

Aislamiento de citomegalovirus a partir de sangre periférica mediante cultivo en *shell-vial*. Consideraciones técnicas.

Jordi Reina, Victoria Fernández-Baca, María Munar e Isabel Blanco

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

FUNDAMENTO: Estudiar la utilidad diagnóstica de la siembra de un segundo *shell-vial* con los polimorfonucleares (PMN) de sangre periférica en el aislamiento de citomegalovirus (CMV) en sangre (viremia) de pacientes inmunodeprimidos.

MATERIAL Y MÉTODOS: Las muestras de sangre recogidas con EDTA fueron fraccionadas por sedimentación en dextrano. De la fracción con predominio de los PMN se realizó el aislamiento en cultivo celular (línea MRC-5) tipo *shell-vial* (viremia) y la prueba de la antigenemia frente al antígeno pp65. Los cultivos fueron revelados a las 18-24 h (primer vial) y a las 72 h (segundo vial) mediante una inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno p72 del CMV.

RESULTADOS: Se han estudiado 878 muestras de sangre de las cuales 247 (28,1%) fueron positivas para CMV. De las muestras positivas, 211 (85,4%) lo fueron en el primer vial y 220 (89%) en el segundo. El 74,5% de las muestras fueron positivas en ambos viales. Ninguno de los dos viales detectó la totalidad de las muestras positivas. Se detectó una toxicidad global del 3% y del 8,5% en las muestras positivas. De los 28 viales tóxicos, este efecto apareció en un 25% en el primer vial y en un 82,1% en el segundo ($p < 0,001$). La utilización del segundo vial ha aportado un 14,5% más de positividad correspondientes a 36 muestras.

CONCLUSIONES: A la vista de los resultados obtenidos parece que para obtener el máximo rendimiento diagnóstico en el aislamiento de CMV mediante cultivo en *shell-vial* de sangre periférica es preciso inocular la totalidad de los PMN extraídos en dos viales. La prolongación en el período de incubación de uno de éstos hasta 72 h determina un incremento de aislamiento de CMV del 14,5%, con una toxicidad global baja.

Palabras clave: Citomegalovirus. Viremia. Cultivo *shell-vial*. Pacientes inmunodeprimidos.

Isolation of cytomegalovirus from peripheral blood by *shell-vial* culture. Technical considerations

BACKGROUND: We performed an study of the possible benefits derived from the use of two vials, incubated for 24 and 72 h respectively, in the isolation of CMV from the leukocyte polymorphonuclear (LPMN) of peripheral blood (viremia) in immunosuppressed patients, using the *shell-vial* culture technique.

MATERIAL AND METHODS: The blood samples with EDTA were fractionated by sedimentation with saline dextran. The LPMN-rich upper layer was used for the isolation of CMV in the *shell-vial* cell culture (MRC-5 cell line) and to prepare the antigenemia pp65 assay. The cultures were stained at 18-24 h (first vial) and 72 h (second vial) with an indirect immunofluorescence assay with a monoclonal antibody against p72 CMV antigen.

RESULTS: We studied 878 blood samples of which 247 (28.1%) were positive for CMV. Of the positive samples, 211 (85.4%) were detected in the first vial, and 220 (89%) in the second vial. Neither of the two vials detected all positive samples. An overall toxicity of 3%, in the positive samples, and 8.5% in positive samples was detected, respectively. Of the 28 toxic samples, 25.9% were detected in the first vial and 85.1% in the second ($p < 0.001$). The use of the second vial increased the number of positive samples in 14.5% (36 blood samples).

CONCLUSIONS: In view of the results obtained in this study it would seem that, in order to obtain the maximum diagnostic yield in the isolation of CMV from LPMN of peripheral blood in immunosuppressed patients by means of the *shell-vial* culture, it is necessary to inoculate all the LPMN extracted into two vials. The lengthening of the incubation period up to 72 h for one of the vials leads to an increased in the isolation of CMV of 14.5% with a low overall toxicity.

Key words: Cytomegalovirus. Viremia. *Shell-vial* culture. Immunosuppressed patients.

Correspondencia: Dr. J. Reina.
Unidad de Virología. Servicio de Microbiología Clínica.
Hospital Universitario Son Dureta.
Andrea Doria, 55. 07014 Palma de Mallorca.

Manuscrito recibido el 30-9-1996; aceptado el 7-5-1997.

Enferm Infecc Microbiol Clin 1997; 15: 361-363.

