

Título:

Reacción en Cadena de la Polimerasa vs Serología
en el Screening de Citomegalovirus en Mujeres
Embarazadas y sus Recién Nacidos.

Autores:

Moncayo Karla, Landivar Xavier, Escobar Saúl.

Palabras Clave:

PCR, Serología, Citomegalovirus, Infección,
Congénita.

Afiliación:

Universidad Católica de Santiago de Guayaquil

Resumen:

La afectación por Citomegalovirus es la causa más común de infección intrauterina. En este estudio se tomaron 90 muestras de sangre periférica de mujeres embarazadas en trabajo de parto y 90 de sangre de cordón umbilical de sus respectivos hijos. Los cuales se analizaron por ImmunoLISA para anti CMV IgM y luego se realizó Nested PCR, ambos resultados fueron comparados estadísticamente. La prevalencia de Citomegalovirus del grupo de madres fue por 15%PCR y 10% serología. En los recién nacidos la prevalencia fue de por 33%PCR y el 44% para anti CMV IgM. La tasa de transmisión vertical observada de los analizados por serología fue del 37% y del 15% por PCR. El 91% (serología) y 93% (PCR) de los recién nacidos infectados fueron de madres aparentemente sanas. Con respecto a la PCR la IgM presenta una sensibilidad del 56% y una especificidad del 81%. Se Concluye que la PCR es un método rápido, sensible y específico que detecta la presencia del virus antes que la IgM, para el diagnostico de infección congénita por CMV y para evaluar la tasa de transmisión vertical.

Summary:

Cytomegalovirus affection is the first cause of intrauterine infection. On this trial we took 90 samples of peripheral blood from pregnant women on labor and 90 from the umbilical cord of their neonates. Samples were analyzed by ImmunoLISA for CMV IgM and later on Nested PCR was done. Both results were compared statistically from where we got that the prevalence of Cytomegalovirus of the group of pregnant women was 15% by PCR and 10% by serology. For neonates the prevalence was 33% by PCR and 44% for anti CMV IgM. Vertical transmission rate observed on samples analyzed by serology was 37%; on the other hand, 15% by PCR. 91% from the neonates with positive IgM came from negative IgM mothers while 93% by PCR. Compared to Nested PCR, IgM has 56% sensitivity and 81% specificity diagnosing Cytomegalovirus infection. From what is conclude that PCR for CMV give us quick, sensible and specific results, can detect the virus even before the IgM for CMV congenital infection diagnosis and evaluate vertical transmission rate.

Introducción:

La infección por Citomegalovirus (CMV), en el paciente inmunocompetente es frecuentemente asintomática y de gran importancia en la mujer embarazada, ya que es la causa más común de infección intrauterina y aproximadamente el 1% de todos los recién nacidos (RN) padecen Citomegalovirus congénito. (1) .Su incidencia mundial es de 0,2-2,2% en los recién nacidos vivos, presentándose en el 1% de los embarazos de pacientes no inmunizadas y en el 5% de las embarazadas seropositivas (2). En USA aproximadamente 1 de cada 150 niños nacen con Citomegalovirus congénito (3).

Si bien es cierto que la serología por ELISA es el método más comúnmente empleado, económico y a mayor alcance de todos para la detección del Citomegalovirus, tan solo tiene un 92.9% de especificidad y 34.4% de sensibilidad aproximadamente (4). Además la determinación de IgG para CMV en el RN no es de gran ayuda ya que un resultado positivo podría reflejar tan solo una transferencia pasiva de anticuerpos de la madre al feto. Mientras que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) si bien es más costosa, tiene una sensibilidad de 89.2% y especificidad de 95.8%, se pueden obtener los resultados en un día laborable siendo un periodo de tiempo más corto que el de los métodos convencionales (5,6). Incluso realizarlo hasta 24 horas luego de tomada la muestra sin que haya alteración del resultado y es considerada una técnica más precisa. (7)

En Ecuador no se han realizado estudios que comparen la sensibilidad y especificidad de la serología versus la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de infección por Citomegalovirus en mujeres embarazadas y el recién nacido. Tampoco conocemos la prevalencia de neonatos infectados con Citomegalovirus de madres aparentemente sanas por serología, ni la tasa de transmisión vertical de Citomegalovirus medida por ambas técnicas. Debido que es un tema de relevancia estadística global es importante resolver estas incógnitas a nivel local para poder determinar si es válido realizar un screening diagnóstico durante el embarazo para Citomegalovirus y así tomar medidas preventivas.

Materiales y métodos

El siguiente es un estudio aleatorio, analítico, transversal de julio a septiembre del 2009 y de enero a marzo del 2010 que utilizó como muestra mujeres embarazadas que acudieron a parir a la maternidad Mariana de Jesús. Fueron escogidas aleatoriamente para el estudio 90 pacientes junto con su recién nacido.

