

Detección de citomegalovirus por PCR en tiempo real en plasmas positivos a VIH

Martha Eugenia Ruiz-Tachiquín,^a Alejandro Gómez-Delgado,^b
Hilda Alicia Valdez-Salazar,^b Penélope Aguilera^c

Detection of cytomegalovirus by real-time PCR in HIV-positive plasm

Background: Cytomegalovirus is a betaherpesvirus responsible for persistent infections that are generally asymptomatic in healthy individuals. In the absence of an effective immune response, as in neonates, cancer patients, organ transplant recipients, individuals with AIDS, etc., cytomegalovirus may cause severe disease. Early detection of this virus would prevent serious health consequences in immunocompromised patients; it is important to employ sensitive methods and accurate detection to support treatment-related decision making. Real-time molecular methods, such as the polymerase chain reaction, possess higher sensitivity to detect positive samples.

Methods: We compared the sensitivity and specificity of the following detection methods: the endpoint PCR trade-validated method (*Pol*, viral gene target) and real-time PCR, which detects viral genes *Pol* (early gene), and *pp65* (late gene). We performed a cross-sectional study of 43 human immunodeficiency virus-positive samples.

Results: The molecular detection methods in real-time detected a greater number of cytomegalovirus-positive samples than those at the endpoint.

Conclusions: There must be at least two independent cytomegalovirus target-genes in order to make the detection by real-time PCR.

El citomegalovirus humano es un patógeno oportunista que pertenece a la familia betaherpesvirus. Posee un genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena con aproximadamente 230 mil pares de bases y 200 marcos de lectura abiertos.¹⁻³ La infección por este virus se manifiesta como retinitis, esofagitis, colitis o encefalitis y representa la principal complicación y primera causa de morbimortalidad en pacientes inmunocomprometidos.² De 20 a 40 % de los individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que no están bajo tratamiento antirretroviral desarrollan enfermedad a causa del citomegalovirus humano. Se ha observado que la coinfección con estos dos virus en individuos con una cuenta de linfocitos CD4+ menor a 50/μL incrementa el riesgo de presentar severas complicaciones en su estado de salud.⁴⁻⁶ El citomegalovirus humano inicia su proceso de infección y replicación al unirse a los receptores de la célula hospedera, provocando eventos que dan por resultado la expresión de varios tipos de genes:

- *Inmediatos o precoces:* son el primer grupo que se expresa en una infección viral activa. Las proteínas virales que producen (IE) son requeridas para iniciar la replicación viral y regular la expresión de sus homólogos tempranos (como *UL54*, también conocido como *Pol*) y tardíos (como *UL83*, también denominado *pp65*).
- *Tempranos:* son dependientes de las proteínas virales IE, las cuales son factores que influyen en la replicación del virus.
- *Tardíos:* son expresados esencialmente después del inicio de la replicación del ADN y están involucrados primordialmente en la ensambladura y la morfogénesis del virus.⁷⁻⁹

Las pruebas de detección molecular comerciales-validadas y semiautomatizadas, como COBAS AMPLICOR HCMV MONITOR™ Test (CACM, Roche Diagnostics) se basan en la detección por reac-

Keywords Palabras clave

Cytomegalovirus	Citomegalovirus
Polymerase chain reaction	Reacción en cadena de la polimerasa
Viral load	Carga viral
Acquired immunodeficiency syndrome	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
HIV	VIH

^aUnidad de Investigación Médica en Genética Humana

^bUnidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias

^cLaboratorio de Patología Vascular Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Secretaría de Salud, Distrito Federal, México

^{a,b}Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Distrito Federal, México

Comunicación con: Martha Eugenia Ruiz-Tachiquín
Teléfono: (55) 5627 6941
Correo electrónico: mertachiquin@yahoo.com.mx

Recibido: 03/09/2013

Aceptado: 07/04/2014

Introducción: el citomegalovirus es responsable de infecciones persistentes, generalmente asintomáticas en personas sanas pero que en ausencia de una respuesta inmune efectiva puede causar enfermedad severa, por ello es muy importante su detección temprana en los individuos con trastornos de la inmunidad. El objetivo de esta investigación fue hacer un análisis del límite de detección, sensibilidad y concordancia de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final con los obtenidos con la PCR en tiempo real.