Introducción

Las infecciones por citomegalovirus (CMV) constituyen en la actualidad una de las primeras causas de mortalidad y morbilidad en los pacientes inmunodeprimidos, especialmente los sometidos a trasplantes de órganos y los pacientes con sida^{1,2}. Debido a la existencia de fármacos antivirales con una actividad específica frente a CMV³⁻⁵, se hace necesario disponer de algunas técnicas que permitan realizar de una forma rápida el diagnóstico de infección por CMV y poder de esta forma iniciar esta terapia específica³⁻⁶.

De entre las técnicas diagnósticas disponibles, la detección de la presencia de antígenos específicos de CMV en el núcleo de los polimorfonucleares (PMN) o antigenemia pp65^{1,7} y el aislamiento de CMV en sangre periférica (viremia)^{8,9} parecen ser los que han demostrado un mayor predictivo positivo sobre el paso de infección a enfermedad^{1,7-11}.

La detección de viremia por CMV es uno de los mejores datos analíticos que permitan establecer la existencia de una carga viral replicativa con capacidad para desarrollar enfermedad por CMV^{8,12,13}. Para el aislamiento de CMV se pueden utilizar los cultivos convencionales que, sin embargo, presentan el inconveniente del prolongado período de incubación que precisan para su positividad y la imposibilidad de cuantificar la carga viral presente en la muestra. La utilización del cultivo poscentrifugación en *shell-vial*, por el contrario, permite el aislamiento de CMV a las 18-24 h con una elevada especificidad y con la posibilidad de cuantificación; por todo ello, parece ser en la actualidad el método de cultivo recomendado^{12,14-16}.

En un intento de obtener el máximo rendimiento diagnóstico al cultivo de sangre periférica hemos realizado un estudio prospectivo para establecer la utilidad de sembrar los PMN extraídos de la sangre en dos viales, prolongando en uno de ellos el período de incubación en un intento de facilitar el aislamiento de CMV en los pacientes con una carga viral baja.

Material y métodos

Durante un período de 12 meses se han estudiado de forma prospectiva todas las muestras de sangre remitidas para la determinación de la antigenemia pp65 y de la viremia. Cada muestra consistía en 3 ml de sangre completa con EDTA que era procesada antes de las 24 h de su llegada al laboratorio.

Las muestras de sangre se procesaron siguiendo las recomendaciones de Gerna et al¹⁷ con pequeñas modificaciones. Así, cada una de éstas se mezcló con 1 ml de dextrano salino y se dejó sedimentar durante 45 min a 36 °C. Transcurrido este tiempo se extrajo 1 ml del sobrenadante (cepa con predominio de PMN) y se transfirió a un tubo estéril al que se añadieron 4 ml de tampón fosfosalino (PBS, pH 7,2). Se realizó una centrifugación a 1.000 rpm durante 10 min y el sedimento se resuspendió en 4 ml de PBS. Se repartieron 2 ml a un tubo para el cultivo celular en *shell-vial* y 2 ml para la antigenemia. La antigenemia pp65 se realizó según la técnica ya descrita previamente¹³.

El tubo destinado al cultivo en *shell-vial* fue centrifugado a 1.000 rpm durante 10 min, lavado con PBS y resuspendido dos veces hasta que finalmente el sedimento se resuspendió en 1 ml de medio de mantenimiento (MEM) para fibroblastos; tras lo cual se realizó el recuento celular en un contador hematológico. Se sembraron 2 viales de la línea MRC-5 (Viracell, Ingelheim Diagnostica) a razón de 500 µl/vial. Los viales se centrifugaron a 700 g durante 45 min y se dejaron reposar a 36 °C durante 30 min. A las 18-24 h de incubación a 36 °C se reveló uno de los viales y el otro lo fue a las 72 h. Tras su fijación durante 10

TABLA 1. Resultados obtenidos en los dos cultivos *shell-vial* inoculados con la sangre periférica (viremia)

Cultivo en <i>shell-vial</i>		N.º (porcentaje sobre positivos)
1º (24 h)	2º (72 h)	
+	+	184 (74,5)
-	+	36 (14,5)
+	-	6 (2,4)
+	Tóxico	21 (8,5)
Tóxico	-	5
Tóxico	Tóxico	2
-	-	624
Total		
211 (85,4 %)	220 (89 %)	878

TABLA 2. Características de los cultivos considerados tóxicos

Cultivo en <i>shell-vial</i>		N.º (%)
1º (24 h)	2º (72 h)	
+	Tóxico	21 (75,0)
Tóxico	-	5 (17,8)
Tóxico	Tóxico	2 (7,1)
Total 7 (25 %)		28

min con metanol a temperatura ambiente, las monocapas fueron teñidas mediante una inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo monoclonal anti-p72 (*immediate-early antigen*, Clon E-13; Argene Biosoft, Francia). La lectura se realizó en un microscopio de fluorescencia a 40x. Los viales fueron considerados tóxicos cuando se observaba la destrucción total de la monocapa debido a la muestra con imposibilidad de su lectura.

