

Detección temprana y altamente sensible de citomegalovirus en muestras de plasma humano VIH-positivas

Cecilia González-Calixto,* Martha-Eugenia Ruiz-Tachiquín,** Juan Burgueño-Ferreira,*** Penélope Aguilera,**** Mónica Espinoza-Rojo*

RESUMEN

La detección temprana de citomegalovirus humano puede evitar graves consecuencias en la salud de pacientes inmunocomprometidos; por ello, es importante el empleo de métodos de detección sensibles y precisos. En el presente trabajo comparamos la sensibilidad y la especificidad de detección de tres métodos: 1) COBAS AMPLICOR CMV MONITOR™ Test (CACM), método comercial validado y semiautomatizado que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar la expresión del gen temprano *Pol*; 2) PCR en tiempo real y 3) transcripción reversa acoplada a la PCR (RT-PCR) en tiempo real, estos últimos de manufactura casera, en los que se validó la detección del gen precoz *Ie1*. Se realizó un estudio transversal con 42 muestras de plasma humano VIH-1 positivas. Los ácidos nucleicos se extrajeron mediante dos métodos: 1) un agente caotrópico y 2) una columna de afinidad. Se obtuvo un 9.5, 26.2 y 33.3% de muestras positivas por CACM, PCR y RT-PCR, respectivamente. Empleando las técnicas caseras se detectó un mínimo de 26 copias/mL. Se utilizó la prueba de kappa para determinar la concordancia entre métodos, obteniendo valores de 0.34 (PCR vs CACM), 0.0079 (RT-PCR vs CACM) y 0.65 (RT-PCR vs PCR). La mayor sensibilidad y especificidad la obtuvo la PCR en tiempo real, así como los mayores valores predictivos positivo y negativo. Concluimos que la detección cualitativa del gen precoz *Ie1* (sinónimo de infección activa) de CMVH en muestras de plasma humano VIH-1 positivas por PCR en tiempo real, podría utilizarse como método alternativo a CACM.

Palabras clave: CMVH, VIH-1, *Ie1*, *Pol*.

ABSTRACT

Early detection of human cytomegalovirus can prevent serious health consequences for immunocompromised patients. Therefore, it is important to employ methods of sensitive and accurate detection. In this paper, we compared the sensitivity and specificity of detection of three methods: 1) COBAS Amplicor™ CMV MONITOR Test (CACM), commercial and validated method; it uses polymerase chain reaction (PCR) to detect the early gene *Pol*, 2) real-time PCR, and 3) real-time reverse transcription coupled to PCR (RT-PCR); the 2 and 3 were homemade, which validated the detection of immediate early gene *Ie1*. We performed a cross-sectional study with 42 positive HIV-1 human plasma samples. Nucleic acids were extracted using two methods: 1) a caotropic agent and 2) an affinity column. We obtained a 9.5, 26.2, and 33.3% of positive samples with CACM, PCR, and RT-PCR, respectively. Using the techniques homemade, we detected a minimum of 26 copies/mL. We used the kappa test to determine correlation between methods, obtaining values of 0.34 (PCR vs CACM), 0.0079 (RT-PCR vs CACM), and 0.65 (RT-PCR vs PCR). The greater sensitivity and specificity were obtained by real time PCR, as well as the largest positive and negative predictive values. We concluded that the qualitative detection of immediate early gene *Ie1* (synonymous of active infection) of HCMV in positive HIV-1 human plasma samples by real time PCR could be used as an alternative method to CACM.

Key words: HCMV, HIV-1, *Ie1*, *Pol*.

* Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Guerrero.

** Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

*** Estadística, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.

**** Laboratorio de Patología Vascular Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".

Correspondencia:

Dra. en C. Mónica Espinoza-Rojo

Av. Lázaro Cárdenas s/n. Ciudad Universitaria. 39090, Chilpancingo, Guerrero, México. Fax: 01 747 4725503. E-mail: moniespinoza@yahoo.com

Recibido: 14-11-2008

Aceptado: 24-08-2009

INTRODUCCIÓN

El citomegalovirus humano (CMVH) es un patógeno oportunista que pertenece a la familia betaherpesvirus. CMVH, posee un genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena, con aproximadamente 230 kpb y 200 marcos de lectura abiertos.¹⁻³ La infección por CMVH se manifiesta como retinitis, esofagitis, colitis o encefalitis y representa la principal complicación y primera causa de morbi-mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. Del 20 al 40% de los individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) que no están bajo tratamiento antirretroviral, desarrollan enfermedad a causa de CMVH. Se ha observado que la coinfección con VIH-1 y CMVH en individuos que presentan una cuenta de linfocitos CD4+ menor a 50/μL, incrementa el riesgo de presentar severas complicaciones en su estado de salud.⁴⁻⁶

