

Detección de citomegalovirus en plasma de pacientes con VIH mediante PCR dúplex en tiempo real

Detection of cytomegalovirus in plasma of patient's HIV by duplex real time PCR

Hilda Alicia Valdez-Salazar¹, Nancy Sánchez-Nájera², Rosa María Ribas-Aparicio³, Ericka Nelly Pompa-Mera⁴, José Antonio Mata-Marín⁴, Alejandro Gómez-Delgado¹, Penélope Aguilera⁵ y Martha Eugenia Ruiz-Tachiquín^{2*}

Resumen

Introducción: El citomegalovirus (CMV) es capaz de provocar enfermedades graves e incluso mortales en pacientes inmunocomprometidos. Es importante contar con pruebas moleculares de detección viral, sensibles y específicas, utilizando como blanco los genes clave para la replicación viral. En la detección molecular de CMV se han utilizado los genes UL122 (replicación) y UL83 (proteína más abundante del tegumento).

Objetivo: Detectar y cuantificar el CMV mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dúplex en tiempo real, a partir de una mínima cantidad de plasma.

Material y métodos: Los genes UL122 y UL83 se amplificaron con diferentes fluoróforos mediante PCR dúplex en tiempo real. Para cuantificar el CMV se generó una recta estándar, a partir de DNA del CMV (1.0-0.0000001 ng).

Resultados: El rango dinámico de la «recta maestra» tuvo una pendiente (m) de -3.0 ; la eficiencia de amplificación fue del 115.44%; de los plasmas de pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con una carga viral $\geq 100,000$ copias/ml, el 11.36% fueron verdaderos positivos para CMV y el 88.64% no tuvieron amplificaciones o estuvieron fuera del rango lineal de detección molecular.

Abstract

Background: Cytomegalovirus (CMV) is able to cause serious and even deadly diseases in immunocompromised patients. It is important to have a sensitive, specific and molecular viral tests for its detection, using as targets, key genes for viral replication. The following genes have been used in the molecular detection of CMV: UL122 (replication) and UL83 (most abundant protein of the tegument).

Objective: Detect and quantify CMV, by real-time duplex PCR, from a minimum amount of plasma.

Material and methods: The UL122 and UL83 genes were amplified with different fluorophores, by real-time duplex PCR. To quantify CMV, curves were generated, starting with DNA-CMV (1.0-0.0000001 ng).

Results: The dynamic range of "master" duplex straight had a pendent (m) -3.0 , the amplification efficiency was 115.44% plasmas from patients with HIV viral load $\geq 100,000$ copies/mL, 11.36% were true positive for CMV and 88.64% had no amplifications or they were outside of the linear range of molecular detection.

¹Instituto Mexicano del Seguro Social Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias; ²Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Oncología, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas; ³Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Posgrado en Biomedicina y Biotecnología Molecular; ⁴Instituto Mexicano del Seguro Social Centro Médico Nacional La Raza, Hospital de Infectología, Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología; ⁵Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", Laboratorio de Patología Vasculard, Cerebral. Ciudad de México, México

Correspondencia:

*Martha E. Ruiz-Tachiquín
E-mail: mertachiquin@gmail.com
2448-5667 / © 2020 Instituto Mexicano del Seguro Social. Publicado por Permayer. Éste es un artículo *open access* bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Fecha de recepción: 12/08/2019

Fecha de aceptación: 09/12/2019
DOI: 10.24875/RMIMSS.M20000013

Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2020;58(2):154-160
<http://revistamedica.imss.gob.mx/>

Conclusiones: Esta prueba identificó dos genes importantes del CMV (UL122 y UL83) en una sola reacción (FAM:VIC), y se ratificó la detección viral a partir de una mínima cantidad de plasma. Esto se traduce en una menor cantidad de muestra biológica requerida y sumaría una herramienta al área clínica, así como un menor consumo de reactivos y materiales.

Palabras clave: Citomegalovirus; Reacción en Cadena de la Polimerasa; Plasma; UL122; UL83

Introducción

El citomegalovirus (CMV) es un beta-herpesvirus de distribución mundial, lo que hace que las infecciones por él producidas sean muy comunes. La Organización Mundial de la Salud estimó que el 40% de la población adulta ha sido infectada con este virus.¹ Los estudios realizados en América Latina, a través de detecciones serológicas en mujeres fértiles, reportan una incidencia en Brasil del 40%, en Chile del 60%, en Costa Rica del 95%, en Venezuela del 93.3% y en México del 58%.² Alvarado-Esquivel, et al.³ realizaron detecciones serológicas en mujeres embarazadas en el Estado de Durango, en México, y encontraron que 225 de 343 (65.59%) resultaron positivas a anticuerpos IgG-CMV.

