



ORIGINAL

## Utilidad de una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real en el diagnóstico de infección congénita y posnatal por citomegalovirus

J. Reina\*, I. Weber, E. Riera, M. Busquets y C. Morales

Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, Islas Baleares, España

Recibido el 5 de febrero de 2013; aceptado el 30 de junio de 2013

Disponible en Internet el 6 de octubre de 2013

### PALABRAS CLAVE

Citomegalovirus;  
Infección congénita;  
Infección posnatal;  
Reacción en cadena  
de la polimerasa  
cuantitativa;  
Reacción en cadena  
de la polimerasa  
cualitativa;  
Cultivo celular

### Resumen

**Introducción:** El citomegalovirus (CMV) es principal virus causante de infecciones congénitas y posnatales en la población pediátrica. El objetivo de este estudio es evaluar la utilidad de una PCR cuantitativa en tiempo real en el diagnóstico de estas infecciones utilizando la orina como única muestra.

**Pacientes y métodos:** Se estudiaron todas aquellas muestras de orina de recién nacidos (< 7 días) con sospecha de infección congénita y las orinas de pacientes con sospecha de infección posnatal (orina al nacer negativa). Las orinas se han estudiado de forma simultánea mediante cultivo celular, PCR cualitativa (PCRc) y PCR cuantitativa en tiempo real (PCRq).

**Resultados:** Se han analizado 332 orinas (270 para descartar infección congénita y 62 infección posnatal). De las primeras 22, fueron positivas en la PCRq, 19 en la PCRc y 17 en el cultivo. Al comparar el cultivo con el resto de técnicas, la PCRq presentó una sensibilidad del 100%. Si se utiliza la PCRq como referencia, el cultivo presentó una sensibilidad del 77,2% y la PCRc del 86,3%. En los casos de infección posnatal, la PCRq detectó 16 positivas, la PCRc 12 y el cultivo celular 10 orinas como positivas. Las orinas presentaron unas cargas virales que oscilaban entre 2.178 y 116.641 copias/ml.

**Conclusiones:** La técnica de amplificación genómica PCRq en tiempo real se ha mostrado más sensible que las otras técnicas analizadas. Esta técnica debería ser considerada como de referencia (gold standard), dejando al cultivo celular como técnica secundaria. El bajo coste y la automatización de la PCRq permitirían realizar el cribado de infección por CMV a grandes poblaciones neonatales y posnatales.

© 2013 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [jorge.reina@ssib.es](mailto:jorge.reina@ssib.es) (J. Reina).

**KEYWORDS**

Cytomegalovirus;  
 Congenital infection;  
 Postnatal infection;  
 Quantitative;  
 polymerase-chain  
 reaction;  
 Qualitative  
 polymerase-chain  
 reaction;  
 Cell culture

## Usefulness of a real-time quantitative polymerase-chain reaction (PCR) assay for the diagnosis of congenital and postnatal cytomegalovirus infection

**Abstract**

*Introduction:* Cytomegalovirus (CMV) is the main virus causing congenital and postnatal infections in the pediatric population. The aim of this study is to evaluate the usefulness of a quantitative real-time PCR in the diagnosis of these infections using urine as a single sample.

*Patients and methods:* We studied all the urine samples of newborns (< 7 days) with suspected congenital infection, and urine of patients with suspected postnatal infection (urine negative at birth). Urines were simultaneously studied by cell culture, qualitative PCR (PCRc), and quantitative real-time PCR (PCRq).

*Results:* We analyzed 332 urine samples (270 to rule out congenital infection and 62 postnatal infections). Of the first, 22 were positive in the PCRq, 19 in the PCRc, and 17 in the culture. PCRq had a sensitivity of 100%, on comparing the culture with the rest of the techniques. Using the PCRq as a reference method, culture had a sensitivity of 77.2%, and PCRc 86.3%. In cases of postnatal infection, PCRq detected 16 positive urines, the PCRc 12, and the cell culture 10. The urines showed viral loads ranging from 2,178 to 116,641 copies/ml.

*Conclusions:* The genomic amplification technique PCRq in real time was more sensitive than the other techniques evaluated. This technique should be considered as a reference (gold standard), leaving the cell culture as a second diagnostic level. The low cost and the automation of PCRq would enable the screening for CMV infection in large neonatal and postnatal populations.

© 2013 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introducción**

El citomegalovirus (CMV) sigue siendo en la actualidad el principal causante de infecciones congénitas. Su incidencia global oscila entre el 0,2-2% y depende de las condiciones sociosanitarias de cada zona o región<sup>1,2</sup>. La mayoría de las infecciones congénitas por CMV son asintomáticas al nacer y solo pueden diagnosticarse de forma activa analizando la presencia del virus en la orina de los primeros 7-10 días de vida<sup>1,3</sup>.