Cuando el CMVH inicia su proceso de infección, el ADN viral se transloca hacia el núcleo de la célula y comienza su replicación. En el momento que el virus se une a los receptores de la célula hospedera, se da lugar a una serie de eventos que provoca la expresión de varios tipos de genes: inmediato-tempranos (precoces), tempranos y tardíos. Los genes precoces (*Ie1* e *Ie2*) son el primer grupo que se expresa en una infección viral activa. Los productos de éstos (IE72 e IE86) son requeridos para iniciar la replicación viral y regular la expresión de sus homólogos tempranos y tardíos. Los genes tempranos son dependientes de las proteínas virales IE, las cuales son factores que influyen en la replicación de CMVH. Los genes tardíos son expresados esencialmente después del inicio de la replicación del ADN viral y están involucrados primordialmente en el ensamblaje y la morfogénesis del virus.⁷⁻⁹

Debido a que el CMVH es el principal agente causal de muerte en pacientes inmunocomprometidos, es importante mejorar la sensibilidad, la especificidad y la precisión de los métodos de detección de éste. Además, es necesaria una buena selección de blancos, como lo son los genes precoces, ya que son los primeros en expresarse en una infección activa. Su detección, junto con la evaluación médica correspondiente, ayudaría a tener un diagnóstico temprano y oportuno en pacientes con una respuesta inmunológica comprometida o suprimida; asimismo, se evitarían complicaciones serias en el desarrollo de la infección. Por lo anterior, las investigaciones en el área se han enfocado a identificar y validar este tipo de técnicas.

Las pruebas de detección molecular comerciales-validadas y semiautomatizadas como COBAS AMPLICOR CMV MONITOR™ Test (CACM, Roche Diagnostics), determinan la carga viral y auxilian en el monitoreo de la infección en pacientes infectados y/o coinfectados (VIH-1 y/o CMVH).¹⁰⁻¹⁴ Éstas son laboriosas, costosas y requieren equipo muy específico para realizarlas, lo que limita su accesibilidad en diferentes sectores de nuestras comunidades. Diversos estudios indican que los métodos moleculares en tiempo real, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) tienen una mayor sensibilidad para detectar muestras positivas al compararlas con los métodos comerciales-validados en uso en los laboratorios de pruebas de rutina.^{11,15-23} Aunado a que las PCR y RT-PCR caseras son rápidas, precisas, reproducibles, accesibles, económicas y flexibles respecto al número de muestras analizadas por ensayo.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo de este trabajo fue hacer un análisis comparativo en función de la sensibilidad y de la especificidad de tres métodos moleculares: 1) CACM en el cual se detecta al gen temprano *Pol*, 2) PCR y 3) RT-PCR en tiempo real, en las cuales se validó la detección del gen precoz *Ie1* y su ácido ribonucleico mensajero (ARNm), respectivamente. El ARNm ha sido considerado como un marcador directo de expresión *in vivo* de CMVH y en particular de la infección activa.^{13,24} El análisis se realizó en muestras de plasma humano VIH-1-positivas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó de acuerdo a las normas éticas definidas en la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Muestras

Se utilizaron 42 muestras de plasma humano VIH-1 positivas, proporcionadas por Roche Diagnostics, provenientes de individuos de 18 o más años de edad, de uno u otro sexo, residentes de la República Mexicana. Todas las muestras tuvieron una carga viral-VIH mayor a 300,000 copias/mL. La carga viral-VIH fue determinada previamente con COBAS AMPLICOR HIV MONITOR™ Test (CAHM, Roche Diagnostics). Las muestras fueron preservadas a -70°C hasta el momento de su uso.

Determinación de la carga viral-CMVH mediante CACM

CACM (Roche Diagnostics) es un método comercial-validado y semi-automatizado, utilizado para detectar ADN-CMVH mediante la PCR. El método amplifica 362 pb situadas en el extremo 5' del gen *Pol* (que codifica para la ADN polimerasa); utiliza iniciadores biotinilados (LC342 y LC383) y cuenta con controles positivos, negativos y de cuantificación. Las condiciones de amplificación se llevaron a cabo, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, la extracción del ADN de las muestras se realizó a partir de 200 μ L de plasma mediante la lisis de partículas virales con un agente caotrópico (tiocianato de guanidina). Posteriormente, el ADN fue precipitado con isopropanol y etanol al 70%. El ADN fue resuspendido en solución diluyente y 50 μ L de esta solución fueron usados en cada reacción de amplificación. Se determinaron las absorciones y se cuantificaron las partículas virales en el analizador COBAS AMPLICOR.^{11,15,25} Los resultados fueron expresados como copias del ADN de CMVH/mL de plasma (copias/mL). Los límites de detección dentro del intervalo lineal del ensayo utilizado son de 400 a 100,000 copias/mL.