Métodos: se realizó un estudio transversal con 43 muestras de plasma humano positivas al virus de la inmunodeficiencia humano, provenientes de individuos de 18 o más años de edad, de uno u otro sexo. Todas las muestras tuvieron una carga viral-VIH mayor a 100

000 copias/mL. Para la PCR en punto final se empleó un método comercial para identificar *UL54* (gen viral blanco) y para la PCR en tiempo real se amplificaron fragmentos de los genes *UL54* (gen temprano) y *UL83* (gen tardío) del citomegalovirus humano.

Resultados: mediante PCR en punto final (método comercial-validado) solo tres individuos fueron positivos a citomegalovirus humano (7 %), con una la carga viral de 1500 a 1670 copias/mL. Las muestras positivas a citomegalovirus humano mediante PCR en tiempo real tuvieron un rango de 4.36 a 4692.86 copias de citomegalovirus humano

Conclusiones: es necesario tener al menos dos genes blancos de citomegalovirus humano para detectarlo de manera ratificada mediante PCR en tiempo real.

Resumen

ción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) en punto final (al término de la reacción se observan resultados) del gen de expresión temprana *UL54*, para determinar la carga viral y auxiliar en el monitoreo de la infección en pacientes infectados y/o coinfectados (VIH y/o citomegalovirus humano).¹⁰⁻¹⁴ Para realizar esta técnica se requiere un robot, lo que limita su accesibilidad en diferentes sectores de las comunidades. Diversos estudios indican que la PCR en tiempo real (en el transcurso de la reacción se observan amplificaciones) tiene una mayor sensibilidad para detectar muestras positivas al compararla con los métodos comerciales empleados para las pruebas de rutina en los laboratorios.^{11,15-23} Además, se señala que las pruebas de PCR de manufactura casera son rápidas, precisas, accesibles y económicas respecto al número de muestras analizadas por ensayo. El objetivo de esta investigación fue hacer un análisis comparativo en función de la sensibilidad y especificidad de los siguientes métodos moleculares:

- CACM (estándar de referencia), con el cual se detecta al gen temprano *UL54* (constitutivo) con PCR en punto final.
- PCR en tiempo real, con la que se evalúa la detección de los genes *UL54* y *UL83* del citomegalovirus humano.

Se determinó el límite de detección, sensibilidad y concordancia de los ensayos de PCR en punto final y se compararon con los obtenidos en tiempo real.

Métodos

Se analizaron 43 muestras de plasma humano positivas a VIH, provenientes de individuos de 18 o más años de edad, de uno u otro sexo. Todas las muestras tuvieron una carga viral-VIH mayor a 100 000 copias/mL (a

mayor carga viral menor número de CD4+). La carga viral de VIH se determinó con COBAS AMPLICOR HIV MONITOR™ Test (CAHM Roche Diagnostics). Las muestras fueron preservadas a -80° C hasta el momento de su uso. El proyecto se realizó conforme a las normas éticas definidas en la Declaración de Helsinki de 1975 y sus enmiendas, así como a los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas en la investigación clínica. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética y el Comité Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social.

La determinación de la carga viral de citomegalovirus humano se llevó a cabo mediante CACM.²⁴ El método amplifica 362 pares de bases situados en el extremo 5' del gen *UL54* que codifica para la ADN polimerasa viral, utiliza iniciadores biotinilados (LC342 y LC383) y cuenta con controles positivos, negativos y de cuantificación. Las condiciones de amplificación se llevaron a cabo conforme a las indicaciones del fabricante:

- La extracción del ADN de las muestras se realizó a partir de 200 µL de plasma mediante la lisis de partículas virales con un agente caotrópico (tiocianato de guanidina). Posteriormente, el ADN se precipitó con isopropanol y etanol a 70 %. El ADN se resuspendió en solución diluyente, de la cual 50 µL se emplearon en cada reacción de amplificación. Se determinaron las absorciones y se cuantificaron las partículas virales en el analizador COBAS MONITOR (robot).^{11,15,25} Los resultados se expresaron como copias del ADN del citomegalovirus humano/mL de plasma (copias/mL). Los límites de detección dentro del intervalo lineal del ensayo fueron 400 y 100 000 copias/mL.