Como criterios de inclusión se emplearon mujeres multíparas o nulíparas de cualquier grupo étnico que cursaban el 3er trimestre del embarazo en trabajo de parto para parir por vía vaginal o cesárea segmentaria ya sea programada o de emergencia entre 16 y 42 años de edad. Fueron excluidas mujeres que cursaban el primer o segundo trimestre del embarazo, eclámpticas o con alteración de la conciencia, VIH (+), menores de 16 y mayores de 42 años de edad.

Luego de la correcta asepsia se obtuvo una muestra de sangre venosa periférica de la madre junto con una muestra de sangre de cordón umbilical del recién nacido durante el trabajo de parto las cuales fueron refrigeradas en una hielera pequeña con bolsas de hielo y llevadas al laboratorio para ser almacenadas de 2 a 8 °C y posteriormente analizadas.

En el laboratorio se centrifugaron las muestras para obtener plasma (claro, no contaminado por organismos) y realizar la serología antiCMV IgM por la técnica de ImmunoLISA de Orgenics la cual fue desarrollada siguiendo su técnica descrita en el manual (8). El suero no fue congelado más de una vez debido que la globulina IgM se degrada. Cuando fue necesario remover algún agente contaminante, se centrifugó el suero a 2000 g por 20 minutos o utilizando un filtro 0.22 u.

El ensayo fue considerado válido si la OD 450nm del pozo blanco A1 es < 0.100 . Después de blanquear con A1, la OD 450nm de la media del control negativo (NC) debe ser < 0.200 . Finalmente la OD 450nm de la media del control positivo (PC) es > 0.800 .

Cuando la prueba resultó válida se calculó el cut-off a través de la fórmula: $NC + 0.250 = \text{CUT OFF}$, el cual fue 0.310. Las muestras con OD 450nm menor que el cut-off son negativas para CMV IgM, mayor que el cut-off son positivas para CMV IgM, con OD 450nm + 20% del cut-off fueron consideradas indeterminadas. Las muestras con un valor de OD450nm superior que el límite superior de la zona indeterminada son consideradas positivas.

Una vez finalizada la serología se procedió a realizar la purificación de ADN por medio del Kit de purificación de genoma de ADN de PureLink™ la cual fue desarrollada paso a paso con la técnica indicada en el manual (9).

Luego se realizó la reacción en cadena de la polimerasa convencional, sobre una cubeta con hielo picado se colocó un tubo eppendorf estéril para preparar la master mix o mezcla maestra para PCR, usando la hoja especialmente diseñada para el objeto. Se puso un volumen igual en microlitros del master mix en cada tubo de reacción (tubos eppendorf 0,2ml). Se llevó los tubos con el cooler al área de extracción de ADN y se añadió a cada uno 1 microlitro del ADN extraído y se trasladó los tubos al termociclador en el área de PCR, para su amplificación en el programa correspondiente (10,11).

Complementariamente a esto realizamos la reacción en cadena de la polimerasa anidada. Aquí en vez del ADN extraído del paciente, se usó el producto amplificado de la primera reacción, con sus respectivos iniciadores (10,11).

El producto de estos procesos fue visualizado en gel de agarosa al 2% en la cámara UV.

Posterior a la obtención de los resultados de ambas pruebas se procedió a tabular las muestras positivas, negativas y en blanco en una hoja de Microsoft Excel. A las muestras de la PCR se dio un valor de -1 para las negativas y 1 para las positivas, el corte utilizado para la serología fue de 0.310, todo por debajo de

ese valor se consideró negativo y todo por encima de la cifra se consideró positivo por medio de las pruebas lógicas medidas con la función "SI".

Se determinaron los verdaderos positivos y negativos junto con los falsos positivos y negativos de la serología con respecto a la PCR por medio de la función "CONCATENAR" y finalmente se los sumo cada uno por la función "CONTAR.SI". De acuerdo a lo obtenido se sacaron los respectivos porcentajes propuestos como objetivos del estudio y se calculó la especificidad tomando en cuenta los verdaderos negativos y los falsos positivos y la sensibilidad con verdaderos positivos y falsos negativos.

Resultados:

El universo total fue de 180 muestras, 90 de sangre venosa periférica de las madres y 90 de sangre de cordón umbilical de sus respectivos hijos. De los cuales 23 muestras se las consideró en blanco (12 hijos y 11 madres) por no ser un espécimen viable para el análisis molecular y posteriormente estadístico, ya sea por coagulación, hemólisis, hiperlipidemia o almacenamiento incorrecto de la muestra (Tabla1).

Se obtuvieron resultados de 157 muestras por serología por el método ImmunoLISA, las cuales fueron analizadas y comparadas con Nested-PCR.

La prevalencia de Citomegalovirus en mujeres embarazadas por serología y PCR fue de 10% (n=79) y 15%(n=79) respectivamente. El 44 %(n=78) de los recién nacidos evaluados por serología tuvo antiCMV IgM y el 33%(n=78) PCR positiva (Figura 1 y 2).

