

PCR EN TIEMPO REAL, UNA HERRAMIENTA EN EL PACIENTE TRASPLANTADO

Dra. Carolina Rodríguez
Laboratorio Dr. Stamboulian
División Biología Molecular

Introducción

En la actualidad, el paciente trasplantado, ha logrado mayor tiempo de supervivencia debido al avance en el manejo clínico y terapéutico.

Pero, pese a la aplicación de las nuevas técnicas quirúrgicas y terapias inmunosupresoras dirigidas a evitar el rechazo del órgano trasplantado, el factor de riesgo más importante en estos pacientes son las infecciones primarias y la reactivación post-trasplante de algunos virus latentes.

La mayor amenaza, luego del trasplante, continúan siendo los virus Epstein Barr humano (EBV) y Citomegalovirus (CMV) causantes de significativa morbilidad y mortalidad.

Desde el laboratorio, esta nueva etapa, es acompañada con nuevas técnicas para diagnosticar tempranamente estas infecciones que, anteriormente, eran consideradas fatales.

Infecciones por CMV y EBV en el paciente trasplantado

Los síntomas relacionados a la infección y enfermedad, varían en los diferentes pacientes, según el tipo de trasplante e intensidad de la inmunosupresión.

En la población trasplantada, existen, tres patrones de infección para estos virus, cada uno con diferente probabilidad de causar enfermedad clínica.

La infección primaria, como mayor factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad, se presenta en individuos seronegativos que reciben órganos o productos derivados de sangre seropositivos. Este es el mayor factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad.

La infección secundaria o reactivación de infección latente ocurre posttrasplante en pacientes seropositivos, que a menudo permanecen asintomáticas por la movilización de la memoria inmunológica. En este caso, el factor más crítico, es el tipo e intensidad de terapia inmunosupresora.

Por último, **la reinfección o superinfección con una nueva cepa**, es otra de las posibilidades.

El mayor factor de riesgo es el estado serológico del receptor del trasplante. Los riesgos de enfermedad resultan más altos en donante positivo y receptor negativo, remarcando como se ha dicho, la importancia del grado de inmunosupresión que presente el paciente.

En todos los casos la falla para reconstituir la inmunidad celular específica después del trasplante conduce a la progresión de la enfermedad.

Epstein Barr humano (EBV)

El EBV es el agente causal de la Mononucleosis infecciosa (MI).

En la infección primaria, su habilidad para infectar e inmortalizar linfocitos B es balanceada por la respuesta efectiva de células T, provocando un estado de latencia, donde el virus puede ser encontrado en algunas células B de la sangre periférica.

Luego del trasplante puede sobrevenir la infección primaria, de mayor riesgo en la población pediátrica, atento a la mayor probabilidad de los niños de ser seronegativos para EBV con anterioridad al trasplante.

La reactivación ocurre regularmente, siendo asintomática en individuos inmunocompetentes, pero pudiendo traer complicaciones en los pacientes en estado de inmunosupresión.

Tanto la infección primaria como la reactivación, se asocian frecuentemente con la enfermedad linfoproliferativa post trasplante (PTLD), que aún, con el mejor tratamiento disponible, es una de las complicaciones más importantes en el paciente trasplantado, ya que la mitad de ellos fallecen dentro del término de un año.

Existe amplia evidencia respecto a que la Mononucleosis infecciosa complicada y el riesgo de desarrollar PTLD, están asociadas a las altas cargas virales de EBV en sangre. Por el contrario, la remisión de la enfermedad se correlaciona con la disminución de esa carga viral.

De allí que el monitoreo de la viremia de EBV es sumamente importante, en el diagnóstico y tratamiento de PTLD.

Citomegalovirus (CMV)

El estado de inmunocompromiso postrasplante, provee un medioambiente ideal para que este virus ejerza su potencial patogénico.

Los efectos de la infección por CMV pueden ser clasificados en directos e indirectos.

Los **efectos directos** son los producidos por la enfermedad de CMV, cuyas manifestaciones clínicas incluyen neumonitis, hepatitis, enfermedad gastrointestinal entre otras, variando su incidencia y la frecuencia relativa en la población trasplantada.

Los **efectos indirectos** están relacionados con el rechazo del injerto y la susceptibilidad a infecciones oportunistas dadas las características inmunomoduladoras de este virus.

