenido de los viales se rotularon dos de ellos como control (C), dos como ganciclovir (G) y dos como foscarnet (F). A los viales C se les añadió 1 ml de medio de mantenimiento para fibroblastos, a los viales G 1 ml de una solución de ganciclovir ya preparada de 20  $\mu$ M (*Cytovene*, Syntex, Roche) y a los viales F 1 ml de una solución de foscarnet de 415  $\mu$ M (Astra). Se dejaron incubar a 36 °C durante 3 días, tras lo cual se reveló uno de los controles a través de su fijación con metanol e inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal anti-p72 (clon E13, Argene Biosoft, Francia), y se realizó el recuento del número total de focos infectivos observados en la monocapa. Si la cantidad de focos era  $<10$ /vial se dejaban incubar todos los viales 2 días más (tiempo total máximo de incubación 5 días), y al final de este periodo se revelaron todos ellos mediante la técnica antes descrita.

Para realizar la lectura del estudio de sensibilidad es preciso contar el número total de focos infectivos que aparecen en los viales control y en cada uno de los que contie-

nen los antivirales; en estos últimos se hace la media aritmética de los focos observados en los dos viales. Finalmente se establece el porcentaje de reducción de focos infectivos observados en los viales G y F comparándolos con el número de focos detectados en los viales control.

La interpretación de los resultados obtenidos se ha realizado siguiendo las recomendaciones de Gerna y cols. (14). Así, si el número de focos infectivos observados en los viales G y F es inferior al 50% de los detectados en el vial control se considera a la cepa sensible a estos fármacos. Si la disminución en el número de focos no es inferior al 50% o el número de ellos es igual al detectado en el vial control significa que la  $DI_{50}$  de la cepa estudiada es  $>20 \mu\text{M}$  para ganciclovir y  $>415 \mu\text{M}$  para foscarnet, y por lo tanto la cepa debe considerarse como resistente a estos fármacos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 25 pacientes estudiados en tan sólo 10 de ellos se pudo realizar el estudio de sensibilidad debido a que, en los otros 15 pacientes, a pesar de presentar valores de antigenemia  $pp65 >50 \text{ PMN} \times 10^5 \text{ PMN}$  el número de focos infectivos detectados en los viales control fue inferior a 10 incluso al quinto día de incubación. Los valores de la antigenemia  $pp65$  en el grupo de pacientes estudiados han oscilado entre 72 y 1075  $\text{PMN} \times 10^5 \text{ PMN}$  (Tabla 1), mientras que el número de focos infectivos observados en los viales de estos pacientes ha oscilado entre 36 y 462.

Los porcentajes de reducción de focos infectivos oscilaron entre 92,6% y 100% para ganciclovir y entre 95,1% y 100% para foscarnet; no se ha detectado ninguna cepa de CMV resistente a los dos fármacos. En el 50% de las cepas la reducción de focos infectivos obtenida por ganciclovir ha sido del 100%, frente al 60% de la observada con foscarnet (Fig. 1).

Como ya se ha mencionado, uno de los principales problemas en la utilización prolongada o continuada de los fármacos antivirales, al igual que ocurre con los antibióti-

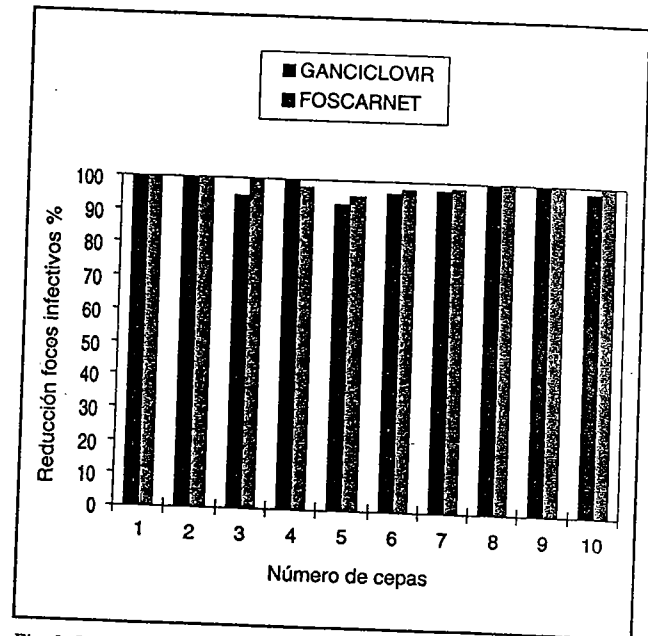


Fig. 1. Porcentajes de reducción de focos infectivos obtenidos por los dos fármacos antivirales estudiados.