Para la detección viral por PCR en tiempo real se realizó la extracción del ADN, a partir 1 mL de plasma

Cuadro I Carga viral de las muestras determinadas por PCR en punto final con un método comercial-validado

Carga viral	n	%	Copias/mL	Media ± DE
Virus de la inmunodeficiencia humana	43	100	43400-3700000	609753.49 ± 566860.92
Citomegalovirus humano	3	7	1500-1670	1558.67 ± 96.464

DE = desviación estándar

obtenido, mediante el estuche QIAamp® UltraSens® Virus (QIAGEN, Valencia, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante:

- 1 mL de plasma se resuspendió en amortiguador de lisis que contenía proteinasa K. Después de la digestión, la reacción se colocó dentro de la columna de afinidad con sílica-gel (QIAamp spin) y los ácidos nucleicos fueron eluidos. El ADN se cuantificó en un espectrofotómetro (Beckman, modelo Du530) a 260 nm. La PCR se realizó a partir de 100 ng del ADN total extraído.

Para las PCR en tiempo real se utilizaron ensayos prediseñados (Custom TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems, California, USA) y se amplificaron fragmentos de los genes *UL54* y *UL83* del citomegalovirus humano. Se usaron los siguientes componentes para la reacción de amplificación:

- 2.5 µL de TaqMan.
- 10 µL de mezcla maestra de PCR (Universal Master Mix PCR).
- 1 µL 20X de mezcla de ensayo (Assay Mix).
- 100 ng del ADN total en un volumen final de 20 µL.

Las condiciones de amplificación consistieron en dos minutos a 50 °C (activación de la enzima UNG) y 10 minutos a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para la desnaturalización y un minuto a 60 °C para la alineación y extensión. Todos los ensayos se realizaron por duplicado en el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR. La valoración del producto de amplificación se llevó a cabo con base en el ciclo umbral de detección (*cycle threshold*) para la PCR en tiempo real. El valor del ciclo umbral

de detección es el número de ciclos de amplificación relacionados con la fluorescencia emitida por la sonda TaqMan. Este valor depende del número de blancos de citomegalovirus humano encontrados en la muestra: a mayor número de copias del virus, menor número de ciclos umbral de detección y viceversa. Se utilizó un control negativo libre del ADN de citomegalovirus humano, verificado por PCR en tiempo real. Como control positivo se empleó ADN de citomegalovirus humano estándar: ATCC DNA From HCMV Strain AD169, BSL:1 (VR-538D). El ADN de citomegalovirus humano se utilizó para la generación de las curvas de cuantificación viral con las dos sondas TaqMan correspondientes a los dos genes virales blancos, *UL54* y *UL83*.

Para validar la capacidad predictiva de las pruebas de detección se midió sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo. Se consideró a CACM como estándar de referencia porque es un método comercial-validado y semiautomatizado, que se emplea en todo el mundo en los laboratorios de pruebas de rutina para la detección de citomegalovirus humano en plasma.²⁶⁻²⁹

Resultados

Se analizaron 43 muestras de plasma positivas a VIH, provenientes de individuos con un rango de edad de 23 a 77 años de edad, de uno u otro sexo: seis (14 %) correspondieron al sexo femenino (edad de 34 ± 8.854 años) y 37 (86 %) al masculino (39.73 ± 11.347 años).

El rango de la carga viral del VIH fue de 43 400 a 3 700 000 copias/mL. De las 43 muestras, solo tres fueron positivas a citomegalovirus humano (7 %); la carga viral tuvo un rango de 1500 a 1670 copias/mL

Cuadro II Carga viral de citomegalovirus humano de las muestras analizadas mediante PCR en tiempo real

Sonda TaqMan	Gen viral blanco	Muestras positivas a citomegalovirus humano	Ciclo umbral de detección	ADN-Citomegalovirus humano	Copias/mL
<i>UL54</i>	<i>Pol</i>	12 (28 %)	32-39	1.16-0.01 pg	4692.86-45.44
<i>UL83</i>	<i>pp65</i>	16 (37 %)	25-40	1.12 pg-1. 29 fg	4521.3-5.20

(cuadro I), mediante cuantificación con PCR en punto final (método comercial-validado).