Tras el nacimiento, las primoinfecciones posnatales por CMV se producen generalmente por la transmisión del virus a través de la leche de las madres seropositivas (viro lactia) o por las transfusiones sanguíneas no controladas para este virus<sup>4,5</sup>.

En ambas situaciones, el CMV puede dar lugar a una infección asintomática o bien presentar un cuadro clínico de enfermedad aguda (fiebre, leucopenia, esplenomegalia). Así mismo se ha demostrado que este tipo de infecciones pueden comportar un incremento en el riesgo de desarrollar secuelas neurológicas de tipo auditivo y retraso psicomotor<sup>4,6-9</sup>.

Como consecuencia de ello, se hace preciso realizar el diagnóstico etiológico específico lo antes posible para poder hacer un seguimiento exhaustivo de los pacientes con infección por CMV<sup>10</sup>. Además, en algunos estudios parece evidenciarse que la carga viral de CMV presente en la orina y/o sangre (plasma) es un marcador del riesgo relativo de desarrollar las secuelas neurológicas<sup>11</sup>.

Con el objetivo de estudiar la utilidad de 2 técnicas distintas, el cultivo celular, hasta ahora la técnica de referencia, y la amplificación genómica (PCR cualitativa y cuantitativa) se ha realizado un estudio prospectivo en el diagnóstico de infección congénita y postnatal por CMV en recién nacidos.

**Pacientes y métodos**

Se ha realizado un estudio prospectivo sobre la utilidad de una PCR cuantitativa (PCRq) en tiempo real frente a una PCR cualitativa (PCRc) y el cultivo celular tipo shell-vial en el diagnóstico de infección congénita y primoinfección por CMV.

Las muestras para el diagnóstico de infección congénita por CMV fueron enviadas de diferentes hospitales y consistían exclusivamente en orinas. Del mismo modo, para el diagnóstico de primoinfección por CMV se utilizó una muestra de orina.

Se ha considerado como infección congénita por CMV su aislamiento o detección genómica en una orina procesada antes de los 7 días posnacimiento. Las primoinfecciones por CMV se consideraron cuando habiendo tenido una orina previamente negativa a CMV, se remitía otra orina cuando concurrían algunas circunstancias clínicas (fiebre, leucopenia, elevación transaminasas) o epidemiológicas (lactancia materna o transfusión sanguínea) compatibles con este tipo de infección.

Para el cultivo de orina frente al CMV, las muestras fueron inoculadas en 2 viales de la línea celular MRC-5 (Viracell, Granada) e incubadas 24 y 48 h. Tras este tiempo las monocapas fueron fijadas con metanol y teñidas mediante anticuerpos monoclonales específicos frente al antígeno p72 del CMV (Biosoft, Irlanda). Fueron consideradas como positivas aquellas que presentaban una fluorescencia específica a nivel nuclear<sup>12,13</sup>.

Para la amplificación genómica se utilizaron 2 técnicas. La PCRc se realizó con 50 µl de la muestra, mediante una técnica de amplificación nested múltiple (Real, Durviz, Granada) y posterior visualización en geles de agarosa. La PCRq se realizó con 700 µl de la orina y con un sistema automatizado comercial (Abbott RealTime CMV, Alemania), que

**Tabla 1** Resultados obtenidos en la comparación de técnicas diagnósticas en la detección de infección congénita por CMV

PCRq	PCRc	CSV	Total <sup>a</sup>
+	+	+	17 (77,2)
+	+	—	2 (9,1)
+	—	—	3 (13,6)
22 (100) <sup>a</sup>	19 (86,3)	17 (77,2)	22

CSV: cultivo shell-vial; PCRc: PCR cualitativa; PCRq: PCR cuantitativa.

<sup>a</sup> Número de muestras (%).

permite cuantificar la positividad de la muestra en copias de genoma/ml de muestra. En ambos casos, se siguieron escrupulosamente las exigencias técnicas de los sistemas comerciales.

## Resultados

Durante el período de estudio se han analizado 332 muestras de orina. De ellas, 270 (81,3%) se remitieron de diferentes hospitales para descartar infección congénita por CMV y 62 (18,7%) para el diagnóstico de primoinfección por CMV. De las 270 orinas iniciales, 22 (8,1%) fueron positivas en la PCRq, 19 (7,1%) en la PCRc y 17 (6,2%) en el cultivo shell-vial. En los 5 casos de cultivo negativo en la orina, se solicitó una segunda muestra a las 48 h, que fue positiva en todos ellos.

