

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**  
**ESCUELA DE BIOANÁLISIS**  
**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**  
**LICENCIADA EN BIOANÁLISIS CLÍNICO**

**DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS “CITOMEGALOVIRUS”**  
**EN DONANTES DE SANGRE ASINTOMÁTICOS CON RESULTADOS**  
**POSITIVOS EN ELISA, MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR DE PCR**  
**TIEMPO REAL**

**CAROLINA ELIZABETH CRESPO PROAÑO**

**DIRECTORA: MST. ROSA CHIRIBOGA**

**QUITO, 2012**

## ***DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN***

Yo, CAROLINA ELIZABETH CRESPO PROAÑO, C.I. 1718924358 autora del trabajo de graduación titulado: DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DEL VIRUS “CITOMEGALOVIRUS” EN DONANTES DE SANGRE ASINTOMÁTICOS CON RESULTADOS POSITIVOS EN ELISA, MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR DE PCR TIEMPO REAL, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN BIOANÁLISIS CLÍNICO en la Escuela de Bioanálisis:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENECYT en forma digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos del autor.

2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo y graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

*Quito,*

*Carolina Elizabeth Crespo Proaño*

*C.I. 1718924358*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<u>CONTENIDO</u>	<u>PÁGINA</u>
DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN.....	2
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	3
LISTA DE TABLAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE GRÁFICAS.....	9
LISTA DE SIGLAS.....	11
DEDICATORIA.....	12
AGRADECIMIENTOS.....	13
RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUCCIÓN.....	16
CAPÍTULO I.....	18
1. Justificación.....	18
2. Planteamiento del problema.....	20
3. Objetivos.....	23
4. Hipótesis.....	23
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.....	24
5. Antecedentes.....	24
6. Citomegalovirus.....	26

6.1. Estructura del virus.....	27
6.2. Composición Genética.....	27
7. Vías de transmisión.....	29
7.1. Transmisión de persona a persona.....	29
7.2. Trasplante de órganos.....	30
7.3. Transmisión vertical y horizontal.....	31
7.4. Transmisión por transfusión de sangre.....	32
8. Tipos de diagnósticos.....	33
8.1. Cultivos celulares.....	33
8.2. Diagnóstico serológico.....	35
9. Respuesta inmune.....	36
9.1. Respuesta inmune celular.....	36
9.2. Respuesta inmune humoral.....	36
<b>CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS-ESTUDIO PILOTO.....</b>	<b>37</b>
10. Estudio Piloto Seroprevalencia en donantes de sangre. ....	37
Metodología ELISA Indirecto.....	37
10.1. Método.....	39
10.2. Recolección de muestras.....	39
10.3. Principio del test.....	39
10.4. Procedimiento.....	40
10.5. Control de calidad de los estándares.....	41
10.6. Cálculo de resultados.....	41
10.7. Cálculo del Index Value.....	41

10.8.	Limitaciones de test.....	42
10.9.	Utilidad real de las técnicas serológicas.....	42
CAPÍTULO IV: MARCO CONCEPTUAL.....		44
11.	Diagnóstico molecular.....	44
11.1.	Métodos moleculares cualitativos.....	45
11.2.	Métodos moleculares cuantitativos: carga vírica.....	45
11.3.	Tabla comparativa de diagnóstico del CMV.....	46
12.	Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	50
12.1.	Concepto.....	50
12.2.	Fundamento.....	50
13.	PCR en Tiempo Real.....	51
13.1.	Concepto.....	49
13.2.	Técnicas de PCR en Tiempo Real para el CMV.....	51
13.3.	Fundamento.....	52
13.4.	Problemas en la amplificación de PCR-TR.....	57
CAPÍTULO V: MARCO METODOLÓGICO.....		60
14.	Segunda Fase del Estudio.....	60
14.1.	Tipo de estudio.....	60
14.1.1.	Proyecto piloto.....	60
14.2.	Operacionalización de las variables.....	61
14.3.	Fase Dos del Proyecto: Materiales y Métodos.....	62
14.4.	Procedimiento de elección de muestras.....	63

14.4.1. Extracción del ADN del CMV .....	63
14.4.2. Purificación del ADN extraído.....	63
14.4.3. Cuantificación del ADN.....	63
14.5.    Amplificación del CMV-ADN.....	64
14.5.1. Kit de amplificación.....	64
14.5.2. Principio.....	64
14.5.3. Primers o cebadores.....	65
14.5.4. CMV control externo.....	65
14.5.5. Control de calidad en amplificación.....	66
14.5.6. Procedimiento.....	66
 CAPÍTULO VI: RESULTADOS.....	 69
15. Estudio piloto.....	69
16. Diagnóstico molecular.....	73
16.1.    Prueba de CHI cuadrado.....	76
17. Control de calidad: PCR-TR.....	78
18. Conclusiones.....	81
19. Recomendaciones.....	81
20. Discusión de CMV.....	82
21. Anexos.....	86
21.1.    ANEXO 1: Curvas de estándares de validación del kit de ELISA.....	86
21.2.    ANEXO 2: Metodología del proyecto piloto: Técnica de Elisa.....	87
21.3.    ANEXO 3: Metodología de amplificación de PCR en tiempo real.....	93
 BIBLIOGRAFÍA.....	 97

## LISTA DE TABLAS

1. Tabla 1: Proteínas estructurales.....	27
2. Tabla 2: Interpretación del Index Value.....	39
3. Tabla 3: Comparación de Técnicas.....	45
4. Tabla 4: Técnicas Histopatológicas y Cultivos para Citomegalovirus.....	46
5. Tabla 5: Preparación de Master Mix Para CMV.....	65
6. Tabla 6: Protocolo para la amplificación Del CMV.....	66
7. Tabla 7: Prevalencia de anticuerpos anti-Ig CMV.....	68
8. Tabla 8: Resultados obtenidos IgG – CMV de acuerdo a la edad.....	69
9. Tabla 9: Chi cuadrado test de Elisa.....	69
10. Tabla 10: Frecuencia de resultados obtenidos de acuerdo a las observancias.....	70
11. Tabla 11: Porcentaje de muestras analizadas de acuerdo al género.....	72
12. Tabla 12: Porcentaje de muestras clasificadas de acuerdo a la reactividad.....	73
13. Tabla 13: Resultados obtenidos en la PCR-TR vs Elisa Test.....	74
14. Tabla 14: Pruebas de Chi cuadrado.....	74
15. Tabla 15: Lista de Pruebas.....	77

## LISTAS DE FIGURAS

1. Figura 1: Estructura viral.....	26
2. Figura 2: Gráfico de amplificación de PCR tiempo real con sus 3 fases.....	51
3. Figura 3: Amplificación del ADN.....	52
4. Figura 4: Curva de disociación.....	54
5. Figura 5: Curva de Melting.....	54
6. Figura 6: Ejemplo de curva estándar.....	55
7. Figura 7: Contaminación en el proceso de amplificación.....	56
8. Figura 8: Curvas atípicas.....	57
9. Figura 9: Gel de Agarosa – extracción de ADN.....	62
10. Figura 10: Clasificación de los resultados analizados.....	67
11. Figura 11: Prevalencia de anticuerpos anti-Ig CMV.....	68
12. Figura 12: Resultados obtenidos IgG – CMV de acuerdo a la edad.....	70
13. Figura 13: Porcentaje de muestras analizadas de acuerdo al género.....	72
14. Figura 14: Porcentaje de muestras clasificadas de acuerdo a la reactividad.....	73
15. Figura 15: Curva de amplificación.....	76
16. Figura 16: Curva estandar.....	78
17. Figura 17: Curva de disociación.....	78

## LISTAS DE GRÁFICAS

1. Gráfica N° 1: Kit de ELISA para CMV.
2. Gráfica N° 2: Suero en diluyente de muestra.
3. Gráfica N° 3: Preparación de placa con cada una de las muestras.
4. Gráfica N° 4: Pipeteo de Control positivo, negativo y estándares de calidad del kit.
5. Gráfica N° 5: Placa preparada y lista para incubación.
6. Gráfica N° 6: Incubación a 37°C por 60 minutos.
7. Gráfica N° 7: Lavado de placa 6 veces con solución de lavado CMV.
8. Gráfica N° 8: Colocar 100 ul de conjugado.
9. Gráfica N° 9: Incubación a 37°C por 60 minutos.
10. Gráfica N° 10: Lavado de placa 6 veces con solución de lavado CMV para eliminación de residuos.
11. Gráfica N° 11: Colocación del sustrato.
12. Gráfica N° 12: Colocación de la solución stop.
13. Gráfica N° 13: Placa lista para ser leída en el espectrofotómetro a referencia de 450nm con un filtro de 600 a 630nm.
14. Gráfica N° 14: Espectrofotómetro utilizado para la lectura de ELISA de CMV.
15. Gráfica N° 15: Kit de extracción de ADN de CMV.
16. Gráfica N° 16: Extracción de ADN con 200 µl de Binding Buffer incluye 20 ul de proteinasa K.
17. Gráfica N° 17: Incubación a 72°C por 10 minutos.
18. Gráfica N° 18: Se añade 100 ul de Bin9ding Buffer puro, utilizando columnas y tubos de recolección se transvasa los 320 ul.

19. Gráfica N° 19: Centrifugación durante 1 minuto a 8000 rpm.
20. Gráfica N° 20: Se repite el proceso de descarte de tubos de recolección se añade solución de lavado y se centrifuga.
21. Gráfica N° 21: Preparación del Master Mix tanto para las muestras como para los controles.
22. Gráfica N° 22: Muestras colocadas en capilares y centrifugadas.
23. Gráfica N° 23: Colocación de capilares en el rotor de LightCycler.
24. Gráfica N° 24: Equipo LightCycler para PCR en tiempo real.
25. Gráfica N° 25: Lectura de resultados de la amplificación de muestras.

## LISTA DE SIGLAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ARN: Ácido ribonucleico
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- CMV: Citomegalovirus
- TORCH: Toxoplasma, rubeola, citomegalovirus, herpes.
- LCR: Líquido Cefalorraquídeo.
- NE : No Especifico
- KPB: Kilo pares de bases
- AD169: Cepa de efecto citopático en adenoides humanos

*Dedicatoria*

*A mi mamá, familia y amigos*

## *Agradecimientos*

*Quisiera de manera muy especial agradecer a mi madre, Norma Proaño, por ser la persona más importante en mi vida, mi pilar fundamental. Ella me enseñó a ser una mujer luchadora y sin miedo a las adversidades que puedan presentarse en la vida. Por ella aprendí a siempre seguir adelante. Las palabras no son suficientes para expresarte todo mi agradecimiento y amor que siento por ti, por tus cuidados, tu preocupación, tu presión y, sobre todo, por cultivar todos los valores y principios que me han llevado a convertirme en la mujer que soy. Gracias y mil gracias Lobis.*

*De manera especial quiero agradecer a mi Directora de Tesis y Amiga incondicional, la Master Rosa Chiriboga, por ser una persona increíble, que me enseñó que con esfuerzo y perseverancia se pueden lograr las cosas y sobre todo que confió en mí para llevar a cabo esta investigación. Las palabras se quedan cortas para expresar todo mi agradecimiento y todo lo que he aprendido y madurado como profesional y persona gracias a usted.*

*De igual manera un inmenso agradecimiento al Dr. Mario Grijalva y todo su equipo de trabajo, por el apoyo que me brindó para que se realice esta tesis en el Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la PUCE. Su ejemplo profesional y su valiosa opinión me brindaron una perspectiva innovadora y grandiosa de la ciencia que se realiza en nuestro país.*

*A mis queridas tías y primos, muchas gracias por su continuo apoyo. Es su cariño parte esencial que me ha impulsado durante todo este tiempo para seguir adelante y cosechar los frutos de mi investigación.*

*A mi novio, Juan Francisco, gracias por tu apoyo incondicional amor, sin tu ayuda creo que no lo hubiera logrado, millón gracias “Vida”.*

*A mis amigos: Gaby Cueva, gracias por todo tu apoyo y por no sólo ser una amiga, sino una maestra ejemplar. A Cesitar, Anita, Sofí y Esteban muchísimas gracias por siempre impulsarme y no permitirme postergar “LA TESIS”. Gracias de manera especial a mi mejor amigo y compañero de aventuras, Pedrito, gracias por todo y por la presión ejercida. Y, a mis queridos amigos Linda, Carlos, Eduardo y mi Tulito, los quiero un montón.*

## RESUMEN

Detección de la Presencia del Virus “Citomegalovirus” CMV en donantes de Sangre Asintomáticos con Resultados Positivos en Elisa, mediante la técnica molecular de PCR Tiempo Real.

**Introducción:** El CMV es un virus que afecta únicamente al hombre ocasionando una enfermedad asintomática y silenciosa. La prevalencia del CMV en adultos va del 30 al 60% en países desarrollados mientras que en países en vías de desarrollo es del 90 al 100%. Para el diagnóstico clínico del CMV se ha tomado en cuenta dos fases: infección y enfermedad en la que la primera se caracteriza por demostrar la presencia del virus a través de técnicas moleculares y, la enfermedad, que son los signos y síntomas característicos de este padecimiento. **Materiales y Métodos:** El presente estudio se realizó en dos fases, la primera fue determinar la seroprevalencia del virus en individuos aparentemente sanos en este caso donantes voluntarios de sangre; la segunda fase fue establecer la presencia del ADN viral mediante PCR-Tiempo Real. **Resultados:** Se determinó una seroprevalencia del 94% con un aumento de acuerdo a la edad; se analizaron 361 muestras seropositivas de las cuales 8 (5%  $\beta=0,05$ ) fueron positivos para la presencia del virus. **Conclusiones y Recomendación:** Se recomienda el uso de bolsas de recolección que proporcione derivados sanguíneos leucorreducidos, que minimicen la transmisión pos-transfusional y la realización de pruebas diagnósticas para CMV cuando se preparen productos para trasfusión a niños prematuros o en caso de trasplantes.

## ABSTRACT

Detection of the Presence of the Virus “ Citomegalovirus “ CMV in Asymptomatic Blood Donors with Positive Results in Elisa, by means of the molecular technique of Real-Time PCR.

**Summary:** CMV is a virus that affects only humans causing an asymptomatic and quiet illness. Prevalence of CMV on adults goes from 30 to 60% on first world countries while in third world countries is up to 90 to 100%. For the clinical diagnosis of the CMV one has taken in account two phases: Infection and illness, in which the first one is characterized for demonstrating the presence of the virus across molecular techniques and, in second place, the illness, that they are the signs and symptoms typical of this suffering. **Materials and Methods:** The present research was realized in two phases, the first one was to determine the seroprevalence of the virus in seemingly healthy individuals, in this case voluntary blood donors; the second phase was to establish the presence of the viral DNA by means of Real-Time PCR. **Results:** It was observed a seroprevalence of 94 % with an increase in accordance with the age; there were analyzed 361 seropositive samples of which 8 (5 %  $\beta$  0,05) were positive for the presence of the virus. **Conclusions and Recommendations:** There is advised the use of compilation bags which provide derivative leucoreduced blood that minimize the post-transfusional transmission and the achievement of diagnostic tests for CMV when products are being prepared for transfusion for premature children or in case of transplants.

## ***INTRODUCCIÓN***

La infección por Citomegalovirus (CMV) generalmente es silenciosa, es decir que la persona infectada no presenta ningún síntoma, sin embargo constituye un riesgo en la transmisión activa del virus a través de la sangre, especialmente a nivel de personas con un sistema inmune débil y en niños prematuros. CMV tiene una amplia distribución mundial con una seroprevalencia variable, la que muchos de los autores la consideran relacionada con el grado de desarrollo del país, así en países en vías de desarrollo existe una prevalencia del 95% al 100%. (*Delgado, Sánchez, Cevera, Munar, Gásco, & Marco, 2000*).

La transmisión del virus toma especial interés a nivel de mujeres embarazadas por las patologías severas que pueden afectar al feto o recién nacido; así también en pacientes que han recibido un trasplante de órgano sólido y/o transfusión sanguínea. (*Ost, 1984*). El CMV puede ser transmitido por contacto directo con la persona infectada a través de secreciones biológicas como: orina, semen, saliva; estudios han demostrado que puede permanecer viable durante 30 minutos, en el estudio realizado en España en el año 2001 se encontró una seroprevalencia elevada en personas con antecedentes de transfusión sanguínea, acupuntura y tatuajes, adicionalmente los investigadores postularon dos momentos en la vida en que se produce el contagio de CMV, uno durante los primeros años y el segundo en la adolescencia asociando el primero con contactos familiares o en la guardería y la segunda con el inicio de las relaciones sexuales. (*Ost, 1984*).

La característica principal del CMV es su latencia, esto convierte a la persona en vulnerable de reinfección ya sea por reactivación o por contacto con un nuevo tipo de virus. (*José Gutiérrez-Salinas, 2010*), esto debido a que persisten copias completas del genoma viral pero sin fase reproductiva lo que en esta fase hace imposible el aislamiento del virus y por ende la detección de las proteínas virales en el organismo. (*Galla & Levy, 2012*). El diagnóstico del CMV desde el punto de vista clínico-diagnóstico se establece en dos etapas: infección y enfermedad, determinándose una infección al detectar o aislar el virus o sus proteínas virales (pp65 es antigénica). (*Crespo, 2000*). Y la enfermedad al grupo de signos y síntomas que el paciente presenta. A nivel de laboratorio se ha clasificado el uso de las pruebas de acuerdo al tipo de paciente así: inmuno-competentes el diagnóstico se basa en la primo-infección es decir en la determinación de marcadores serológicos, especialmente del tipo IgG se detecta a las 4-6

semanas y persiste de forma indefinida. A nivel de pacientes que van a recibir un trasplante se considera útil el aislamiento del virus a través de pruebas moleculares.

Por consiguiente, la detección en donantes de sangre considerados como “sanos” se debería utilizar una prueba de tamizaje como ELISA, sin embargo, esta prueba únicamente es indicativa de exposición viral no así de una actividad viral o infección. Esta metodología mide la cantidad de anticuerpos por medio de la unión antígeno-anticuerpo y medición de la absorbancia. A pesar de ser una tecnología barata, útil y fácil de realizar no nos indica si existe una replicación viral. El auge de la nueva tecnología como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) nos permite determinar la presencia del genoma viral indicativo del inicio de una reinfección.

El presente estudio se realizó en dos fases la primera constituyó la determinación de la prevalencia de anticuerpos anti-IgG CMV en metodología ELISA y la segunda fase la demostración de la presencia de ADN en muestras con anticuerpos IgG sean estos elevados, medianos o en la zona gris.

Demostrándose que el virus mantiene su latencia, sin embargo este puede reactivarse de acuerdo a datos de la literatura citada.

## **CAPITULO I**

### **1. JUSTIFICACIÓN**

La transfusión sanguínea es un medio terapéutico muy usado en personas que padecen algún tipo de anemia, cirugías mayores, o en niños prematuros, etc. (*García Escamillas & Méndez López, 2006*). Sin embargo a pesar de los beneficios y potencial terapéutico, la transfusión de componentes sanguíneos no está exenta de riesgo de contagio de agentes infecciosos al receptor, (*Guitierrez Salinas, 2009- 2010*) dentro de ellos se encuentra el virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV), virus de las hepatitis B y C y Citomegalovirus.

El Citomegalovirus es un virus que pertenece a la familia Herpesviridae que infecta al ser humano y que al igual que los otros virus una vez adquirida la infección permanece en forma latente dentro del organismo, por esta razón puede ser transmitido por contacto directo con secreciones contaminadas como: saliva, lágrimas, orina, sangre y semen. Otro factor importante que puede producir una primoinfección y una reactivación (del virus latente) o la reinfección por una cepa distinta. En las tres situaciones el virus se puede aislar durante meses o años en tejidos y líquidos corporales. (*García Escamillas & Méndez López, 2006*) (*Guitierrez Salinas, 2009- 2010*). Actualmente, los cambios políticos realizados al Sistema Nacional de Sangre del País donde el Ministerio de Salud promueve la centralización del tamizaje serológico al Hemocentro Nacional han impulsado a estudios que permitan incluir nuevos marcadores serológicos o nuevas medidas preventivas para evitar la contaminación con agentes infecciosos a través de las transfusiones.

En estudios realizados tanto a nivel de Latinoamérica como Estado Unidos han determinado que donantes aparentemente sanos mantienen el virus en forma latente, el que al ser transfundido a personas potencialmente susceptibles puede desencadenar consecuencias fatales. Esto ocurre especialmente a nivel hospitalario y en personas que reciben trasplantes de algún tejido. Desde el punto de vista clínico-diagnóstico se debe establecer una diferencia entre infección y enfermedad. Definiéndose como infección por CMV como el aislamiento del virus o la detección de proteínas virales (antigemia Ag pp65) o ADN por PCR o por PCR-tiempo real en cualquier líquido y/o tejido del cuerpo. En los cuadros latentes no es posible el

aislamiento del CMV. (*Real-Time, 2000*). La enfermedad es la presencia de sintomatología clínica.

El tamizaje serológico permite establecer la presencia de anticuerpos contra el Citomegalovirus, los cuales son indicativos de contacto previo con este virus pero no así de infección activa, para ello es necesario demostrar la presencia del virus a través de pruebas moleculares como la PCR tiempo real. Sin embargo esta tecnología puede ser costosa y de difícil implementación.

Previamente, se realizó un estudio a nivel de donantes de sangre de dos diferentes Bancos de Sangre que permitió establecer la prevalencia del CMV, se analizó un total de 3.000 muestras de donantes provenientes de la ciudad de Quito y provincias de la sierra ecuatoriana, donde se encontró que el 94% de los donantes presentaban anticuerpos de tipo IgG contra el virus. Sin embargo y al tratarse de anticuerpos de memoria (IgG), no se conocía si el virus se encontraba activo o no. Por lo tanto, se desconocía si podría existir una transmisión activa, esta razón la determinación de la prevalencia de CMV en el plasma de los donantes es crucial pues no se puede eliminar la sangre ni sus derivados en un porcentaje que puede desencadenar un desabastecimiento o utilizarlos a pesar de conocer que presentaban anticuerpos para el virus y la posibilidad de que este activo.

Ante los resultados encontrados y las interrogantes formuladas en el estudio piloto se establece la necesidad de confirmar la presencia del virus en estos donantes y así descubrir que prevalencia de Citomegalovirus activo se presenta en donantes de sangre aparentemente sanos, proporcionando datos que permitan instaurar acciones inmediatas que eviten la transmisión y efectos secundarios en las transfusiones de sangre.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El Diagnóstico clínico de la infección por Citomegalovirus es realizado generalmente a través de técnicas inmunoserológicas como es “ELISA”, estas técnicas son consideradas sensibles y específicas, sin embargo detectan únicamente la presencia de anticuerpos, lo que indica la exposición al virus, pero no indican si existe actividad del virus, esto podría ocasionar la presencia de un elevado número de resultados falsos positivos. Del estudio piloto llevado a cabo durante los meses de abril a diciembre del 2009, se encontró una prevalencia de anticuerpos contra Citomegalovirus CMV de 94% en donantes voluntarios de sangre provenientes de dos Bancos de Sangre de la ciudad de Quito.

Sin embargo, al analizar las densidades ópticas de las muestras positivas, se observó que existían muestras con valores elevados al punto de corte establecido por la técnica (>3.000); y otras con valores cercanos al punto de corte (0,405), este hallazgo condujo al cuestionamiento: De qué relación existe entre la cantidad producida de anticuerpos vs replicación viral en el caso del CMV? Para responder esta inquietud es necesario realizar pruebas confirmatorias para la infección, en este caso la técnica molecular de PCR permitirá establecer la presencia del ADN-viral.

Del estudio realizado por V Yagüe, 1998 sobre la comparación de dos metodologías para el diagnóstico de CMV en pacientes con trasplante renal, encontró que la técnica de ELISA es un método rápido, barato y sencillo, para establecer la presencia de anticuerpos contra la infección por CMV. En contraste, la técnica molecular cualitativa de PCR constituye una técnica altamente sensible para diagnosticar la presencia de pequeñas cantidades de partículas virales, su replicación. (*Yague, I, A, Álvarez, Fernández, & Picazo, 1998*).

