

Comparación entre centrifugación y sedimentación previa al cultivo en el aislamiento de citomegalovirus en la orina de receptores de trasplante renal

Jordi Reina, Concepción Alberto, Francisca Ballesteros, María Munar y Margarita Mari

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

FUNDAMENTO: Realizar un estudio comparativo entre el proceso de centrifugación convencional y la sedimentación de la orina en su capacidad para detectar la presencia de citomegalovirus en esta muestra.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se han estudiado las orinas procedentes de 45 pacientes receptores de un trasplante renal. Cada una de las muestras se dividió en dos partes y, tras su descontaminación, una de ellas fue sometida a centrifugación (1.500 rpm durante 10 min) y la otra a sedimentación a temperatura ambiente durante 30 min. Del sobrenadante de cada una de ellas se sembraron 250 µl en un *shell*-vial de la línea MRC-5. Los cultivos se incubaron durante 48 h a 37 °C y fueron revelados mediante una inmunofluorescencia indirecta. Las orinas consideradas como tóxicas totales fueron resembradas después de su dilución al 1:1 con medio de mantenimiento.

RESULTADOS: Se han analizado 845 orinas, 743 (88%) fueron negativas y 102 (12%) positivas; 66 (7,8%) fueron consideradas como tóxicas: 35 (4,1%) con toxicidad parcial y 31 (3,6%) con toxicidad total. Las orinas centrifugadas fueron positivas en el 86,2% de los casos frente al 98% de las sedimentadas ($p = 0,004$). De las 31 orinas consideradas como tóxicas totales, 17 (2,2%) correspondían a orinas negativas y 14 (13,7%) a las positivas. De ellas, 12 (85,7%) correspondían a las orinas centrifugadas y 2 (14,3%) a las sedimentadas ($p = 0,001$).
CONCLUSIONES: El porcentaje de toxicidad de las orinas ha sido bajo (7,8%), lo cual parece no recomendar la dilución sistemática de todas las orinas. El proceso de sedimentación ha permitido detectar un mayor número de orinas positivas para citomegalovirus con una menor toxicidad sobre las monocapas. La utilización de este proceso disminuiría el número de orinas que precisarían ser resembradas.

Palabras clave: Citomegalovirus. Orina. Centrifugación. Sedimentación.

Comparison between centrifugation and sedimentation prior to cultures in the isolation of cytomegalovirus in the urine of renal transplant receptors

BACKGROUND: To compare the capacity of conventional centrifugation and spontaneous sedimentation to detect the presence of cytomegalovirus (CMV) in urine samples.
MATERIAL AND METHODS: We studied urine samples from 45 renal transplant recipients. After decontamination half of each sample was centrifuged (1,500 rpm for 10 minutes) and the other half was allowed to sediment at room temperature for 30 minutes. From the supernatant of each of these 250 µl was inoculated in a shell-vial (MRC-5). Cultures were incubated for 48 hours at 37 °C and stained by an indirect immunofluorescence assay. The samples considered totally toxic were re-inoculated after dilution 1:1 with maintenance medium.

RESULTS: Of 845 urine samples analyzed, 743 (88%) were negative and 102 (12%) positive. 66 (7.8%) were considered toxic: 35 (4.1%) partially toxic and 31 (3.6%) totally toxic. Of the centrifuged urine samples 86.2% were positive against 98% of the sedimented samples ($p = 0.004$). Of the 31 samples considered totally toxic, 17 (2.2%) corresponded with negative urine samples and 14 (13.7%) with positive samples. Of these, 12 (85.7%) were detected in centrifuged samples and 2 (14.3%) in sedimented samples ($p = 0.001$).

CONCLUSIONS: The percentage of toxicity in the urine samples was low (7.8%) which does not seem to suggest the need for systematic dilution of all samples. The sedimentation process enabled us to detect a greater number of urine samples positive for CMV with a lower rate of toxicity of the monolayers. The use of this process would reduce the number of samples requiring re-inoculation.

Key words: Cytomegalovirus. Urine samples. Centrifugation. Sedimentation.

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 7-9-1998; aceptado el 2-12-1998.

Enferm Infecc Microbiol Clin 1999; 17: 82-84.