Luego de descartar los casos de las muestras de madres que carecían de hijos por los motivos ya mencionados y viceversa(n=75), obtuvimos que de las madres IgM positiva por ImmunoLISA, es decir, con un cut off >0.310, el 37% (n=8) tuvo su recién nacido con IgM positiva. Mientras que por Nested-PCR las madres positivas presentaron un 15%(n=13%) de neonatos positivos, lo que da a conocer un gran diferencia en la tasa de transmisión vertical por ambos métodos (Figura 3 y 4). El 91% de los recién nacidos con IgM positiva fueron de madres IgM negativa, mientras que por PCR el 93% de niños positivos venían de madres negativas. Valores que nos dan a conocer la significativa prevalencia de Citomegalovirus congénito en recién nacidos de madres aparentemente sanas en el tercer trimestre del embarazo (Figura 5).

Con respecto a la PCR se obtuvo que la IgM presenta una sensibilidad del 56% y una especificidad del 81% para el diagnóstico de infección por Citomegalovirus en mujeres embarazadas en el último trimestre de embarazo y el recién nacido.

Tablas y figuras:

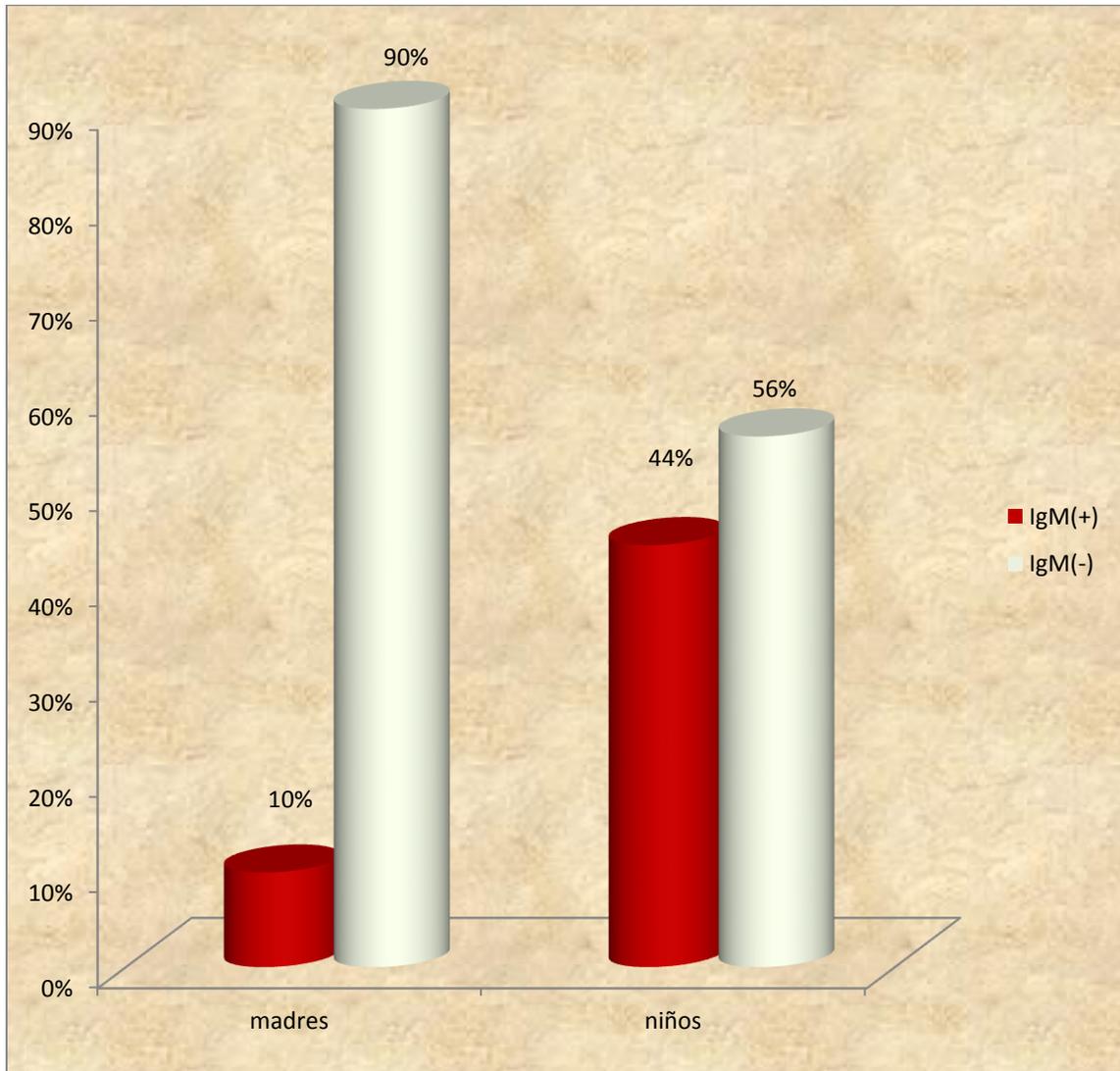
Tabla 1. Resultados de IgM y Nested PCR para Citomegalovirus en mujeres embarazadas y su recién nacido.