Al comparar el cultivo shell-vial como técnica de referencia con la PCRq, en las muestras para el diagnóstico de infección congénita, esta ha presentado una sensibilidad del 100%, especificidad del 98%, valor predictivo positivo del 77,2% y valor predictivo negativo del 100%. Si se utiliza la PCRq como técnica de referencia, el cultivo shell-vial ha presentado una sensibilidad del 77,2%, especificidad del 100%, valor predictivo positivo del 100% y valor predictivo negativo del 98%. La PCRc, comparada con la PCRq, ha presentado una sensibilidad del 86,3%, especificidad del 100%, valor predictivo positivo del 100% y valor predictivo negativo del 98%. Los valores obtenidos al compararla con el cultivo shell-vial han sido del 100, el 99,2, el 89,4 y el 100%, respectivamente.

En las 62 orinas con sospecha de primoinfección, 16 (25,8%) fueron positivas en la PCRq, 12 (19,3%) en la PCRc y 10 (16,1%) en el cultivo celular. En los 6 casos con cultivo negativo, solo 4 orinas fueron positivas en la segunda muestra y 2 en la tercera muestra. En este tipo de muestras la sensibilidad fue del 100% para la PCRq, 75% para la PCRc y el 62,5% para el cultivo shell-vial.

En ambos tipos de situaciones, ninguna orina fue positiva a CMV y negativa en las PCR. En las tablas 1 y 2 se expresan los resultados comparativos obtenidos en los 2 grupos de muestras procesadas.

Las orinas positivas en la PCRq presentaron unas cargas virales que oscilaron entre 2.178 y 116.641 copias/ml. La carga viral de CMV en las orinas inicialmente negativas oscilaba entre 1.200 y 5.430 copias/ml. La carga viral de las orinas con PCRq positiva y PCRc negativa tenía todas cargas inferiores a 5.000 copias/ml.

**Tabla 2** Resultados obtenidos en la comparación de técnicas diagnósticas en las infecciones postnatales por CMV

PCRq	PCRc	CSV	Total <sup>a</sup>
+	+	+	10 (62,5)
+	+	—	2 (12,5)
+	—	—	4 (25,0)
16 (100) <sup>a</sup>	12 (75,0)	10 (62,5)	16

CSV: cultivo shell-vial; PCRc: PCR cualitativa; PCRq: PCR cuantitativa.

<sup>a</sup> Número de muestras (%)

## Discusión

Las infecciones congénitas por CMV son una entidad clínica no despreciable que se presenta en cerca del 1% de los recién nacidos sanos (excretadores asintomáticos). Esta excreción urinaria es uno de los principales mecanismos de transmisión horizontal del CMV, que permite la pronta adquisición de esta infección<sup>1,2,4</sup>. A pesar de este porcentaje, la inmensa mayoría de los pacientes no muestran signos ni síntomas a lo largo de su vida; sin embargo, se calcula que entre el 5-15% de ellos podrían desarrollar alteraciones neurosensoriales y psicomotrices a largo plazo<sup>1,4</sup>.

Por todo ello, el diagnóstico de la infección congénita por CMV debería ser un objetivo básico de salud pública<sup>14</sup>. Hasta ahora el aislamiento del CMV en orina o saliva de los recién nacidos hasta los 7-10 días de vida era la técnica de referencia para este tipo de diagnóstico. Aunque esta técnica solo se aplica a los niños que nacen con algún tipo de sintomatología o bien presentan criterios de ingreso o mantenimiento hospitalario<sup>1,10,15</sup>.

En 2012, de Vries et al.<sup>16</sup> realizaron un estudio multicéntrico para demostrar que la técnica de amplificación genómica-PCR en tiempo real era más sensible que el clásico cultivo de orina para la detección del CMV. En este estudio, el cultivo detectó un 7,4% de orinas positivas frente al 8,2% de la PCR en tiempo real. Esto se traduce en 3 casos de infección congénita que no hubieran sido diagnosticados por el método clásico (cultivo celular).

En nuestro estudio, el cultivo celular permitió el diagnóstico de 17 (6,2%) pacientes con infección congénita y las técnicas moleculares de 19 (7,1%) para la PCRc y de 22 (8,1%) para la PCRq. Es decir, con la técnica molecular cuantitativa se diagnosticaron 5 casos más de infección congénita que no se detectaron mediante cultivo de orina. En estos 5 casos, se solicitó una segunda muestra de orina que fue remitida en un plazo de 2-5 días. En todas ellas el cultivo fue positivo, apoyando la positividad previa de la PCR.