Introducción

La infección por citomegalovirus (CMV) constituye en la actualidad una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en los pacientes inmunodeprimidos. Entre el 50-60% de los pacientes receptores de trasplan-

TABLA 1. Valores de aislamiento de CMV obtenidos con la aplicación de cada uno de los métodos

Centrifugación	Sedimentación	Número (%)
+	+	86 (84,3)
+	-	2 (1,9)
-	+	14 (13,7)
88 (86,2)	100 (98)	102

CMV: citomegalovirus.

te renal padecen infección por CMV¹⁻³. En la actualidad, las mejores técnicas para establecer el diagnóstico de esta infección son la prueba de la antigenemia pp65 y el cultivo de sangre periférica (viremia)⁴⁻⁶.

El aislamiento de CMV en orina no aporta en general ningún dato diagnóstico, ni de precocidad ni predictivo, en este grupo de pacientes; por lo tanto, no es una muestra útil en este aspecto^{3,7}. Sin embargo, la presencia de CMV en la orina es un hecho muy frecuente y prolongado en el curso biológico de las infecciones causadas por este virus en este grupo de pacientes. La orina puede ser utilizada para la obtención de cepas de CMV de estos pacientes con fines epidemiológicos o de análisis de susceptibilidad antiviral^{8,9}.

Uno de los principales inconvenientes de las orinas, en su procesamiento rutinario, es su elevado efecto tóxico sobre las monocapas celulares^{8,11}. Debido a ello, se han propuestos diferentes métodos para disminuir este fenómeno, como la dilución previa de la muestra¹²⁻¹⁴. Se presenta un estudio en el que se ha comparado el proceso de centrifugación convencional con la simple sedimentación espontánea de la orina en la capacidad para detectar la presencia de CMV en estas muestras.

Material y métodos

Durante un período de 3 meses se han analizado las orinas procedentes de 45 pacientes receptores de trasplante renal. Cada una de las muestras era descontaminada mezclándose 3 ml de la orina con 0,5 ml de un medio de descontaminación mínimo esencial medium [MEM] + mezcla de antibióticos) y dejándose a temperatura ambiente durante 30 min. Tras este proceso cada muestra era dividida en dos partes: una de ellas era sometida a un proceso de centrifugación a 1.500 rpm durante 10 min y la otra se mantenía durante 30 min en sedimentación espontánea a temperatura ambiente.

Después de realizar estos procesos se aspiraban 250 µl del sobrenadante de cada una de las partes y se inoculaban en un cultivo tipo *shell*-vial de la línea celular MRC-5 (Vircell, Ingelheim Diagnostica, Barcelona). Los viales fueron centrifugados a 3.500 rpm durante 15 min y mantenidos durante 30 min a 37 °C para completar el proceso de adsorción viral. Los cultivos se incubaron durante 48 h a 37 °C, tras lo cual fueron lavados, fijados con metanol a temperatura ambiente durante 10 min y teñidos con un anticuerpo monoclonal anti-p72 (Clon E13, Biosoft-Argene, Francia) mediante una técnica de inmunofluorescencia indirecta siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los cultivos sólo se han considerado positivos o negativos desde el punto de vista cualitativo y no se han evaluado las diferencias en el recuento total de focos infectivos observados en la monocapa (sensibilidad cuantitativa).

Se ha considerado una orina como parcialmente tóxica si estaba destruida en < 50% de su extensión, y tóxica total si no se podía observar ningún resto viable de la monocapa, impidiendo la posible detección de cualquier foco infectivo («monocapa saltada»).

Las orinas consideradas como tóxicas totales fueron diluidas al 1:1 con MEM y procesadas de nuevo según el protocolo anterior.

El análisis estadístico se ha realizado utilizando la prueba de la χ^2 y la determinación de la *t* de Student para los datos apareados. Todos los valores de *p* son bilaterales y se ha considerado como significativo un valor de *p* < 0,05.

Resultados

Durante el período de estudio se han analizado 845 orinas. De todas ellas, 743 (88%) fueron consideradas como negativas para CMV (cultivo negativo) y 102 (12%) positivas (aislamiento de CMV); 66 (7,8%) orinas fueron tóxicas: 35 (4,1%) con toxicidad parcial y 31 (3,6%) con toxicidad total.