La amplificación del genoma CMV por PCR es crucial, ya que el genoma del virus es altamente variable. (*P, HN, & KL, 2006*). Por esta razón la elección de los primers debe ser de manera meticulosa, una de las alternativas es la selección del PCR REAL TIME.

Este es un método basado en el PCR tradicional, pero esta reacción es un proceso de amplificación y detección simultánea del ADN amplificado en “tiempo real”, pudiendo

realizarse dicha detección por medio de diferentes reacciones físicas y químicas. Adicionalmente es un sistema que evita la manipulación de los productos amplificados evitando así las contaminaciones, permite obtener resultados en poco tiempo y una mínima variabilidad en los resultados obtenidos.

En el estudio denominado: “Early diagnosis of human cytomegalovirus disease in transplant recipients by DNA amplification in plasma” (*Wolf & Spector, 1993, vol. 56*) determinaron que el diagnóstico molecular por PCR es el marcador más fiable de la presencia de la viremia de CMV, esta prueba se aplicó tanto a donantes como receptores de tejidos, concomitantemente con cultivos celulares, encontrándose que de los 11 pacientes que tuvieron resultados negativos en los cultivos, pero positivo en plasma-PCR, posteriormente desarrollaron la enfermedad.

Concluyendo de esta manera que la detección en plasma-PCR es un método rápido, específico y altamente sensible para el diagnóstico precoz de CMV y podría ser útil para la terapia profiláctica en pacientes trasplantados (*Jiwa, Van Gemert, & Raap, 1989*).

En un análisis longitudinal de 162 receptores de trasplante hepático, identificaron 51 pacientes con presencia de viremia por CMV, luego de ser sometidos a detección en la técnica molecular de PCR, estos hallazgos determinan la importancia de una detección a tiempo que evitaría problemas de transmisión a través de donaciones de tejidos (*Frente, Sabin, Burroughs, Rolles, Griffiths, & Emery, 1997*).

En un estudio realizado en la India (*Rckha, Chandraseckhara, & Yeshwanth, 1995*) en donantes asintomáticos se encontró que aquellos derivados sanguíneos que presentaron anticuerpos para CMV no mostraron viremia en pruebas moleculares, siendo indicativo que no hay transmisión activa en sangre; sin embargo no se podría concluir que un resultado negativo en PCR evite la transmisión. Por lo expuesto anteriormente la aplicación de técnicas moleculares permite establecer la presencia del ADN viral útil para el diagnóstico de viremia activa.

En Ecuador, no existen publicaciones y estudios al respecto, es por eso que se requiere conocer si los donantes asintomáticos con anticuerpos contra el virus tienen una viremia activa o no, y de esta manera alertar al Sistema de Sangre sobre la posibilidad de transmisión.

Así el propósito de este estudio es demostrar si en los donantes de sangre existe la posibilidad de infección asintomática activa del virus (CMV) demostrada mediante la presencia del ADN-viral.

### **3. OBJETIVOS:**

#### ***OBJETIVO GENERAL:***

- Establecer la presencia del Citomegalovirus (CMV) en donantes voluntarios de sangre mediante la técnica molecular PCR-Tiempo Real.

#### ***OBJETIVOS ESPECÍFICOS:***

- Determinar la presencia del virus en donantes con resultados fuertemente positivos en ELISA.
- Determinar la presencia del virus en donantes con resultados débil positivo e indeterminados.
- Correlacionar si la cantidad de anticuerpos detectados en ELISA es directamente proporcional con la replicación viral.
- Proporcionar información a los Bancos de Sangre sobre los resultados obtenidos para el manejo de productos sanguíneos con resultados positivos en ELISA.

### **4. HIPÓTESIS:**

Ho Los donantes con resultados reactivos en serología mantienen al virus latente no hay replicación viral.

H1 Los donantes con resultados reactivos en serología hay replicación viral no esta en latencia.

## ***CAPITULO II***

### ***MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL***

#### ***5. ANTECEDENTES:***

El Hemocentro Nacional en Quito, recolecta entre 1-2% de sangre de la población total de Quito, es decir recibe aproximadamente 5830 donaciones por mes. De los cuales el 98% son transfundidos a pacientes que lo requieren por varias afecciones a su salud. Por lo tanto, son individuos inmunodeprimidos que pueden ser susceptibles en adquirir cualquier infección.

Dentro de los requisitos para la donación voluntaria es mantener un buen estado de salud, a pesar de que la anamnesis permite realizar una adecuada “selección” de los donantes, en varias ocasiones se ha detectado la presencia de infecciones con HIV, Hepatitis B y C, Enfermedad de Chagas y Sífilis en individuos sanos. Así también se ha encontrado donantes con malaria o Citomegalovirus en unidades sanguíneas a ser transfundidas a niños prematuros y trasplantados, sin embargo estas pruebas no son parte de la rutina.

De acuerdo a los estándares de Banco de Sangre, publicados en 2004 (*Organización Panamericana de la Salud, 2004*) se manifiesta que existen cinco marcadores serológicos obligatorios en todos los Bancos de Sangre y Hemocentros a nivel mundial, sin embargo investigaciones y análisis epidemiológicos pueden establecer la necesidad de incluir nuevos marcadores serológicos.

El Citomegalovirus humano (HCMV), generalmente produce infecciones asintomáticas en individuos inmunocompetentes. Pero a nivel de personas inmunodeprimidos y en los recién nacidos ocasiona infecciones graves, debido a que generalmente son ellos los que reciben transfusiones sanguíneas para mejorar su estado de salud, sin embargo estas pueden convertirse en uno de los factores de riesgo para la transmisión viral. (*Lezama y Michel 2000*) (*Studahl, Bergstrom, & Hagber, 1998*) Pues se ha observado reactivaciones virales bajo determinadas circunstancias, como en pacientes inmunodeprimidos o trasplantados, ocasionando desenlaces fatales. (*Studahl, Bergstrom, & Hagber, 1998*)

Para el diagnóstico clínico de CMV se han descrito y utilizado varios métodos, siendo el más común ELISA sin embargo en los últimos años aparecieron varios estudios acerca de la superioridad del diagnóstico molecular. (*Kusne, Manez, & Frye, 1997*).

Uno de los métodos más utilizados es la amplificación por PCR. Estudios de sensibilidad de este método indican que es capaz de detectar desde 4 mil células infectada en 100.000 células analizadas. (*Aguayo & Corvalán, 1999*).

El CMV, es un virus envuelto por una cápsula, posee ADN de doble cadena, de 235 Kpb en su genoma, es un virus que permanece latente principalmente a nivel de macrófagos por lo que su transmisión a través de la sangre resulta ser altamente efectiva. La utilización de la técnica molecular de PCR permite evidenciar su presencia en las células y por ende su actividad.

La PCR en tiempo real es un método muy sensible y capaz de cuantificar el ADN viral en plasma antes de que aparezca la sintomatología clínica (*Ikewaki, Ohtsuka, Ogata, Kikuchi, & Nasu, 2000*) (*Gouarin, Vabret, Gautl, Petitjean, Regeasse, & Huralt de Ligny, 2004*) siendo una prueba que no es afectada por un retraso en la separación del plasma, se ha comprobado que no se degrada el ADN viral fácilmente (*Nesbitt, Cook, & Jerome, 2004*) y que permite obtener los resultados de múltiples muestras en breve tiempo, al realizar simultáneamente la amplificación y detección del producto, evitando así errores por manipulaciones post-PCR. (*Foy y Parkes 2001*).

De los estudios realizados indican que la existencia de ADN de Citomegalovirus en la sangre de una persona es indicativo que dicho virus se encuentra en fase de replicación y por tanto, infectante. (*Gutiérrez Salinas, y otros, 2009*). Eso significa que la persona que lo padece, aunque no tenga ningún tipo de síntomas que denoten una infección, puede actuar como agente infectante para otras personas y, de esta forma, propagar la infección por Citomegalovirus. (*Rckha, Chandraseckhara, & Yeshwanth, 1995*).

## 6. CITOMEGALOVIRUS:

El Citomegalovirus (CMV) también conocido como herpesvirus humano tipo 5, subfamilia *Betaherpesviridae* pertenece a la familia de los virus herpes, de los cuales sólo 8 infectan al hombre, que incluye al virus del herpes simple, virus varicela-zoster, y virus de Epstein-Barr. (Vioglioglia, 2007).

El CMV forma parte del complejo TORCH, denominación que reúne a varias entidades virales (*Toxoplasma gondii*, Rubéola, Citomegalovirus, y Herpes virus). La determinación de estos agentes infeccioso puede prevenir problemas futuros en una mujer embarazada y son utilizados como diagnóstico preventivo en los controles prenatales.

Al virus CMV se lo aislo de distintos fluidos orgánicos y células: orina, heces, saliva, semen, secreción del cuello uterino, leche materna y linfocitos. (Vioglioglia, 2007). El hallazgo característico en los tejidos infectados, es la presencia de células gigantes citomegálicas (20-40 $\mu$ ) con voluminosas inclusiones intranucleares (8-10 $\mu$ ) basófilas, rodeadas por un halo claro. (Vioglioglia, 2007). La infección por CMV puede ser sintomática o asintomática, ocurre por transmisión vertical de madre a hijo, perinatal, a través de la leche materna o secreciones infectadas de la madre; también puede darse por transmisión sexual o por transfusiones sanguíneas y un 50% por trasplante de órganos. (Vioglioglia, 2007).

El CMV tiene la habilidad de crear estados de latencia una vez que ha ingresado al organismo, este proceso no se conoce exactamente como ocurre pero se conoce que algunas células como: polimorfonucleares, linfocitos T, células endoteliales vasculares, células epiteliales renales y glándulas salivales alojan el virus en un estado no replicativo o de replicación muy lenta. (Mattera & Barrios, *Citomegalovirus*, 2000; García Escamillas & Méndez López, 2006).

La reactivación del virus ocurre generalmente en episodios de inmunodepresión, luego del uso de agentes quimioterapéuticos u otras enfermedades inmunes.

## **6.1 ESTRUCTURA DEL VIRUS:**

El virus presenta una estructura compleja. El virión está constituido por una cápside, tegumento y envoltura. El núcleo contiene la molécula de ADN y un genoma de 235 Kpb que codifica 165 genes. Su tamaño va desde los 120 a los 300nm. Esta variación depende, en parte, del grosor del tegumento y del estado de la envoltura, pudiendo variar de unos herpesvirus a otros o, incluso, dentro de la misma especie.

Los genomas de los diferentes tipos y subtipos de CMV humanos tienen por lo menos un 90% de homología entre ellos, pero todas las cepas tienen diferentes perfiles de restricción que fueron utilizados como marcadores epidemiológicos. (Mattera & Barrios, Hespervirus , 2008). Es decir, que se los puede diferenciar utilizando las enzimas de restricción y comparando el tamaño de los fragmentos.

La envoltura está formada por glicoproteínas que resultan de la disociación de una poliproteína precursora presente en las células infectadas, estas glicoproteínas portan los epítopes que inducen la formación de anticuerpos neutralizantes de la infección. (Delgado, Sánchez, Cevera, Munar, Gásco, & Marco, 2000). Aún no se conoce el receptor celular que sirve para la penetración viral, se cree que es a través de un proceso denominado endocitosis.

Una vez dentro de la célula se da la replicación del virus en el núcleo y las largas inclusiones intranucleares que se observan en las células infectadas corresponden agregados de nucleoproteínas. El Citomegalovirus es especie-específico, se reconoce un solo serotipo humano, pero con diferentes genotipos, los que son responsables de las reinfecciones.

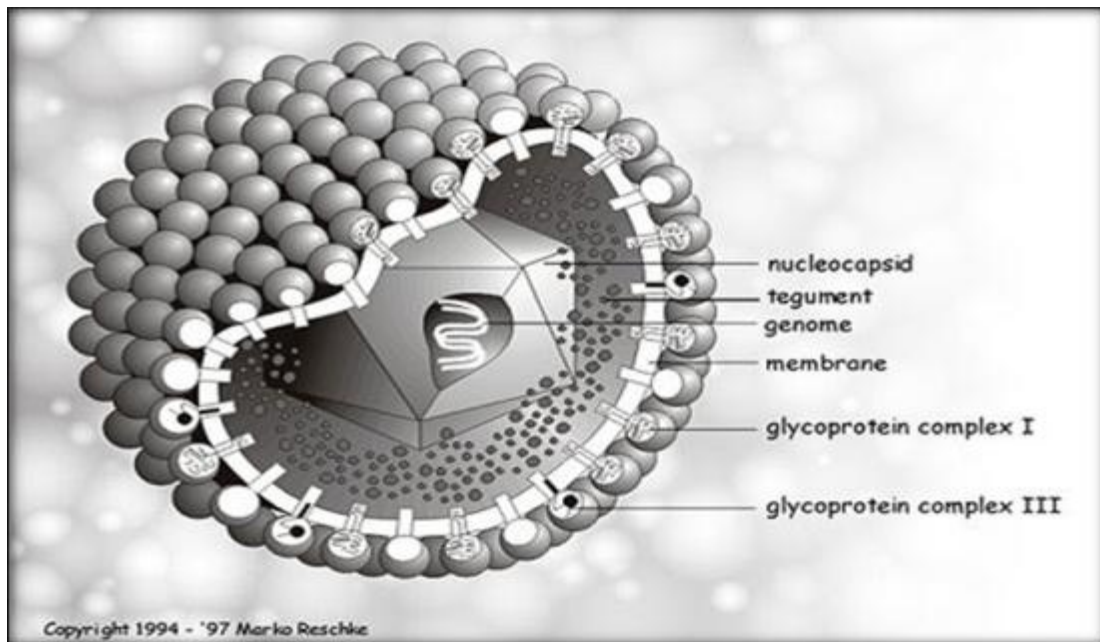
Como una de las características del CMV, es el ciclo vital complejo que presenta tendiendo a la latencia y reactivación en la inmunosupresión o estímulo alogénico, como en el trasplante de tejidos de una persona a otra. (Mattera & Barrios, Hespervirus , 2008).

## **6.2 COMPOSICIÓN GENÉTICA:**

El ácido desoxirribonucleico (ADN) del CMV es de doble cadena de tipo lineal, con una longitud de 240.000 pares de bases, un diámetro de 150 a 250nm, y un peso molecular  $155 \times 10$  Daltons. Por estas características se considera a este virus como uno de los más grandes

que infectan a los seres humanos. Debido al tamaño de su genoma se divide en dos fragmentos (uno corto y otro largo), unidos por secuencias repetidas de guanina y citosina. (Alcina, 2010). La cápside está constituida por 2 proteínas principales, una mayor de 153Kd y una menor 34Kd, y 2 proteínas pequeñas de 28 y 11Kd. Posee una proteína básica 52Kd ligada al ADN y una proteína de 38Kd presente únicamente en las partículas no infecciosas, que contribuye al ensamblaje de las partículas virales. Estas proteínas se organizan en 162 cápsómeros. (Alcina, 2010). La cápside es icosaédrica recubre al ADN y esta a su vez se encuentra rodeada por un tegumento compuesto por fosfoproteínas de diferente peso molecular. El ADN central contiene un núcleo que está rodeado por una cápside compuesta por 162 capsómeros. (Figura N°1). (Mattera & Barrios, *Hespesvirus*, 2008). En total se han identificado en los viriones unas 59 proteínas estructurales, algunas de estas son estimulantes antigénicos en el desarrollo de la respuesta inmune. (Tabla N°1).

Figura N°1: Estructura Viral CMV



*Estructura viral Dr. Marko Reschke*

Tabla N° 1 Proteínas Estructurales

Cápside	Tegumento	Glicoproteínas
Proteína transportadora menor de las cápside (UL 46).	pp65 (UL 83)*	gB (UL55)**
Proteína más pequeña de la cápside (UL 48-49)	pp71(UL 82)	gM(UL100)
Asamblina (UL 80)	pp28 (UL99)	gH(UL75)
Proteína menor de la cápside (UL 85).	pp150(UL32)	gL(UL 115)
Proteína menor de la cápside (UL 86)	Proteína mayor del tegumento (UL 48)	gO(UL74)
	Pp50	gN(UL73)
	pp38 (UL80 $\alpha$ )	gp48(UL4)

\*La pp65 es la proteína estructural viral dominante (diana) de la respuesta inmune celular.

\*\*La glicoproteína gB es la principal diana de los anticuerpos neutralizantes y está muy conservada en todas las especies

## 7. VIAS DE TRASMISIÓN:

La transmisión del CMV ocurre de persona a persona y afecta a individuos de cualquier edad, aunque su contagio es más común durante la niñez, la adolescencia y la juventud. La infección requiere contacto cercano y directo con los líquidos corporales de una persona infectada. Pero, también puede transmitirse a través de transfusiones sanguíneas o por órganos trasplantados.

### 7.1 Transmisión de persona a persona:

El CMV se transmite de una persona a otra, generalmente mediante contacto cercano y prolongado con secreciones humanas como: la orina, saliva, sangre, excremento, lágrimas, leche materna, semen y secreciones cervicales siendo estas secreciones corporales en las cuales puede encontrarse al CMV.

Algunos ejemplos de cómo una persona puede adquirir el CMV de una persona infectada incluyen, besar, tener relaciones sexuales, compartir utensilios para comer o beber, o compartir juguetes que han estado en la boca de otros niños.

No se puede adquirir el CMV simplemente al compartir el mismo techo con alguien, salvo que exista intercambio de secreciones corporales. Además, no existe ninguna información que indique que el CMV se transmita a través del aire. (Llamas Fuentes, Pérez Martínez, & Gallego Valcarse, 2006)

## ***7.2 Trasplante de órganos:***

El CMV puede transmitirse a receptores de trasplantes de órganos o médula ósea y a pacientes que reciben transfusiones sanguíneas de un donador con antecedentes de infección por CMV o con una infección activa. Se ha demostrado que una de las causas de fallas en el trasplante de riñones son las infecciones por CMV, las manifestaciones ocurren a los 4 meses produciendo desde el rechazo al injerto hasta la muerte del paciente. (Llamas Fuentes, Pérez Martínez, & Gallego Valcarse, 2006)

Existen dos tipos de situaciones de riesgo frecuentemente relacionadas con la infección y enfermedad dada por CMV, la primera cuando el donante de órganos es positivo y el receptor negativo para anticuerpos contra el virus, en esta circunstancia se puede desencadenar la infección de forma inmediata y fatal en el receptor y la segunda, al utilizar tratamiento con anticuerpos mono y/o policlonales con terapia antirechazo que causan inmunosupresión ocasionando la reactivación del virus y una replicación intensa. (Llamas Fuentes, Pérez Martínez, & Gallego Valcarse, 2006)

Estudios han determinado que la infección por CMV aparece del 30% al 80% en trasplantes de órganos sólidos, siendo las complicaciones más severas a nivel de órganos como intestino, páncreas y pulmón, con menor porcentaje entre el 30% al 50% a nivel de hígado, corazón, y riñón. (Llamas Fuentes, Pérez Martínez, & Gallego Valcarse, 2006)

Existen otros factores de exposición o predisposición como dosis elevadas a corticoides, cargas virales de CMV elevadas, medicamentos, coinfecciones con otros virus y estrés asociado a situaciones críticas. (Llamas Fuentes, Pérez Martínez, & Gallego Valcarse, 2006).

### **7.3 Transmisión vertical y horizontal:**

De los estudios realizados se ha establecido que el virus se transmite de manera horizontal, es decir, por contacto directo de una persona a otros por medio de secreciones como orina, saliva, semen, lágrimas y leche. (*Mattera & Barrios, Hespervirus , 2008*).

También se ha documentado la transmisión de forma vertical de madre a hijo, esta puede darse antes, durante o después del nacimiento. (Zuckerman, Ariel J; Banatvala, Jangu E; Pattison, Jhon R; Griffiths, Paul D; Schoub, Barry D, 2004) El CMV puede transmitirse al bebé antes del nacimiento en una madre con infección primaria o recurrente. Cuando el bebé padece una infección por CMV antes del nacimiento, esto se conoce como infección congénita por CMV. (Zuckerman, Ariel J; Banatvala, Jangu E; Pattison, Jhon R; Griffiths, Paul D; Schoub, Barry D, 2004).

Aproximadamente el 90% de los bebés que padecen una infección por CMV previo al nacimiento, no presentan ningún síntoma ocasionado por el virus al nacer; sin embargo, el 10% restante tendrá diverso grado de anormalidades. (Zuckerman, Ariel J; Banatvala, Jangu E; Pattison, Jhon R; Griffiths, Paul D; Schoub, Barry D, 2004).

En un estudio realizado por Stango 1980 (*Stagno, Reynolds, & Tsiantos, 1980*) se menciona que solo un tercio de las mujeres que han presentado una infección primaria para CMV pueden producir una infección intrauterina. Esto puede deberse a la latencia del virus que es capaz de mantenerse en las células inactivo y activarse posteriormente, el mayor riesgo se produce en niños prematuros que no tienen su sistema inmune desarrollado. (*Navarrete Delgadillo, Villanueva Mendez, Alvarez Mantilla Toqueo, García González 2005*).

Otra vía de contacto directo es a través de la leche materna, se ha demostrado que el calostro o primera leche de madres infectadas contiene mayor cantidad del virus que otras secreciones, ocasionando la transmisión de este virus durante su lactancia. Cuando se da la ingesta de leche con CMV, los neonatos en algunos casos pueden desarrollar infecciones bucales, a nivel de glándulas salivales, respiratorias, de la faringe, y en la mucosa del esófago, esto puede ocasionar casos de diarreas agudas idiopáticas. (*Navarrete Delgadillo, Villanueva Méndez, Álvarez Mantilla Toquero, & García González, 2005*).

La transmisión por contacto sexual, generalmente está vinculada a los individuos sexualmente activos y que tienen contacto con una persona infectada por el virus, sin embargo estas afirmaciones aún no han sido comprobadas.

#### ***7.4 Trasmisión por transfusión de sangre:***

La transmisión de infecciones por vía transfusional es una de las complicaciones más importantes en receptores de sangre. En los últimos años se incrementaron las medidas para disminuir el riesgo de transmisión y en la actualidad, en los países desarrollados, es muy baja. Sin embargo, la trascendencia epidemiológica de transmisión de infecciones virales viene dada por la existencia de donantes aparentemente sanos con infecciones ocultas. (*Gutiérrez Salinas, et al., 2009*).

La primera asociación entre CMV y transfusión se describió en 1966, y a partir de ese momento fue evidente que mientras la mayoría de los pacientes expuestos a este virus, desarrollaban infecciones asintomáticas o leves, una minoría compuesta por pacientes inmunodeprimidos sufría enfermedades severas. (*Rivero Jimenez, 2006*).

La seroprevalencia de anticuerpos anti-CMV en la población general es elevada, varía entre el 50 al 100 % en diferentes países dependiendo de factores tales como nivel socioeconómico, edad, área geográfica, y otros. (*Rivero Jimenez, 2006*) Este hecho ocasiona que la disponibilidad de unidades seronegativas sea muy limitada.

En estudios llevados a cabo en Cuba con el desarrollo de inmunoensayos enzimáticos (*IEE*) de Labsystems Oy, se encontró el 32,7 % de seropositivos para IgG anti-CMV en 300 donantes de sangre, 57,3 % en 220 embarazadas a término, 67,8 % en politransfundidos y 77% en 60 receptores de trasplantes renales. (*Rivero Jimenez, 2006*). El período de incubación por transmisión de persona a persona no está bien determinado, sin embargo se cree que puede ser entre 3 a 12 semanas pero puede variar, se ha establecido que de 3 a 8 semanas en caso de transmisión pos transfusional y de 4 semanas a 4 meses en caso de transplante. (*Delgado, Sánchez, Cevera, Munar, Gásco, & Marco, 2000*).