En ambos tipos de efectos, el tiempo de sobrevida del paciente disminuye.

Varios aspectos de la biología del CMV, conducen a concluir que la diseminación en sangre, se produce en la infección activa, siendo la viremia reconocida como el mayor factor de riesgo para la progresión a la enfermedad clínica.

El manejo apropiado de estos pacientes, depende de la detección temprana y la cuantificación de la viremia, para identificar el riesgo de enfermedad, diagnosticando la infección y determinando la respuesta y duración del tratamiento.

La introducción de los ensayos de antigenemia y moleculares marcó una nueva era en la habilidad para detectar rápidamente la infección citomegálica y conducir al uso de terapia adecuada.

Estrategia de prevención de enfermedad

En las últimas décadas, la práctica de la prevención y el manejo del paciente trasplantado, ya sea en órgano sólido o hematopoyético, han evolucionado notoriamente.

El manejo de las infecciones producidas por estos virus abarca la identificación del factor de riesgo, la detección temprana de infección, seguida por la iniciación de terapia antiviral, la estrategia antiviral profiláctica y reducción en inmunosupresión.

Para prevenir el desarrollo de enfermedades causadas por estos virus se utilizan dos estrategias básicas:

- **La primera**, consiste en administrar un agente antiviral efectivo, a los pacientes con posibilidad de reactivación del virus (**profilaxis**).
- **La segunda**, sólo utilizable en individuos con reactivación viral demostrada, consiste en usar un antiviral, pero antes de que ocurra la enfermedad (**terapia temprana o preemptiva**).

Un uso selectivo de las drogas antivirales por un corto período de tiempo en pacientes de alto riesgo, podría evitar los efectos colaterales innecesarios relacionados con la prolongada terapia, acelerando la reconstitución inmune y evitando la enfermedad tardía.

Para esta segunda estrategia, es importante un rápido diagnóstico de las infecciones que permita el manejo crítico de la enfermedad. De allí la relevancia de contar con un marcador sensible y temprano de reactivación y métodos de laboratorio cuantitativos rápidos, sensibles y precisos para monitorear la carga viral.

Diagnóstico CMV Y EBV en el paciente trasplantado

La introducción de diagnósticos sensibles y rápidos que detecten replicación viral e infección activa antes del comienzo de la enfermedad, posibilita una terapia temprana que efectivamente administrada a pacientes con alto riesgo, evita el desarrollo de la enfermedad, y también, la profilaxis indiscriminada a individuos sin factores de riesgo.

Hasta hace poco tiempo atrás, la aplicación primaria de los tests diagnósticos de laboratorio, consistían en confirmar o excluir el agente etiológico, EBV o CMV, como causa de los síntomas clínicos.

Actualmente, en cambio, el incremento de la vigilancia y la terapia temprana (preemptive), demuestran la necesidad de tests más sensibles que detecten la infección con anterioridad al comienzo de los síntomas clínicos.

Son varios los requisitos para monitorear un ensayo de CMV o EBV:

- 1) Alta sensibilidad para permitir una detección temprana del riesgo de enfermedad.
- 2) Potencial para cuantificar los resultados e incrementar el valor predictivo positivo de detección de la enfermedad y posibilitar el seguimiento del tratamiento antiviral.
- 3) Rapidez en la instauración o cambio de tratamiento.

En la actualidad, los métodos de detección de antígeno y moleculares cuantitativos, están disponibles y cumplen estos requerimientos.

El ensayo de antigenemia pp65, método cuantitativo específico desarrollado a principio de los años 90, ha sido ampliamente utilizado en el diagnóstico de la enfermedad y monitoreo de la terapia. Sin embargo, este ensayo puede tener falsos negativos debido a la baja expresión del antígeno en pacientes con bajo recuento celular. Además, es éste un ensayo laborioso que requiere el procesamiento inmediato de las muestras y su interpretación es subjetiva.

En cambio, la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), ha revolucionado el diagnóstico virológico otorgando una poderosa herramienta para detectar y cuantificar ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico) viral en muestras clínicas. Esta técnica otorga la oportunidad de mejorar sustancialmente la detección de muy bajo nivel de viremia, así como también, la de monitorear la eficacia de la terapia antiviral.