| <u>N-PCR</u> | Niños (+) | Niños (-) | Niños blanco* | Total |
|---------------------|-----------|-----------|---------------|-------|
| Madres (+) | 2 | 11 | 0 | 13 |
| Madres (-) | 26 | 46 | 4 | 76 |
| Madres Blanco* | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Total | 28 | 57 | 5 | 90 |
| <u>IgM</u> | Niños (+) | Niños (-) | Niños blanco* | Total |
| Madres (+) | 3 | 5 | 0 | 8 |
| Madres (-) | 30 | 38 | 4 | 72 |
| Madres blanco* | 2 | 1 | 7 | 10 |
| Total | 35 | 44 | 11 | 90 |

*muestras que no pudieron ser leídas o procesadas debido a que se degradaron.

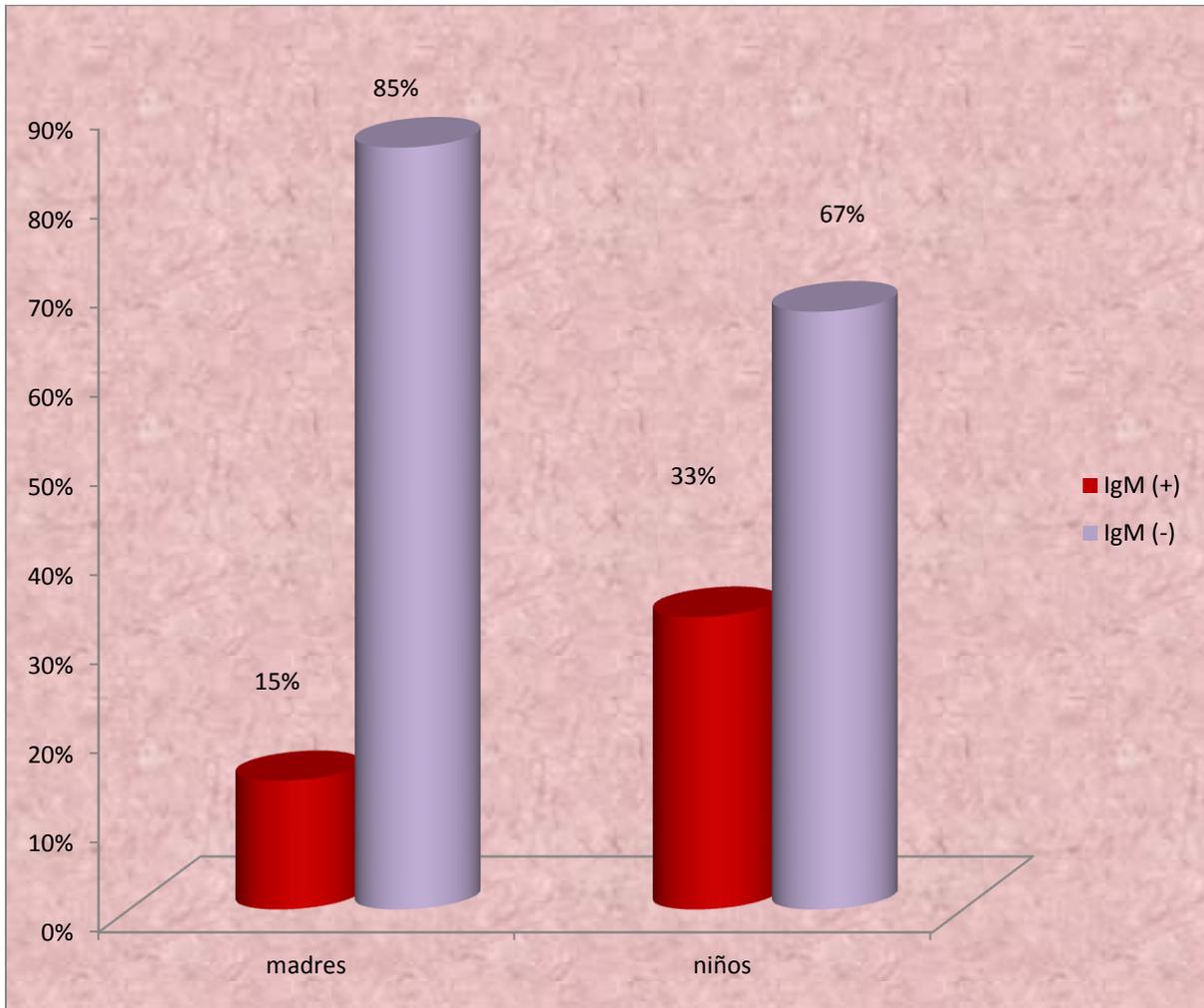
Fuente: Tabulación de resultados obtenidos por la técnica ImmunoLISA CMV IgM Capture de Origenics y por Nested polimerase chain reaction.