## **8. TIPOS DE DIAGNÓSTICO:**

Desde el punto de vista clínico-diagnóstico se ha establecido la distinción entre infección y enfermedad. Se define infección por CMV como el aislamiento del virus o la detección de proteínas virales (antigemia Ag pp65) o ADN por PCR convencional o PCR time real en cualquier líquido y/o tejido del cuerpo. (*Crespo, 2000*). Sin embargo, en una infección latente no es posible el aislamiento del CMV. A nivel del paciente inmunocompetente el diagnóstico de una primoinfección se basa en la sospecha clínica y por la determinación de marcadores serológicos. Así, la seroconversión de IgG-CMV se detectan a las 4-6 semanas y persiste de forma indefinida en cambio la determinación de IgM-CMV detectables 7-12 días después de la infección primaria y desaparece 3-6 meses. En la reactivación o reinfección se constatará un incremento del nivel basal de IgG CMV. (*Jorgelina L. Blejer, 2012*).

A nivel de inmunodeprimidos o receptores de trasplantes se considera que existe enfermedad infecciosa por CMV cuando presenta un síndrome clínico y se detecta el virus en sangre, tejido u órgano afectado. (*Cortéz, Beltrán, Olaya, & Hernandez, 1999*).

Para el diagnóstico del Citomegalovirus se ha utilizado varias técnicas como:

- ❖ Cultivos Celulares.
- ❖ Diagnóstico Serológico.
- ❖ Diagnóstico Molecular.

### **8.1 CULTIVOS CELULARES:**

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células 'in vitro', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. (*Cardona, Navarro, & Pérez, 2012*) En pacientes inmunocomprometidos el diagnóstico de infección activa por Citomegalovirus (CMV) es imprescindible para el inicio, el monitoreo y la finalización de la terapia antiviral específica. Para ello, se requiere demostrar la presencia de replicación viral. El aislamiento en cultivo es uno de los métodos patrones, sin embargo este virus es difícil de ser cultivado, únicamente en las células diploides humanas es posible obtener un crecimiento in vitro. (*Cardona, Navarro, & Pérez, 2012*).

En el mercado de insumos para usar biología molecular se puede obtener diversas líneas de este tipo celular, lo que facilita y amplía el diagnóstico a nivel del laboratorio. Las más utilizadas son las líneas semicontinuas de fibroblastos MRC-5 o WI-38 de pulmón embrionario humano (*Cardona, Navarro, & Pérez, 2012*). Esta técnica del cultivo convencional consiste en inocular tubos de cultivos celulares y la positividad del crecimiento viral se detecta mediante la observación del efecto citopático, que es característico de este virus. (*Cardona, Navarro, & Pérez, 2012*)

Sin embargo, este es uno de los herpesvirus con tiempo de replicación más largo, lo que se traduce en la tardanza en desarrollar el efecto citopático en los cultivos y, en consecuencia, en una demora en el tiempo real de diagnóstico, la infección produce una secuencia de cambios morfológicos que comienzan con la contracción celular y siguen con la aparición de inclusiones intranucleares y citoplasmáticas y el agrandamiento de algunas células individuales que tienden agruparse, y posteriormente, a fusionarse dando lugar a células gigantes típicas. (*Cardona, Navarro, & Pérez, 2012*) Estudios han determinado que el término medio de detección suele ser de unos 10 días, sin embargo puede prolongarse entre 15-20 días, y difícilmente se observa la presencia antes de los cinco días después de la inoculación.

Estos plazos son excesivos para iniciar un proceso terapéutico, lo que constituye la mayor desventaja de este método diagnóstico (*Cardona, Navarro, & Pérez, 2012*). Otro problema de los cultivos convencionales es la labilidad del virus, lo que limita el transporte a centros de referencia para cultivo. (*Cardona, Navarro, & Pérez, 2012*)

Por último, la sensibilidad del cultivo es 48 % para el control en pacientes inmunodeprimidos, lo que se evidencia a nivel de muestras como el de líquido cefaloraquídeo LCR. Una excepción a esto se encontró a nivel de los cultivos de orina procedentes de neonatos con infección congénita, cuya elevada carga vírica permite un crecimiento viral in vitro a las 48 h. (*Cardona, Navarro, & Pérez, 2012*).

El método de cultivo conocido como shell vial (SV) ha permitido obviar alguno de los inconvenientes del cultivo en tubo (*Cardona, Navarro, & Pérez, 2012*); este método permite la detección de antígenos víricos de forma inmediata y precoz mediante la utilización de anticuerpos monoclonales en cultivos sobre viales de fondo plano.

## 8.2 Diagnóstico Serológico:

Es un análisis que mide el número de anticuerpos que se producen ante la presencia de un antígeno o sustancia extraña. (Navarro, 2012) Existe una gran variedad de técnicas serológicas que permiten detectar anticuerpos de las clases IgG e IgM frente al CMV, de forma individual o conjunta permitiendo en cierto grado determinar una infección reciente o pasada o simplemente el contacto con el virus. (Navarro, 2012) En estas técnicas es común el uso de un antígeno pegado en la superficie del soporte sólido que puede ser un extracto de células infectadas por la cepa prototipo AD169 (cepa de efecto citopático en adenoides humanos) o bien partículas víricas purificadas mediante centrifugación en gradiente de densidad. (Revello María Grazia, 2002),

Las técnicas más habituales son la fijación de complemento, la inmunofluorescencia (indirecta y anticomplementaria), la aglutinación pasiva y los métodos inmunoenzimáticos (EIA). (Navarro, 2012). Uno de los problemas detectados en la técnica de fijación de complemento, para la detección conjunta de anticuerpos IgG e IgM es la falta de sensibilidad.

La inmunofluorescencia indirecta es más sensible que la fijación de complemento, permite la detección individualizada de distintos tipos de anticuerpos, pero genera falsos positivos por la presencia de receptores de los anticuerpos inducidos por el CMV, en las células infectadas que sirven de antígeno en la reacción (Navarro, 2012).

La aglutinación con partículas de látex sensibilizadas con antígeno de CMV permite la detección conjunta de IgG e IgM es sensible, específica, sencilla y rápida su realización sin embargo la lectura al ser subjetiva puede ocasionar resultados falsos positivos o negativos.

Las técnicas inmunoenzimáticas o ELISA pueden evaluar la presencia de los anticuerpos IgG, IgM o ambos contra los extractos del virus pegado en el fondo del soporte sólido. (Navarro, 2012). Las técnicas de ELISA se realizan mediante la adición secuencial de todos los reactivos necesarios separados por etapas de lavado. Cada una de las operaciones puede realizarse manualmente con micropipetas o con equipamiento para la automatización de todas y cada una de las etapas.

El método ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente), la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada, y por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. (Pérez, 2009).

## **9. Respuesta Inmune**

### ***9.1 Respuesta Inmune Celular.***

Al tratarse de un virus la principal respuesta inmune es la celular mediada por las células NK (natural killer), siendo estas las que evitarán la progresión de la infección en su fase inicial (Viglioglia, 2007). La inmunidad específica está mediada por los linfocitos CD8 y CD4 los que son claves para la resolución de la infección primaria y proporcionan una vigilancia inmune a largo plazo. (Galla & Levy, 2012).

Sin embargo toda esta respuesta inmune no logra eliminar al virus y este permanece en forma latente en las que persisten copias completas del genoma viral pero sin fase productiva. Por lo que, en esta fase es imposible el aislamiento del virus y por ende la detección de las proteínas virales en el organismo. (Galla & Levy, 2012). Los epítopes responsables en un 70-90% de ocasionar una respuesta inmunitaria son los derivados de la matriz pp65, estimulando a los linfocitos CD8.

### ***9.2 Respuesta Inmune humoral.***

El estudio realizado demuestra el papel sinérgico que la inmunidad humoral puede desempeñar en la respuesta frente al CMV; así determinaron que durante el embarazo en mujeres con inmunización previa, confieren un nivel de protección al feto entre un 70 a un 80%. Sin embargo no se descarta por completo que ocurra una infección intrauterina (Ochoa C, 2006). Las proteínas del CMV reconocidas por el sistema inmune humoral son las glicoproteínas gB y gH. El 50% de los anticuerpos neutralizantes están representados por anticuerpos anti gB.

### ***CAPITULO III***

#### ***MATERIALES Y MÉTODOS-ESTUDIO PILOTO***

##### **10. Estudio Piloto - Seroprevalencia en donantes de sangre.**

###### **Metodología ELISA Indirecto**

La mayoría de infecciones producidas por CMV son asintomáticas y es una enfermedad que no requiere declaración obligatoria, su incidencia y prevalencia se estima fundamentalmente por estudios sero-epidemiológicos.

En Ecuador no existen publicaciones de la prevalencia del CMV, por esta razón se realizó inicialmente el estudio piloto para establecer la seroprevalencia de Citomegalovirus en los donantes de sangre de Quito mediante la técnica de Elisa tipo Indirecta cuyo fundamento se basa en la reacción inmune antígeno-anticuerpo, mediante la fijación en el soporte sólido (tiras o pocillos) recubiertos con antígeno purificado de CMV AD169 (ATCC) cadena producida en fibroblastos humanos (*Boeck, 2011*). Los anticuerpos circulantes de tipo Ig G se unirían a los antígenos pegados en la fase sólida para que con la adición de un conjugado o anticuerpo marcado con la enzima peroxidasa formen el complejo que va a unirse con el sustrato y producir la reacción de color indicativo de muestras reactivas, el aumento del color es directamente proporcional a la cantidad de complejos inmunes formados.

El kit utilizado fue CMV IgG (Enzyme Immunoassay Test Kit). For in vitro Diagnostic Use. Catalog N° 720-320, DIAMEDIX, USA. Este kit contenía los estándares:

- Estándar: 0 EU/ml un vial contiene 1,8 ml de suero humano prediluido, no-reactivo para anticuerpos de CMV IgG.
- Estándar 10 EU/ml dos viales contienen 1.8 ml de suero humano prediluido débil reactivo para anticuerpos CMV Ig G.
- Estándar 160 EU/ml un vial contiene 1.8 ml de suero humano prediluido, fuerte reactivo para anticuerpos CMV Ig G.

- Control positivo alto un vial contiene 1.8 ml de suero humano prediluido, moderadamente reactivo para anticuerpos CMV Ig G.
- Control bajo positivo un vial contiene 1.8 ml de suero humano prediluido bajo reactivo para anticuerpos de CMV IgG.
- Control negativo un vial contiene 1.8ml de suero humano prediluido no reactivo para anticuerpos CMV IgG

Nota: Estándares y controles son preparados de diferentes lotes de sueros.

- ✚ Diluyente de muestra: una botella contiene 60 ml de fosfato buffer con proteínas estabilizadoras.
- ✚ Solución de lavado concentrado: dos botellas que contienen 50 ml de fosfato buffer salino con conservante Proclin 300,15 ppm.
- ✚ Conjugado: una botella contiene 25 ml de inmunoglobulina G antihumana de cabra con peroxidasa de rábano además incluye proteínas estabilizadoras.
- ✚ Sustrato HRP: una botella contiene 25 ml de TMB solución (3,3', 5,5"-tetramethylbenzidina).
- ✚ Solución de paro: una botella que contiene 30 ml de ácido fosfórico 1N y ácido hidrociorhídrico 1N. Precaución: ácido corrosivo, evite el contacto con piel y ojos. Si existe contacto debe lavar copiosamente con agua.

Mantenimiento de todos los reactivo de 2 a 8°C.

#### Otros materiales requeridos

- Lavador automático.
- Pipetas de 5-50ul; 100-1000ul.
- Timer
- Probetas de 1000
- Agua tipo II. Destilador ELGA, System.
- Papel absorbente
- Lector de placas de ELISA 450nm con referencia 600-630nm.
- Incubadora de placas ELISA 37°C.

### **10.1 Método**

Se recolectaron sueros de donantes voluntarios de sangre provenientes de dos Bancos de Sangre en la ciudad de Quito durante los meses de abril a diciembre del año 2009, recolectándose un total de 3.000 donantes.

### **10.2 Recolección de muestras:**

Se obtuvo sangre total de donantes en tubos sin anticoagulante, el suero fue separado por centrifugación de 10 min a 3.000 rpm y mantenido a temperatura ambiente por un período de 8 horas. Los sueros en los que no se realizaron las pruebas ese mismo día fueron conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  evitando ciclos de descongelación.

Antes de realizar las pruebas los sueros fueron descongelados a temperatura ambiente y mezclados. Sueros con hemólisis y lipémicos no fueron utilizados de acuerdo a las recomendaciones de *Approved Estándar-Procedures for the handling and processing of blood specimens, H18A*, documento que establece las recomendaciones para evitar errores pre-analíticos. (<http://www.clsi.org/source/orders/free/h18-a3.pdf>) (R., Bessman, Smith, Szamosi, Warunek, & Wiseman, 2004)

La caracterización de los sueros se realizó mediante la técnica de ELISA casa comercial DIAMEDIX, CMV IgG utilizado para la detección cualitativa y semi-cuantitativa de anticuerpos de tipo IgG contra Citomegalovirus. Se eligió la detección de la Inmunoglobulina G debido que a nivel de los pacientes inmunocompetentes, el diagnóstico de la primoinfección se basa en la determinación de marcadores serológicos que constatan la seroconversión de IgG-CMV, anticuerpo que se detecta a las 4-6 semanas y persiste de forma indefinida, mientras que IgM-CMV es detectable 7-12 días después de la infección y desaparecen 3-6 meses. Al tratarse de donantes aparentemente saludables sin síntomas clínicos se debe buscar la presencia de anticuerpos de memoria IgG. (José Gutiérrez-Salinas, 2010)

**10.3 Principio del test:** las muestras diluidas son incubadas con el antígeno de CMV que se encuentra pegado en los pocillos, el antígeno está formado por cepas purificadas, AD 169 producida en fibroblastos humanos. (Ost, 1984). Si están presente en las muestras (sueros)

anticuerpos contra CMV tipo IgG estos forman un complejo antígeno-anticuerpo, todo lo residual es eliminado por aspiración y lavado. Conjugado anti-anticuerpo marcado por una enzima es añadido para que se una al complejo formado, los residuos son eliminados por aspiración y lavado. Por último se añade sustrato dando un producto de color en el caso de que exista todo el complejo anterior. La absorbancia de este producto final puede ser leída en espectrofotómetro de 450 nm (referencia de 600-630) siendo directamente proporcional a la concentración de IgG de anticuerpos contra antígeno CMV presente en la muestra. (*Diamedix, 1984*).

#### **10.4 Procedimiento:**

Precauciones en relación al manejo de muestras, estándares y controles deben ser consideradas como potencialmente patógenas. Cada suero utilizado para la elaboración de estándares, controles del kit han sido encontrados negativos para los marcadores serológicos de Hepatitis B, C, HIV 1-2, sin embargo las muestras deben ser manejadas como potencialmente infecciosas recomendaciones impartidas por el Centro de Control de Enfermedades Infecciosas (*CDC*)/*National Institutes of Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories"* <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl.pdf> (*Wilson & Chosewood, 2009*)

- Realizó una dilución 1:100 de los sueros de donantes en diluyente que contiene fosfato buffer con proteínas estabilizadoras. (5ul suero más 500ml de diluyente).
- Mezcla por vortex para asegurar una adecuada solución.
- Coloca la mezcla en cada pozo en una cantidad de 100ul
- Cada ensayo debe incluir los estándares de 0EU/ml; 10EU/ml; 160EU/ml además de un control negativo, control bajo positivo y un control alto positivo.
- Mezclar las muestras y coloca 100ul en cada pozo.
- Incubar a 37°C por 1 hora: en este tiempo se logra la unión de antígenos-anticuerpos.
- Lavar 6 veces (eliminar los residuos)
- Colocar 100ul de conjugado en cada pozo evitando la formación de burbujas.
- Incubar a 37°C por 1 hora: permite la unión del anticuerpo secundario más enzima.
- Lavar 6 veces

- Colocar 100ul de sustrato
- Colocar 100ul de Stop solución
- Leer a 450nm con un filtro de referencia de 600-630nm.

### **10.5 Control de Calidad de los estándares:**

1. Control positivo alto, positivo bajo y negativo deben ser incluidos en el test.
2. La absorbancia del estándar 0EU/ml debe ser <0,2.
3. La absorbancia del estándar 10EU/ml debe ser más alta que el control negativo.
4. La absorbancia del estándar 160EU/ml debe ser más alta que el control positivo.
5. El control positivo bajo debe ser superior a 8EU/ml
6. El control positivo alto debe ser superior a 10EU/ml
7. El control negativo deber ser <8EU/ml.

Los controles positivo y negativo son utilizados para monitorear el adecuado funcionamiento del kit. En el Anexo N°1, podemos encontrar las Curvas de los Estándares de validación del kit, realizadas con ayuda del Programa de Control de Calidad Interno en Bancos de Sangre del Centro de Investigaciones de Enfermedades Infecciosas – PUCE, 2010.

### **10.6 Cálculo de Resultados**

Ensayo cualitativo: estos resultados se obtienen usando el estándar de 10EU/ml por triplicado. Se obtuvo la media de las absorbancias del estándar excluyéndose aquel estándar que presente una absorbancia menor o mayor al 15% de la media obtenida.

**10.7 Cálculo del Index Value:** Valor de la absorbancia de los sueros/media de los estándares. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos.

Tabla N°2: Interpretación del Index Value

INDEX VALUE	EU/ml	Interpretación
<0.80	<8.0	Negativo para anti-CMV Ig G
0.8-0.99	8.0-9.9	Indeterminado para anti-CMV Ig G
>1.0	>10.0	Positivo para anti-CMV Ig G

## **10.8 Limitaciones del Test**

- Los resultados obtenidos en el test son únicamente una ayuda en el diagnóstico no es una prueba confirmatoria de enfermedad.
- La muestra utilizada en la determinación de anticuerpos anti-CMV es suero, obtenidos en los 2 servicios de sangre en el que se realizó el estudio, el uso de sangre total o plasma no ha sido establecido.
- La presencia de un resultado reactivo es indicativo de exposición al virus, no se puede diferenciar entre infección activa o pasada.
- Los exámenes realizados a pacientes inmunosuprimidos deben ser interpretados con precaución.
- La demostración de actividad viral en sueros reactivos debe ser realizado por técnicas moleculares al aislar el ADN viral.

## **10.9 Utilidad real de las técnicas serológicas:**

En los pacientes inmunocompetentes, las pruebas serológicas son útiles para detectar el estado de infección, o con fines de investigación sero-epidemiológicas de la población y, especialmente, en el tamizaje de donantes y receptores de órganos. (*Pérez, 2005*)

En el trasplante de órganos, el injerto de un órgano procedente de un donante seropositivo para el CMV en un receptor seronegativo (trasplante D+/R-) es un factor de riesgo bien conocido para el desarrollo de complicaciones graves por este virus tras el trasplante.

También es importante el tamizaje viral en los trasplantados de precursores células madres o stem cell, si bien aquí el mayor riesgo se produce en el receptor previamente seropositivo, por reactivación del virus latente. La serología es el único método que es capaz de diagnosticar la infección primaria y diferenciarla de la reactivación, aunque éste es un objetivo más bien teórico pues, en la práctica, lo que se hace es iniciar la quimioprofilaxis en caso de riesgo de primoinfección, como ocurre con los trasplantes D+/R- . (*Pérez, 2005*)

Sólo la demostración de una seroconversión IgG establece el diagnóstico de infección primaria. (*Alcina, 2010*) (*Revello María Grazia, 2002*). La detección de IgM únicamente no lo hace, ya que pueden deberse a la persistencia de títulos tras una infección pasada, a la

producción de estos anticuerpos en algunos casos de reactivación (especialmente en pacientes inmunodeprimidos) y al estímulo policlonal por otros virus como Epstein-Barr, herpes humanos 6 y 7 y varicela-zóster. (*Revello María Grazia, 2002*)

Aunque la principal aplicación de la serología se centra en la detección del estado inmune de un individuo frente al virus, también puede aplicarse al diagnóstico de la infección primaria, especialmente si es sintomática. Para la detección de IgM es preferible un EIA de captura que evita resultados falsos positivos que ocurren en el ELISA indirecto esto tipo de problemas se debe a la inhibición competitiva debido a la presencia de IgG o la interferencia debida al factor reumatoideo de clase IgM (*Revello María Grazia, 2002*).

Sin embargo, es preciso tener presente las limitaciones de la serología para el diagnóstico de la infección activa y la enfermedad por CMV. Los pacientes inmunodeprimidos no desarrollan una respuesta inmune adecuada, lo que hace difícil detectar la infección primaria por seroconversión, o las reactivaciones por el aumento significativo del título de anticuerpos.

Con todo, la mayor desventaja práctica de la determinación de IgG radica en la demora en obtener resultados inherentes a la necesidad de muestras pareadas, lo que les resta interés en el manejo de los pacientes de riesgo. Las pruebas que detectan IgM son más rápidas pero ya se han señalado antes los problemas técnicos que presentan. (*Pérez, 2005*)

Además, la IgM tampoco permite diferenciar la infección primaria de la reactivación o la reinfección en el individuo inmunodeprimido, ni mucho menos distinguir la infección activa de la enfermedad ni establecer pronósticos al respecto.

La detección de Ac específicos (serología) es útil en estudios de seroprevalencia y en la identificación de primoinfecciones. El Ac IgM se detecta en las infecciones primarias, pero también puede estar presente en las reactivaciones del virus. (*Boeck, 2011*) (*Revello María Grazia, 2002*), la ausencia de este anticuerpo no descarta la infección, porque pueden desaparecer cuando la infección ha sido muy precoz durante el embarazo. La antigenemia tiene baja sensibilidad en recién nacidos.

## ***IV MARCO CONCEPTUAL***

### **11. Diagnóstico Molecular:**

Las técnicas moleculares, se han aplicado en el diagnóstico del CMV, entre ellas la de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de esta se han descrito múltiples procedimientos que varían desde la secuencia a amplificar y método de detección. (*Concepción Gimeno Cardona, 2005*).

Para el diagnóstico del CVM uno de los métodos moleculares más utilizado es la amplificación por PCR de la región promotora del gen pp65 (*Aguayo & Corvalán, 1999*). Este gen codifica para una fosfoproteína de 65 KDa con ubicación en la matriz nuclear y que corresponde a una proteína de expresión tardía. Durante la replicación viral, la expresión genética se divide en dos fases: temprana y tardía. La expresión temprana es aquella que codifica enzimas y proteínas reguladoras que son necesarias para el inicio del proceso de replicación viral. Por otro lado, la expresión tardía es aquella donde se codifican proteínas estructurales, es decir, proteínas necesarias para el ensamblaje del virus. (*Hunt, 2007*).

Los cebadores utilizados en este ensayo han sido diseñados utilizando la cepa Towne como referencia y análisis experimentales han demostrado una alta sensibilidad ya que no amplifican otros genomas virales pertenecientes a la familia Herpesviridae o de otros microorganismos. (*Aguayo & Corvalán, 1999*).

Estudios de sensibilidad indican que el método es capaz de detectar desde 4 células infectadas en 100.000 células analizadas y la validación clínica de esta estrategia se realizó correlacionando resultados moleculares con otros métodos de uso clínico, observando en 14 casos analizados 1 falso positivo y 1 falso negativo (sensibilidad 93%, especificidad 93%). (*Aguayo & Corvalán, 1999*).

Para el estudio y el análisis del CMV existen 2 clases de métodos moleculares: cualitativos y cuantitativos.

### **11.1 Métodos moleculares cualitativos:**

Las técnicas moleculares, especialmente las de amplificación, se han aplicado para el diagnóstico del CMV, entre ellas la PCR. También se han descrito métodos de PCR múltiple, que permiten la detección de varios herpes virus a la vez. La principal ventaja de estos métodos es su gran sensibilidad; así, en muestras de sangre o de LCR, pueden detectar incluso 10-100 copias/ml. Los mejores resultados se obtienen con técnicas anidadas y detección con hibridación-EIA (Pérez, 2005), siendo la especificidad superior al 98% si se hace una elección cuidadosa de los primers y se toman las precauciones adecuadas para evitar la contaminación cruzada con amplicones.