Resultados y discusión

Durante el período de estudio se analizaron 878 muestras de sangre de las cuales 247 (28,1%) fueron consideradas positivas (aislamiento de CMV). De las muestras positivas, 211 (85,4%) lo fueron en el primer vial y 220 (89%) en el segundo (tabla 1). El 74,5% de las muestras fueron positivas en ambos viales, en 6 casos (2,4%) el primer vial fue positivo y el segundo negativo y en 36 casos (14,5%) sólo fueron positivos en el segundo vial. Los viales se consideraron tóxicos en 28 casos (el 3,2% de todas las muestras y el 8,5% de las muestras positivas, 21/247) (tabla 2). El efecto tóxico fue más manifiesto en los viales de 72 h que en los de 18-24 h (el 82,1% frente al 25% respectivamente; $p < 0,001$).

Debido a la realización rutinaria del cultivo en *shell-vial* en su forma cuantitativa, inoculamos en los viales la totalidad de los PMN extraídos, oscilando la misma entre 150.000-1.000.000 de PMN por vial¹³. Uno de los posibles problemas de esta elevada concentración de PMN es la aparición de efectos tóxicos o destructivos sobre las monocapas celulares; para evitar este fenómeno sembramos dos viales siguiendo las recomendaciones de Storch et al¹². Además, el segundo vial lo incubamos 72 h para asegurarnos el máximo rendimiento del cultivo en aquellos pacientes con carga viral baja (antigenemia pp65 negativa).

El 85,4% de las muestras de sangre fueron positivas para CMV a las 18-24 h de incubación (primer vial), porcentaje muy superior al comunicado por Bennion et al¹⁸,

que tan sólo detectan un 30,6% a las 21 h y un 75% a las 72 h (el 89% en nuestro estudio). La explicación a esta diferencia podría encontrarse en el volumen inoculado en el cultivo en *shell-vial*. La mayoría de autores inoculan un volumen fijo sin establecer la concentración de PMN presente o bien una cantidad fija de PMN, generalmente la misma utilizada para la antigenemia (200.000 PMN). Por ello los resultados comparativos muestran bastantes diferencias. Storch et al¹² propusieron que para la obtención del máximo rendimiento del cultivo en *shell-vial* para CMV en sangre periférica deberían sembrarse entre 2-4 viales con un volumen final de 1-200.000 PMN.

Si se compara globalmente el número total de muestras positivas para CMV obtenidas en el primer vial (211/85,4%) y el segundo vial (220/89%) se comprueba que no existen diferencias significativas ($p > 0,5$). Sin embargo, en 36 casos sólo fue positivo el segundo vial, por lo tanto la siembra del mismo aportó un 14,5% más de aislamientos positivos. Este porcentaje es bastante similar al comunicado por Arens et al¹⁹ y situado en el 10% para todas las muestras analizadas y el 17,7% para la sangre. Estos datos confirman estudios previos sobre la obtención, por término medio, de un 10% más de cultivos positivos para CMV cuando se inocula más de un vial²⁰.

Además, ninguno de los dos viales detectó la totalidad de las muestras positivas, existiendo 63 muestras (25,5%) que tan sólo fueron detectadas por uno de los dos viales. En 5 de los 6 casos (83,3%) en los que tan sólo fue positivo el primer vial, la antigenemia pp65 fue negativa y en el restante su valor fue de 1 PMN-positivo $\times 10^5$ PMN. Es muy posible que el motivo de la negatividad de uno de los cultivos correspondiera a una muy baja carga viral en sangre periférica y a su no distribución uniforme entre los dos viales.

En cuanto a las 36 muestras que fueron positivas tan sólo a las 72 h de incubación, parecería lógico pensar que la suma de la baja carga viral y de la prolongación en el tiempo de incubación hayan favorecido su positividad. Prueba de ello es que el 66,6% de las muestras presentaron una antigenemia pp65 negativa, es decir, $< 1 \times 200.000$ PMN. El resto, sin embargo, presentaron valores de antigenemia que oscilaron entre 1-100 PMN-positivos ($\bar{X} = 40,3$); en estos casos es posible que no se obtuviera por errores técnicos una distribución uniforme de los PMN entre los dos viales o bien que la prolongación del periodo de incubación favorezca la aparición de focos infectivos en pacientes en las primeras fases del tratamiento antiviral específico con ganciclovir (3 casos) o con uno inespecífico (aciclovir) (2 casos).