Figura 1. Prevalencia de mujeres embarazadas y sus recién nacidos con anti CMV IgM (+) y (-).



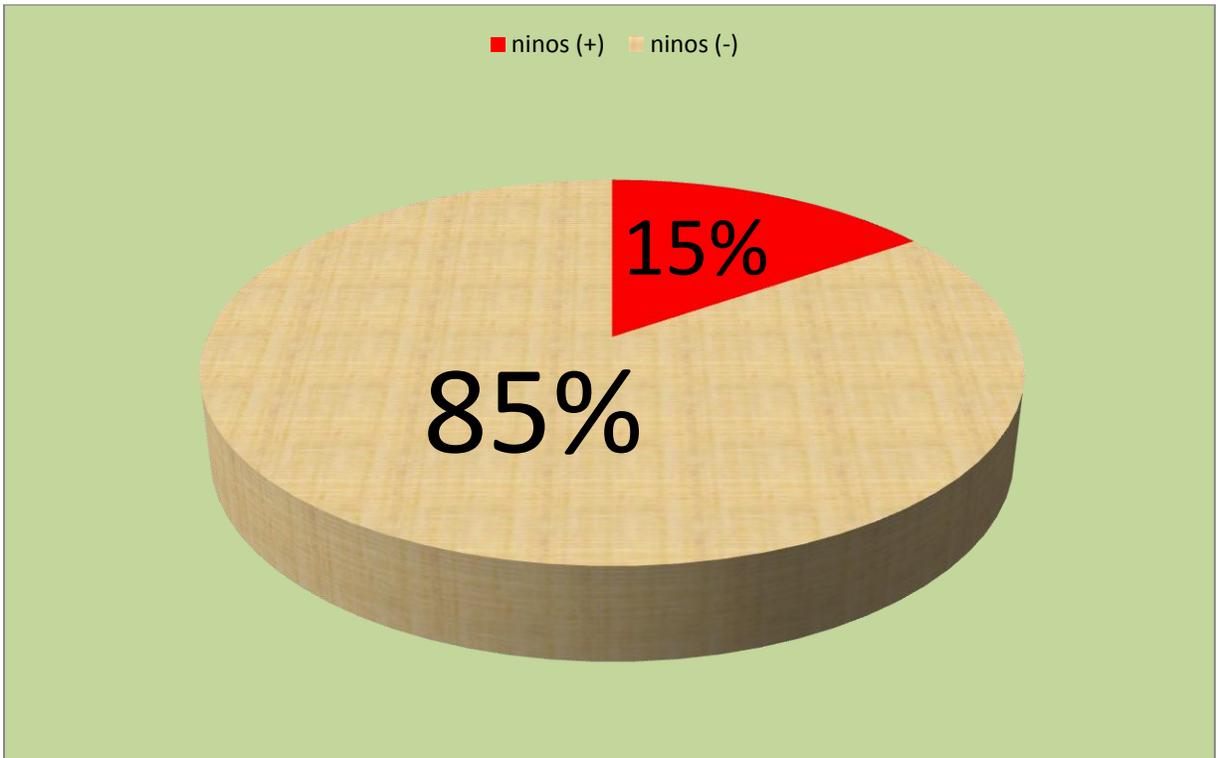
Fuente: Tabulación de resultados obtenidos por la técnica ImmunoLISA CMV IgM Capture de Orgenics.

Figura 2. Prevalencia de mujeres embarazadas y sus recién nacidos con PCR (+) y (-) para CMV.