Recientemente, se ha cambiado el sistema de detección por otro que utiliza tecnología en tiempo real. En general, existe poca experiencia con esta técnica, aunque los resultados son aceptables y aplicados al seguimiento de pacientes de riesgo, fundamentalmente transplantados.

### **11.2 Métodos moleculares cuantitativos: carga vírica:**

En la actualidad, existen dos tipos de tecnología aplicada a la cuantificación de la carga vírica del CMV por métodos moleculares disponibles comercialmente: la técnica de captura del híbrido y la PCR competitiva cuantitativa. El método de captura de híbrido se basa en la formación de un híbrido mixto entre el ADN del CMV, previa lisis de la muestra, y una sonda de ARN complementaria. (Pérez, 2005)

Posteriormente, estos híbridos son captados por anticuerpos anti-híbrido ADN-ARN fijados sobre las paredes de un tubo soporte de la reacción, que se revela con la adición de un conjugado con fosfatasa alcalina que actúa sobre un sustrato quimioluminiscente.

En la versión más moderna, el método amplifica la señal original unas 3.000 veces, se muestran que la sensibilidad analítica (700 copias/ml), es comparable o algo inferior a la antigenemia y al método Amplicor® CMV Monitor. Puesto que la cuantificación se lleva a cabo por referencia a una curva de calibración con 12 estándares, el método no se aplica sobre lotes de muestras pequeños, por lo que resulta poco flexible. (Pérez, 2005).

El método Amplicor® CMV Monitor está basado en una amplificación competitiva por PCR y utiliza cebadores específicos del gen de la polimerasa de ADN vírico marcados con biotina. La extracción se lleva a cabo con isopropanol tras una lisis con tiocianato de guanidina en presencia de detergentes, seguida de una precipitación con etanol absoluto.

La amplificación se realiza a cabo en presencia de un estándar interno cuantificado y la detección se hace por hibridación con sondas específicas dirigidas al estándar interno, que actúa de referencia de la eficacia de la amplificación y al ADN diana del CMV en la muestra problema. Tanto la amplificación como la detección se lleva a cabo automáticamente en el aparato Cobas® Amplicor y los resultados se expresan en copias de CMV/ml plasma o por  $5 \times 10^6$  leucocitos.

La sensibilidad analítica es de 400 copias/ml de plasma o  $5 \times 10^6$  leucocitos, algo inferior a la versión cualitativa Amplicor® CMV, y el intervalo de linealidad, entre este límite inferior y 105 copias por el volumen de plasma o número de células antes señalado, probablemente suficiente para el seguimiento de los pacientes (*Pérez, 2005*).

Respecto a los valores de carga vírica por unidad de volumen, son superiores en el caso de sangre completa (carga leucocitaria) que el obtenido sobre plasma, pero los estudios muestran muy buena correlación entre ambos valores, por lo que se prefiere el plasma por su más fácil manipulación.

### ***11.3 Tabla comparativa de diagnósticos del CVM:***

A continuación se presenta una tabla comparativa entre los tipos de diagnósticos mencionados anteriormente con el propósito de conocer cuál es el más eficaz (Tabla N°3)

Tabla N° 3: Comparación de Técnicas.

TECNICA	VENTAJAS	INCONVENIENTES	APLICACION
Diagnóstico serológico.			
Fijación de complemento.	Detección de aumento de los títulos de anticuerpos.	Laboriosa.	No se recomienda hoy como técnica de partida.
	Antígenos comerciales.	Insuficiente sensibilidad.	NE.
Enzimoimmunoanálisis (ELISA).	Metodología/ Disponible en el mercado	Controlar la eficiencia de los reactivos comerciales.	Determinación de estado inmunológico. Soporte de algunos diagnósticos clínicos.
Inmunofluorescencia indirecta (IFI).	Detecta IgG e IgM.	Escasa especificidad en la detección de IgG.	Detección de IgM, en ciertas condiciones (suero absorbido).
Método de cultivo.			
Cultivo en tubo.	Especificidad.	Insuficiente sensibilidad.	Diagnóstico de la infección congénita.
		Tardanza en resultados.	Confirmación en casos atípicos.
Cultivo en shell vial.	Rapidez.	Disponer de cultivos.	Seguimiento de trasplantados.
	Especificidad / Celulares.	NE.	Diagnóstico rápido diferencial en diferentes tipos de muestras.
Diagnóstico Molecular.			
	Mayor Efectividad Rapidez./ Detecta desde 4 células infectadas en 100.000 células analizadas.	NE.	NE.

*La tabla muestra las principales ventajas y desventajas de la aplicación de las técnicas usadas para el diagnóstico de Citomegalovirus.*

Tabla N° 4: Técnicas Histopatológicas y Cultivos para Citomegalovirus.

Técnica	Sensibilidad analítica	Ventajas	Inconvenientes	Aplicación
Métodos cualitativos.				
PCR	Simple: 10 <sup>3</sup> copias Anidada: 10-10 <sup>2</sup> copias	Elevada sensibilidad	Ausencia de estandarización. Bajo valor predictivo de ECMV (no aplicable a seguimiento de pacientes de riesgo)	Diagnóstico de la afectación del SNC Diagnóstico prenatal de la infección congénita
Nuclisens pp67	700 copias ARN	Asociación con ECMV	No cuantitativo. Instrumental específico. Poca experiencia clínica Precio	Seguimiento de pacientes de riesgo
Amplicor® CMV	1000 copias/ml plasma	Escasas	Sensibilidad insuficiente como procedimiento cualitativo	Superada por procedimiento cuantitativo (Amplicor® CMV Monitor)

*La tabla muestra la sensibilidad analítica de las técnicas utilizadas para el diagnóstico del virus de CMV*

**Tabla N° 4: Técnicas Histopatológicas y Cultivos para Citomegalovirus.**

**Métodos cuantitativos**

<b>Técnica</b>	<b>Sensibilidad analítica</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Inconvenientes</b>	<b>Aplicación</b>
Digene Hybrid Capture (captura del híbrido)	700 copias/ml sangre	Sencillez del proceso	Muchos controles/muestra Poca experiencia clínica Precio	Seguimiento de pacientes de riesgo
Quantiplex® CMV ADN ramificado	900 copias/10 <sup>6</sup> PMN	Alta reproducibilidad	Requiere partir de 2x10 <sup>6</sup> PMN Instrumental específico Trabajo en lotes grandes	No se ha llegado a comercializar
Amplicor® Monitor	400 copias/ml plasma 400 copias/5x10 <sup>6</sup> PMN.	Elevada sensibilidad	Instrumental específico Impacto de controles	Seguimiento de pacientes de riesgo

*La tabla muestra las principales ventajas y desventajas de la aplicación de las técnicas usadas para el diagnóstico de virus de CMV*

## **12. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):**

### **12.1 Concepto:**

Es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde (*Staz & Kornblih, 2012*). Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad, virus o bacterias causantes de una enfermedad, hacer investigación científica sobre el ADN amplificado (*Staz & Kornblih, 2012*).

La PCR es una técnica rápida, muy sensible y según la metodología aplicada, cualitativa o cuantitativa. En la PCR convencional, la detección del ADN viral indica infección por CMV, pero no distingue entre latencia y replicación viral, a diferencia de una PCR cuantitativa, en la cual una carga viral elevada reflejaría replicación viral.

### **12.2 Fundamento:**

- La reacción en cadena de la polimerasa, PCR se fundamenta en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN flanqueado por dos secuencias de oligonucleótidos que hibridan en la cadena complementaria de la molécula de ADN que se va a amplificar (cebadores o “primer”) y son utilizados por una ADN polimerasa termoresistente (Taq polimerasa) para copiar la secuencia de la misma. La reacción es un proceso que consta de 3 etapas: desnaturalización, hibridación y extensión (*KB., 1990*) (*NS., 1992*). Desnaturalización: para que pueda iniciarse la reacción es preciso que las moléculas de ADN se separen en cadenas simples, esto se consigue calentando a temperaturas de 90 a 95°C; lo que produce la rotura de los enlaces del puente de hidrógeno y separación de las cadenas, esta temperatura se debe mantener unos minutos. Si el ADN se desnaturaliza parcialmente dificultando la hibridación (*Biomédicas, 2008*).
- Hibridación: Una vez desnaturalizado el ADN se disminuye la temperatura entre 40-60°C para que se produzca la unión de los primers a las secuencias que se quiere amplificar, por lo tanto, la temperatura dependerá de la longitud de los primers y sus

secuencias. (Temperaturas inferiores a la óptima produce uniones inespecíficas; al contrario temperaturas elevadas dificulta la eficacia de la misma) (*Biomédicas, 2008*).

- Extensión: En esta etapa actúa la polimerasa termo resistente e incorpora los nucleótidos para que se produzca la replicación de la cadena molde. La temperatura debe ser 72°C, a este nivel la Taq polimerasa alcanza su máxima actividad. Una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb y 40 seg para fragmentos de 1.2 Kb. Al finalizar cada ciclo el número de copias se duplica, es así que después de 20 ciclos existe un millón de copias del ADN inicial (*Biomédicas, 2008*).

### **13. PCR TIEMPO REAL:**

#### **13.1 Concepto:**

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa permite cuantificar además de detectar y amplificar secuencias de ADN. La PCR en tiempo real (o PCR cuantitativa) fue creada para resolver el problema de la cuantificación de la técnica de la PCR. En la PCR en tiempo real se emplean sondas marcadas con fluorocromos. (*Medicina Molecular*)

En la PCR cuantitativa, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento durante la amplificación, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. (*Medicina Molecular*)

#### **13.2 TÉCNICAS DE PCR TIEMPO REAL PARA EL CMV.**

Todas las técnicas se basan en la amplificación por PCRq seguida de la detección en el mismo tubo en el que se lleva a cabo la amplificación. Dicha detección puede hacerse con fluorocromos que se intercalan en el ADN amplificado por ejemplo, SYBR Green o con sondas específicas fluorogénicas en sus diversos formatos: sondas Taqman, molecular beacons, sondas FRET, etc.

La cuantificación se realiza con un soporte informático, determinando el primer ciclo en el que se detecta fluorescencia en la muestra y extrapolando con una curva de calibración externa o, si se utilizan fluorocromos diferentes, con un patrón interno.

Los métodos de amplificación en tiempo real poseen ventajas técnicas, a pesar de las diferencias metodológicas, las evaluaciones existentes muestran una sensibilidad analítica de hasta 100 copias y un intervalo lineal de cuantificación situado entre valores de 6-7 en la escala logarítmica decimal, con lo que, en principio, cubrirían las cualidades de los métodos cualitativos y cuantitativos actuales. (*Varela-Ledo, Romero Susana*) Con todo, las principales ventajas para el laboratorio serían la sencillez, flexibilidad, rapidez diagnóstica y el realizar la amplificación y detección en el mismo tubo cerrado, evitando así la posibilidad de contaminación cruzada con amplicones.

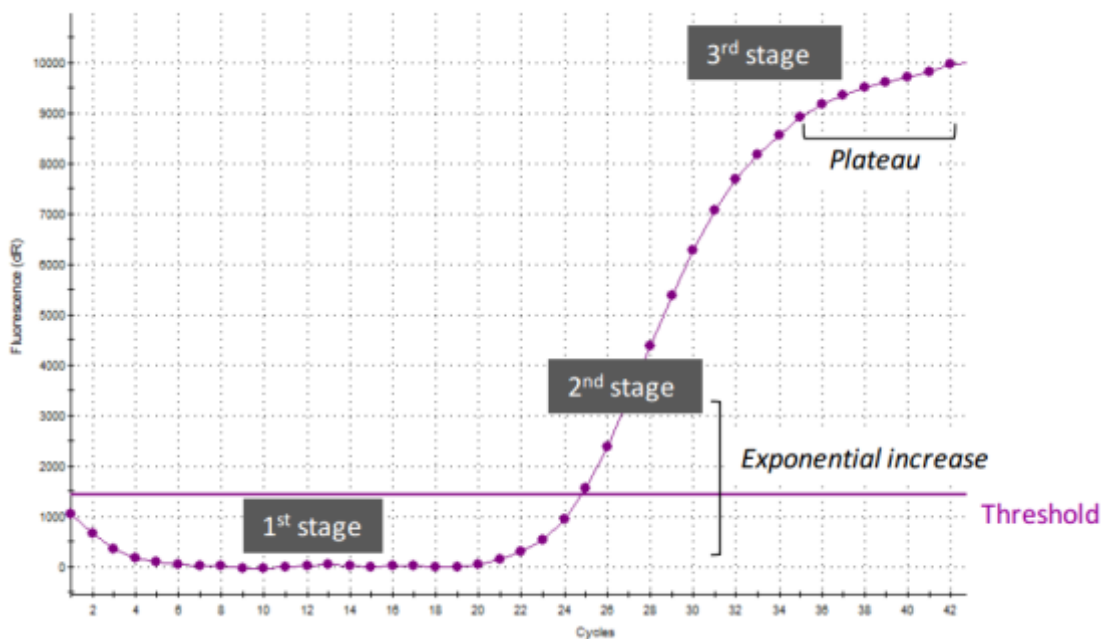
### **13.3 FUNDAMENTO:**

Esta reacción es un proceso de amplificación por PCR y detección simultánea del ADN; cuya principal característica es cuantificar la cantidad de ADN o ARN presente en la muestra. Existen dos tipos de PCR tiempo real: técnica basada en fluorocromos no específicos y técnica basada en sondas específicas (*Noris Rodríguez, 2000*). En las técnicas basadas en fluorocromos no específicos, el ADN se une al fluorocromo por lo general SYBR Green, produciendo fluorescencia que se mide en un termociclador para PCR Tiempo Real. Permite cuantificar sólo una secuencia por reacción, es más económica que las sondas específicas. (*Noris Rodríguez, 2000*).

Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan sondas unidas a dos fluorocromos que hibridan la zona intermedia entre el iniciador directo y el inverso. Cuando la sonda está intacta presenta transferencia energética de fluorescencia, pero cuando está dañada no se produce fluorescencia (*Noris Rodríguez, 2000*). Esto permite monitorear el cambio de patrón y deducir el nivel de amplificación. Durante la amplificación, la rapidez con que la señal fluorescente alcanza el nivel umbral (*threshold level*), se correlaciona con la cantidad inicial de ADN, permitiendo de esta manera la cuantificación del mismo. El número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente alcance el nivel umbral, se conoce como *Threshold cycle (Ct)* y es el parámetro en el cual se fundamenta la cuantificación. (*Noris Rodríguez, 2000*)

**Curva de amplificación:** Los resultados obtenidos en la técnica de PCR a tiempo real se presentan en un gráfico de amplificación (curva de amplificación), en este se expresa la fluorescencia en el eje de ordenada y el número de ciclos en el eje de las abscisas. (MICROBIAL, 2000). La curva de amplificación (figura N°2) consta de una fase inicial donde la producción de fluorescencia (ADN producto) está por debajo de la detección; una segunda fase en la que ocurre un incremento de la fluorescencia el cual es exponencial en su inicio y la tercera fase (plateau) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia. (MICROBIAL, 2000) (Noris Rodríguez, 2000). Por lo tanto, en este gráfico es posible establecer un valor de fluorescencia umbral que señala el aumento exponencial, este valor se representa con una recta horizontal (línea *Threshold* o *Umbral*).

Figura N°2: Gráfico de Amplificación de PCR tiempo real con sus tres fases.

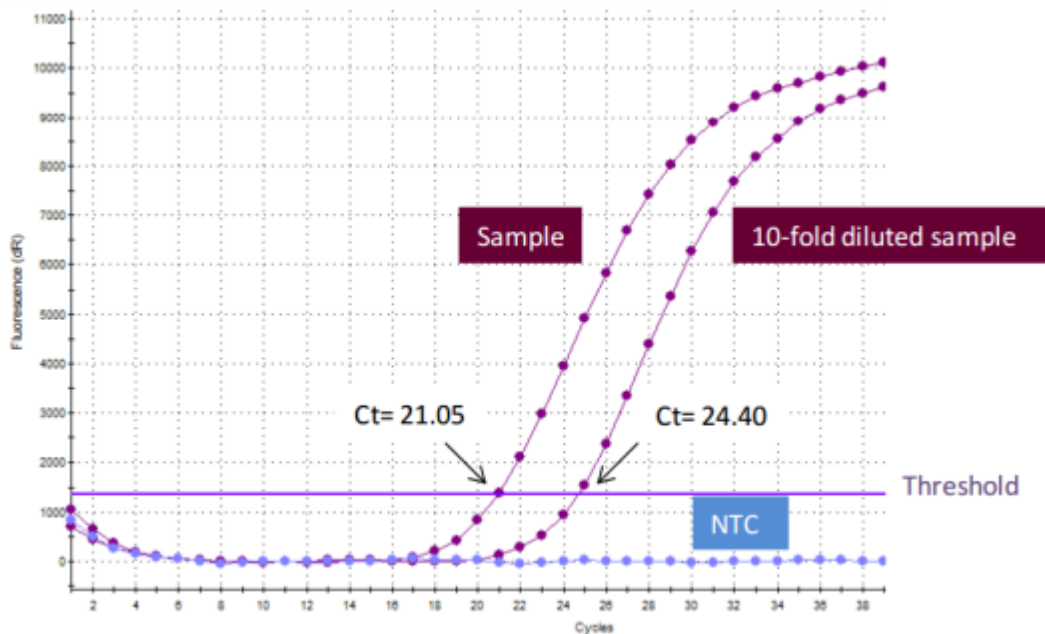


Fuente: Guía de interpretación de resultados: MICROBIAL 2000.

La curva de amplificación consta de una fase inicial donde la producción de fluorescencia (ADN producto) está por debajo de la detección; una segunda fase en la que ocurre un incremento de la fluorescencia el cual es exponencial en su inicio y la tercera fase (plateau) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia.

En la curva de amplificación el punto de intersección con el umbral se denomina Ct (Threshold Cycle), este indica el ciclo en que la fluorescencia alcanza el valor umbral; así cuanto más ADN inicial tenga la muestra alcanzara este valor, entonces será menor el número de ciclos necesarios (Ct menor). Los valores de Ct son determinados por el ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva. (Bustin, 2005) Es importante considerar que un valor de Ct superior a 40 ciclos indica que no hay amplificación, se puede observar en la Figura 3 Cada vez que se diluye una muestra 10 veces el valor del Ct aumenta aproximadamente 3,3 ciclos. (MICROBIAL, 2000).

FIGURA N° 3 Amplificación del ADN\_ Threshold Cycle



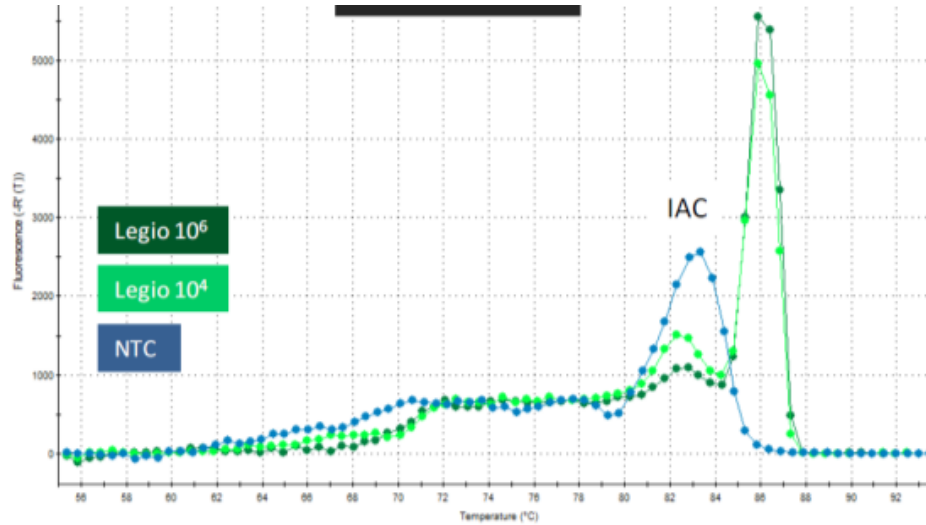
Fuente: Guía de interpretación de resultados-MICROBIAL 2000

En este gráfico de amplificación puede observarse que la muestra diluida supera el umbral más tarde. Véase que el control negativo (NTC) no supera el valor umbral, puesto que no contiene ADN inicial para que se produzca reacción de amplificación.

**Control Interno:** Generalmente los kit utilizados en PCR tiempo real poseen un control interno de amplificación que es incluido en el mix de reacción a una concentración ajustada de modo que la sensibilidad y especificidad del test no se afectan durante la amplificación. De hecho en las muestras positivas puede desaparecer la señal de amplificación del control interno; no así en las negativas que siempre debe estar presente. Si no se obtiene señal del control interno ni del patógeno se consideran la presencia de problemas a nivel de la reacción; como inhibición, y/o degradación de productos de la PCR (*MICROBIAL, 2000*). La mayoría de problemas de inhibición ocurren en el momento de la extracción de ADN debido a la presencia de partículas o sustancias en las muestras complejas. Esto generalmente se soluciona con dos procesos: El primero a través de kit de purificación y el otro método es realizando una dilución 1/10 o 1/100 del extracto de ADN de la muestra con agua destilada y libre de ácidos nucleicos, no debe realizarse diluciones mayores pues podría disminuir la concentración de ADN. (*Noris Rodríguez, 2000*).

**Curva de disociación, melting o denaturación:** Por esta razón, es importante observar la curva de disociación ya que permite establecer si la señal obtenida en el gráfico de amplificación corresponde al patógeno estudiado o al control interno o a los dos. (*MICROBIAL, 2000*) Así, en las muestras negativas sólo aparece el pico correspondiente al control interno, mientras que en las positivas se observa ambos pico. Se considera que existe una inhibición de la reacción cuando la señal no supere el umbral en el gráfico de amplificación o si muestra retraso respecto al control. Si no se observa los picos del control interno ni del patógeno se considera el resultado como inespecífico y requiere ser repetido, aunque la muestra supere el umbral en la curva. En el caso de aparecer picos que no correspondan ni al patógeno ni al control interno el resultado no es tomado en cuenta. (*MICROBIAL, 2000*) (*Noris Rodríguez, 2000*), esto se puede observar en la Figura N°4.

FIGURA N° 4: Curva de disociación.

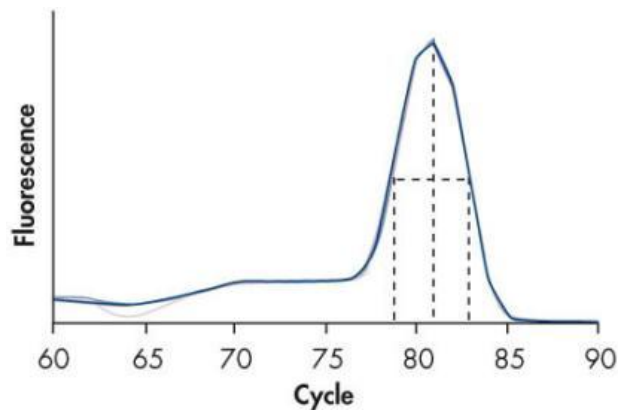


Fuente: Guía de interpretación de resultados-MICROBIAL 2000.

Curva de disociación de las muestras con 10<sup>6</sup> y 10<sup>4</sup> copias del gen diana del patógeno. Se muestran dos picos: uno, a mayor temperatura, correspondiente al patógeno, y otro, a menor temperatura, correspondiente al IAC. En cambio, el control de la muestra un solo pico correspondiente al IAC.

Las curvas de Denaturación o Melting también muestra el perfil de denaturación de los productos amplificados. Si un producto presenta un perfil de denaturación diferente (valores de Tm diferentes), significa que es otro producto (no específico) de amplificación, pueden ser dímeros. Figura 5, indica una curva de disociación de dímeros.