Algunos grupos de individuos en los que el CMV causa deterioro de la salud por eventos de infección primaria, reactivación o reinfección son los pacientes inmunocomprometidos, como los receptores de trasplante de órganos, con cáncer, aquellos a los que se les está practicando hemodiálisis y los infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).⁴ Por ello, es muy importante tener métodos para la detección certera y rápida del CMV (virus oportunista) en este tipo de pacientes. En la detección molecular del CMV se han utilizado los genes UL122 (*le2*), *immediate early gene*, implicado en la replicación, y UL83 (*pp65*), *late gene*, gen precursor de la proteína más abundante del tegumento. En nuestro estudio se amplificaron los genes UL122 y UL83 empleando diferentes fluoróforos para cada uno mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dúplex en tiempo real.

Método

El proyecto se realizó de acuerdo con las normas de la Declaración de Helsinki de 1975 y sus enmiendas, y los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas de investigación clínica; asimismo, fue aprobado por la Comisión Nacional de

Conclusions: This test identified two important CMV genes (UL122 and UL83) in a single reaction (FAM:VIC), viral detection was confirmed from a minimum amount of plasma. This mean a smaller amount of biological sample required and would add a tool to the clinical area, as well as a lower consumption of reagents and materials.

Keywords: Cytomegalovirus; Polymerase Chain Reaction; Plasma; UL122; UL83

Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social (número de registro 2005-785-130).

Las muestras de plasma-VIH recolectadas fueron de pacientes VIH vírgenes a tratamiento, de ambos sexos y mayores de edad. Las cargas virales se determinaron con COBAS AMPLICOR HIV MONITORTM Test (CAHM, Roche Diagnostics, PCR punto final) y COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test (CACM, Roche Diagnostics, PCR punto final), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se utilizaron muestras de plasma de individuos negativos a CMV y VIH como controles negativos, y como controles positivos se utilizó DNA estándar del CMV de la cepa AD-169 del ATCC [(DNA-HCMV STRAIN AD-169, BSL: 1-VR-538D) (Lote 57847407, USA)].

A partir de 200 µl de plasma se extrajo el DNA de pacientes VIH con QIAamp UltraSens Virus Kit (QIAGEN®, Hilden, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinaron la concentración y su pureza (260/280) en el espectrofotómetro EPOCH (BioTek Instruments, Inc., VT, USA).

Como control interno y de calidad del DNA su usó el kit Multiplex PCR Qiagen GmbH, Hilden, Alemania. En esta reacción se amplificaron siete fragmentos (100-700 pares de bases [pb]) del gen gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH, gen *housekeeping*). Las secuencias de los cebadores empleados fueron descritas por Utrera-Barillas, et al.⁵ La mezcla de reacción de PCR (12.5 µl) contenía 1X Master mix, 0.2 µM de cada cebador o *primer*, y 5 ng de DNA. La amplificación se hizo en el termociclador MasterCycler GSX1 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) como sigue: 95 °C por 15 minutos, seguida por 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 90 segundos y 72 °C por 90 segundos, y una extensión final de 72 °C por 10 minutos. Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con un marcador de DNA de 100 pb (Promega Corporation, WI, USA), teñido con 1X GelRedTM (Biotium, Inc., CA, USA), y visualizados con luz ultravioleta en un

transiluminador acoplado a un sistema de fotodocumentación (Syngene, MD, USA).

Para la estandarización de la técnica se utilizó el DNA-CMV estándar (ATCC, DNA-HCMV STRAIN AD-169, BSL: 1-VR-538D) y se realizaron diluciones seriadas (1.0, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0.000001, 0.0000001 ng/μl) (Cuadro I) para la construcción de la «recta maestra» y equivalencias a número de copias.

Se utilizó Universal Master Mix 2X de Kappa Biosystems™ 2X (MA, USA), además de los cebadores UL122 y UL83 (200 nM, Applied Biosystems™, NY, USA) y sondas TaqMan® UL83-FAM, UL122-VIC (200 nM, Applied Biosystems™, NY, USA); las secuencias se muestran en el cuadro II. Cabe señalar que el diseño de estas fue realizado por nuestro grupo de trabajo.