A demás de la mayor sensibilidad demostrada de las técnicas moleculares, la orina como muestra presenta algunos problemas en el cultivo celular. En los recién nacidos no es infrecuente encontrar cristales, uratos y fosfatos en las orinas que repercuten negativamente sobre la viabilidad de la línea celular. Es decir, la toxicidad intrínseca de la muestra sobre el cultivo celular es obviada por las técnicas moleculares que realizan inicialmente un proceso de extracción de ácidos nucleicos que, generalmente, no se ve afectada por las características de la muestra<sup>12,13,15-17</sup>.

Como hemos podido comprobar en este estudio, no todas las técnicas de amplificación genómica muestran la misma sensibilidad analítica. La PCRc que utilizamos rutinariamente se basa en la amplificación y la detección por geles de agarosa. Por lo tanto, el resultado es la visualización de una banda de amplificación. Esta técnica es ligeramente subjetiva y precisa de una carga viral mínima para poder ser observada<sup>17,18</sup>. Por ello, no es extraño que 2 orinas positivas en la PCRq fueran negativas en la PCR cualitativa, ya que sus cargas virales estaban todas por debajo de 5.000 copias/ml, que podría ser (no tenemos datos demostrativos) el límite inferior de detección de la técnica PCRc en nuestro laboratorio.

Una de las ventajas de la PCRq es la cuantificación de la carga viral presente en la orina procesada. Existen algunos estudios que parecen indicar que su valor podría ser utilizado como marcador de posibles secuelas neurológicas o para identificar a los pacientes con mayor riesgo de enfermedad grave<sup>7,11</sup>. Aunque no existe todavía un punto de corte a partir del cual podamos identificar a este tipo de pacientes, si se podría realizar un seguimiento cuantitativo de ellos como parámetro evolutivo y de pronóstico. Por lo tanto, la cuantificación, si demostrada en plasma<sup>19</sup>, puede en el futuro ser una herramienta muy útil en este tipo de pacientes; por ejemplo, podría seleccionar a aquellos pacientes que se beneficiarían de un tratamiento precoz específico frente al CMV<sup>1,4</sup>. Así, Nijman et al.<sup>11</sup> han demostrado que la carga viral de CMV en la orina de las infecciones posnatales (media de  $1 \times 10^5$  copias/ml) es significativamente menor que la observada en la orina de los pacientes con infección congénita (media  $8,5 \times 10^6$  copias/ml). En nuestro caso, no hemos podido confirmar estas diferencias, probablemente debido al bajo número de pacientes estudiados.

El diagnóstico de las infecciones posnatales por CMV utiliza generalmente la misma metodología que la congénita, es decir, el cultivo de orina como técnica de referencia<sup>13,16</sup>. Sin embargo, para este tipo de infecciones es preciso disponer del antecedente previo de una orina negativa que descarte una infección congénita asintomática<sup>1,4</sup>. La detección de CMV en una orina mas allá de los días 10-14 posnacimiento, sin otra negativa previa, no nos permite establecer el momento de la infección por CMV<sup>1,6</sup>. En nuestro estudio sobre las primoinfecciones posnatales por CMV, solo se analizó a aquellos pacientes que poseían como mínimo una orina negativa antes de los 10 días de vida.

De nuevo el cultivo celular ha mostrado una menor positividad que las técnicas moleculares, ya que solo detectó 10 (16,1%) pacientes con presencia del CMV en esta muestra. La PCRq detectó 16 (25,8%), lo cual implica que el cultivo presentó frente a esta técnica una sensibilidad del 62,5%. En los casos con PCR positiva y cultivo de orina negativo, se solicitó una nueva muestra de orina que permitió el aislamiento de CMV en todos estos casos previamente negativos. Así la no utilización de las técnicas moleculares no hubiera permitido este tipo de diagnóstico, al igual que en las infecciones congénitas, o lo hubiera retrasado si persistían las condiciones clínicas o epidemiológicas que lo sustentaban<sup>17</sup>.

La mayor sensibilidad de la PCRq utilizada en este estudio (20 copias/ml) permitiría su utilización en los programas de cribado de infección congénita por CMV. Tal y como han demostrado los estudios de Paixao et al.<sup>20,21</sup>, la utilización

de la metodología de pools de orinas (unas 20/determinación) permite la detección de estas infecciones con una sensibilidad del 100%. La agrupación de orinas disminuiría drásticamente los costes por determinación y el trabajo inherente a la manipulación de un gran número de muestras.