La detección cualitativa del ADN por PCR en muestras de sangre provee una sensibilidad cercana al 100% para la detección de la enfermedad, pero una especificidad de sólo el 50% o menos, ya que no permite diferenciar entre infección latente y enfermedad activa.

La detección de ARNm (Ácido ribonucleico mensajero), indica replicación viral e infección activa, sin embargo este ensayo posee menor sensibilidad que los dos anteriores. Por su parte, el test comercial COBAS Amplicor CMV Monitor, desarrollado por ROCHE, para detectar carga viral de CMV, si bien tiene alta sensibilidad y especificidad, es de alto costo, estrecho rango dinámico y alta demanda de tiempo para su realización.

La PCR cuantitativa es diseñada con una menor sensibilidad para mejorar la especificidad clínica.

La PCR en tiempo real ha introducido un test altamente sensible, específico, rápido y cuya relación costo beneficio es positiva para determinar la carga viral.

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real ha revolucionado el diagnóstico en el laboratorio de microbiología, al combinar la química de la PCR con sondas fluorescentes para detectar el producto amplificado en la misma reacción, permitiendo, además, medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizada en cada momento, mostrando y registrando, la cinética de la reacción de amplificación.

Ofrece la base ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares como la identificación, genotipificación y cuantificación de diferentes agentes infecciosos. Esto es de invaluable utilidad en el diagnóstico etiológico, caracterización genética, decisión y seguimiento en tratamientos antimicrobianos respectivamente.

Esta técnica ha resultado un test altamente sensible, específico, rápido y de mejor relación costo beneficio para determinar la carga viral. Permite predecir enfermedad y monitorear la respuesta a la terapia antiviral, pudiendo, además ser utilizada como marcador subrogante de resistencia antiviral y reactivación clínica.

En general, es una técnica rápida de aproximadamente una hora, operativamente más sencilla y con igual o mayor sensibilidad y especificidad que una PCR convencional. Se agrega a ello, la

virtud de que al no manipularse el producto amplificado para su detección, presenta menor riesgo de contaminación cruzada.

La PCR en tiempo real, resulta entonces, una valiosa herramienta en el laboratorio clínico.

Otorga resultados cuantitativos de ácidos nucleicos virales presentes en una muestra clínica, permitiendo establecer una relación entre la carga viral de dicho espécimen y la predicción de infección de enfermedad clínica.

Este conocimiento respecto de las cargas virales de determinados virus es relevante en el paciente trasplantado, especialmente en el monitoreo de la evolución de infección y el manejo de la efectividad de la terapia antiviral.

Técnicamente la PCR cuantitativa se realiza utilizando un nivel de copias conocido de un reactivo estándar para un determinado target viral.

La curva estándar se establece haciendo diluciones seriadas por triplicado, procedimiento realizado por el software del instrumento, relacionando la medición de fluorescencia del producto amplificado y el número de ciclos en el que el target viral es detectado.

Esta curva puede ser utilizada de forma externa cada vez que uno realice una carga viral de dicho espécimen. En dicho experimento se deben incorporar dos estándares para que, a partir de estos, se pueda interpolar los resultados en la curva estándar.

La detección cuantitativa, tarea que también es realizada por el software, es determinada por la comparación del número de ciclos (crossover point o Cp) del espécimen con la curva estándar.

La utilización de estándares comerciales es ideal para lograr la uniformidad de los resultados, pero no están disponibles para todas las determinaciones, y en nuestro país, no siempre son accesibles y generalmente tienen un alto costo.

Una alternativa para solucionar estos inconvenientes, es insertar en un plásmido un segmento de ADN, proveniente de un cultivo viral, posteriormente amplificado en una PCR y subclonado en un vector. Este plásmido puede ser cuantificado espectrofotométricamente y ser utilizado realizando diluciones seriadas por triplicado para generar la curva estándar externa (Cp versus log número de copias) FIG 1 y 2.