Se prepararon el cóctel de reacción Universal Master Mix 2X (Kappa Biosystems™) y los cebadores y sondas correspondientes en un volumen final de reacción de 20 μl. Antes de colocar la placa dentro del termociclador, se centrifugó a 3800 rpm durante un minuto (centrífuga marca Eppendorf, modelo 5810). Se programó el termociclador 7500 (Applied Biosystems™) con el siguiente programa: 2 minutos a 60 °C, 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

Se realizó una prueba de detección molecular PCR en tiempo real dúplex de los genes virales U122 y UL83 utilizando sondas TaqMan® marcadas con dos diferentes fluoróforos (Cuadro II). Se obtuvieron los valores de Ct (ciclo umbral promedio) y se llevaron a cabo los análisis pertinentes.

Análisis estadístico

Además del coeficiente de determinación (R^2) para evaluar los ensayos de PCR en tiempo real dúplex, a través del rango dinámico de detección, se propuso cuantificar la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivo y negativo de la prueba, tomando como referencia a CACM, porque es un método comercial validado y semiautomatizado, que se empleó en los laboratorios de pruebas para la detección molecular de CMV en plasma.

Resultados

Se analizaron 132 plasmas de pacientes VIH, de los cuales 15 (11.36%) fueron mujeres, con un promedio de edad de 36.26 ± 9.77 años, y 117 (88.63%)

Cuadro I. Datos experimentales para la construcción de la «recta maestra» para cuantificar UL83 y UL122, a partir de ATCC, DNA-HCMV STRAIN AD-169, BSL: 1-VR-538D

DNA-HCMV	Log10 [DNA-HCMV]	Número de copias CMV
1 ng	0	4.04 E+06
0.1 ng	-1	4.04 E+05
0.01 ng	-2	4.04 E+04
0.001 ng	-3	4.04 E+03
0.0001 ng	-4	4.04 E+02
0.00001 ng	-5	4.04 E+01
0.000001 ng	-6	4.04 E+00
0.0000001 ng	-7	1

hombres, con un promedio de edad de 34.18 ± 9.03 años. Las cargas virales del VIH tuvieron un rango de 100,000 a 1,540,000 copias/ml (CAHM, Roche Diagnostics) y la cuantificación de linfocitos CD4 fue ≥ 200 (datos obtenidos del expediente clínico). Las cargas virales del CMV (CACM, Roche Diagnostics) fueron negativas en todos los plasmas de pacientes VIH.

Las cargas virales del CMV (CACM, Roche Diagnostics) fueron negativas en todos los plasmas de pacientes VIH.

Las concentraciones de los DNA de los plasmas de los pacientes VIH tuvieron rangos de 0.6815 a 161.9455 ng/μl y una pureza (260/280) de 1.49-1.82.

Los 132 DNA de los plasmas de los pacientes VIH se sometieron a una PCR múltiple punto final para amplificar diferentes regiones del gen GAPDH. Todas las muestras amplificaron al menos una banda de 100 pb. Dado que los tamaños de los amplicones de la PCR dúplex en tiempo real fueron de 96 pb-UL122 y 84 pb-UL83, se determinó que las muestras deberían amplificar 100 pb del gen GAPDH para asegurar, verificar o validar la calidad y la homogeneidad del DNA extraído.

Se generó una «recta maestra» a partir de diluciones seriadas del DNA del CMV (ATCC, DNA-HCMV STRAIN AD-169, BSL: 1-VR-538D) de 1.0-0.0000001 ng = 4 millones - 1 copias del CMV/ml (ocho puntos). La pendiente (m) fue de -3.0, equivalente a una eficiencia de amplificación del 115.44%. El valor de R^2 fue 1.0 para cuantificar UL83-FAM:UL122-VIC (Fig. 1) (Cuadro III).

Cuadro II. Cebadores y sondas utilizados para identificar CMV por PCR dúplex en tiempo real

Gen CMV	Amplicón pb	Cebador sentido	Cebador antisentido	Sonda TaqMan®
UL83	84	5'-GGGACACAACAC CGTAAAGC-3'	5'-GTGGAAGAGGACCT AACGATGAC-3'	FAM-5'-CCGCAACCCTT CATGC-3'-MGB-NFQ
UL122	96	5'-GGCTCACCTCGT CAATCTTGA-3'	5'-AGAAGGTGCGCCAA TATCATGAAAGA-3'	VIC-5'-CCCCCTTCTGCA CACCC-3' MGB-NFQ

Cuadro III. Datos experimentales para la construcción de la «recta maestra» para cuantificar UL83 y UL122, a partir de ATCC, DNA-HCMV STRAIN AD-169, BSL: 1-VR-538D