Extracción de ácidos nucleicos y síntesis del ADN complementario para la detección por PCR en tiempo real

El ADN y el ARN fueron extraídos a partir de 1 mL de plasma, mediante el estuche QIAamp® UltraSens™ Virus (QIAGEN, Valencia, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 1 mL de plasma fue resuspendido en amortiguador de lisis conteniendo proteinasa K; después de la digestión, la reacción se colocó dentro de la columna de afinidad con sílica-gel (QIAamp spin) y ambos ácidos nucleicos fueron eluidos. El ADN y el ARN se cuantificaron en un espectrofotómetro (Beckman, modelo Du530) a 260 nm. La PCR se realizó a partir de 500 ng del ADN.

Para la síntesis del ADN complementario (ADNc), las muestras del ARN fueron tratadas con DNasa I (1U/ μ L) con la finalidad de eliminar el ADN co-precipitado en el proceso de extracción. Se utilizó 1 μ g del ARN en 1 μ L de amortiguador de reacción 10X [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 9 μ L de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC; 1:1000) y 1 μ L de DNasa I. La mezcla se incubó por 30 min a 37°C, posteriormente se agregó 1 μ L de EDTA (25 mM) y se mantuvo durante 10 min a 65°C. Para la síntesis del ADNc se tomó 1 μ g (12 μ L) del ARN y se mez-

cló con 0.5 μ M (1 μ L) de oligo-dT y 4.5 μ L de agua-DEPC; la mezcla se incubó por 10 min a 72°C y se colocó en hielo inmediatamente. La mezcla de reacción se preparó con 5 μ L de amortiguador [50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ y 10mM DTT], 40 mM (1 μ L) de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 20 U (0.5 μ L) de RNAsin y 200 U (1 μ L) de enzima MVL-RT, se incubó por 1 h a 37°C y 5 min a 95°C.

Detección de CMVH por las PCR y RT-PCR en tiempo real

Para las PCR y RT-PCR en tiempo real se utilizó un ensayo prediseñado (Custom TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystem, California, USA). Las secuencias de los oligonucleótidos fueron: sentido 5'-gct cac atc atg cag ctc ctt aat a-3', antisentido 5'-gct tat cct cag gta caa tgt agt tct c-3' y la sonda TaqMan® MGB, FAM™ 5'-aag cca tcc aca tct c-3' (Applied Biosystems). Se amplificó un fragmento de 72 pb correspondiente al exón 4 del gen *Ie1* de CMVH. Se usaron los siguientes componentes para la reacción de amplificación: 2.5 μ L de TaqMan®, 10 μ L de mezcla maestra de PCR (*Universal Master Mix* PCR), 1 μ L 20X de mezcla de ensayo (*Assay Mix*) y 500 ng del ADN en un volumen final de 20 μ L. Las condiciones de amplificación fueron: un paso inicial de 2 min a 50°C (activación de la enzima UNG) y 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C para la desnaturalización y 1 min a 60°C para la alineación y extensión. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en el equipo Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR. La valoración del producto de amplificación se llevó a cabo con base al ciclo umbral de detección (Ct, siglas en inglés por *Cycle threshold*) por la PCR en tiempo real. El valor de Ct es el número de ciclos de amplificación asociados a la fluorescencia emitida por la sonda TaqMan®. Este valor depende del número de blancos de CMVH encontrados en la muestra: a mayor número de copias de CMVH menor número de Ct y viceversa.

Se utilizó un control negativo libre del ARN y ADN de CMVH, verificado por PCR en tiempo real. Además, se comprobó la ausencia del ADN de CMVH en las muestras del ARN, tratando las muestras positivas con DNasa (1 U/ μ L) y verificando posteriormente la no amplificación por PCR en tiempo real.

Análisis estadístico

La estadística descriptiva se realizó con el Software STATA versión 8.2. Se determinó la concordancia a

través del coeficiente kappa²⁶ para comparar las mediciones de los ensayos moleculares. Se construyó el intervalo de confianza asintótico para el coeficiente del 95% (IC 95%)²⁷ y se realizó la prueba exacta de igualdad a cero (significancia).²⁸ El estudio de concordancia se utilizó para comparar el desempeño de dos mediciones en la capacidad que tendría una de subrogar o reemplazar a la otra.^{12,29} Para validar la capacidad predictiva de las pruebas de detección se midió: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Se consideró a CACM como estándar de referencia porque es un método comercial-validado y semiautomatizado, internacionalmente utilizado en los laboratorios de pruebas de rutina para la detección de CMVH en plasma.

RESULTADOS

Detección y cuantificación de CMVH por CACM

Se analizaron 42 muestras de plasma humano VIH-1 positivas, con el método comercial-validado y semiautomatizado, CACM. Se detectaron 4 muestras positivas ADN-CMVH (9.5%) con una carga viral de 1,500, 1,560, 1,670 y 26,000 copias/mL.