FIGURA N°5 Curva Melting



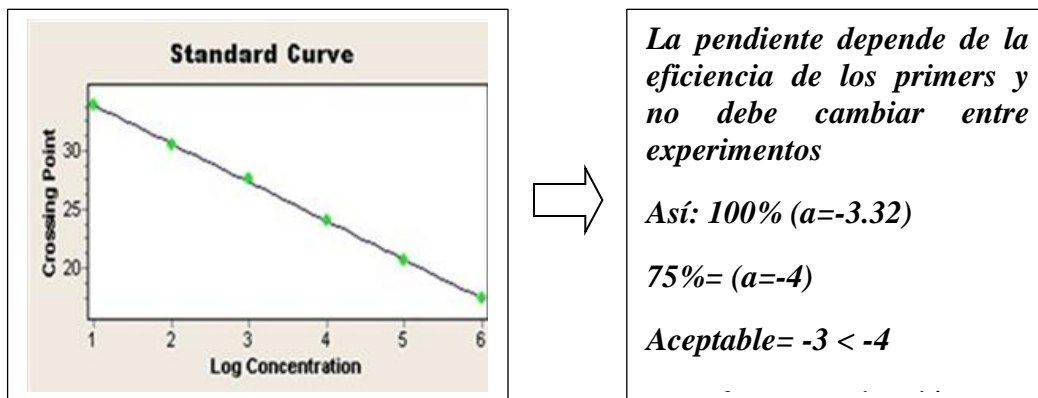
Fuente: Guía de lectura de resultados: QIAGEN.

En este ejemplo se observa la presencia de dímeros y no existen productos amplificados.

**Curva Estándar:** La eficiencia de la PCR se calcula a partir de la pendiente (slope) de la curva estándar. Al finalizar la PCR se representa el valor del Ct obtenido respecto a la concentración del ADN en escala logarítmica. Los factores que afectan a la eficiencia de la PCR son: diseño de los primers puede dar lugar a la hibridación de secuencias inespecíficas; contenido de GC, concentración de reactivos y presencia de inhibidores en los reactivos de extracción. También puede verse afectada por: Tm de cualquier estructura secundaria que debe ser inferior a 60°C. Figura N°6, muestra la pendiente de la curva.

Para realizar la curva de calibración se usan diluciones seriadas de un estándar con concentración conocida, al graficar la curva se produce una relación lineal entre Ct y la concentración de ADN permitiendo de esta manera la determinación de la concentración de muestras desconocidas con base a los valores de Ct. (Noris Rodríguez, 2000).

Figura N° 6: Ejemplos de Curva Estándar. Efectividad de la Reacción PCR.

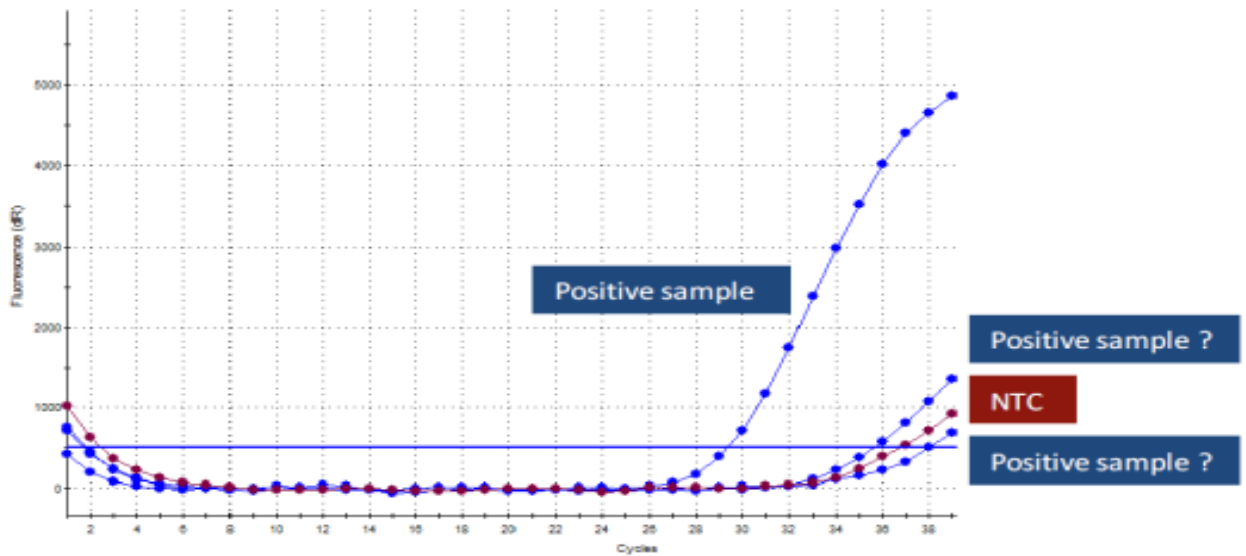


### 13.4 Problemas en la amplificación de PCR Tiempo Real.

Debido a la gran sensibilidad de la PCR se pueden producir señales débiles a partir del ciclo 35, esto se produce por contaminaciones pequeñas con aerosoles de ADN al momento de colocar la muestra en el tubo de reacción. Al ser interpretada se decide si se la toma en cuenta o no; sin embargo, en caso de duda se debe repetir el análisis mejorando la preparación de la muestra. (MICROBIAL, 2000).

**Contaminación de amplificación:** En la Figura N°7, se puede observar una muestra claramente positiva y dos muestras dudosas que, juntamente con el control dan señal entre los ciclos 35 y 38. No es posible saber si estas dos muestras dudosas son realmente positivas por el patógeno o si son producto de una débil contaminación por aerosoles. En el caso del control, es más que probable que la débil señal sí sea producto de contaminación por aerosoles, puesto que no contiene ADN del patógeno.

FIGURA N°7: Contaminación en el proceso de amplificación

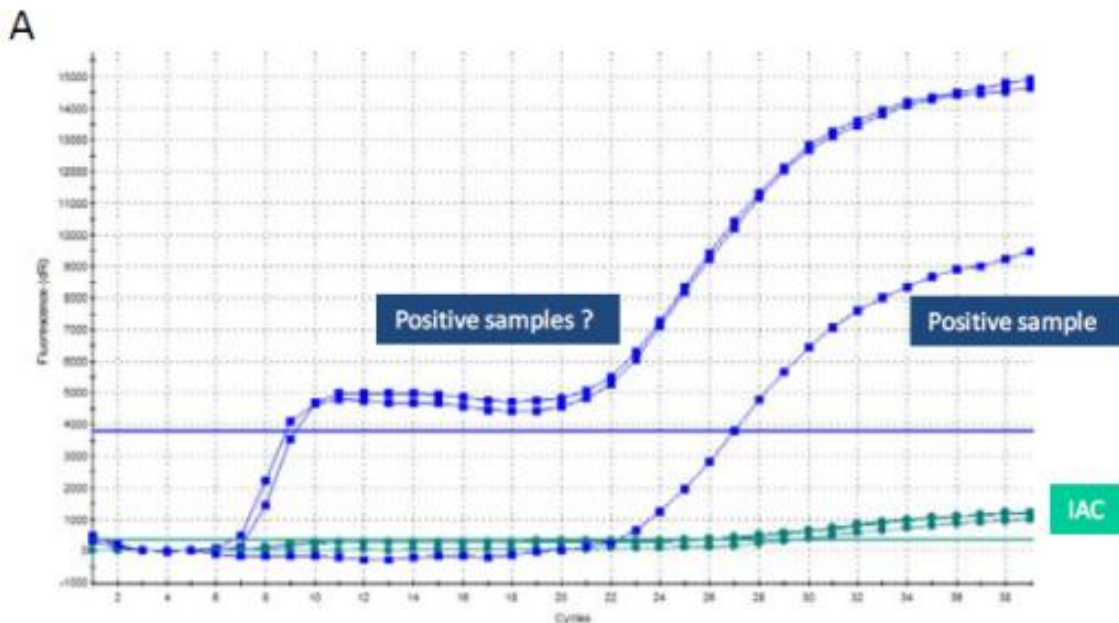


Fuente: Guía de interpretación de resultados-MICROBIAL 2000.

*Este ejemplo muestra la presencia de dos muestras que emiten conjuntamente con el control interno fluorescencia en el ciclo 35.*

**Curvas Atípicas:** Ocasionalmente se puede obtener las curvas de amplificación con una forma atípica, esto puede suceder si el ADN extraído y añadido al mix de reacción contiene sustancias que modifiquen la emisión de fluorescencia; configuración errónea del sistema de lectura del termociclador. Toda curva que no presente las tres fases debe ser descartada y analizada nuevamente. La Figura N°8 muestra dos ejemplos de curvas atípicas.

FIGURA N°8: Curvas Atípicas.



Fuente: Guía de interpretación de resultados-MICROBIAL 2000.

Curva se observan tres muestras amplificadas y el control interno de amplificación; la muestra positiva da una clara emisión; sin embargo las otras dos forman una curva no definida completamente atípica por lo que se recomienda repetir la amplificación.

## ***CAPITULO V***

### ***MARCO METODOLÓGICO***

#### ***SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO***

##### **14.1 Tipo de estudio**

Es un estudio no experimental transversal que fue realizado en dos fases de estudio; la primera que constituyó el proyecto piloto y la segunda la detección molecular.

**14.1.1 Proyecto Piloto:** Las muestras fueron recolectadas de dos Servicios de Sangre y tamizadas en ELISA, se analizaron las absorbancia de cada suero reactivo y se clasificaron en fuertemente reactivos, bajos e indeterminados de acuerdo al punto de corte. (Anexo N°2). Tanto los sueros con resultados reactivos para la presencia de anticuerpo Ig G contra CMV, como los resultados negativos fueron alicuotados y guardados a -20°C.

##### ***14.2 Operacionalización de las variables***

***Variable dependiente:*** ADN Citomegalovirus

***Variables independientes:*** Donantes con serología reactiva y 10% de los negativos

## Operacionalización de Variables

<i>Hipótesis</i>	<i>Variable</i>	<i>Definición</i>	<i>Indicador</i>
<i>Ho Los donantes con resultados reactivos en serología mantienen al virus latente no hay replicación viral.</i>	Presencia del ADN Citomegalovirus (CMV)	Detección de la fracción pp65 del virus CMV utilizando técnica molecular de PCR Tiempo Real	Porcentaje de sueros positivos en PCR-Tiempo real / Total de muestras positivas para anticuerpos IgG-CMV
			Porcentaje de sueros positivos en PCR-Tiempo real / Total de muestras indeterminadas para anticuerpos IgG-CMV
<i>H1 Los donantes con resultados reactivos en serología hay replicación viral no está en latencia.</i>	Sueros con resultados reactivos en ELISA, para anticuerpos Ig G contra CMV	Muestras que presentan absorbancia superiores al punto de corte establecido en las pruebas de ELISA.	Total de muestras consideradas positivas con absorbancias 11-120 U para Ac-IgG-CMV/ Total de donantes analizados.
			Total de muestras consideradas indeterminadas para CMV con absorbancias 9-10 U para Ac-IgG-CMV/ Total de donantes analizados.

### 14.3 Fase Dos del Proyecto-Materiales y Métodos:

The LightCycler-CMV para detección del DNA-Citomegalovirus en capilares.

- NanoDrop
- High Pure Viral Nucleic Acid Kit de extracción de ADN 96 reacciones
- Kit de purificación de ADN 96 reacciones
- Agarosa Ultra pure.
- Tris Base
- Kit de amplificación para CMV 96 reacciones
- Roche LightCycler™
- LightCycler capilares de vidrio para 96 reacciones.
- LightCycler adaptadores de centrifuga
- Microcentrifuga refrigerada.

Otros materiales requeridos

- Pipetas de 5-50ul; 100-1000ul.
- Timer.
- Puntas de 5-50ul; 100-1000ul
- Puntas con filtro de 5-50ul
- Puntas con filtro de 1000ul
- Cámara de electroforésis
- Probetas de 1000
- Agua tipo II. Destilador ELGA, System.
- Papel absorbente
- Cámara UV
- Cámara fotográfica para geles de agarosa.
- Guantes

#### ***14.4 Procedimiento de elección de muestras***

De los sueros recolectados se escogieron aleatoriamente un total de 600 muestras. Las que presentaban absorbancia superiores a 3.000, entre 1.500-2.000 , los cercanos al punto de corte y negativos del proyecto piloto. Antes de la extracción del ADN, los sueros fueron descongelados a temperatura ambiente y mezclados. No fueron utilizados los sueros con hemólisis y lipémicos de acuerdo a las recomendaciones de “*Approved Estándar-Procedures for the handling and process-ing of blood specimens, H18A3*” <http://www.clsi.org/source/orders/free/h18-a3.pdf>)

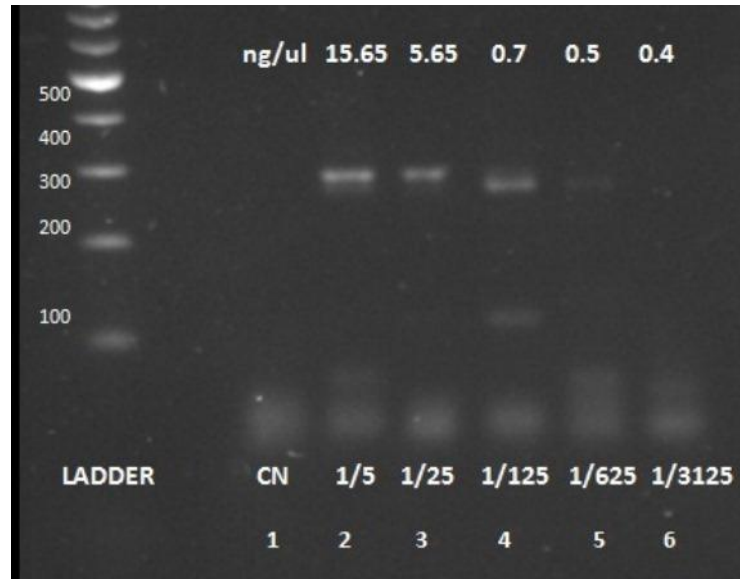
***14.4.1 Extracción del ADN CMV:*** El ADN fue extraído desde  $10^6$  células usando High Pure Viral NucleicAcid Kit. Por medio de incubación a  $72^{\circ}\text{C}$  se obtiene la lisis viral utilizando Binding Buffer en presencia de Proteinasa K; subsecuentemente los ácidos nucleicos se unen específicamente a la superficie de las fibras de vidrio en presencia de una sal caotrópica. La reacción de unión se produce en cuestión de segundos debido a la interrupción de las estructuras organizadas de moléculas de agua y la interacción de los ácidos nucleicos con la superficie de la fibra de vidrio. Por lo tanto, la adsorción en la lana de fibra de vidrio se ve favorecida. Este proceso es específico para los ácidos nucleicos ADN.

***14.4.2 Purificación del ADN extraído:*** Purificado utilizando el Kit de Qiagen High Pure Viral (Cat. N.11 858 874 001) utilizando columnas de filtración y eluido en 100 ul en buffer.

El ADN es purificado a través de un sistema de columnas con propiedades de unión selectiva de la membrana, esta posee un diseño único de gel de sílice. Buffer especiales son suministrados con cada kit y optimizados para la recuperación eficiente de ADN y eliminación de contaminantes. Absorción ADN a la membrana de sílice ocurre en presencia de una concentración elevada de sal mientras los contaminantes pasan a través de la columna. Las impurezas son arrastradas de manera eficiente y el ADN puro es diluido en Tris Buffer.

***14.1.3 Cuantificación del ADN:*** Se realizó la cuantificación de ADN en el NanoDrop® ND100 utilizando 2ul del ADN extraído, se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% y se corroboró su calidad, lo que muestra la figura N°9.

Figura N° 9. Gel de Agarosa-extracción de ADN



*Se observa la concentración de ADN en relación a las diluciones seriadas dobladas realizadas y se utilizo un lades de 500pb que corresponde la presenca de ADN.*

## 14.5 Amplificación de CMV-ADN

### 14.5.1 Kit de amplificación: ROCHE

*CMV LCSetvers 2.0 (Internal control y human positive control).*

Cada kit de amplificación contiene:

- 1) CMV P&P (Primer, Hybridization Probes and Internal Control) 96 Reactions
- 2) Human Positive Control P&P (Primer and Hybridization Probes) 96 Reactions
- 3) CMV External Positive Control (pocillos para diluciones) 2 Tiras.
- ❖ CMV P&P (Primer, Hybridization Probes and Internal Control): se utilizó sondas de hibridación lo que facilita el análisis en tiempo real de secuencias amplificadas a partir de secuencias blanco o target.

### **14.5.2 Principio:**

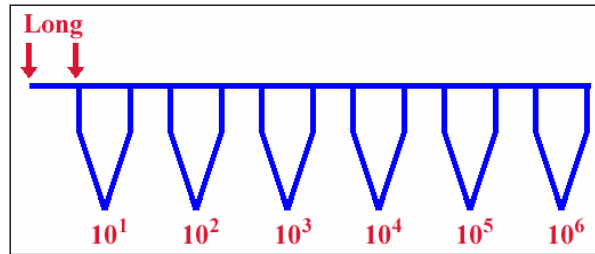
El método “LightCycler” de hibridación con sondas, utiliza dos sondas oligonucleotídicas que se hibridizan a secuencias adyacentes al DNA, en una disposición “cabeza a cola” 3’-5’. Este método se basa en los sistemas de detección con dos fluoróforos que marcan a cada sonda. Así por ejemplo el fluoróforo FAM el cual indica la presencia del patógeno a ser detectado, mientras que la sonda marcada con el fluoróforo JOE indica la correcta amplificación mediante el uso de un control interno de amplificación (IAC), gracias a este es posible detectar inhibiciones de la reacción, lo que evita falsos resultados negativos. (ROCHE, 2006-2007).

Los resultados de este tipo de análisis se pueden observar en un gráfico de amplificación en el que se observarán dos tipos de curvas: una para detectar el patógeno y otra para el control interno.

La interacción de los dos fluorocromos puede ocurrir solamente cuando ambos están unidos al ADN. Cuando las dos sondas están hibridizadas al ADN molde, los fluorocromos se encuentran cercanos entre sí y pueden transferir energía de resonancia fluorescente (TERF) entre ellos y ser medible. El fluorocromo del donador “F1” (por ej. fluoresceína) es excitado por una fuente de luz externa, pasando una parte de su energía de excitación al fluorocromo adyacente del aceptor “F2” (por ej. LightCycler-Rojo 640 o 705) (TERF). El fluorocromo excitado F2 emite una luz medible (a una longitud de onda distinta).

**14.5.3 Primers o Cebadores:** Primers CMV son del kit de la casa comercial Roche, en las sondas de hibridación: deben mantener una concentración final de 0.2 a 1µM. Es recomendado el uso de una concentración de 0,5µM. Las sondas de hibridación (5’ a 3’ dirección), CGTTTCGTCGTAGCTACGCRTACAT-fluorescein; aceptor fluorophore probe, LC-Red 640-ACACCACTTATCTYCTGGGCAGC-phosphate. Se realizó una PCR cuantitativa en el light cycler (amplificación de un fragmento de 365 pb del gen de la polimerasa UL54) pp65.

**14.5.4 CMV Control Externo:** consiste de 6 pocillos (tubos) que contienen de  $10^1$  a  $10^6$  copias/ul de control positivo liofilizado de CMV. A cada pocillo se añade 40ul de agua grado molecular PCR.



- 1) Empezar por el tubo número 1
- 2) Utilizar puntas con filtro de 5 a 50 ul y tomar el agua de PCR grade
- 3) Cuidadosamente romper con la punta la cobertura de aluminio que cubre cada pozo y disolverla el liofilizado.
- 4) Descartar la punta y tomar una nueva repetir el proceso con todos los pozos.
- 5) Colocar 5ul de cada dilución en 5 capilares de reacción para ser utilizado como calibradores de la prueba.

**14.5.5 Control de Calidad en la amplificación:** Para identificar la presencia de inhibidores de la amplificación, el kit contiene un control interno que ha sido incluido en el tubo de reacción. El amplicon del control interno es detectado a través de un específico par de sondas de hibridación que contienen fluoresceína.

Para identificar la eficiencia de la amplificación de cada muestra un fragmento del genoma humano es amplificado paralelamente con el fragmento de CMV, utilizando primers específicos dentro de mismo protocolo de amplificación. El amplicon es identificado con fluoresceína usando un par de sondas de hibridación.

**14.5.6 Procedimiento:**

- Extracción de ADN se realizó con 200 ul de plasma añadidos a 200ul de Binding buffer que posee 20 ul de Proteinasa K, se mezcla inmediatamente e incuba a 72°C por 10 min, inmediatamente se añade 100 ul de Binding buffer puro. Utilizando columnas y tubos de recolección se transvasa los 320 ul y se centrifuga 1min a 8.000 x g, se descarta el tubo de colección y se añade a la columna 500ul de inhibidor removedor de buffer se repite el paso de centrifugación, descarta el tubo de recolección y se añade a

la columna 450 ul de solución de lavado, se centrifuga, descarta el tubo de recolección y se añade 50 ul de buffer de elución.

- Purificación del ADN se utilizó 50 ul de ADN extraído y 500 ul de buffer y soluciones de lavado por 3 ocasiones mediante centrifugación se elimina los contaminantes y luego es diluido con tris base. (Anexo N°3)
- Para la amplificación se preparó: Master Mix tanto para las muestras como para el control de humano provisto en el kit. (Tabla N°5) siguiendo las indicaciones del fabricante y el protocolo de amplificación (Tabla N° 6).

Tabla N° 5. Preparación de Master Mix para CMV-DNA

Mix Amplificación			Volumen Final	
FastStart DNA Master	4.00 ul	Roche 03515575001		
Hybridization Probes				
CMV P&P (contiene el control interno)	1.00ul			
DNA CMV extraído	5.00ul			
H <sup>1</sup> 2 O grado PCR	10.00ul			
<i>Preparación de Master Mix para Human Positive Control</i>				
Mix Amplificación			Volumen Final	
FastStart DNA Master	4.00 ul	Roche 03515575001		
HybridizationProbes				
hu control positivo P&P	1.00ul			
DNA CMV extraído	5.00ul			
H <sup>2</sup> O grado PCR	10.00ul			<i>Fuente. Manual ROCHE</i>

Las muestras fueron colocadas en capilares y colocadas en LightCycler siguiendo el siguiente protocolo de amplificación.