La inoculación de dos viales con la totalidad de los PMN de la muestra no tiene tan sólo como objetivo el incrementar el volumen de la siembra sino además disminuir, como ya se ha mencionado, la toxicidad intrínseca de la misma^{18,19}. El porcentaje de toxicidad obtenido en este estudio es bastante bajo, el 3% para todas las muestras y el 8,5% para las positivas, lo cual refuerza la recomendación de utilizar un mínimo de dos viales por muestra. La toxicidad de la muestra parece incrementarse con el tiempo de incubación, incidiendo además sobre el envejecimiento progresivo de las monocapas^{19,20}. En nuestro estudio la mayoría de toxicidades se obtuvieron a las 72 h de incubación, que determinaron la pérdida de 21 muestras positivas detectadas en el primer vial.

En resumen, creemos que para la obtención del máximo rendimiento diagnóstico del cultivo en *shell-vial* para CMV a partir de los PMN de sangre periférica (viremia) es preciso inocular la mayor cantidad posible de PMN repartidos en un mínimo de dos viales que deberían incubarse 24 y 72 h, respectivamente. Con todo ello se consigue un elevado porcentaje de positividad (28,1%) y un incremento del 14,5% de la misma sobre la que se obtendría si sólo se utilizara un vial, con un porcentaje escaso de toxicidad sobre las monocapas.

Bibliografía

1. Van den Berg AP, Van der Bij W, Van Son WJ, Anema J, Van der Giessen M, Schrim J et al. Cytomegalovirus antigenemia as useful marker of symptomatic cytomegalovirus infection after renal transplantation. A report of 130 consecutive patients. *Transplantation* 1989; 48: 991-995.
2. Gallant JE, Moore RD, Richman DD, Keruly J, Chaisson RE. Incidence and natural history of CMV disease in patients with advanced HIV disease treated with zidovudine. *J Infect Dis* 1992; 166: 1.223-1.227.
3. Crumpacker CS. Ganciclovir. *N Engl J Med* 1996; 335: 721-729.
4. Jacobson MA, O'Donnell JJ, Mills J. Foscarnet treatment of cytomegalovirus retinitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 736-741.
5. Rahhal FM, Arévalo F, Chávez de la Paz E, Munguia D, Azen S, Freeman WR. Treatment of cytomegalovirus retinitis with intravitreal cidofovir in patients with AIDS. *Ann Intern Med* 1996; 125: 98-103.
6. Martin M. Prophylactic cytomegalovirus management strategies. *Transplantation Proc* 1995; 27: 23-27.
7. Van der Bij W, Torensma R, Van Son WJ, Anema J, Schrim J, Tegzess AM et al. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. *J Med Virol* 1988; 25: 179-188.
8. Van der Bij W, Schrim J, Torensma R, Van Son WJ, Tegzess AM, The TH. Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2.531-2.535.
9. Landry ML, Ferguson D. Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2.851-2.856.
10. Lipson SM, Kaplan MH, Tseng LF, Mandel FS. Use of the cytomegalovirus antigenemia (CMV-Ag) assay for the detection of CMV in the blood of AIDS patients. *Can J Microbiol* 1993; 39: 1.059-1.065.
11. Van der Giessen M, The TH, Van Son WJ. Cytomegalovirus antigenemia assay. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2.909-2.910.
12. Storch GA, Buller RS, Bailey TC, Ettinger NA, Langlois T, Gaudeault-Keener M et al. Comparison of PCR and pp65 antigenemia assay with quantitative shell vial culture for detection of cytomegalovirus in blood leukocytes from solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 997-1.003.
13. Reina J, Blanco I, Munar M. Correlation between human cytomegalovirus quantitative p72 antigenemia and viremia. *Clin Diagn Virol* 1996; 7: 63-67.
14. Gleaves CA, Smith T, Shuster EA, Pearson GR. Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 217-221.
15. Paya CV, Wold AD, Smith TF. Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by the shell vial assay and the conventional tube cell cultures. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 755-757.
16. Buller RS, Bailey TC, Ettinger NA, Keener M, Langlois T, Miller JP et al. Use of a modified shell vial technique to quantitate cytomegalovirus viremia in a population of solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2.620-2.624.
17. Gerna G, Revello MG, Percivalle E, Morini F. Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1.232-1.237.
18. Bennion DW, Carlquist J, Wright LJ. Specimen type as a source of variability in the reproducibility and timing of cytomegalovirus identification by culture. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 21: 203-207.
19. Arens M, Owen J, Hagerty CM, Reed CA, Storch GA. Optimizing recovery of cytomegalovirus in the shell vial culture procedure. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1991; 14: 125-130.
20. Paya CV, Wold AD, Ilstrup DM, Smith T. Evaluation of number of shell vial cell cultures per clinical specimen for rapid diagnosis of cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 198-200.