Detección del ADN de CMVH por PCR en tiempo real

Se amplificó un fragmento del gen precoz *Ie1* de CMVH por PCR en tiempo real, a partir del ADN extraído con el estuche QIAamp® UltraSens™ Virus. El producto final de la reacción fue un fragmento de 72 pb, el cual se verificó por corrimiento electroforético en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (dato no mostrado). Para establecer el límite de detección de la PCR en tiempo real en la amplificación del fragmento del gen precoz *Ie1*, se analizó la muestra con la mayor carga viral (26,000 copias/mL) empleando diluciones seriadas (factor de dilución 10). El valor mínimo de detección fue de 26 copias/mL con un valor promedio de Ct de 33.6. Este resultado indica una concentración viral muy baja, por lo que se realizó una medición cualitativa.

Dado que la estrategia de extracción del ADN afecta la sensibilidad y la reproducibilidad de los métodos moleculares,¹⁷ se probaron dos métodos de extracción. Éstos consistieron en: 1) la lisis de partículas virales con un agente caotrópico y precipitación con alcohol, y 2) el estuche QIAamp® UltraSens™ Virus, el cual combina propiedades de unión selectivas a

una columna de sílica-gel con volúmenes de elución flexibles. Se realizó un ensayo de PCR en tiempo real con las 42 muestras de plasma humano VIH-1 positivas, a partir del ADN extraído por cada método. Con el método 1 (M1) se obtuvieron 11 muestras positivas (26.2%) con una media de Ct de 38.38. Empleando el método 2 (M2) se obtuvieron 14 muestras positivas (33.3%) con una media de Ct de 38.26 (*Cuadro I*).

Detección del ARNm de CMVH por RT-PCR en tiempo real

En el análisis de la RT-PCR en tiempo real, se realizó la extracción del ARN utilizando el estuche QIAamp® UltraSens™ Virus (M2). Se obtuvieron 10 muestras positivas (24%) con una media de Ct igual a 40.99 (*Cuadro I*).

PCR y RT-PCR en tiempo real vs CACM

Con base en el coeficiente de concordancia kappa, considerando un IC 95% y significancia, se compararon los resultados que se obtuvieron con la PCR en tiempo real y CACM. Empleando el ADN extraído con el M1, la amplificación por la PCR en tiempo real y CACM coincidieron al detectar ADN-CMVH en 3 muestras, 30 muestras resultaron negativas por ambos métodos (concordancia de 0.336, significativa) y en 9 muestras no hubo concordancia (resultados positivos por un método, pero negativos por otro). La amplificación por la PCR en tiempo real (empleando el ADN extraído por el M2) y CACM coincidieron en la detección de 4 muestras positivas, 28 negativas (concordancia de 0.348, significativa) y en las 10 muestras restantes no hubo concordancia. La PCR en tiempo real detectó 16.6 y 23.8% más casos positivos que los determinados por CACM empleando los métodos 1 y 2, respectivamente (*Cuadro II*).

Cuadro I. PCR y RT-PCR en tiempo real para la detección del ADN-CMVH en muestras de plasma humano VIH-1-positivas.

	Ensayos en tiempo real	
	Extracción del ADN con M1 (Ct)	Extracción del ADN con M2 (Ct)
PCR en tiempo real	11 Muestras positivas (38.73)	14 Muestras positivas (38.26)
RT-PCR en tiempo real	NA	10 Muestras positivas (40.99)

Ct : Ciclo del umbral de detección; NA: No aplica

Al comparar la RT-PCR con CACM, se encontró que estas metodologías coincidieron en detectar 1 muestra positiva y 29 negativas (concordancia de 0.008, no significativa), mientras que 12 muestras no fueron concordantes (*Cuadro II*). El análisis estadístico mostró que estos dos métodos presentaron los resultados más discordantes.

RT-PCR vs. PCR en tiempo real

Al comparar los resultados de la RT-PCR y PCR en tiempo real, se encontró que ambos métodos detectaron 9 muestras positivas, 27 negativas (concordancia de 0.654, significativa) y 6 muestras no fueron concordantes (*Cuadro III*). El análisis estadístico mostró que con estos métodos se obtuvieron los resultados más concordantes.

Determinación de sensibilidad y especificidad de RT-PCR vs PCR en tiempo real

Considerando a CACM como estándar de referencia, se calcularon las sensibilidades y especificidades de cada método (*Cuadro IV*). La PCR en tiempo real ob-

tuvo: 1) una sensibilidad del 75 y 100% con M1 y M2, respectivamente y 2) una especificidad del 79 y 74% con M1 y M2, respectivamente. Mientras que la RT-PCR en tiempo real presentó una sensibilidad del 25% y una especificidad del 76.3% con M2. La PCR en tiempo real empleando ADN extraído con M2 tuvo un VPN del 100% y un VPP del 28.5%, los más altos observados. La mayor especificidad (79%) se obtuvo utilizando ADN extraído con el M1 (*Cuadro IV*).