Tabla N° 6: Protocolo para amplificación de CMV Real Time

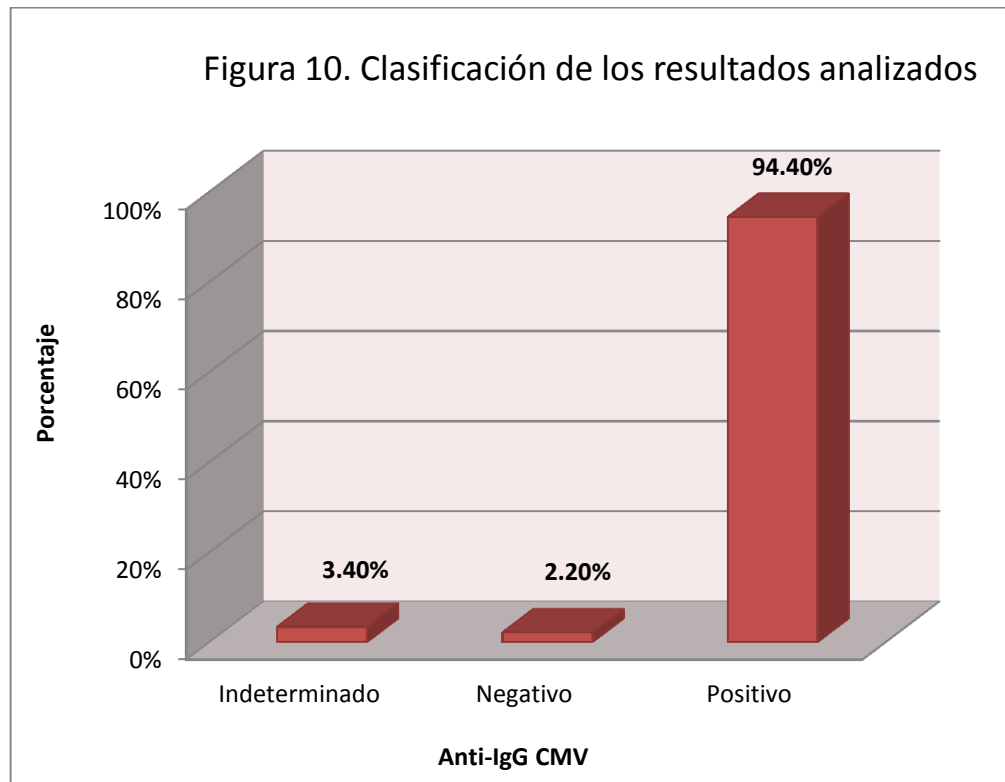
Ciclos	Número total de ciclos (1)					
TaqActivation	Paso 1					
Target Temp (°C)	95oC					
Tiempo de incubación	480 sec					
Temperatura. Rate Transición	20.0					
Ciclos	Número total de ciclos (45)					
Amplificación	Paso 1	Paso 2	Paso 3			
Temperatura (°C)	95	62	72			
Tiempo de incubación (sec)	5	10	13			
Temperatura. Rate Transición (°C/sec)	20.0	20.0	20.0			
Secundaria temperatura (°C)	0	58	0			
Stepsize (°C)	0	0.2	0			
Stepdelay (Cycles)	0	1	0			
<i>Fuente: Manual ROCHE</i>						
Ciclos	Número total de ciclos (1)					
Melting Curve	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6
Temperatura (°C)	72	95	85	40	85	40
Tiempo de incubación (sec)	30	20	1	30	1	5
Temperatura. Transición rate (oC/sec)	20	20	20	0.2	0.5	20
Secundaria temperatura (°C)	0	0	0	0	0	0
Stepsize (°C)	0	0	0	0	0	0
Stepdelay (Cycles)	0	0	0	0	0	0

*El análisis de la PCR fue realizada en el mode “F2/back F1” “640/back 530” para analizar la amplificación de CMV y en el mode “F3/back F1, 705 /back 530” para analizar la amplificación del control interno y del control genoma humano control positivo. (Figura N°1- 2- 3)*

## ***CAPITULO VI***

### ***RESULTADOS.***

**15. Estudio Piloto:** Se analizó un total de 2953 muestras de donantes de sangre provenientes de dos Bancos de Sangre de la ciudad de Quito. 47 muestras fueron eliminadas del estudio por carecer de información requerida y mal estado de conservación (presencia de turbidez). De las 2953 muestras de donantes recolectados 853 (29%) fueron mujeres y 2100 (71%) hombres, la edad promedio fue de 33 años con un máximo de 68 años y un mínimo de 16. Se encontraron un total de 2788 (94,4%) positivos para anticuerpos IgG CMV, un 3,4% de casos considerados indeterminados y 2,2% de negativos (Figura N°10)



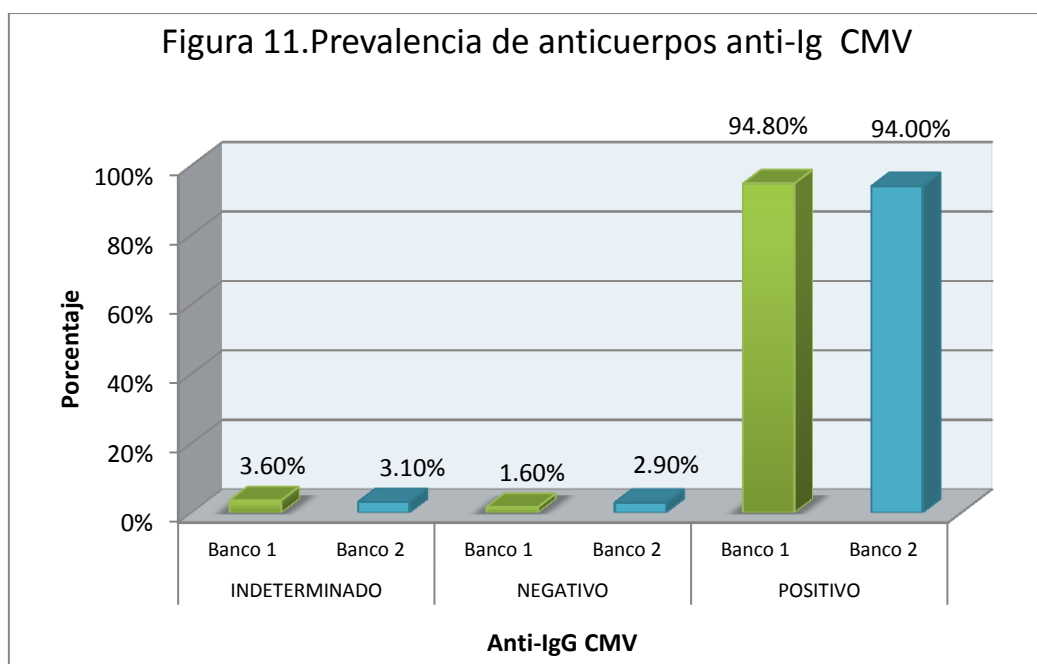
*Fuente: Base de datos\_CMV\_CIEI\_Estudio Piloto\_SPSS 16.0-2008.*

De los análisis realizados se determinó que a nivel de los dos Bancos de Sangre existe una prevalencia de 94% de donantes con anticuerpos anti-IgG CMV. (Tabla N°7, Figura N° 11). La relación entre el género de los donantes de sangre y la reactividad no fue significativa debido a la diferencia entre el número de donantes hombres y mujeres captado durante el año del estudio.

Tabla N°7. Prevalencia de anticuerpos anti-Ig CMV

		Banco de Sangre		Total
		1	2	
Resultado	Indeterminado	53 3.6%	46 3.1%	99 3.4%
	Negativo	24 1.6%	42 2.9%	66 2.2%
	Positivo	1409 94.8%	1379 94.0%	2788 94.4%
Total		1486 100.0%	1467 100.0%	2953 100.0%

Fuente: Base de datos\_CMV\_CIEI\_Estudio Piloto\_SPSS 16.0-2008.



Fuente: Base de datos\_CMV\_CIEI\_Estudio Piloto\_SPSS 16.0-2008.

Los resultados demuestran que existe entre un 92% a 98% de positividad en todas las edades, confirmándose que el aumento de la infección esta en relación con la edad 49-59 (98,7%),  $p < 0.001$  (Tabla N°8 y 9 – Figura N° 12).

Tabla N° 8. Resultados obtenidos IgG-CMV de acuerdo a la edad

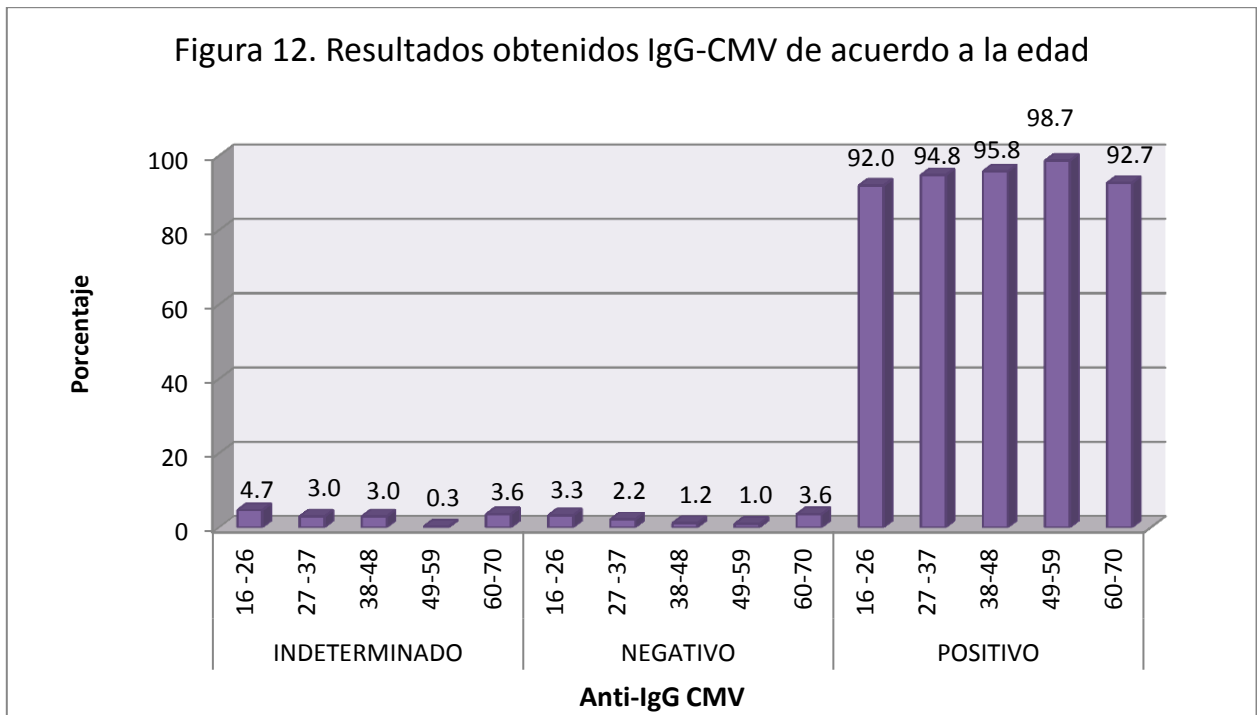
		RECODIFICADA EDAD					Total
		16-26	27-37	38-48	49-59	60-70	
Resultado	Indeterminado	49 4.7%	25 3.0%	22 3.0%	1 .3%	2 3.6%	99 3.4%
	Negativo	34 3.3%	18 2.2%	9 1.2%	3 1.0%	2 3.6%	66 2.2%
	Positivo	957 92.0%	780 94.8%	707 95.8%	293 98.7%	51 92.7%	2788 94.4%
Total		1040 100.0%	823 100.0%	738 100.0%	297 100.0%	55 100.0%	2953 100.0%

Fuente: Base de datos\_CMV\_CIEI\_Estudio Piloto\_SPSS 16.0-2008.

Tabla N° 9. Chi-Square Tests de ELISA

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	26.590	8	.001
Likelihood Ratio	31.709	8	.000
N of Valid Cases	2953		

Fuente: Base de datos\_CMV\_CIEI\_Estudio Piloto\_SPSS 16.0-2008



Fuente: Base de datos\_CMV\_CIEI\_Estudio Piloto\_SPSS 16.0-2008.

También se clasificó a los resultados obtenidos por la técnica ELISA, de acuerdo al valor de la absorbancia en relación al punto de corte en negativos, indeterminados y positivos. Tabla N°10. Lo que condujo al cuestionamiento de “*si la cantidad de anticuerpos detectados tiene relación con la presencia del virus o su actividad viral*”, ya que el 94,4% de los donantes presentaban valores sobre las 50 U.

Tabla N° 10. Frecuencia de resultados obtenidos de acuerdo a absorbancia

			Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje valido	Porcentaje acumulado
Valid	1-8	Negativo	66	2.2	2.2	2.2
	9-10	Indeterminado	99	3.4	3.4	5.6
	11-120	Positivo	2788	94.4	94.4	100.0
Total			2953	100.0	100.0	

Fuente: Base de datos\_CMV\_CIEI\_Estudio Piloto\_SPSS 16.0-2000.

**Estadísticas**

N	Valid	2953
	Missing	0
Mean		2.92
Median		3.00
Mode		3
Std. Deviation		.342
Skewness		-4.622
Std. Error of Skewness		.045
Kurtosis		21.158
Std. Error of Kurtosis		.090

*Los análisis estadísticos demuestran una distribución asimétrica de los datos y una curva leptocúrtica con valores que se ubican hacia la derecha.*

*Con un error muestral de 0.045-0.09.*

*Fuente: Base de datos-CMV-CIEI-análisis SPSS V 16-0 2008*

**16. Diagnóstico Molecular:** Se analizaron un total de 368 muestras de acuerdo al resultado obtenido del cálculo del N utilizando la fórmula:

$$n = \frac{N * Z_{1-\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{1-\alpha}^2 * p * q}$$

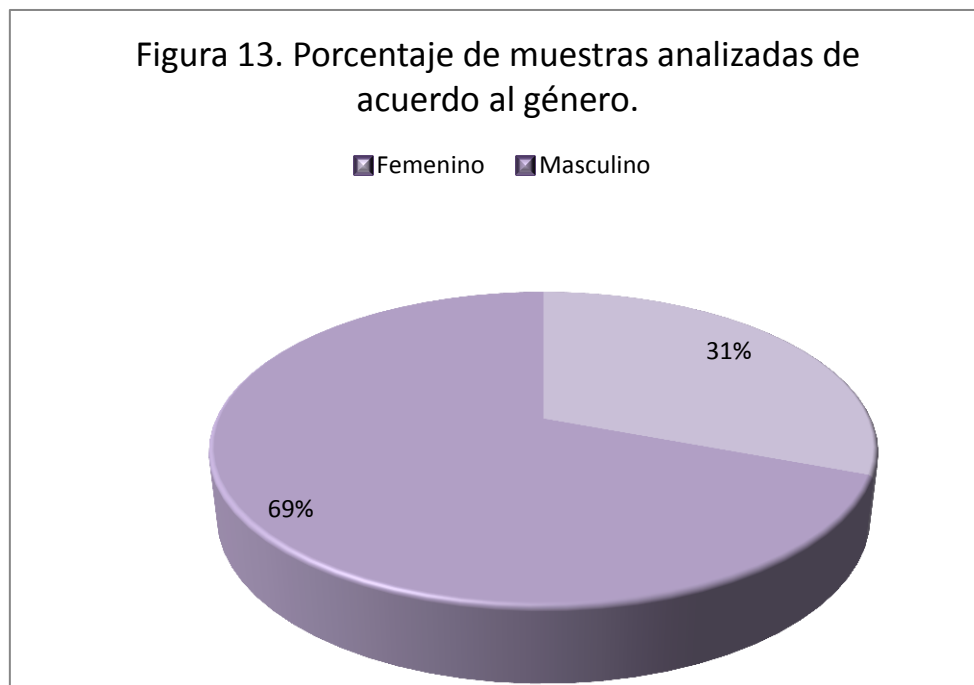
Total de la población (n)	2952
Nivel de confianza o seguridad (1-α)	99%
Precisión (d)	3%
Proporción (valor aproximado del parámetro que queremos medir)	5%
Tamaño muestral (n)	313
El tamaño muestral ajustado a pérdidas	
Proporción esperada de pérdidas (r)	15%
Muestra ajustada a las pérdidas	368

Se analizaron 361 muestras 7 fueron descartadas por tener escasa cantidad de plasma menor a 100 ul ya que se necesitan 250 ul de acuerdo a la técnica para obtener ADN. De las cuales el 69,3% corresponden a donantes masculinos. (Tabla N°11, Figura N° 13)

Tabla N° 11. Porcentaje de muestras analizadas de acuerdo al género.

		<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Porcentaje acumulado</i>
Válidos	Masculino	250	69,3	69,3
	Femenino	111	30,7	100,0
	Total	361	100,0	

*Fuente: Base de datos\_CMV\_CIEI\_Estudio Piloto\_SPSS 16.0*



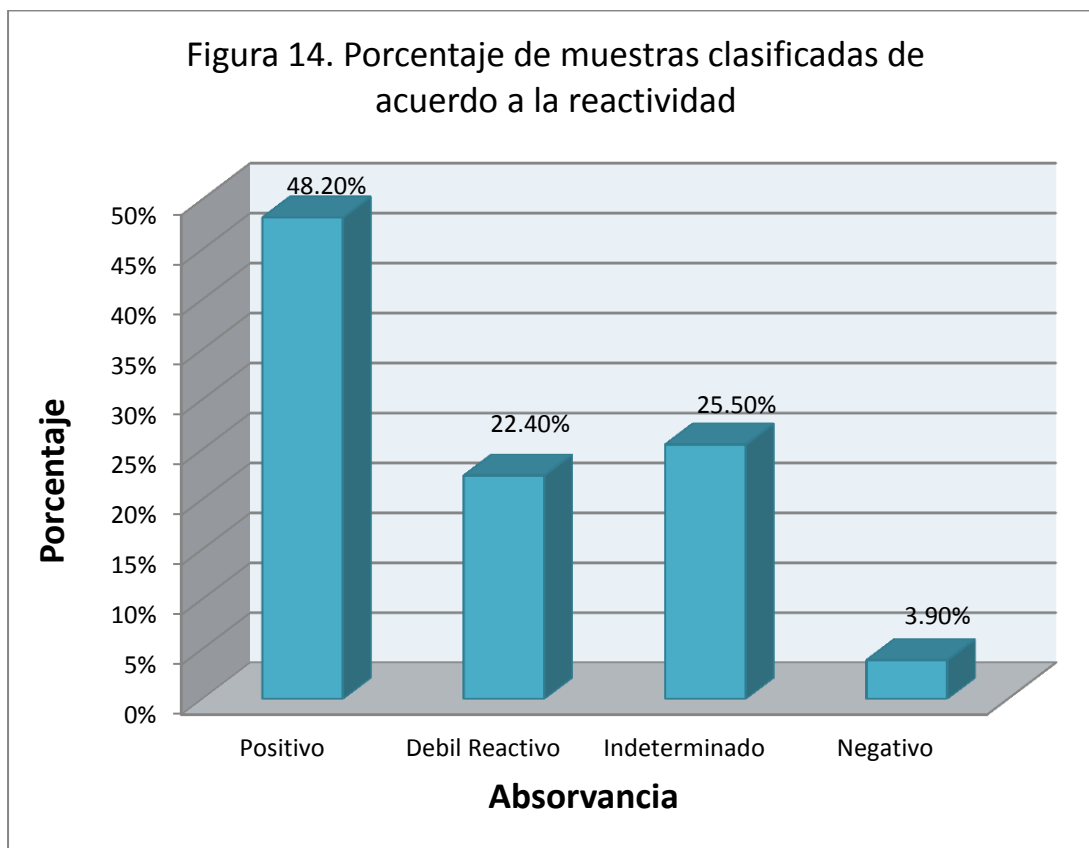
*Fuente: Base de datos\_CMV\_CIEI\_Estudio Piloto\_SPSS 16.0-2008.*

Para los análisis moleculares se realizó una nueva clasificación de los sueros de acuerdo a su absorbancia, así se los dividió en reactivos, débil reactivos e indeterminados. (Tabla N°12, Figura N°14).

Tabla N° 12. Porcentaje de muestras clasificadas de acuerdo a la reactividad.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
Válidos	Positivo	174	48,2	48,2
	Débil Reactivo	81	22,4	70,6
	Indeterminado	92	25,5	96,1
	Negativo	14	3,9	100,0
	Total	361	100,0	

Fuente: Base de datos\_CMV\_CIEI\_Estudio Piloto\_SPSS 16.0



Fuente: Base de datos\_CMV\_CIEI\_Estudio Piloto\_SPSS 16.0-2008.

Por lo que se realizó el análisis molecular de 48,2% de sueros positivos; 22,4% sueros de débil reactivo; 25,5% indeterminados y 3,9% negativos.

Del análisis molecular de PCR cuantitativo se detectó un total de 8 (2,21%) muestras de las 361 analizadas; 6 (3,44%) de las que fueron positivas en ELISA; 2 (2,17%) de las indeterminadas. Las negativas mantuvieron su resultado en la prueba molecular. (Tabla N°13).

Tabla N° 13. Resultados obtenidos en la PCR-Tiempo Real vs ELISA test.

		PCR		Total
		Positivo	Negativo	
ELISA	Positivo	6	168	174
	Débil Reactivo	0	81	81
	Indeterminado	2	90	92
	Negativo	0	14	14
Total		8	353	361

*Fuente: Base de datos\_CMV\_CIEI\_Estudio Piloto\_SPSS 16.0-2010.*

### 16.1 Prueba De Chi Cuadrado:

Se verifico la relación entre las dos pruebas por el método de chi cuadrado dando los siguientes valores: Tabla N°14.

Tabla N° 14. Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,631 <sup>a</sup>	2	,442
Razón de verosimilitudes	2,944	2	,229
Asociación lineal por lineal	1,417	1	,234
N de casos válidos	361		

*Fuente: Base de datos\_CMV\_CIEI\_Estudio Piloto\_SPSS 16.0-2008.*

Con los valores obtenidos y sabiendo que si  $p > 0,05$  se acepta la hipótesis nula caso contrario se rechaza, para esta investigación  $p = 0,442$ , por lo tanto se cumple la condición y se dice:  $p > 0,05$  se acepta la hipótesis nula dice: *Los donantes con resultados reactivos en serología mantienen al virus latente y no hay replicación viral*. En otras palabras los resultados indican que la cantidad de anticuerpos no tiene relación con la presencia o ausencia del virus.

*Cálculo del error  $\beta$* : indicará el poder del estudio y la aceptación definitiva de la hipótesis nula, mediante la fórmula.  **$Z = 4,8 / 0,05$**

**Error Beta** =  $1 - \beta = 1 - 0,05 = 0,95$

Lo que determina que el estudio tiene un poder del 95% y un error  $\beta$  de 5% lo que quiere decir que existe una probabilidad de cometer un error del 5% cuando decimos que una muestra positiva para anticuerpos de tipo IgG-CMV mantiene el virus en estado latente. Y con un 95% de poder de encontrar en la población un estado de latencia que puede reactivarse en determinados estados inmunológicos.

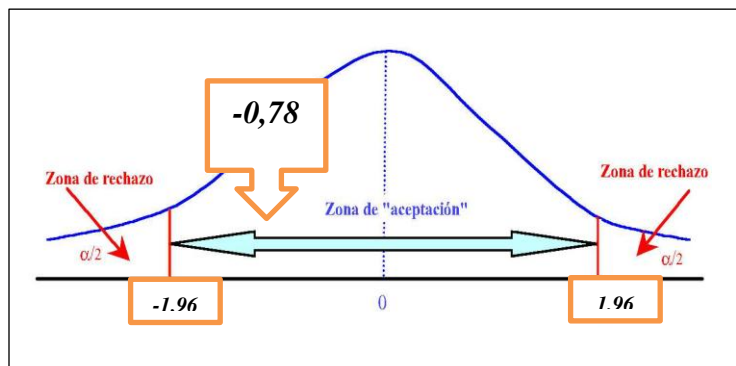
**Confirmación de la aceptación de la hipótesis nula**

$$z = \frac{\hat{p} - p}{\sqrt{\frac{pq}{n}}}$$

- $\hat{p}$  Proporción muestra: 28%
- $p$  Proporción poblacional (considerado en la hipótesis nula) :60%
- $q$   $1 - p$  Inverso de "p". 1-0,28
- $n$  Número de elementos muestreados. 300
- $z$  Valor de Z tipificado

$Z = -0,32 / 0,41 = -0,78$ .