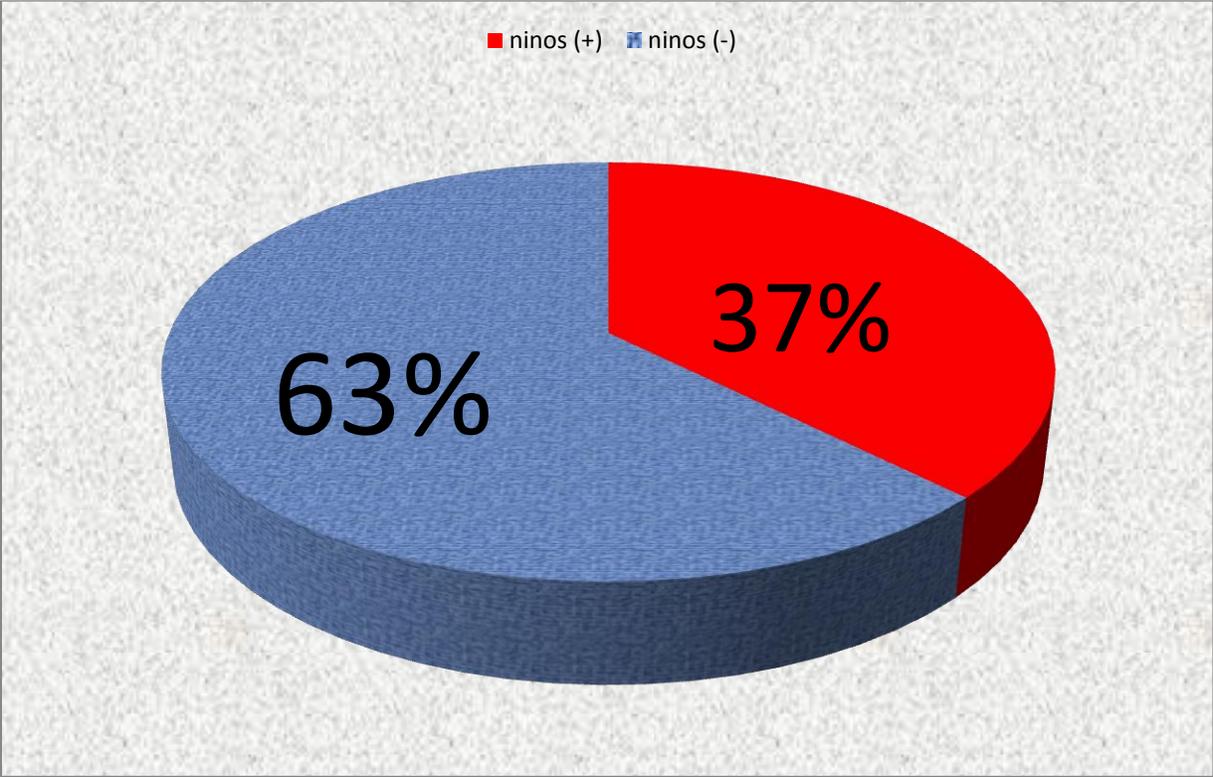
Fuente: Tabulación de resultados obtenidos por la técnica Nested Chain Polymerase Reaction.

Figura 3. Tasa de transmisión vertical de Citomegalovirus congénito de madres PCR (+).



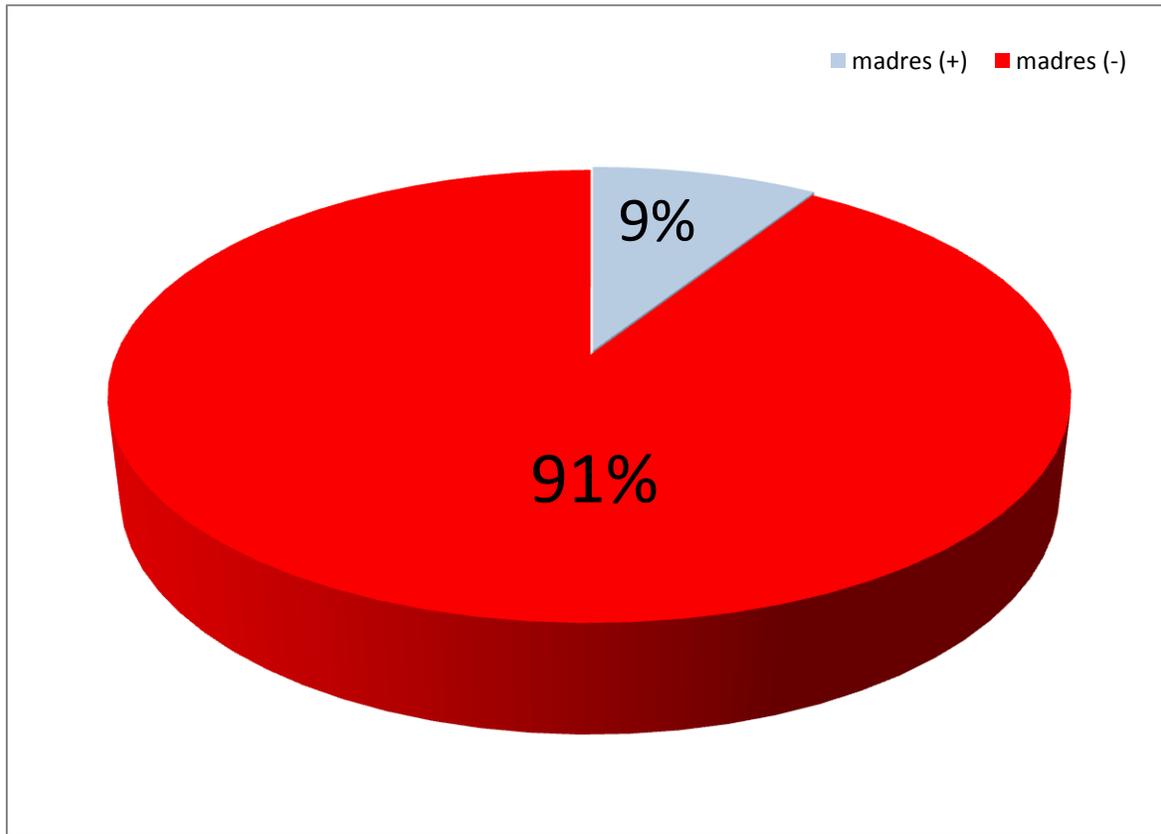
Fuente: Tabulación de resultados obtenidos por la técnica Nested Chain Polimerase Reaction.