DISCUSIÓN

En individuos inmunosuprimidos, las infecciones causadas por virus oportunistas (*e.g.* CMVH) pueden generar severas complicaciones de salud. Por ello, detectar la infección por CMVH con prontitud, precisión y exactitud es la clave para tomar decisiones terapéuticas acertadas y oportunas en personas infectadas con VIH-1.

La carga viral de CMVH determinada por CACM (PCR) es una herramienta utilizada internacionalmente en los laboratorios de pruebas de rutina. Sin embargo, se ha reportado que la detección de genes por PCR en tiempo real ofrece mayores beneficios en cuanto a sensibilidad y simplicidad.^{11,17-19,30}

Cuadro II. Concordancia entre los resultados obtenidos por los ensayos en tiempo real y CACM.

Ensayos	No. de muestras de plasma humano VIH-positivas			Coeficiente de concordancia kappa, (IC 95%), valor de <i>p</i>
	CACM positivos	CACM negativos	Total	
PCR ^{M1} en tiempo real positivo	3 (7.1%)	8 (19.0%)	11 (26.2%)	0.336 (0.002-0.669), 0.039
PCR ^{M1} en tiempo real negativo	1 (2.3%)	30 (71.4%)	31 (73.8%)	
PCR ^{M2} en tiempo real positivo	4 (9.5%)	10 (23.8%)	14 (33.3)	0.348 (0.080-0.615), 0.009
PCR ^{M2} en tiempo real negativo	0	28 (66.6%)	28 (66.6%)	
RT-PCR ^{M2} en tiempo real positivo	1 (7.1%)	9 (19.0%)	10 (26.2%)	0.008 (-0.259-0.274), 1.0000
RT-PCR ^{M2} en tiempo real negativo	3 (2.3%)	29 (71.4%)	32 (73.8%)	
Total	4 (9.5%)	38 (90.5%)	42 (100%)	

M1. Extracción por lisis con agente caotrópico; M2. Extracción de ADN con el estuche QIAamp®UltraSens™ Virus

Cuadro III. Concordancia entre los resultados obtenidos por la RT-PCR y PCR en tiempo real.

Ensayos	No. de muestras de plasma humano VIH-positivas (%)			Coeficiente de concordancia kappa, (IC 95%), valor de <i>p</i>
	PCR Positivos	PCR Negativos	Total	
RT-PCR ^{M2} en tiempo real positivo	9 (7.1%)	1 (19.0%)	10 (42.9%)	0.654 (0.406-0.902), 0.0001
RT-PCR ^{M2} en tiempo real negativo	5 (2.3%)	27 (71.4%)	32 (61.9%)	
Total	14 (9.5%)	28 (90.4%)	42 (100%)	

M2. Extracción de ADN con el estuche QIAamp®UltraSens™ Virus

Cuadro IV. Sensibilidad y especificidad de las PCR y RT-PCR en tiempo real vs CACM como estándar de referencia.

Tipo de ensayo de detección	Muestras positivas	Muestras negativas	Sensibilidad (IC95%)	Especificidad (IC95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)
PCR ^{M1} en tiempo real	11 (26.2%)	31 (73.8%)	75% (32-100%)	79% (50-100%)	27% (0-54%)	97% (91-100%)
PCR ^{M2} en tiempo real	14 (33.3%)	28 (66.6%)	100 ^b	74% (46-100%)	28.5% (4-53%)	100 ^b
RT-PCR ^{M2} en tiempo real	10 (24%)	34 (76%)	25% (0-75%)	76% (48-100%)	10% (0-29%)	91% (81-100%)
CACM ^a	4 (9.5%)	38 (90.5%)	NA	NA	NA	NA

^a Ensayo de referencia; ^b Error estándar igual a cero; NA: No aplica; M1: extracción de ADN con un agente caotrópico; M2: extracción de ADN con el estuche QIAamp®UltraSens™ Virus; VPP: Valor predictivo positivo; VPN: Valor predictivo negativo.

En este estudio determinamos que la PCR en tiempo real casera podría ser una técnica de detección alternativa a la detección semiautomatizada CACM, durante el control y monitoreo de la salud de los pacientes co-infectados con CMVH y VIH-1. Existen diferencias importantes entre ambos métodos, mismas que se discuten enseguida.

Influencia del gen blanco y del método de detección en la sensibilidad de las pruebas

En este estudio, las PCR y RT-PCR en tiempo real utilizaron como blanco de detección al gen precoz *Ie1*. Los genes precoces son los primeros en ser expresados en la infección viral activa y son independientes de la síntesis *de novo* de proteínas.⁷⁻⁹ El blanco de CACM es el gen temprano *Pol* que codifica para la polimerasa, su expresión requiere de los genes precoces para poder cumplir sus funciones en la replicación viral y es indicativo de la presencia del virus, pero no discrimina entre infección activa o pasiva.