En definitiva, parece evidente que las técnicas de amplificación genómica, y en particular la PCRq, muestran una mayor sensibilidad en la detección de CMV en la orina pediátrica. Es muy posible que debamos empezar a utilizar esta técnica como método de referencia en este tipo de infección (tanto la congénita como la posnatal), dejando el cultivo celular como técnica de segunda línea. El incremento de la sensibilidad diagnóstica y el establecimiento de la carga viral en la orina, junto con un coste más bajo, parecen ser razones suficientes para realizar un amplio estudio definitivo que clarifique el empleo rutinario de esta técnica en las diferentes situaciones en las que queramos detectar la presencia del CMV en muestras pediátricas.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The silent global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26:86–102.
2. Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol.* 2008;41:192–7.
3. Rahav G. Congenital cytomegalovirus infection. A question of screening. *Isr Med Assoc J.* 2007;9:392–4.
4. Alarcón Allen A, Baquero-Artiago F. Revisión y recomendaciones sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección postnatal por citomegalovirus. *An Pediatr (Barc).* 2011;74:52, e1–13.
5. Reina J, Balliu P. Primoinfección por citomegalovirus (CMV) asociada a lactancia materna en pacientes de riesgo. *Rev Esp Pediatr.* 2012;68:349–51.
6. Collados Navas R, Casado Garcia J. Infección congénita por citomegalovirus: la gran desconocida. *Semergen.* 2011;37:549–53.
7. Boppana SB, Fowler KB, Pass RF, Rivera LB, Bradford RD, Lakeman FD, et al. Congenital cytomegalovirus infection: Association between virus burden in infancy and hearing loss. *J Pediatr.* 2005;146:817–23.
8. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Ambrosetti U, Corbetta C, Sergi P. A wider role for congenital cytomegalovirus infection in sensorineural hearing loss. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22:39–42.
9. Luck S, Shaland M. Postnatal cytomegalovirus: Innocent bystander or hidden problem? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2009;94:F58–64.
10. Demmler-Harrison GJ. Congenital cytomegalovirus: Public health action towards awareness, prevention and treatment. *J Clin Virol.* 2009;46 Suppl 4:S1–5.
11. Nijman J, van Loon AM, de Vries LS, Koopman-Esseboom C, Groenendaal F, Uiterwaal CS, et al. Urine viral load and correlation with disease severity in infants with congenital or postnatal cytomegalovirus infection. *J Clin Virol.* 2012;54:121–4.
12. Reina J, Balliu P, Salva F, Lopez-Corominas V, Fernandez-Baca V, Alberto C, et al. Diagnóstico virológico de las infecciones congénitas por citomegalovirus. *Rev Esp Pediatr.* 1997;53:517–21.
13. Reina J, Balliu P, Salva F, Lopez-Corominas V, Fernandez-Baca V, Alberto C, et al. Utilidad de diferentes técnicas analíticas en el

- diagnóstico de infección congénita por citomegalovirus. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1997;15:502-3.
14. Dollard SC, Schleiss MR, Grosse SD. Public health and laboratory considerations regarding newborn screening for congenital cytomegalovirus. *J Inher Metab Dis*. 2010;33 Suppl 2:S249-54.
  15. Sandin RL, Rodriguez ER, Rosenberg E, Porter-Jordan K, Caparas M, Nasim S, et al. Comparison of sensitivity for human cytomegalovirus of the polymerase chain reaction, traditional tube culture and shell vial assay by sequential dilutions of infected cell lines. *J Virol Methods*. 1991;32:181-91.
  16. De Vries JJC, van der Eijk AA, Wolthers KC, Rusman LG, Pas SD, Molenkamp R, et al. Real-time PCR versus viral culture on urine as a gold standard in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol*. 2012;53:167-70.
  17. Daiminger A, Schalasta G, Betzl D, Enders G. Detection of human cytomegalovirus in urine samples by cell culture, early antigen assay and polymerase chain reaction. *Infection*. 1994;22:24-8.
  18. Kearns AM, Turner AJ, Eltringham GJ, Freeman R. Rapid detection and quantification of CMV DNA in urine using LightCycler-based real-time PCR. *J Clin Virol*. 2002;24:131-4.
  19. Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, Papa I, Gabrielli L, Guerra B, et al. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics*. 2006;117:e76-83.
  20. Paixao P, Almeida S, Gouveia P. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by detection of viral DNA in urine pools. *J Virol Methods*. 2005;128:1-5.
  21. Paixao P, Almeida S, Videira PA, Ligeiro D, Marques T. Screening of congenital cytomegalovirus infection by real-time PCR in urine pools. *Eur J Pediatr*. 2012;171:125-9.