Figura 4. Tasa de transmisión vertical de Citomegalovirus congénito de madres IgM (+).



Fuente: Tabulación de resultados obtenidos por la técnica ImmunolISA CMV IgM Capture de Organics.

Figura 5. Prevalencia de niños con CMV congénito de madres IgM (-).



Fuente: Tabulación de resultados obtenidos por la técnica ImmunoLISA CMV IgM Capture de Organics.

Discusión:

La infección por CMV es reconocida como la principal causa de infección congénita en humanos con una incidencia de 0,2 a 2,4% y la seroprevalencia de anticuerpos en mujeres gestantes oscila entre el 83% y 100% siendo más frecuente en países subdesarrollados como el nuestro (12). Varios estudios han sido publicados a nivel internacional acerca de la eficacia de la PCR, entre ellos un estudio realizado en Sao Paulo, Brasil que comparó el método ELISA con la PCR reveló que de 243 pacientes embarazadas de las cuales 94.6% eran IgG positivas solo 0.8% fueron antiCMV IgM positivas mientras que el 21.9% lo fueron por PCR estableciendo la superioridad de la PCR sobre la serología (4).

Debido que los falsos positivos por la contaminación cruzada es un problema en la Nested PCR (13), en nuestro estudio se tomaron medidas de precaución estrictas tales como cambio frecuente de guantes, procesamiento de muestras en diferentes laboratorios para manejo de los reactivos y ADN, desinfección de las áreas de trabajo con etanol y luz UV previo al inicio del procesamiento, etc.

El presente estudio reveló que el 10% de las gestantes y el 44% de los recién nacidos eran IgM positivo y por PCR el 15% de gestantes y 33% de los recién nacidos fueron positivos. Resultados que si bien denotan superioridad de la PCR sobre la serología en las gestantes al igual que los de publicaciones anteriores no es con un porcentaje significativo como es lo acostumbrado posiblemente porque el universo y el grupo de estudio fue diferente y no se evaluó la IgG para conocer que mujeres embarazadas contaban con inmunidad previa para Citomegalovirus y así saber quienes tenían mayor riesgo de reactivar la infección por la inmunosupresión del embarazo y quienes no estaban inmunizadas y se trataba de una primo infección para así dividir las y estudiarlas en subgrupos. Sin embargo, en este estudio, evaluamos a las pacientes como un todo debido que el objetivo es definir el test de screening rutinario lo suficientemente competente para la mayoría, si no es para todas las pacientes.

Otro motivo por la cual puede ser que no se hayan tenido valores altos de diferencia en la prevalencia entre ambos métodos es debido a los falsos positivos de la IgM para CMV en pacientes con infección de virus de Epstein Barr por reacción cruzada, algo que comúnmente suele suceder(14). También como concluyó Bastien et al, la PCR no es una técnica aislada, por el contrario involucra un conjunto de técnicas (15), tales como la extracción del ADN y la preparación del master mix con iniciadores diferentes y esto también tenga influencia sobre la eficacia de la amplificación por múltiples factores.

Con respecto a la prevalencia de niños infectados de madres aparente sanas por serología 91% y 93% por PCR, definitivamente es una cifra alarmante que traduciría infección neonatal en el transcurso del embarazo, desapareciendo en la madre y permaneciendo en el feto motivo por el cual sería imprescindible el screening no solo durante el primer trimestre del embarazo sino a lo largo del mismo para no posponer el tratamiento y evitar secuelas a largo plazo en el recién nacido iniciándolo intrauterino(16). Este resultado se correlaciona con lo ya publicado dado que el riesgo de transmisión vertical es más alto durante la primera infección (aunque en este estudio se desconoce el valor de anti CMV IgG) variando según la edad gestacional y siendo más alta durante el tercer trimestre del embarazo (17, 18, 19).

Por PCR se obtuvo una tasa de transmisión vertical de CMV del 15% (tomando en cuenta que en esta se obtuvieron 13 madres positivas las cuales 2 transmitieron el virus) mientras que por serología fue del 37%(solo se obtuvieron 8 madres positivas de las cuales 3 transmitieron el virus), tenemos un gran porcentaje de diferencia entre ambos métodos, que puede traducir un alto número de falsos positivos de la IgM. Sin embargo, no se puede emitir un juicio de valor en el parámetro de transmisión vertical por tener cantidad limitada de muestras de madres positivas con hijos positivos, aparte que no necesariamente son las mismas madres que le transmitieron a sus hijos el virus por serología que por PCR.

La serología demostró baja sensibilidad (56%) y especificidad (81%) en este estudio que se correlacionan con cifras reportadas anteriormente 34.4% y 92.9% respectivamente (4) en comparación con la PCR.