Diversos estudios realizados en pacientes trasplantados, reportaron un número mayor de muestras positivas cuando sus genes blancos (tempranos y tardíos) fueron amplificados mediante la PCR en tiempo real que al hacerlo con CACM.^{11,31} Apoyando estos reportes, nosotros determinamos que, el número de muestras positivas detectadas por la PCR en tiempo real fue tres veces mayor que las detectadas por CACM.

Efecto del método de extracción de los ácidos nucleicos virales en la determinación de muestras positivas

La relevancia de los métodos de extracción de ADN viral se refleja como una diferencia en el número de muestras positivas.^{14,17,21} Previamente, Najioullah y cols. (2001) reportaron que purificando al ADN con el estuche *High Pure Viral Nucleic Acid* (Roche Diagnostics® GmbH, Germany), se obtuvo una mayor

concentración del ADN viral, que cuando se utilizó el estuche QIAamp DNA Blood Mini (QIAGEN®, Alemania). Es decir, la eficiencia de extracción del método empleado influyó en el número de copias/mL determinadas por la PCR en tiempo real.

En el presente estudio, la extracción del ADN con el estuche QIAamp® UltraSens™ Virus (M2) omitió algunos pasos de agitación, incluidos en la extracción con un agente caotrópico (M1). Esta agitación pudo haber degradado al ADN viral y podría ser la causa de resultados negativos al momento de la amplificación mediante CACM.³² Además, la utilización de la columna de afinidad (M2) eliminó inhibidores de la PCR. Esto contribuiría a explicar el número menor de muestras positivas (9.5%) obtenidas por CACM usando el M1 que empleando el M2 por la PCR y la RT-PCR en tiempo real (33.3 y 24%, respectivamente). Asimismo, apoya el número mayor de muestras positivas obtenidas por la PCR en tiempo real empleando el M2 (33.3%) en comparación con el M1 (26.2%).

Tamaño de los amplicones

La sensibilidad de la prueba también está asociada al tamaño de los amplicones generados por los iniciadores. Para las PCR y RT-PCR en tiempo real se amplificó un fragmento del gen *Ie1* de 72 pb vs CACM que utilizó como blanco de amplificación un fragmento del gen *Pol* de 362 pb. Boom y cols. (2002) determinaron que el número de muestras positivas aumentó cuando se amplificaron fragmentos pequeños del ADN (134 pb) comparados con aquellos que amplificaron fragmentos grandes (578 pb). Estos autores sugirieron que el ADN viral pudo fragmentarse, tanto en muestras de suero como de plasma. Este fenómeno podría interpretarse de la siguiente manera: a mayor tamaño del amplicón, menor posibilidad de obtener un resultado positivo, y contribuiría a explicar las diferencias entre CACM vs PCR y RT-PCR respecto al número de muestras positivas obtenidas por cada uno.

Límite de detección, sensibilidad y concordancia de los ensayos en tiempo real vs CACM

La PCR en tiempo real, tiene un rango dinámico (o intervalo lineal) de detección de 400 a 100,000 copias/mL. Sin embargo, fuera de este rango dinámico es posible detectar muestras positivas con carga viral baja. En nuestro estudio tuvimos como número mínimo detectable 26 copias/mL, este resultado coincidió con reportes previos, en los que el límite inferior de detección por PCR en tiempo real fue de 10 copias/mL.^{15,18,19} Adicionalmente, CACM ultrasensible, el cual requiere de una centrifugación del plasma previa a la extracción del ADN viral y es un método menos accesible en nuestro medio, detectó cargas virales similares a las determinadas por la PCR en tiempo real (20 a 45 copias/mL).¹⁷ Nosotros utilizamos el formato estándar de CACM con la finalidad de emplear metodologías accesibles y sencillas.

Es importante tener en cuenta que muestras positivas por PCR y negativas por CACM o viceversa, tienen una carga viral muy baja, lo que dificultó la precisión y cuantificación por PCR en tiempo real. Estudios realizados en pacientes trasplantados, leucémicos y con enfermedad neonatal describieron que los resultados fuera del intervalo lineal de detección reportado por CACM, es decir, concentraciones menores a 400 copias/mL no reflejan estrictamente la ausencia de CMVH.¹⁵

A pesar de las contradicciones encontradas en el presente trabajo (en las muestras con cargas virales bajas) los resultados indicaron que la PCR en tiempo real y CACM tuvieron una concordancia significativa.