Los resultados de aislamiento comparativos obtenidos entre las orinas sometidas a centrifugación y a sedimentación se presentan en la tabla 1. En términos globales, las orinas centrifugadas fueron positivas en el 86,2% de los casos frente al 98% de las orinas dejadas en sedimentación espontánea. Estos resultados han evidenciado significación estadística (*p* = 0,004).

De las 35 orinas consideradas como tóxicas parciales 24 (3,2%) correspondieron a las orinas negativas y 11 (10,7%) a las orinas positivas. Estas 11 orinas positivas fueron detectadas por los dos métodos estudiados.

De las 31 orinas consideradas como tóxicas totales, y resembradas tras su dilución, 17 (2,2%) correspondían a las orinas negativas y 14 (13,7%) a las positivas. En el grupo de orinas positivas, 12 (85,7%) correspondían a las orinas centrifugadas y 2 (14,3%) a las sedimentadas; tras la dilución ninguna de las orinas fue tóxica en ambos métodos. Estos datos han tenido significación estadística (*p* = 0,001).

Las orinas resembradas debido a su toxicidad total pasaron a ser todas orinas normales o parcialmente tóxicas permitiendo la observación de los focos infectivos en aquellas que eran positivas.

Discusión

Como ya se ha mencionado, la toxicidad de las orinas sobre las monocapas celulares es uno de los principales inconvenientes del procesamiento de estas muestras^{9,11}. Este efecto tóxico es debido fundamentalmente a la naturaleza bioquímica de la muestra (proteínas, cristales, sales) y su efecto sobre las células del cultivo^{9,11,12}. Se ha comprobado, además, que el efecto tóxico está íntimamente relacionado con la edad del cultivo celular^{15,16}. A medida que las monocapas van envejeciendo, además de perder sensibilidad en la detección del CMV se incrementa el efecto tóxico de la orina sobre ellas. Por lo tanto, una primera recomendación para disminuir al máximo este efecto tóxico directo es el empleo de monocapas celulares con pases bajos; en el caso de los fibroblastos humanos o de sus líneas semicontinuas comerciales (MRC-5) esta disminución se obtiene en un pase inferior al 30^{9,10,14}. En esta fase de propagación los fibroblastos tienen una elevada sensibilidad a la infección viral con una baja sensibilidad a la toxicidad de las diferentes muestras clínicas^{9,10}.

Además de lo anteriormente mencionado, una posibilidad para disminuir la toxicidad de las orinas es su predilución antes de la siembra. Varios autores preconizan y han demostrado una sensibilidad semejante en el aislamiento de CMV con orina prediluida y sin diluir, pero con un descenso significativo del efecto tóxico directo^{13,14,17}. La eliminación del efecto tóxico beneficia a las orinas positivas, evitando falsos resultados negativos si no se resiembra la muestra.

El porcentaje de efecto tóxico de las orinas sobre las monocapas es bastante amplio y varía mucho en función del tipo de línea celular utilizada (comercial o personal), el tipo de cultivo celular (convencional o en *shell-vial*) y del tiempo que se incuba la muestra (24 o 48 h). En general, este porcentaje suele oscilar entre el 5 y el 44%, que suele descender al 5-13% cuando se prediluye la orina^{13,14}.

En nuestro estudio, sólo el 7,8% de las orinas analizadas, sin ningún tipo de predilución, fueron consideradas tóxicas y el 3,6% como tóxicas totales, obligando a la resiembra de la muestra. A la vista de estos datos no nos parece práctico realizar una predilución sistemática de todas las orinas como recomiendan algunos autores^{13,14,17}, dado que la inmensa mayoría no lo necesitarían (92,2%) y sólo sería eficaz en 66 orinas.

En nuestro estudio, las orinas con toxicidad parcial (< 50% de destrucción monocapa) no han necesitado de la predilución, dado que el porcentaje de monocapa viable permitía, dentro de unos límites, considerar a la muestra negativa o positiva. En este caso no se ha observado ninguna diferencia entre las orinas centrifugadas y sedimentadas, de modo que cualquiera de estos dos métodos sería igualmente aceptable.

En el caso de las orinas consideradas como tóxicas totales, la resiembra de las mismas previa dilución al 1:1 con el medio de mantenimiento ha permitido que todas ellas pasaran a ser tóxicas parciales, con posibilidad de observación, o normales, con integridad de la monocapa. De nuevo, e independientemente del método de procesamiento previo utilizado, la dilución de la orina es uno de los principales factores que disminuyen de forma significativa el efecto tóxico de estas muestras sobre los cultivos celulares^{13,14,17,18}.