Para evaluar el ensayo de PCR en tiempo real se estableció el rango dinámico de detección. Las curvas de cuantificación generadas para las dos sondas TaqMan correspondientes a los genes *UL54* y *UL83* fue de $4 - 4 \times 10^6$ copias del virus. *UL54* con una $r^2 = 0.985$ y una pendiente de -3.300 ± 20.52 y *UL83* con una $r^2 = 0.998$ y una pendiente de -3.321 ± 14.33 . Las muestras positivas a citomegalovirus humano mediante PCR en tiempo real tuvieron un rango de 4.36 a 4692.86 copias (cuadro II).

Al comparar las muestras positivas detectadas por PCR en punto final y las identificadas mediante PCR en tiempo real, se observó que los ensayos en los que se detectaron los genes virales *UL54* y *UL83* tuvieron sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos similares entre ellos (cuadro III). En comparación con los valores generados por un solo gen, la combinación de dos genes (*UL54* y *UL83*) presentó valores de sensibilidad y especificidad mayores: sensibilidad 1, especificidad 0.8, valor predictivo positivo 0.27, valor predictivo negativo 1 y 25.5 % de resultados positivos comparado con 6.9 % que identificó el estándar.

Respecto a los métodos de extracción del ADN viral, la extracción con columna de afinidad coincidió con un mayor número de muestras positivas a citomegalovirus humano, en comparación con la extracción fenólica; el número de muestras positivas con lisis proteica (proteínasa K) fue mayor en comparación con un agente caotrópico (tiocianato de guanidina).

Respecto al tamaño del amplicón, el método de detección viral basado en la PCR en punto final genera un amplicón de mayor tamaño (362 pares de bases) que el generado por la PCR en tiempo real (menor de 100 pares de bases); el número de muestras positivas al virus fue mayor con un amplicón pequeño.

Discusión

Es importante mejorar la sensibilidad, especificidad y precisión de los métodos para detectar al citomegalovirus humano, debido a que es el principal agente causal de muerte en los pacientes inmunocomprometidos. Además, es necesaria una buena selección de genes blancos, métodos eficientes, flexibles y rápidos. Nuestro grupo de investigación evaluó la detección del gen *UL123* por PCR en tiempo real en un trabajo previo.³⁰

La validación de un resultado positivo de genes tempranos y tardíos, junto con la evaluación médica correspondiente, ayuda al diagnóstico oportuno en los pacientes con una respuesta inmunológica com-

Cuadro III Eficacia de la PCR en tiempo real comparada con CAMC como estándar de referencia

	Sensibilidad	Especificidad	VP+	VP-	Porcentaje de positivos*
<i>UL54</i>	1	0.78	0.25	1.0	27.9
<i>UL83</i>	1	0.68	0.19	1.0	37.2

VP+ = valor predictivo positivo, VP- = valor predictivo negativo,

*Comparado con 6.9 % de resultados positivos que identifica el estándar

prometida o suprimida; asimismo, se evitarían serias complicaciones en el desarrollo de la infección. Por lo anterior, las investigaciones en el área se han enfocado a identificar y proponer diferentes alternativas de detección viral.

La PCR en tiempo real tiene varias ventajas:

- Posee una metodología simple con la que se obtienen resultados en un tiempo razonable.
- Genera un amplicón pequeño (menor a 100 pares de bases).
- Permite procesar un número flexible de muestras por ensayo (desde una hasta 92 en el termociclador más seis controles).
- Tiene un costo menor en comparación con los ensayos comerciales.
- Sus resultados concuerdan con los obtenidos en ensayos comerciales (todas las muestras positivas a citomegalovirus humano mediante la PCR en punto final fueron positivas por la PCR en tiempo real).

En las técnicas en tiempo real diseñadas y evaluadas en este trabajo se ajustó la cantidad del ADN inicial. Las desviaciones estándar entre las repeticiones de los puntos de las curvas generadas fueron menores a 0.2, con $r^2 = 0.999$ y pendiente de -3.32 , aproximadamente, lo que indica más de 90 % de eficiencia de la amplificación del blanco. Respecto a los valores predictivos positivo y negativo, las técnicas en tiempo real son más certeras en detectar muestras negativas a citomegalovirus humano, por lo que proponemos la detección de más de un gen blanco para validar y ratificar un resultado positivo.

Por lo mencionado, sería factible su implementación en laboratorios de biología molecular con mínima infraestructura y recursos limitados en diferentes sectores del territorio nacional, con resultados confiables, similares o alternativos a los métodos de detección comerciales-validados.