cos, es la aparición de cepas resistentes (6, 7). De los utilizados frente al CMV, el ganciclovir, debido a su empleo mayoritario, es el que en estos momentos empieza a presentar problemas de resistencia. Así, se ha podido comprobar cómo alrededor del 8% de los pacientes con SIDA y retinitis por CMV tratados con ganciclovir desarrollan cepas resistentes a este fármaco, lo cual obliga a su sustitución por foscarnet (6). El principal factor causante de la aparición de estas resistencias lo constituyen los tratamientos prolongados y las profilaxis, especialmente en pacientes receptores de un trasplante (5-7).

Por todo ello, es preciso realizar, aunque no de una forma rutinaria, estudios de sensibilidad destinados a conocer el estado de las cepas de CMV que afectan a la población inmunodeprimida. Así mismo, en aquellos pacientes con tratamientos de más de 3 meses y con mala evolución clínica debería estudiarse la sensibilidad del CMV al fármaco que se esté utilizando (6, 7).

Uno de los principales inconvenientes de las técnicas de sensibilidad *in vitro* frente a fármacos antivirales es la laboriosidad y tardanza en la obtención de los resultados. Así, la técnica de reducción de placas requiere un mínimo de 4 a 6 semanas para la obtención de resultados definitivos (11, 15). Por ello es una técnica que no se realiza en todos los laboratorios y sólo en casos específicos frente a algún paciente problemático.

La posibilidad de realizar el estudio de sensibilidad antiviral a partir de los PMN de sangre periférica simplifica de forma clara toda la problemática de esta técnica. Siguiendo las recomendaciones de Gerna y cols. (14) se puede utilizar como parámetro de sensibilidad o resistencia el porcentaje de reducción del número de focos infectivos que se obtienen en el cultivo rápido *shell-vial*. Este método, evidentemente,

Tabla 1. Resultados obtenidos en el estudio de la sensibilidad a ganciclovir y foscarnet en 10 cepas de CMV aisladas en sangre periférica.

Nº	Clínica	Antigenemia*	SVC**	Nº total de focos infectivos (% reducción)	
				Ganciclovir	Foscarnet
1	Retinitis	1075	108	0 (100)	0 (100)
2	Retinitis	463	36	0 (100)	0 (100)
3	SF-VIH*	302	73	4 (94,5)	0 (100)
4	SF-VIH	76	44	0 (100)	1 (97,7)
5	Colitis	380	41	3 (92,6)	2 (95,1)
6	SF-VIH	530	180	6 (96,6)	4 (97,7)
7	SF-TR**	1000	462	11 (97,6)	8 (98,2)
8	SF-TR	90	60	0 (100)	0 (100)
9	SF-TR	410	102	0 (100)	0 (100)
10	SF-TR	72	50	1 (98,0)	0 (100)

\*Antigenemia = número de  $\text{PMN} \times 10^5 \text{ PMN}$ .

\*\*SVC = *shell-vial* cuantitativo = número total de focos infectivos.

\*SF-VIH = síndrome febril en paciente VIH+.

\*\*SF-TR = síndrome febril en paciente con trasplante renal.

sólo puede aplicarse a aquellos pacientes con viremia positiva y debería considerarse sólo como *screening*, dado que utiliza únicamente una concentración fija de cada uno de los antivirales. Estas dos consideraciones no le restan significación, pues parece aceptado que el aislamiento de CMV en sangre periférica es uno de los principales marcadores de infección activa y/o enfermedad por CMV (16). Por lo tanto, la técnica se aplica a una muestra clínica de elevada significación, fenómeno que no ocurre cuando se utilizan las cepas de CMV aisladas en muestras de difícil valoración como orina, frotis faríngeo e incluso líquido broncoaspirado (2, 3).

Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de la técnica de reducción de focos es la elevada dificultad de predecir, a partir de los valores de la antigenemia pp65, el número de focos infectivos que aparecerán en los viales control (14). Este fenómeno se debe al hecho, ya demostrado, de que no siempre existe una buena correlación entre la antigenemia y el cultivo cuantitativo; algunos autores apuntan el hecho de que en el cultivo *shell-vial* sólo se recupera el 10% de los teóricamente infectados PMN observados en la antigenemia pp65 (17, 18). Debido a ello, sólo hemos podido estudiar la sensibilidad en 10 de los 25 pacientes con valores de antigenemia elevados; en 15 de ellos el número de focos infectivos detectados en el cultivo era <10, y por lo tanto no utilizables para el estudio debido a la simple variación que se produce por el azar o la no distribución uniforme de los PMN infectados entre los diferentes viales. Por ello recomendamos que sólo se realice el estudio de sensibilidad a partir de los PMN de sangre periférica con valores previos de antigenemia >50 PMN+ × 10<sup>5</sup> PMN, dado que valores inferiores apenas aportan un número de focos infectivos significativo.

Debido a que esta técnica sólo utiliza una única concentración para cada uno de los antivirales (ganciclovir 20 µM y foscarnet 415 µM), debe considerarse como un método rápido de *screening* o selección, de modo que la detección de resistencia deberá confirmarse mediante la técnica convencional de reducción de placas (11, 14). Existen ciertas discrepancias en cuanto a los valores de sensibilidad del CMV frente a ganciclovir y foscarnet dependiendo de la línea celular utilizada (MRC-5 o MRHF). Así, para Drew y cols. (6), una cepa de CMV debe considerarse sensible si su DI<sub>50</sub> (concentración del antiviral que inhibe el 50% del número de placas) es <5 µM para ganciclovir y <400 µM para foscarnet, datos no coincidentes con los descritos por Pepin y cols. (19). A pesar de ello, parece evidente que cualquier cepa de CMV que presente una DI<sub>50</sub> >20 µM para ganciclovir debe ser considerada como resistente (14). Gerna y cols. (14) han elegido esta concentración única tras calcular la DI<sub>50</sub>, la DI<sub>90</sub> y los correspondientes índices de sensibilidad (IS) para un conjunto amplio de cepas de CMV. En este estudio todas las cepas con valores >20 µM eran resistentes por la técnica convencional y presentaban valores de IS<sub>50</sub> >6,9 para ganciclovir y >5,9 para foscarnet.

Confirmando los resultados obtenidos por Rabella y cols. (20) y Cañizares y cols. (21), ninguna de las cepas estudiadas por nosotros se ha mostrado resistente a ganciclovir y foscarnet. Sin embargo, en nuestro caso todas las cepas pertenecían a pacientes que no habían sido tratados previamente (receptores de trasplantes renales) o lo habían sido por periodos de tiempo no superiores a las 4-6 semanas de forma intermitente (retinitis). Probablemente la sensibilidad general de las cepas refleje el estado de la cepa salvaje existente en la población y la resistencia sólo se desarrolle de forma individual en un determinado paciente sometido a unas condiciones terapéuticas específicas.

En resumen, creemos que la técnica de sensibilidad antiviral a partir de los PMN de sangre periférica determinando el porcentaje de reducción de focos infectivos puede ser muy válida y útil como sistema de *screening*, pudiendo ser realizada de forma sencilla y obteniendo los resultados en un periodo corto de tiempo. Estamos de acuerdo en que todavía no es necesario realizar de forma rutinaria el estudio de sensibilidad de todas las cepas aisladas, pero quizá sí debería realizarse cada cierto periodo de tiempo para conocer la evolución natural de las cepas en el entorno hospitalario. La sencillez y rapidez de la técnica permiten aplicarla en aquellos pacientes que no responden bien o presentan una evolución tórpida tras el tratamiento inicial con un determinado antiviral.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rubin, R.H. *Infection in the renal and liver transplant patient*. En: Rubin, R.H., Young, L.S. (Eds.). *Clinical Approach to Infection in the Compromised Host* (2nd Ed.). Plenum Publishing Corporation, New York 1988; 557-621.
2. Jacobson, M.A., Mills, J. *Serious cytomegalovirus disease in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Clinical finding, diagnosis, and treatment*. *Ann Intern Med* 1988; 108: 585-594.
3. Landry, M.L., Ferguson, D. *Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease*. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2851-2856.
4. Van der Bij, W., Schirm, J., Torensma, R., van Son, W.J., Tegzess, A.M., The, T.H. *Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood*. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2531-2535.
5. Laskin, O.L., Stahl-Baylis, C.M., Kalman, C.M., Rosecan, L.R. *Use of ganciclovir to treat serious cytomegalovirus infections in patients with AIDS*. *J Infect Dis* 1987; 155: 323-327.
6. Drew, W.L., Miner, R.C., Busch, D.F., Follansbee, S.E., Guillet, J., Mehalko, S.G. y cols. *Prevalence of resistance in patients receiving ganciclovir for serious cytomegalovirus infection*. *J Infect Dis* 1991; 163: 716-719.
7. Erice, A., Chou, S., Biron, K.K., Stanat, S.C., Balfour, H.H., Jordan, M.C. *Progressive disease due to ganciclovir resistant cytomegalovirus in immunocompromised patients*. *N Engl J Med* 1989; 320: 289-293.
8. Gerna, G., Baldanti, F., Zavattoni, M., Sarasini, A., Percivalle, E., Revello, M.G. *Monitoring of ganciclovir sensitivity of multiple human cytomegalovirus strains coinfecting blood of an AIDS patient by an immediate-early antigen plaque assay*. *Antiviral Res* 1992; 19: 333-345.
9. Leport, C., Puget, S., Pepin, J.M., Levy, S., Perrone, C., Brun-Vezinet, F., Vilde, J.L. *Cytomegalovirus resistant to foscarnet: Clinicovirologic correlation in a patient with human immunodeficiency virus*. *J Infect Dis* 1993; 168: 1329-1330.