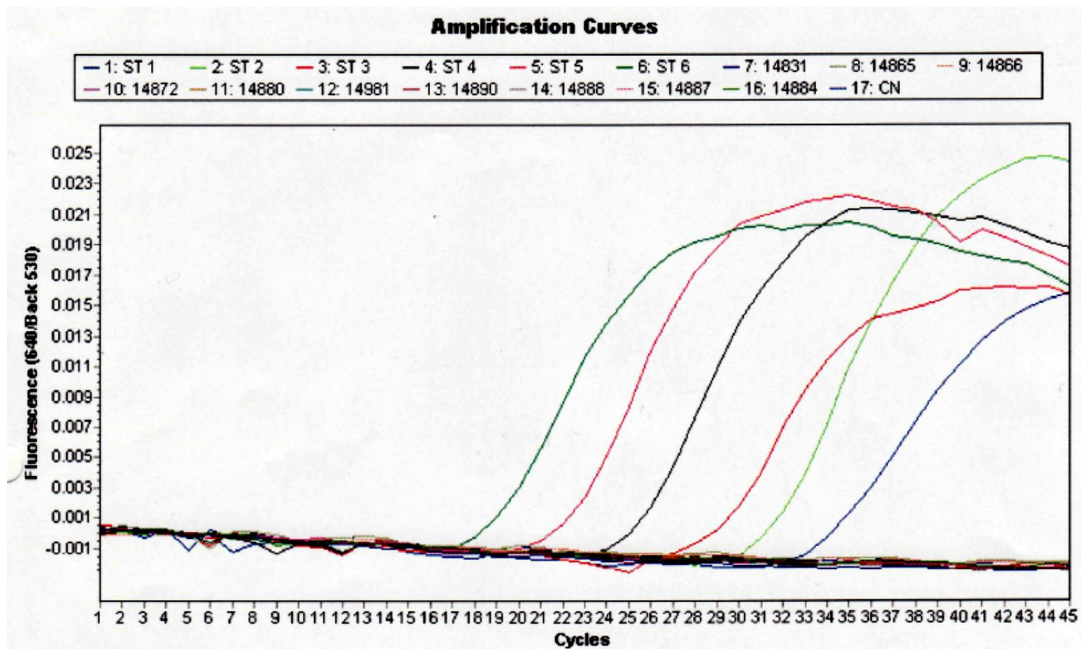
**Se acepta la hipótesis nula**



## 17. CONTROL DE CALIDAD: PCR TIEMPO REAL

Se utilizaron controles internos tanto de extracción como de amplificación y se analizó las curvas de amplificación, curva estándar y melting de los estándares de acuerdo a las figuras N° 15,16 y 17 obtenidas en el programa computarizado del LightCycler.

Figura N°15. Curvas de Amplificación.



*La gráfica muestra el ciclo de inicio de amplificación que es entre 17-19 del estándar 1 y 2 que tienen una concentración de  $10^1$  y  $10^2$  copias/ml del ADN viral.*

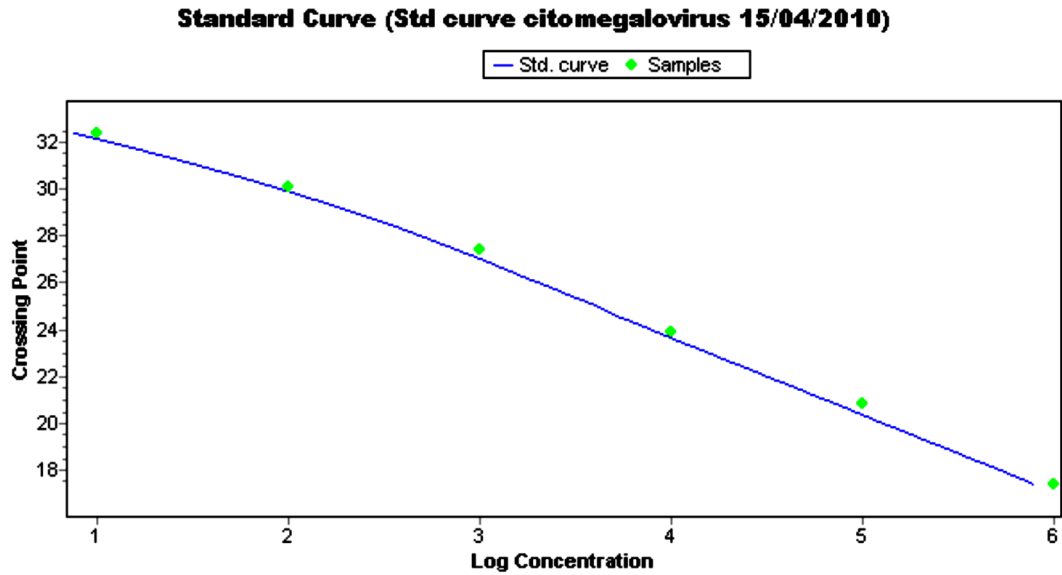
Tabla N°15. Lista de Pruebas.

Identificación	Tipo	CP	Concentración	Stándar	Resultado
ST1	Estándar	32,36	10 <sup>1</sup> copias/ml	1,00E1	Positivo
ST2	Estándar	30,06	10 <sup>2</sup>	1,00E2	Positivo
ST3	Estándar	27,38	10 <sup>4</sup>	1,00E3	Positivo
ST4	Estándar	23,94	10 <sup>5</sup>	1,00E4	Positivo
ST5	Estándar	20,88	10 <sup>6</sup>	1,00E5	Positivo
ST6	Estándar	17,41	10 <sup>7</sup>	1,00E6	Positivo
14865	Paciente				Negativo
14866	Paciente				Negativo
14872	Paciente				Negativo
14880	Paciente				Negativo
14981	Paciente				Negativo
14890	Paciente				Negativo
14888	Paciente				Negativo
14887	Paciente				Negativo
14884	Paciente				Negativo
CN	Paciente				Negativo

*Ct= empieza alrededor del ciclo 17 hasta el 32°C*

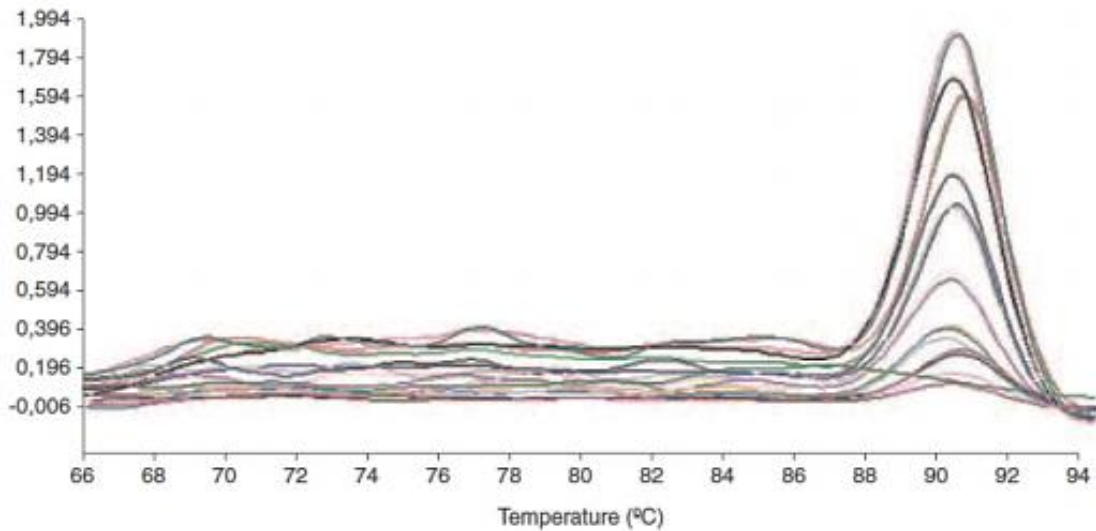
FIGURA N° 16. Curva Estándar

Error: 0.0110  
Efficiency: 2.010



*Indica la eficiencia de los estándares que es elevada en 2.010 por la pendiente de la curva.*

FIGURA N° 17. Curvas de disociación.



*Curva Melting muestra la disociación de la corrida entre 88 a 93°C, esto permite establecer que no existen otras amplificaciones inespecíficas*

## **18. CONCLUSIONES:**

- Se estableció una prevalencia del 94% de anticuerpos IgG-CMV en la población de donantes voluntarios de sangre.
- Se determinó que la prevalencia aumenta con la edad al igual que en estudios realizados en países en vías de desarrollo.
- Se comprobó que el CMV infecta a la mayoría de la población a lo largo de su vida manteniendo su estado latente en individuos inmunocompetentes ya que los donantes de sangre son aceptados bajo parámetros de buen estado de salud.
- Se encontró que el 2,21% de los donantes asintomáticos tienen actividad viral y pueden ser altamente infecciosos.
- Se concluye que todas las muestras que fueron positivas tuvieron contacto previo con el virus y que a pesar de estar inactivo constituye un riesgo en transfusiones sanguíneas especialmente a nivel de pacientes inmunodeprimidos.

## **19. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda que los derivados sanguíneos sean obtenidos en fundas de recolección que ayuden a la leucorreducción, ya que el virus tiende a localizarse a nivel de los leucocitos, de esta manera los concentrados de glóbulos rojos estarán libres de leucocitos y proporcionarán más beneficios a los pacientes que necesitan mejorar su calidad de vida.
- Cuando se trate de pacientes inmunodeprimidos, recién nacidos, niños y/o pacientes que van a recibir trasplante de órganos sólidos se debe realizar pruebas inmunoserológicas diagnósticas para CMV tanto a los donadores como receptores (trasplantes).

## 20. DISCUSIÓN DE CMV

El estudio piloto llevado a cabo al inicio de la investigación tuvo como propósito establecer la prevalencia del Citomegalovirus en donantes de sangre de la ciudad de Quito, pues esta enfermedad no está considerada dentro de la lista de enfermedades de reporte obligatorio por lo que para conocer su seroprevalencia se requirió realizar el estudio seroepidemiológico, (*Organización Panamericana de la Salud, 2011*) de esta manera se encontró que a nivel de los donantes de sangre existía un 94% de reactividad y que aumentaba con la edad ( $p < 0,05$ ), encontrándose a la vez un rango mayor de seroprevalencia que el estimado para los países en desarrollo que están entre 30 al 90% en países desarrollados (*Rajiv, 2009*).

El estudio de Staras y col, 2006 estableció una seroprevalencia estimada del 70% a nivel de Estados Unidos, los cuales indicativo de contacto previo con el virus; en relación a los países latinoamericanos reportaron una prevalencia de CMV del 65% al 90% de CMV-IgG y en personas que superaban los 16 años de edad (*Colugnati FAB, 2007*). Una investigación realizada en México determinó una prevalencia de CMV-IgM del 21,39% de donantes asintomáticos y de estos el 26,08% (12 casos) fueron positivos en la técnica molecular de PCR indicando una replicación viral activa (*Gutiérrez-Salinas-José, 2009-2010*). La presencia del virus en donantes que aparentemente son sanos constituye un riesgo para las personas inmunocomprometidas que podrían recibir esos derivados sanguíneos constituyéndose de esa manera en una fuente de contagio (*Gutiérrez-Salinas-José, 2009-2010*)

Una de las vías de transmisión de Citomegalovirus constituye la transfusión de sangre (*Rajiv, 2009*), desde 1975 ya se conocía de la existencia de CMV pos-transfusional los síntomas se presentaban comúnmente en pacientes inmunodeprimidos, sin embargo siempre existía la duda si el paciente tenía el virus y este era reactivado sin tener relación con los productos sanguíneos transfundidos (*Kane Robert, 1975*). Otro autor, Henle et, estimó que el 5 al 12% de la sangre donada fue de portadores sanos del virus y que ocasionaron respuestas serológicas en los receptores (*Henle, 1970*), lo que fue confirmado por Prince y col, quien mencionó la relación de riesgo que existía entre el volumen de sangre transfundida y la seroconversión de los resultados.

Una de las estrategias para evitar el contagio de CMV por vía sanguínea constituye el obtener productos sanguíneos de donantes negativos para CMV o a través de productos filtrados

(Boeckh M. , 2011); sin embargo son alternativas que requieren estudios previos y deben ser analizados por cada región de acuerdo a la prevalencia y disponibilidad de donantes de sangre; en Ecuador la medida tomada en los Bancos de Sangre constituye la realización de pruebas inmunocromatográficas o ELISA a las sangres que van a ser transfundidas a recién nacidos o pacientes trasplantados y el uso de productos leucorreducidos (Barona, 2012).

Por otro lado, algunos estudios realizados demuestran que el virus se mantiene en estado latente debido a su capacidad de inmunomodulación del sistema inmune lo que le ha permitido escapar a través de la reducción de la expresión de las moléculas de HLA que le facilita el escape de los linfocitos CD8 que no permanecen vigilantes y de esta manera perdurar en las células infectadas que se convierten en inmortales por la inhibición de la apoptosis, además interrumpe el desarrollo de las células T que actúan en la destrucción de células infectadas (Frederic Cofán, 2012), esto de alguna manera permite explicar la transmisión a través de derivados sanguíneos provenientes de donantes asintomáticos.

Landini y Vorhagen, mencionan que en el diagnóstico serológico de CMV existe la posibilidad de reactividad cruzada con virus de la misma familia y esto ocurre especialmente cuando utilizan como antígenos los cultivos de CMV en fibroblastos (Landini Mp, 1985) (Vornhagen R, 1994), la prueba utilizada en el presente estudio tenía como antígeno (cadena de la cepa AD-169 producida en fibroblastos humanos) que de acuerdo con el fabricante el uso de este antígeno reduce la presencia de reacciones cruzadas (Crespo, 2000). El progreso en biología molecular a permitido obtener la secuencia viral y delimitar las porciones de la cadena del virus para elaborar antígenos recombinantes y utilizarlos en el diagnóstico inmunológico, así también el descubrimiento de las diferentes cepas de CMV abierto un mejor conocimiento del virus (Revello María Grazia, 2002). La utilización de la determinación de IgM para infección reciente constituye una buena elección sin embargo es importante elegir el tipo de ELISA adecuado, así el indirecto tiene la particularidad de obtener resultados falsos positivos por la interferencia de los anticuerpos de tipo IgG presentes en el suero, por lo que se recomienda utilizar el ELISA de captura (Revello María Grazia, 2002).

Sin embargo, para confirmar la seroconversión se requiere la determinación de IgG que de alguna manera es indicativo de contacto con el virus, Revello and Grazia sugieren que para constatar una infección viral se debe realizar pruebas de avididad de IgG de esta manera existiría

una diferenciación así lo realizaron en el diagnóstico de CMV en el embarazo constatando su teoría (*Revello María Grazia, 2002*).

Los resultados obtenidos del estudio piloto o inicial mostró la presencia de absorbancias en la metodología de ELISA mayores a 3.000, entre 2.000 y 10.000 y cercanas al punto de corte, con estos análisis se estableció la hipótesis de si la cantidad de anticuerpos era un indicio de replicación viral; sin embargo los resultados demostraron que en la mayoría de donantes no existía replicación ya que los resultados de PCR fueron negativos, el estudio de Martín Correa encontró la presencia de resultados similares a los de este estudio con diferentes niveles de anticuerpos IgG como el autor los catalogó (altos, medianos y bajos) sin conocer el verdadero significado, menciona que podría tratarse de inicios de reactivaciones, infección inicial, actividad viral lo que le convierte en un portador de alto riesgo de transmisión de la enfermedad (*Correa Martín R., 1990*); sin embargo los autores Chou y Norman concluyen que solo un 60% de los donantes con resultados positivos podrían transmitir la infección por CMV, es decir existen falsos positivos (*Chou S, 1988*); la elección del método serológico se basó en el hecho de que se trataba de alertar al sistema de sangre y se necesitaba un método que detecte donantes asintomáticos y permita determinar si el receptor también es negativo como lo menciona Correa en su publicación, además establece que el uso de IgM no es diagnóstica por los problemas inmunológicos que presentan los pacientes inmunosuprimidos (*Gutiérrez-Salinas José, 2009-2010*), por lo tanto la pruebas serológicas nos indican la exposición al virus, pero no su confirmación de reproducción viral, bajo estas circunstancias se recurre a una técnica más sensible y específica como la determinación del ADN-CMV.

De los estudios realizados acerca del tipo de muestra a ser utilizada para la determinación del ADN-CMV en el diagnóstico de infección activa, los autores establecieron que el plasma era la mejor opción, sin embargo puede utilizarse suero (*Boeckh B. G., 1998*); de las pruebas realizadas en este estudio se utilizó como muestra “suero”; por lo tanto podríamos identificar si el virus estaba iniciando una infección. Al igual que las otras metodologías diagnósticas, el PCR esta sometido a variaciones en cada proceso como: extracción de ADN, amplificación y lectura de resultados, es por esta razón que se eligió el kit comerciales estandarizados LightCycler-CMV ROCHE como lo especifica el artículo publicado por Habbal (*Wafa Habbal, 2008*), quien manifiesta que es un sistema cerrado que evita la contaminación de las

muestras y su manipulación; adicionalmente detectan  $10^1$  copias por ml de muestra y posee controles de extracción y amplificación (*Lars Schaade, 2000*). El estudio realizado por Lars, correlaciona los resultados obtenidos tanto en la metodología de COBAS AMPLICOR y LIGHTCYRCLE, mediante la dilución de muestras positivas (la concentración de ADN) encontrando una correlación con la concentración esperada de  $10^4$  a  $10^8$  copias que es indicativo de infección viral, el análisis de resultados muestra que las copias por mililitro obtenidas en el LightCycler son las verdaderas positivas ( $r = 1$ ,  $P < 0,0001$ , IC 95%; 0,99 a 1,00), mientras que la prueba de COBAS AMPLICOR subestimado la presencia de altas concentraciones ( $r = 0,88$ ,  $p < 0,02$ , IC 95%; 0,24 a 0,99). (*Lars Schaade, 2000*); es decir que la tecnología más sensible constituye las del equipo LightCycler, con estos antecedentes se puede concluir que el virus se encuentra latente en los donantes de sangre y que puede reactivarse o re-infectar en cualquier momento.

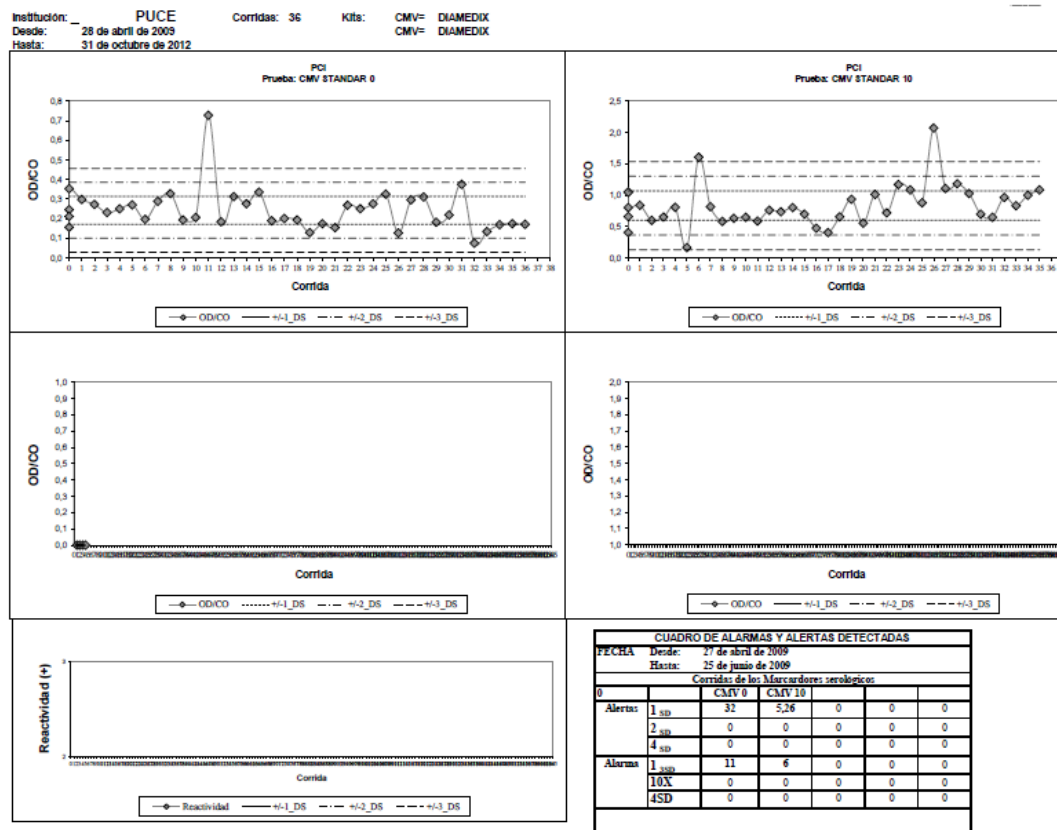
Al igual que Berroa en 1991, sugirió a los bancos de sangre que debían determinar la presencia de citomegalovirus en la sangre que va a ser utilizada en pacientes inmunosuprimidos, recién nacidos prematuros, en trasplantados y embarazadas (*Berroa del Río, Teijelo Famadas, Ballester Santovenia, & Rodríguez Pérez, 1991*); los resultados de este estudio también lo sugieren y sobre todo tratar de utilizar productos leucorreducidos. Las mismas recomendaciones las realizó Gutiérrez y col, 2010 incluyendo que los Bancos de Sangre deben incluir un estricto control de calidad para evitar que esta infección reaparezca o se desarrolle en los pacientes inmunosuprimidos (*Gutiérrez Salinas José, 2010*).