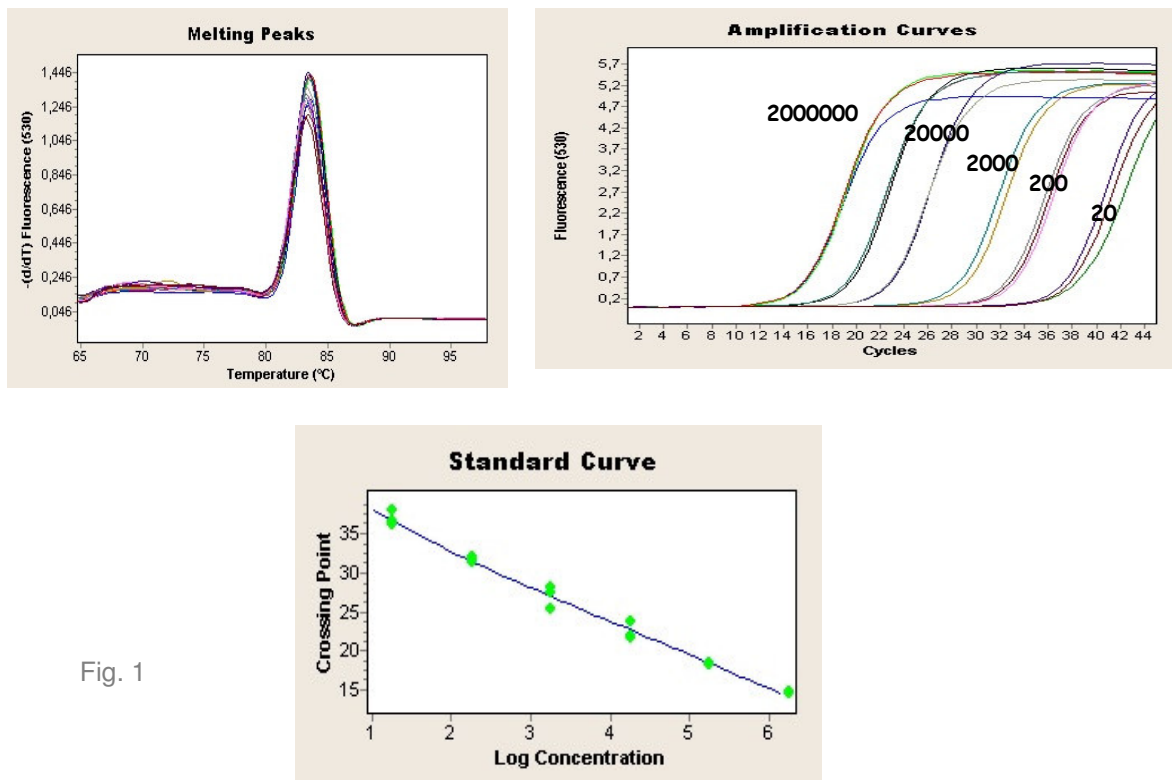


Fig. 1

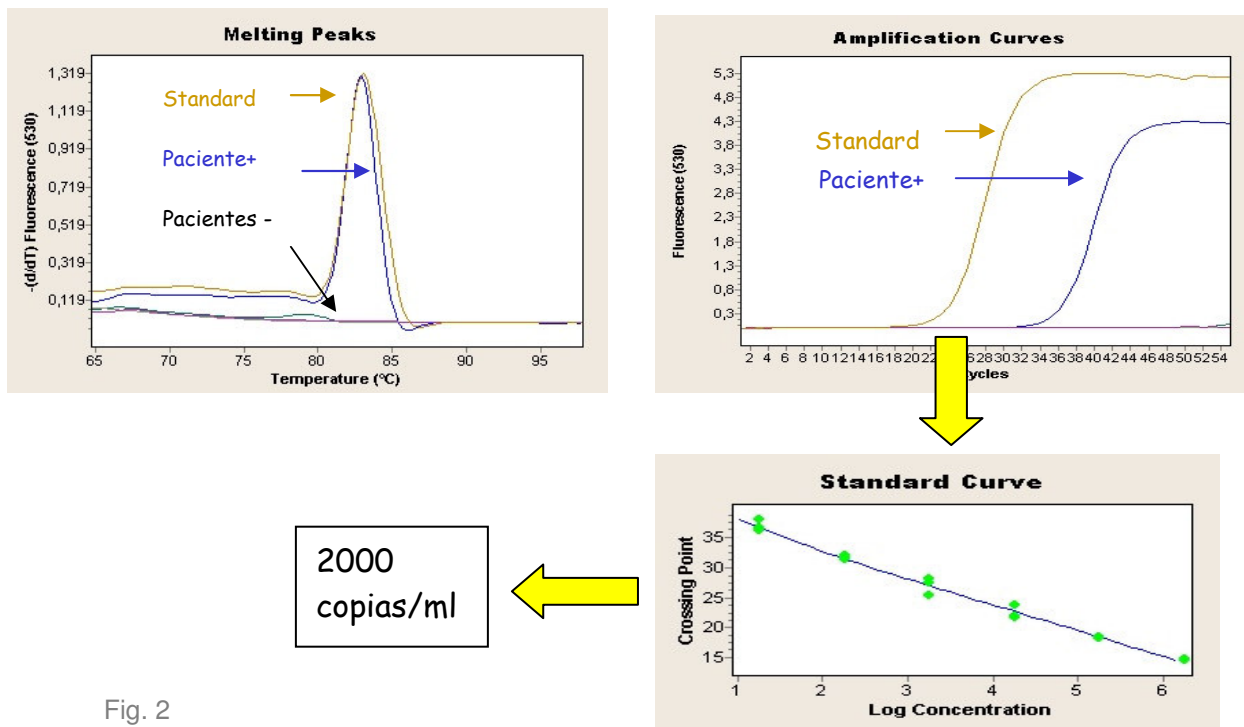


Fig. 2

Esta curva estándar es utilizada para cuantificar las muestras clínicas.

La PCR en tiempo real tiene así, un amplio rango dinámico, mayor sensibilidad, exactitud y reproducibilidad que cualquier otro ensayo.

La combinación de su excelente sensibilidad y especificidad, el bajo riesgo de contaminación, su fácil y rápida operatividad han convertido esta técnica en una alternativa muy interesante en el diagnóstico clínico frente a la convencional técnica de laboratorio.

Es indudable que por sus cualidades se extenderá ampliamente a diferentes aplicaciones microbiológicas.

Conclusión

Los pacientes con enfermedad o riesgo de desarrollar enfermedad por CMV o EBV muestran altos títulos de carga viral, más que los que tienen una infección latente.

Si bien ha de reconocerse que cada paciente puede tener un valor de corte individual, en el cual la carga viral conduce a infección sintomática, es necesario contar con una guía práctica para el comienzo de la terapia antiviral apropiada, y, en tal sentido, la utilidad de la cuantificación de estos virus, podría resultar aplicable con resultados exactos y reproducibles a cada población de pacientes.

La detección cuantitativa por PCR en Tiempo Real está siendo utilizada cada vez con mayor frecuencia para el monitoreo de riesgo de enfermedad en pacientes inmunocomprometidos. Las ventajas de esta determinación sobre otros métodos virológicos moleculares y no moleculares, han