Agradecimientos

Nuestro reconocimiento a Juan Rodrigo Aldariz Amaya y David Maravilla Jiménez, por su asistencia técnica. De igual forma, agradecemos el apoyo financiero que recibimos de la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/PROT/G10/820) y del Ins-

tituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (PICSA-12-295).

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno en relación con este artículo.

Referencias

- 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.
- Emery V. Investigation of CMV disease in immunocompromised patients. *J Clin Pathol*. 2001;54(2): 84-8.
- Mecarski ES, Courcelle CT. Cytomegalovirus and their replication. En: Knipe DMP, Howley M, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE editores. *Fields Virology*. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven; 2001. p. 2629-73.
- Iuliano R, Forastieri G, Brizzi M, Mecocci L, Mezzotta F, Ceccherin-Nell L. Correlation between plasma HIV-1 RNA levels and the rate of immunologic decline. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1997;14(5):408-14.
- Deayton JR. Changing trends in cytomegalovirus disease in HIV-infected patients. *Herpes*. 2001;8(2): 37-40.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Morbidity and Mortality Weekly Rep*. 1993;41(RR-17):1-19. Texto libre en <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00018871.htm>
- Sainz B Jr, LaMarca HL, Garry RF, Morris CA. Synergistic inhibition of human cytomegalovirus replication by interferon-alfa/beta and interferon-gamma. *BMC Virol J*. 2005;2:14. Texto libre en <http://www.virologyj.com/content/2/1/14>
- 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(1):26-35.
- 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(6):2692-705. Texto libre en <http://jvi.asm.org/content/75/6/2692.long>
- 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(2):727-32. Texto libre en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86188/>
- Pang XL, Chui L, Featon J, LeBlanc B, Preiksaitis JK. 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(7):3167-74.
- Pellegrin I, Garrigue I, Binquet C, Chene G, Neau D, Bonot 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(10):3124-32.
- 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. Texto libre en <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/1/2>
- Preiser W, Rabenau H, Vogel Ju, Brixner V, Doerr HW. Performance characteristics of an automated PCR assay for the quantification of cytomegalovirus DNA in plasma. *J Virol Microbiol*. 2002;101(1-2):149-57.
- 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(1):55-64.
- Onishi Y, Mori S, Higuchi A, Kim SW, 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(2):125-35. Texto libre en https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/210/2/210_2_125/_article
- 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(4):298-303.
- Gault E, Michel Y, Dehée A, Belabani C, Nicolas J, Garbarg-Chenon A. Quantification of human cytomegalovirus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39(2):772-5. Texto libre en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87818/>
- Griscelli F, Barrois M, Chauvin S, Lastere S, Bellet D, Bourhis JH. Quantification of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39(12):4362-9. Texto libre en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88550/>
- Kalpoe JS, Kroes AC, de Jong MD, Schinkel J, de Brouwer CS, Beersma MF, 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(4):1498-504. Texto libre en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC387533/>
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(6):1723-7. Texto libre en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1933050/>
 22. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006;1(3):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;38(7):2536-42.
 24. Gerna G, Baldanti F, Lilleri D, Parea M, Alessandrino E, Pagani A, et al. Human cytomegalovirus immediate-early mRNA detection by nucleic acid sequence-based amplification as a new parameter for pre-emptive therapy in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2000;38(5):1845-53. Texto libre en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86605/>
 25. Roche Molecular Systems, Inc. COBAS AMPLICOR MONITOR™ Test, Roche Diagnostics. P/N: 03563898190. Rev. 2003;1:1-38.
 26. Cohen JA Coefficient of agreement for nominal scales. *Educational Psychological Measurement.* 1960;20(1):37-46.
 27. Fleiss JL, Cohen J, Everitt BS. Large-sample standard errors of kappa and weighted kappa. *Psychol Bul.* 1969;72(5):323-7.
 28. Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. Second edition. New York: John Wiley & Sons; 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(4): 340-6.
 30. González-Calixto C, Ruiz-Tachiquín ME, Burgueño-Ferreira J, Aguilera P, Espinoza-Rojas M. Detección temprana y altamente sensible de citomegalovirus en muestras de plasma humano VIH-positivas. *Bioquímica.* 2009;34(3):129-36.