## 21. ANEXO

### 21.1 ANEXO N°1: Curvas de estándares de validación del kit de ELISA.



PROGRAMA DE CONTROLES INTERNOS (PCI)  
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS (LIEI)  
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR (PUCE)



Muestra un proceso analítico normal

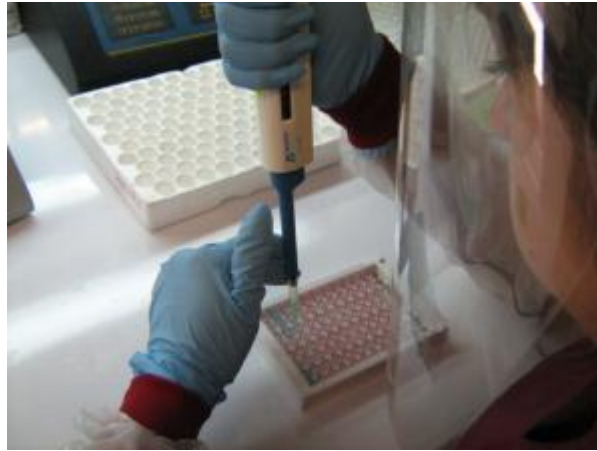
**21.2 ANEXO N° 2: METODOLOGÍA DEL PROYECTO PILOTO: TÉCNICA DE ELISA.**



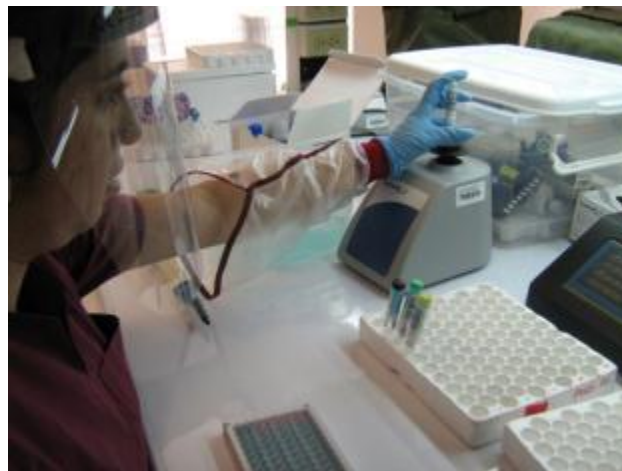
*GRAFICA 1: Kit de ELISA para CMV*



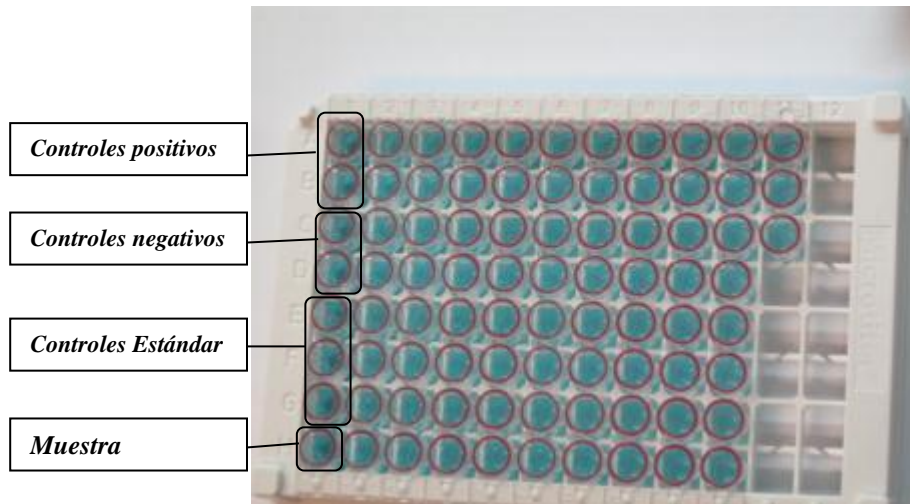
*GRAFICA 2: Suero en Diluyente de muestra*



*GRAFICA 3: Preparación de placa con cada una de las muestras*



*GRAFICA 4: Pipeteo de Control Positivo, Negativo y Estándares de Calidad del Kit.*



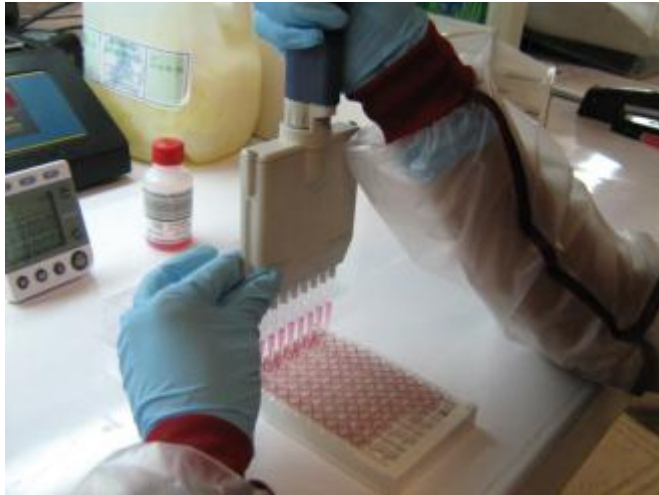
*GRAFICA 5: Placa preparada y lista para incubación*



*GRAFICA 6: Incubación a 37° por 60 minutos*



*GRAFICA 7: Lavado de Placa 6 veces con solución de lavado CMV*



*GRAFICA 8: Colocar 100 ul de conjugado*



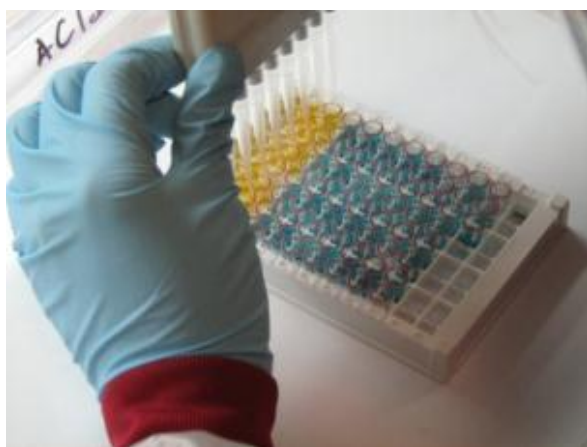
*GRAFICA 9: Incubación a 37°C por 60 minutos*



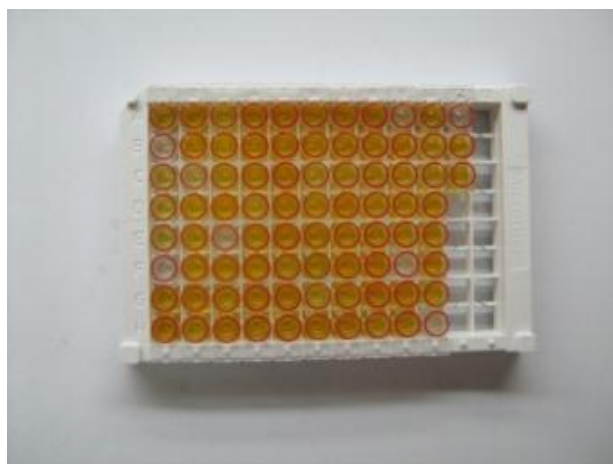
*GRAFICA 10: Lavado de placa 6 veces con solución de lavado CMV para eliminación de residuos.*



*GRAFICA 11: Colocación del sustrato*



*GRAFICA 12: Colocación de la solución stop*



*GRAFICA 13: Placa lista para ser leída en el espectrofotómetro a 450nm con un filtro de referencia de 600 a 630nm*

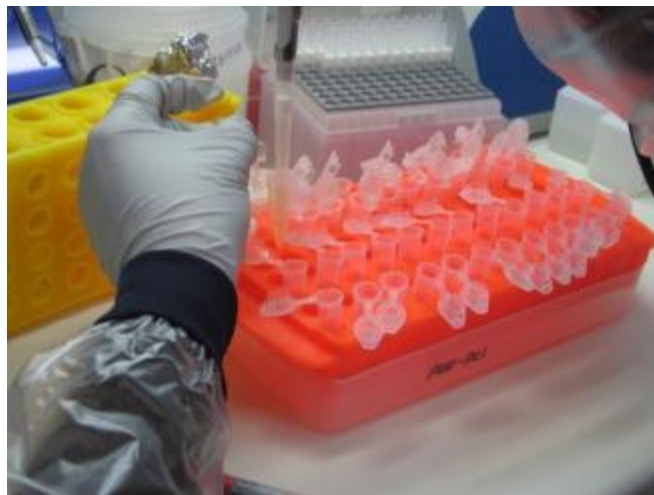


*GRAFICA 14: Espectrofotómetro utilizado para la lectura del ELISA de CMV.*

### 21.3 ANEXO 3: METODOLOGÍA DE AMPLIFICACIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL.



*GRAFICA 15: Kit de extracción de ADN de CMV*



*GRAFICA 16: Extracción de ADN con 200 ul de plasma añadidos a 200 ul de Binding Buffer (incluye 20 ul de Proteinasa K)*



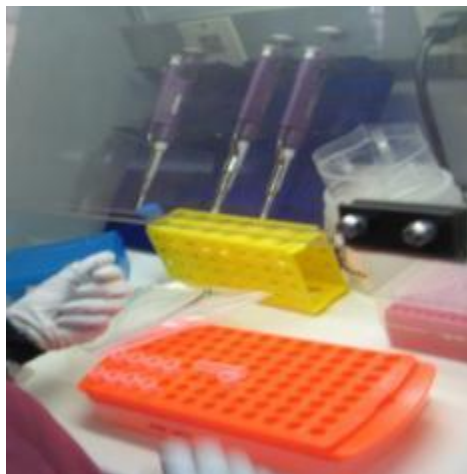
*GRAFICA 17: Incubación a 72°C por 10 minutos*



*GRAFICA 18: Se añade 100ul de Binding Buffer puro, utilizando columnas y tubos de recolección se transvasa los 320ul.*



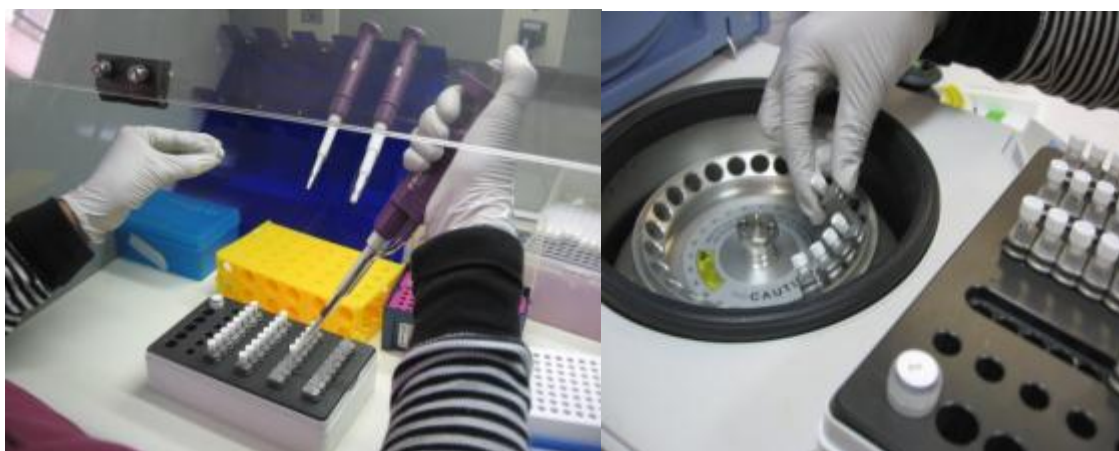
*GRAFICA 19: Centrifugación durante 1 minuto a 8000 rpm*



*GRAFICA 20: Se repite el proceso de descarte de tubos de recolección se añade solución de lavado y se centrifuga*



*GRAFICA 21: Preparación del Master Mix tanto para las muestras como para controles*



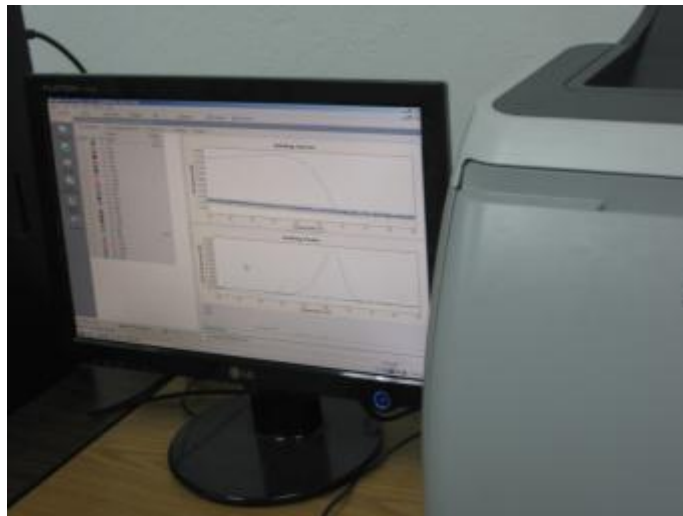
*GRAFICA 22: Muestras colocadas en capilares y centrifugadas*



*GRAFICA 23: Colocación de capilares en el rotor de LightCycler*



*GRAFICA 24: Equipo LightCycler para PCR en Tiempo Real*



*GRAFICA 25: Lectura de resultados de la amplificación de muestras.*

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Aguayo, F., & Corvalán, A. (1999). *Diagnóstico Molecular de Citomegalovirus* . Medicina Clínica Conde, 28-31.
- Alcina, A. V. (2010). *Citomegalovirus* . Asocioación Española de Pediatría, 684-696.
- Barona, E. (12 de 09 de 2012). *Evaluación de los Bancos de Sangre*. (C. Crespo, Entrevistador)
- Berroa del Río, M., Teijelo Famadas, M., Ballester Santovenia, A., & Rodríguez Pérez, M. (1991). *Determinación de anticuerpos contra citomegalovirus en donantes de sangre*. Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia, 7(2):75-9.
- Biomédicas, I. d. (2008). *Fundamentos y Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa PCR*.
- Boeck, M. G. (2011). *Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle*. The Journal of Clinical Investigation, Vol 121, No5: 1673-1680.
- Boeckh, B. G. (1998). *Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications*. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, p. 533–554.
- Boeckh, M. (2011). *Complications, Diagnosis, Management, and Prevention of CMV Infections: Current and Future*. American Society of Hemathology, 305-309.
- Cardona, C., Navarro, D., & Pérez, J. (Marzo de 2012). *Diagnóstico Microbiológico de las infecciones por Herpesvirus*. Recuperado el Marzo de 2012, de *Procedimientos en Microbiología* : [www.seimc.org/documentos/protocolos/mircobiologia/cap8a.html](http://www.seimc.org/documentos/protocolos/mircobiologia/cap8a.html)
- Chou S, N. D. (1988). *The influence of donor factors others than serologic status on transmission of cytomegalovirus to transplant recipients*. Transplantation, 46:89-93.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2004). Procedures of the Handling and Processing of Blood Specimens: Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).*
- Colugnati FAB, S. S. (2007). Incidence of cytomegalovirus infection among the general population and pregnant women in the United States. BMC Inf Dis , 7:71-80.*
- Concepción Gimeno Cardona, D. N. (2005). Diagnóstico Microbiológico de las Infecciones por Herpesvirus. Procedimientos de Microbiología.*
- Correa Martín R., A. E. (1990). Estandarización de un método de ELISA para citomegalovirus humano. Acta Médica Colombiana , Vol 15 N°4: 180-186.*
- Cortéz, A., Beltrán, M., Olaya, B., & Hernandez, M. (1999). Riesgo de enfermedades infecciosas transmitidas por transfusión en el Valle del Cauca, Colombia . Colombia Médica, 1-6.*
- Crespo, M. d. (2000). El Diagnóstico Viral por el Laboratorio. Colombia Médica, Vol 31.*
- Delgado, O., Sánchez, A., Cevera, M., Munar, M., Gásco, J., & Marco, J. (2000). La Enfermedad del Citomegalovirus en transplante de renal. Servicio de Farmacia, Hospital Universitario Son Dureta, 296-303.*
- Demmler, G. J. (1998). Lo que gente debe saber acerca del virus del Citomegalovirus . CMV Reseach Fund, 1-11.*
- Diamedix. (1984). Inserto del Kit.*
- Frederic Cofán, Á. A.-M. (2012). Enfermedad por citomegalovirus: efectos directos e indirectos. Nefrologia , Sup Ext 3(1):4-13.*
- Frente, A., Sabin, C., Burroughs, A., Rolles, K., Griffiths, P., & Emery, V. (1997). Interrelationships among quantify of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in blood, donor - recipient serostatus, and administration of methylprednisolone as risk factors for HCMV disease following liver transplantation. J Infectology, 1484-1490.*

- Galla, S., & Levy, M. (Abril de 2012). Infecciones por Herpesvirus Humanos . *Obtenido de [www.sepeap.org/archivos/pdf/herpesvirus.pdf](http://www.sepeap.org/archivos/pdf/herpesvirus.pdf)*
- Gallego, M., Muñoz, L., & Cortés, A. (2000). *Características socioculturales de los donantes y no donantes de sangre en Colombia* . Colombia Médica, 1-11.
- García Escamillas, R., & Méndez López, T. (2006). *Reacciones adversas por transfusión sanguínea en pacientes cardiopatas* . Revista Patología Clínica, 139 -145.
- Gouarin, S., Vabret, A., Gault, E., Petitjean, J., Regeasse, A., & Huralt de Ligny, B. (2004 ). *Quantitative analysis HCMV DNA load in whole blood of renal patients using real time PCR essay* . Journal Clinic Microbiology , 194-201.
- Gutiérrez Salinas, J. (2009- 2010). *Detección de infección asintomática por citomegalovirus en donadores voluntarios de sangre*. Medicina Internacional, 109-115.
- Gutiérrez Salinas José, C. G. (2010). *Detección de infección asintomática por citomegalovirus en donadores voluntarios de sangre*. Med Int Mex., 26(2) : 109-115.
- Gutiérrez Salinas, J., Carmona García, R., García Ortiz, L., Chima, G. M., Suástegui Domínguez, S., Espinoza Elizondo, R. M., y otros. (2009). *Detección de infección asintomática por citomegalovirus en donadores voluntarios de sangre*. . Medicina Internacional Mexicana , 109-115.
- Gutiérrez-Salinas José, C.-G. R.-O. (2009-2010). *Detección de infección asintomática por citomegalovirus en donadores*. Med Int Mexico, 26(2):109-115.
- Gutiérrez-Salinas-José, C.-G. R.-O. (2009-2010). *Detección de infección asintomática por citomegalovirus en donadores voluntarios de sangre*. Med Int Mex 2009, 26(2):109-115.
- Henle, W. G. (1970). *Antibody responses to the Epstein-Barr virus and cytomegaloviruses after open-heart and other*. N. Engl. J. Med., 282:1068-1074.
- Hunt, R. (2007). *Obtenido de Microbiología e Inmunología Online*.

- Ikewaki, J., Ohtsuka, E., Ogata, M., Kikuchi, H., & Nasu, M. (2000). Real Time PCR essay compared to nested PCR and antigenemia assays for detecting cytomegalovirus reactivation in adult T cell leukemia - lymphoma patients . Journal of Clinical Microbiology, 4382- 4387.*
- Jiwa, N., Van Gemert, G., & Raap, A. (1989). Early Diagnostic of human cytomegalovirus diseases in transplant recipients by DNA amplification in plasma. PUBMED, 72-76.*
- Jorgelina L. Blejer, L. A. (2012). Riesgo de Transmisión de Infecciones por Vía Transfusional. Medicina, Buenos Aires, 62: 259-278.*
- José Gutiérrez-Salinas, \*. R.-G.-O.-D.-E. (2010). Detección de infección asintomática por citomegalovirus en donadores . Medicina Interna de México, Volumen 26.*
- Kane Robert, W. E. (1975). Cytomegalovirus Infection in a Volunteer Blood. American Society for Microbiology Infection and Immunity, p. 719-723.*
- KB., M. (1990). The unusual origin of the polymerase. Sci. Am, 262 (4): 56-61.*
- Kusne, S., Manez, R., & Frye, B. L. (1997). Use of DNA amplification for diagnostic of Cytomegalovirus enteritis after intestinal transplantation. Gastroenterology, 1121-1128.*
- Landini Mp, R. M. (1985). Human immune response to cytomegalovirus structural polypeptides studied by immunoblotting. J Med Virol, 17:303-311.*
- Lars Schaade, P. K. (2000). Detection of Cytomegalovirus DNA in Human Specimens by LightCycler PCR. J Clin Microbiol. 2000 , 38(11):4006-09.*
- Llamas Fuentes, F., Pérez Martínez, J., & Gallego Valcarse, E. (2006). CITOMEGALOVIRUS EN EL TRANSPLANTE RENAL. ASOCIACION ESPAÑOLA DE MEDICOS INTERNOS RESIDENTES , 2-6.*
- Mattera, A., & Barrios, P. (2000). Citomegalovirus. Generalidades de Herpesvirus, 252-256.*
- Mattera, A., & Barrios, P. (2008). Hespervirus . CEFA, 535- 566.*

- MICROBIAL*. (2000). Sistemas de detección de patógenos por PCR a tiempo real-Guía de Interpretación de Resultados.
- Navarrete Delgadillo, N., Villanueva Méndez, M., Álvarez Mantilla Toquero, E., & García González, R.* (2005). *Detección de Citomegalovirus humano en el paciente pediátrico*. *Revista de Enfermedades infecciosas en Pediatría*, 1-7.
- Navarro, D.* (Marzo de 2012). Diagnóstico Serológico de la Infección de Citomegalovirus Humano . *Recuperado el Marzo de 2012, de Control de Calidad SEIMC: [www.seimc.org/control/revisiones/serologia/serocmv.pdf](http://www.seimc.org/control/revisiones/serologia/serocmv.pdf)*
- Nesbitt, S., Cook, L., & Jerome, K.* (2004). *Cytomegalovirus quantitation by Real Time PCR is unadected by delayed separations of plasma from whole blood*. *Journal Clinical Microbiology*, 1296.1297.
- Noris Rodríguez, M. A.* (2000). *Reacción en Cadena de la Polimerasa y otras técnicas moleculares*. *Venezuela*.
- NS., T.* (1992). *The polymerase chain reaction*. *Diagn Mol*, 1(1):58-72.
- Obstetricia, P. d.* (2005). *Drscope*. *Recuperado el 5 de Enero de 2012, de [http://www.drscope.com/pac/gineobs/g4/g4\\_pag45.htm](http://www.drscope.com/pac/gineobs/g4/g4_pag45.htm)*
- Ochoa C, O. d.* (2006). *La existencia en la gestante de inmunidad previa a citomegalovirus, no evita la infección congénita*,. *Evid Pediatr.* , 2:48.
- Organización Panamericana de la Salud.* (2004). *Estándares de Trabajo para Servicios de Sangre*. *Washington D.C.*
- Organización Panamericana de la Salud.* (2011). *Indicadores de Salud 2011*. *OMS/OPS*.
- Ost, L. E.* (1984). *Cytomegalovirus Infection of Human Blood Cells*. *The Journal of Infectious Diseases*, Vol 149.
- P, S., HN, M., & KL, T.* (2006). *Evaluation of three Polymerase chain reaction tests targeeting morphological transforming region II, UL-83 gene and glycoprotein O gene for the*

*detection of Human Cytomegalovirus genome in clinical specimens of immunocompromised patients in Chennai India . Virology Journal , 3-20.*

*Pérez Payá, A., Apolinar Valiente, E., Acosta Boga, B., Ribes Konoekx, C., Díaz Marijuan, C., & Muñoz Guillén, A. (2002). INFECCIÓN PRINATAL POR CITOMEGALOVIRUS EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINO. ANALES ESPAÑOLES DE PEDIATRICA, 244-248.*

*R., R., Bessman, D., Smith, S., Szamosi, D., Warunek, D., & Wiseman, J. (2004). Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline. Pennsylvania: NCCLs.*

*Rajiv, C. T. (2009). Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. Clin. Microbiol. Rev, 22(1):76.*

*Rckha, S., Chandraseckhara, M., & Yeshwanth, M. (1995). Cytomegalovirus infection acquired through blood trasnfutions . Indian Pedriatric, 575-577.*

*Real-Time, D. o. (2000). ANDREAS NITSCHKE,1 NINA STEUER,1 CHRISTIAN ANDREAS SCHMIDT,1 OLFERT LANDT,2. Journal of Clinical Microbiology, 2734-2737.*

*Revello María Grazia, a. G. (2002). Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus, and Newborn Infant. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Vol 15-No4: 680-709.*

*Rivero Jimenez, R. A. (2006). Transmisión de infecciones virales por la transfusión de sangre. Revista Cubana Hematología Inmunología Hemoter, 22, 0-0.*

*ROCHE. (2006-2007). LightCycler FastStart DNA Masterplus HybRrobe. USA: ROCHE.*

*Stagno, S., Reynolds, D., & Tsiantos, A. (1980). Primary cytomegalovirus infection in pregnant and nonpregnant women: suppression in early gestation. J Infection Diseases, 522-527.*

*Staras SAS, D. S. (2006). Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. Clin Infec Dis , 43:1143-1151.*

- Staz, L., & Kornblih, A. R. (Marzo de 2012). Ciencia hoy. *Obtenido de Revista de Divulgacion Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy: [www.cienciahoy.org.ar/hoy23/reaccion.htm](http://www.cienciahoy.org.ar/hoy23/reaccion.htm)*
- Studahl, M., Bergstrom, T., & Hagber, L. (1998). *Acute viral encephalitis in adults a prospective study*. *Journal Infections Diseases*, 215-220 .
- Varela, L., & Romero, S. (2006). *Detección de ADN de CMV en plasma mediante PCR en tiempo real utilizando SYBR-GREEN como señal de amplificación* . *Revista de enfermedades infecciosas- Microbiología clinica*.
- Viglioglia, P. (2007). *Infeción por Citomegalovirus*. *Actualidad Terapeutica Dermatologica*, 293-303.
- Vioglioglia, P. (2007). *Infeción por citomegalovirus Atencion a sus manifestaciones cutáneas*. *Notas Terapéuticas*, 298.
- Vornhagen R, P. B. (1994). *Early serodiagnostic of acute human cytomegalovirus infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens*. *J Clin Microbiology*, 32: 981-986.
- Wafa Habbal, F. M. (2008). *Optimization of Human Cytomegalovirus LightCycler Real-Time PCR*. *J Infect Developing Countries* , 2(5):406-410.
- Wilson, D., & Chosewood, C. (2009). *Boisafety in Microbiology and Biomedical Laboratories*. *Atlanta: HHS Publication* .
- Wolf, D. G., & Spector, S. A. (1993, vol. 56). *Early diagnosis of human cytomegalovirus disease in transplant recipients by DNA amplification in plasma*. *Transplantation*, 330-334.
- Yague, V., I, C., A, K., Álvarez, R., Fernández, C., & Picazo, J. (1998). *Citomegalovirus: estudio comparativo de técnicas de diagnóstico* . *Enfermedades infecciosas Microbiología Clínica*, 16-163.

*Zuckerman, Ariel J; Banatvala, Jangu E; Pattison, Jhon R; Griffiths, Paul D; Schoub, Barry D. (2004). Principles and Practice of Clinical Virology. London : Jhon Wiley & Sons Ltd.*