Al realizar este mismo análisis detectando al ARNm (el cual es considerado como un marcador directo de infección activa por CMVH),^{13,24} determinamos un número menor de muestras positivas con la RT-PCR¹⁰ que con la PCR en tiempo real.¹⁴ Estos fueron los métodos más concordantes, muy probablemente porque detectaron al mismo blanco, con el mismo tamaño de amplicón y utilizaron el M2 para la extracción de los ácidos nucleicos.

La detección de la expresión del gen blanco será eficiente, si existe un número de copias del ADN viral que esté dentro de los límites del intervalo lineal de detección de la prueba. Las muestras analizadas en este estudio tuvieron un número de copias del ADN viral fuera del intervalo lineal, lo que dificultó la detección del ARNm. La mayor discordancia se obtuvo al comparar los resultados de la RT-PCR en tiempo real vs CACM (10 vs 4 muestras positivas). Este último método no detectó ADN-CMVH en 9 de las 10 muestras positivas por RT-PCR en tiempo real. Pro-

bablemente las diferencias se debieron, a que tanto los métodos de extracción de los ácidos nucleicos, blancos de detección y tamaños de los amplicones fueron diferentes.

Al comparar los resultados de la PCR en tiempo real con CACM, se observaron valores altos de sensibilidad (100%) y VPN (100%), resultados coincidentes con reportes previos.^{11,31} En cambio, esto no sucedió con la especificidad (74%) y el VPP (28.5%), lo que indicó un mal comportamiento de la PCR en tiempo real vs CACM. Es decir, la técnica alternativa (PCR en tiempo real) es buena para predecir casos negativos, pero no para los positivos.

En este sentido, reafirmamos que el límite inferior en las pruebas de detección es motivo de controversia, tanto a nivel del ADN como del ARNm. Por ello, consideramos que no deberían reportarse resultados estrictamente 'negativos', sino como 'no detectados', además de adjuntar los límites lineales de detección de la prueba utilizada en los reportes de los mismos. Por lo que, recomendamos confirmación de los resultados en casos que involucren cargas virales bajas y por debajo del límite lineal inferior; con la ejecución de un par de métodos que utilicen diferentes blancos de detección, métodos de extracción y amplificación, con el objetivo central de que la salud del paciente no se vea comprometida dramáticamente por la presencia de CMVH.

Considerando que la PCR en tiempo real desarrollada en este estudio tiene varias ventajas como: 1) detectar al gen precoz *Ie1*, sinónimo de infección activa, 2) utilizar un método de extracción de ácidos nucleicos eficiente, 3) generar un amplicón pequeño de 72 pb, 4) ser un método simple, tanto en trabajo técnico como en equipo necesarios, 5) requerir de un menor tiempo para obtener resultados, 6) permitir procesar un número flexible de muestras por ensayo, 7) tener un costo por prueba bajo en comparación con CACM, 8) obtener la mayor concordancia (significativa) con CACM; sería factible su implementación en laboratorios de biología molecular con mínima infraestructura y recursos económicos limitados en diferentes sectores de nuestro país. La prueba podría emplearse como método alternativo a CACM, para detectar al ADN-CMVH en muestras de plasma humano VIH-1 positivas, sin ser mutuamente excluyentes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Biól. Flor Patricia Castillo Robles^{qepd}, asesora técnica de Roche Diagnostics, por su valiosa asistencia técnica durante la realización del presente trabajo.

Los autores del presente trabajo declaran no tener relación alguna con actividades de promoción de reactivos y/o equipo de Roche Diagnostics ni de otras marcas mencionadas.