10. Knox, K.K., Drobyski, W.R., Carrigan, D.R. *Cytomegalovirus isolate resistant to ganciclovir and foscarnet from a marrow transplant patient.* Lancet 1991; 337: 1292-1293.
11. Biron, K.K., Stanat, S.C., Sorrell, J.B., Fife, J.A., Keller, P.M., Lambe, C.U., Nelson, D.J. *Metabolic activation of the nucleoside analog 9-(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl) guanine in human diploid fibroblasts infected with human cytomegalovirus.* Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 2473-2477.
12. Dankner, W.M., Scholl, D., Stanat, S.C., Martin, M., Sonke, R.L., Spector, S.A. *Rapid antiviral DNA-DNA hybridization assay for human cytomegalovirus.* J Virol Methods 1990; 28: 293-298.
13. Tatarowicz, W.A., Lurain, N.S., Thompson, K.D. *In situ ELISA for the evaluation of antiviral compounds effective against human cytomegalovirus.* J Virol Methods 1991; 35: 207-215.
14. Gerna, G., Sarasini, A., Percivalle, E., Zavattoni, M., Baldanti, F., Revello, M.G. *Rapid screening for resistance to ganciclovir and foscarnet of primary isolates of human cytomegalovirus from culture-positive blood samples.* J Clin Microbiol 1995; 33: 738-741.
15. Snoeck, R., Andrei, G., De Clerq, E. *Patterns of resistance and sensitivity to antiviral compounds of drug-resistant strains of human cytomegalovirus selected in vitro.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 574-579.
16. Gerna, G., Zipeto, D., Parea, M., Revello, M.G., Silini, E., Percivalle, E., Zavattoni, M., Grossi, P., Milanese, G. *Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia and DNAemia.* J Infect Dis 1991; 164: 488-498.
17. Buller, R.S., Bailey, T.C., Ettinger, N.A., Keener, M., Langlois, T., Miller, J.P., Storch, G.A. *Use of a modified shell vial technique to quantitative cytomegalovirus viremia in a population of solid-organ transplant recipients.* J Clin Microbiol 1992; 30: 2620-2624.
18. Reina, J., Blanco, I., Munar, M. *Correlation between human cytomegalovirus quantitative p72 antigenemia and viremia.* Clin Diagn Virol 1996 (en prensa).
19. Pepin, J.M., Simon, F., Dussault, A., Collin, G., Dazza, M.C., Brun-Vezinet, F. *Rapid determination of human cytomegalovirus susceptibility to ganciclovir directly from clinical specimen primocultures.* J Clin Microbiol 1992; 30: 2917-2920.
20. Rabella, N., Otegui, M., Gurgui, M., Labeaga, R., Mercader, M., Sánchez, I., Barraquer, P., Prats, G. *Valores obtenidos en el estudio de la sensibilidad in vitro de citomegalovirus a ganciclovir y foscarnet.* VII Congreso Nacional SEIMC, Torremolinos. Libro de Resúmenes, Abstract 15/10; 117.
21. Cañizares, A., Lobo, M., Pérez-Elías, M.J., González, J., Redondo, E., Guerrero, A. *Estudio de sensibilidad in vitro a dos antivirales de ceapas de citomegalovirus procedentes de pacientes con retinitis.* VII Congreso Nacional SEIMC, Torremolinos. Libro de Resúmenes, Abstract 15/16; 119.