En el grupo de muestras tóxicas totales y posteriormente consideradas como positivas hemos observado cómo la mayoría (85,7%) eran secundarias al proceso de centrifugación. De este modo uno de los principales beneficios del proceso de sedimentación espontáneo estudiado es la disminución del número de orinas con toxicidad total. Así, utilizando el método de centrifugación tuvimos que resembrar 29 orinas (17 de las consideradas como negativas y 12 de las positivas) lo que representa el 3,4% de todas las orinas procesadas. El empleo del método de sedimentación espontáneo nos obligó a resembrar 19 orinas (17 de las negativas y 2 de las positivas), representando el 2,2% de las muestras analizadas, no evidenciando, sin embargo, estos porcentajes significativa estadística ($p = 0,9$).

A la vista de los resultados obtenidos en este estudio comparativo, el método de sedimentación espontánea ha obtenido un porcentaje mayor de aislamientos de CMV en orina, con una disminución de la toxicidad total, aunque el bajo porcentaje de orinas tóxicas totales detectadas parece aconsejar más la predilución de las orinas que presenten este efecto adverso que la modificación del procesado rutinario, con centrifugación incluida, de las orinas previo a su siembra en los cultivos celulares.

Bibliografía

1. Sinnott JT, Coleman D, Cheek J, Rubin RW. Infections in renal transplantation. *Infect Dis Newslet* 1989; 8: 41-48.
2. Griffiths PD. Viral complications after transplantation. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36: 91-106.
3. Reina Prieto J, Bestard Palmer X, Saurina Gomila J, Gasco Company J, Fernández-Baca Gutiérrez del Álamo V, Munar Roca M. Utilidad del cultivo de orina y sangre para el diagnóstico de infección por citomegalovirus en el receptor de trasplante renal. *Rev Clin Esp* 1998; 198: 3-6.
4. 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.
5. 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.
6. Perez JL, García García A. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por citomegalovirus. *Rev Clin Esp* 1998; 198: 1-2.
7. Wunderli W, Auracher JD, Zbinden R. Cytomegalovirus detection in transplant recipients: comparison of different methods in a prospective survey. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2.648-2.650.
8. Britt WJ, Alford CA. Cytomegalovirus. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology* (3.ª ed.). Filadelfia: Lippincott-Raven Publishers, 1996; 2.493-2.523.
9. Pass RF, Britt WJ, Stagno S. Cytomegalovirus. En: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, editores. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections* (7.ª ed.). Washington DC: American Public Health Association, 1995; 253-271.
10. Pass RF, Britt WJ, Stagno S. Cytomegalovirus. En: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, editores. *Diagnostic procedures for viral rickettsial and chlamydial infections* (7.ª ed.). Washington: American Public Health Association, 1995; 253-272.
11. Leland DS. Concepts of clinical diagnostic. En: Lennette EH, editor. *Virology* (2.ª ed.). Nueva York: Marcel Dekker, 1992; 1-43.
12. Gieaves CA, Meyers JD. Comparison of MRC-5 and HFF cells for the identification of cytomegalovirus in centrifugation culture. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987; 6: 179-182.
13. Acosta B, Ferrer D, Jordan M, González D, Gobernado M. Detección de citomegalovirus en orina por la técnica de *shell-vial*: valor de diluir la muestra. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1991; 9: 561-563.
14. Pedraza MA, Otero JR. Evaluación del efecto de la dilución de la orina sobre la toxicidad y el aislamiento de citomegalovirus con la técnica rápida de cultivo-centrifugación en viales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992; 10: 352-354.
15. 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.
16. Fedorko DP, Ilstrup DM, Smith TF. Effect of age of shell-vial monolayers on detection of cytomegalovirus from urine specimens. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2.107-2.109.
17. DeGirolami PC, Dajos J, Eichelberger K, Mills LS, DeLuca AM. Rapid detection of cytomegalovirus in clinical specimens by immunofluorescent staining of shell-vial cultures. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 528-532.
18. Lee MS, Balfour HH. Optimal method for recovery of cytomegalovirus from urine of renal transplant recipients. *Transplantation* 1977; 24: 228-230.