REFERENCIAS

1. Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990; 154: 125-69.
2. Emery V. Investigation of CMV disease in immunocompromised patients. *J Clin Pathol.* 2001; 54: 84-8.
3. Mecarski ES, Courcelle CT. Cytomegalovirus and their replication. In: Knipe DMP, Howley M, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, (ed.) Lippincott-Raven; Philadelphia, Pa: Fields Virology; 2001: 2629-73.
4. Luliano R, Forastieri G, Brizzi M, Mecocci L, Mezzotta F, Ceccherin-Nellil. Correlation between plasma HIV-1 RNA levels and the rate of immunologic decline. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1997; 14: 408-14.
5. Deayton J. Changing trends in cytomegalovirus disease in HIV-infected patients. *Herpes.* 2001; 8: 2.
6. Centers for disease control and prevention. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Morbidity Mortal Weekly Rep.* 1993; 41: 1-19.
7. Sainz B, LaMarca H, Garry R, Morris C. Synergistic inhibition of human cytomegalovirus replication by interferon- α /beta and interferon- γ . *BMC Virol J.* 2005; 2: 14.
8. García-Ramírez J, Ruchti J, Huang H, Simmen K, Angulo A, Ghazal P. Dominance of virus over host factors in cross-species activation of human cytomegalovirus early gene expression. *J Virol.* 2001; 75: 26-35.
9. Grzimek N, Dreis D, Schmalz S, Reddehase M. Random, asynchronous, and asymmetric transcriptional activity of enhancer-flanking major immediate-early genes *ie1/3* and *ie2* during murine cytomegalovirus latency in the lungs. *J Virol.* 2001; 75: 2692-705.
10. Wattamano P, Clayton J, Kopicko J, Kissinger P, Elliot S, Jarrott C, et al. Comparison of three assays for cytomegalovirus detection in AIDS patients at risk for retinitis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 727-32.
11. Pang X, Chui L, Featon J, LeBlanc B, Preiksaitis J. Comparison of lightcycler-based PCR, COBAS Amplicor CMV Monitor, and pp65 antigenemia assay for quantitative measurement of cytomegalovirus viral load in peripheral blood specimens from patients after solid organ transplantation. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 3167-74.
12. Pellegrin I, Garrigue I, Binquet C, Chene G, Neau D, Bonnot P, et al. Evaluation of new quantitative assays for diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3124-32.
13. Amorim ML, Cabeda JM, Seca R, Mendes AC, Castro AP, Amorim JM. CMV infection of liver transplant recipients: comparison of antigenemia and molecular biology assays. *BMC Infect Dis.* 2001; 1: 2.
14. Preiser W, Rabenau H, Vogel J, Brixner V, Doerr H. Performance characteristics of an automated PCR assay for the quantification of cytomegalovirus DNA in plasma. *J Virol Microbiol.* 2002; 101: 149-57.
15. Najioullah F, Thouvenot D, Lina B. Development of a real-time PCR procedure including an internal control for the measurement of HCMV viral load. *J Virol Methods.* 2001; 92: 55-64.
16. Onishi Y, Mori S, Higuchi A, Kim S, Fukuda T, Heike Y, et al. Early detection of plasma cytomegalovirus DNA by real-time PCR after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Tohoku J Exp Med.* 2006; 210: 125-35.
17. Yerly S, Perrin L, Van-Delden C, Schaffer S, Thamm S, Wunderli W, Kaiser L. Cytomegalovirus quantification in plasma by an automated real-time PCR assay. *J Clin Virol.* 2007; 38: 298-303.
18. Gault E, Michel Y, Dehée A, Belabani C, Nicolas J, Gargarg-Chenon A. Quantification of human cytomegalovirus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001; 37: 772-5.
19. Griscelli F, Barrois M, Chauvin S, Lastere S, Bellet D, Bourhis J. Quantification of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 4362-9.
20. Kalpoe J, Kroes A, De Jong M, Schinkel J, De Brouwer C, Beersma M, et al. Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 1498-504.
21. Caliendo A, Ingersoll J, Fox-Canele A, Pargman S, Bythwood T, Hayden M, et al. Evaluation of real-time PCR laboratory-developed test using analyte-specific reagents for cytomegalovirus quantification. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 1723-7.
22. Nolan T, Hands R, Bustin S. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006; 1: 1559-82.
23. Machida U, Kami M, Fukui T, Kazuyama Y, Kinoshita M, Tanaka Y, et al. Real-Time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol.* 2000; 3: 2536-42.
24. Gerna G, Baldanti F, Lilleri D, Parea M, Alessandrino E, Pagani A, Locatelli F, et al. Human cytomegalovirus immediate-early mRNA detection by nucleic acid sequence-based amplification as a new parameter for preemptive therapy in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1845-53.
25. Roche Molecular Systems, Inc. COBAS AMPLICOR CMV MONITOR™ Test, Roche Diagnostics. P/N: 03563898 190. *Rev.* 2003; 1:1-38.
26. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Measur.* 1960; 20: 37-46.
27. Fleiss JL, Cohen J, Everitt BS. Large-sample standard errors of kappa and weighted kappa. *Psychological Bulletin.* 1969; 72: 323-7.
28. Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions.* Second Edition, New York: John Wiley & Sons, Inc; 1981.
29. Duffau TG, Navarrete RL, Fernández CC. Estudio de concordancia clínica en educandos de pre y postítulo en pediatría. *Rev Chil Pediatr.* 2000; 71: 340-6.
30. Schaade L, Kockelkorn P, Ritter K, Kleines M. Detection of cytomegalovirus DNA in human specimens by light cycler PCR. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 4006-9.
31. Herrmann B, Larsson V, Rubin C, Sund F, Eriksson B, Arvidson J, et al. Comparison of a duplex quantitative real-time PCR assay and the COBAS Amplicor CMV Monitor test for detection of cytomegalovirus. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 1909-14.
32. Boom R, Sol C, Schuurman T, Breda A, Weel J, Beld M, et al. Human cytomegalovirus DNA in plasma and serum specimens of renal transplant recipients is highly fragmented. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 4105-13.