En resumen la PCR es un método que provee resultados rápidos, sensibles y específicos para el diagnóstico de infección congénita por CMV, que puede detectar la presencia del virus incluso antes que la IgM (20), sobretodo si se trata de una recurrencia y para evaluar la tasa de transmisión vertical, si se la realiza correctamente. Debido que la prevalencia de niños infectados en el último trimestre del embarazo por CMV de madres aparentemente sanas es bastante alta habría que hacer un seguimiento durante todo el embarazo del mismo a madre e hijo para iniciar un tratamiento precoz y evitar secuelas a corto y largo plazo.

Referencias Bibliográficas:

- 1.- Yalauhari-Mejía JP, Arizmendi-Villanueva R, Cruz-Ramirez JL y col. Citomegalovirus congénito. Informe de caso. *Rev Esp Med Quir* 2010;15(1):38-40.
- 2.- Gaytant MA, Steegers EA, Semmekrot BA, Merkus HM, Galama JM. Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome. *Obstetrical and Gynecological Survey*. 2002 Apr;57(4):245-56.
- 3.- Knowledge and Practices of Obstetricians and Gynecologists Regarding Cytomegalovirus Infection During Pregnancy --- United States, 2007, *MMWR* Vol. 57, 65-68 (January 25, 2008).
- 4.- Alves SH, Rossi CL, De Souza CA, Vigorito AC, Botelho SC. Comparison of serology, antigenemia assay and the polymerase chain reaction for monitoring active cytomegalovirus infections in hematopoietic stem cell transplantation patients. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 48(5):275-278, (September-October, 2006).
- 5.- Warren WP, Balcarek K, Smith R, Pass RF. Comparison of rapid methods of detection of cytomegalovirus in saliva with virus isolation in tissue culture. *J Clin Microbiol* 1992 Apr;30(4):786-9.
- 6.-Distéfano A, Alonso A, Martin F, Pardon F. Human Cytomegalovirus: detection of congenital and perinatal infection in Argentina. *BMC Pediatr*. 2004 Jun; 4: 11.
- 7.- Shannon E. Nesbitt, Linda Cook, and Keith R. Jerome- Cytomegalovirus Quantitation by Real-Time PCR Is Unaffected by Delayed Separation of Plasma from Whole Blood. *J Clin Microbiol*. 2004 March; 42(3): 1296-1297. doi: 10.1128/jcm.42.3.1296-1297.2004.
- 8.- Manual de Organics. ImmunoLISA CMV IgM Capture. Lote 090304^a. Ref 80288000. 2010-05-30.
- 9.- Manual de Invitrogen. Purelink viral RNA/DNA kit. Versión C. 25-0916. 29 Nov 2006.
- 10.- Vroni G, Kalogeropoulos C, Gartzonika C, Priavali E, Levidiotou S. Usefulness of Herpes Consensus PCR methodology to routine diagnostic testing for herpesviruses infections in clinical specimens. *Virology* 2007, 4:59. doi:10.1186/1743-422X-4-59.
- 11.- Tenorio A, Echevarría JE, Casas I, Echevarría JM, Tabarés E. Detection and typing of human herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993;44:261-9.
- 12.- Seroprevalencia de la infección por Citomegalovirus en puérperas y su impacto neonatal. Estripeaut D, Moreno Y, Ahumada S, Martínez A, Racine JD, Sáez-Llorens X. *An Pediatr (Barc)* 2007: 135 – 139.
- 13.- Zhang Sh, Zhou Yi, Li Lei, Hu La. Monitoring Human Cytomegalovirus infection with Nested PCR: Comparison of positive rates in plasma and leukocytes and with quantitative PCR. *Virology* 2010, 7:73. Doi: 10.1186/1743-422X-7-73.

- 14.- Miendje Y, Goubau P, Bodéus M. False-Positive IgM Antibody Tests for Cytomegalovirus in Patients with Acute Epstein-Barr Virus Infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2000) 19 :557–560.
- 15.- Bastien P, Procop GW, Reischl U: Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *J Clin Microbiol* 2008, 46: 1897-1900.
- 16.- Jacquemard F, Yamamoto M, Costa J, Romand S, Jaqz Aigrain E, Dejean A, Daffos F, Ville Y. Maternal administration of valaciclovirin symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection. *BJOG* 2007; 114: 1113-21.
- 17.- Stagno S. Cytomegalovirus. In: Remington JS, Klein JO, editors. *Infectious diseases of the fetus and new-born infant*. Philadelphia: WB Saunders Co. 2001:389-424.
- 18.- Revello MG, Gema G. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2004; 29: 71-83.
- 19.- Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Lilleri D, Gorioni G, Gema G. Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional primary human cytomegalovirus infections. *J Infect Dis* 2002; 15:553-7.
- 20.- Pomsawan A, Surang T, Krisana P, Uraiwan CH, Suphawat K, Kruawan B, Janya J, Ruedevilai S. Rapid diagnosis of cytomegalovirus congenital infection in neonates. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 2001 March; 32(1): 154-157.