sido ampliamente descritas, incluyendo su amplio rango dinámico, bajo límite de detección, alta precisión y exactitud, bajos tiempos de realización, por lo que resulta indudablemente una técnica con mejor relación costo beneficio.

El futuro debe direccionarse a implementar instrumentos automatizados para realizar tests reproducibles y estandarizados que pueden ser comparados entre los laboratorios.

Queda aún por determinar el espécimen clínico óptimo donde realizar las cargas virales de estos virus, el punto de corte que permita prevenir la enfermedad, en cada tipo de trasplante.

Bibliografía

-2006 Real Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clin Microbiol Reviews 19: 165-256.

-2003 Development of Real Time PCR Assay for the Quantitative Detection of Epstein_Barr Virus and Cytomegalovirus, Comparison of TaqMan Probes, and Molecular Beacons. J.of Molecular Diagnostic; 5 :15-20.

-2000 New Strategies for Prevention and Terapy of Cytomegalovirus Infection and Disease in Solid-Organ Transplant Recipients.Clin Microbiol Reviews;13: 83-121.

-2004 Quantitative Real Time PCR whit Automated Sample Preparation for Diagnostic and Monitoring of Cytomegalovirus Infection in Bone Marrow Transplant Patients. Clinical Chemistry; 50: 5 :846-856.

-2004 Prompt versus preemptive intervention for EBV lymphoproliferative disease. Tranplantation;103 3979-3981

-2004 Dynamic EBV gene loads in real, hepatic, and cardiothoracic trasplant recipients as determined by real time PCR lighy cyclcr. Transp Infect Dis;6:156-164.