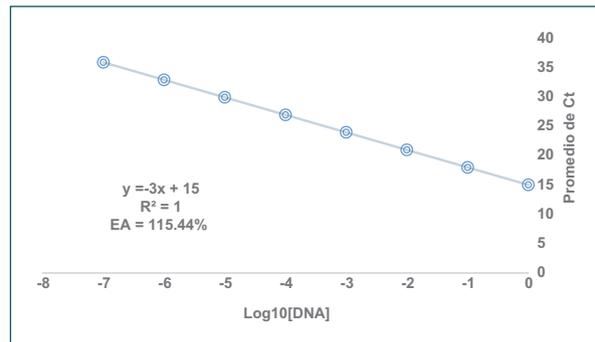
DNA-HCMV	Log10 [DNA-HCMV]	Número de copias HCMV	Ct
1 ng	0	4.04 E + 06	15
0.1 ng	-1	4.04 E + 05	18
0.01 ng	-2	4.04 E + 04	21
0.001 ng	-3	4.04 E + 03	24
0.0001 ng	-4	4.04 E + 02	27
0.00001 ng	-5	4.04 E + 01	30
0.000001 ng	-6	4.04 E + 00	33
0.0000001 ng	-7	1	36
Pendiente			-3
R ²			1
Eficiencia de amplificación			115.44%

Los 132 DNA de plasmas de pacientes VIH se sometieron a la PCR dúplex en tiempo real (qPCR) UL122-VIC:UL83-FAM (qPCR-dúplex). En la prueba, 10 muestras (7.57%) fueron positivas a UL122-VIC y cinco (3.78%) a UL83-FAM.

En 117 (88.64%) DNA de plasmas de pacientes VIH no se obtuvo el valor de Ct ni señal de amplificación en la qPCR-dúplex.

Se cuantificó el número de copias del CMV de las muestras y el rango fue de 1 a 254/ml.

Debido al bajo número de muestras en las que se observó amplificación de los genes diana y a la prueba con que se compararon estos resultados, la cual tiene una sensibilidad menor (400,000-400 copias/ml), no fue posible determinar el valor predictivo positivo, el valor predictivo negativo, la sensibilidad ni la especificidad, ya que las detecciones por qPCR fueron más sensibles y específicas.

**Figura 1.** «Recta maestra» de ocho puntos para la cuantificación de UL122 y UL83 de 1.0-0.0000001 ng de ATCC, DNA-HCMV STRAIN AD-169, BSL: 1-VR-538D.

Discusión

La prueba de detección viral propuesta en este trabajo, la PCR dúplex en tiempo real para la identificación de los genes UL122 y UL83 en una sola reacción, fue reproducible. De acuerdo con los valores obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo⁶, los valores de Ct fueron similares a los encontrados en reacciones individuales.

Para evaluar los ensayos de PCR dúplex en tiempo real se estableció el rango dinámico de detección. El valor de R² fue de 1.0. De acuerdo con Martínez-Rodríguez,⁷ este valor debe ser > 0.99 e idealmente 1.0, lo que se traduce como una relación lineal y un ajuste entre los ejes de abscisas y ordenadas al origen en la serie de valores analizados.

En cuanto a la ecuación de la recta, el valor de la pendiente (*m*) permite calcular la eficiencia de amplificación. Este valor en la recta generada fue > 100, el cual se obtuvo de ocho diluciones (ocho puntos para construir la «recta maestra») del DNA estándar del CMV. De acuerdo con el manual de Applied Biosystems de 2010 para el Termociclador 7500 (como el que se utilizó en esta prueba), se recomienda utilizar cinco o seis diluciones del DNA estándar, y que en esta serie de diluciones, al momento de graficar los promedios

de Ct obtenidos, el valor de m sea cercano a -3.32 , lo que corresponde a una eficiencia ideal del 100%.⁸

Se construyó una recta de cuantificación viral con datos experimentales. Para este ensayo, los cebadores y las sondas fueron seleccionados con base en regiones de genes importantes en la replicación del CMV; asimismo, se eligieron regiones conservadas del virus y exclusivas para la cepa AD-169, que es la de mayor circulación en el continente americano.⁹ Es importante que sean secuencias cortas y que los fragmentos a amplificar sean pequeños y con bajo contenido de guaninas y citosinas para facilitar la amplificación. También, los iniciadores deben tener una temperatura de fusión similar, no formar estructuras secundarias y carecer de complementariedad entre ellos.^{10,11,12} La importancia de las secuencias bien conservadas aumenta la especificidad analítica de la prueba. Además, permite discriminar entre diferentes herpesvirus, como reportaron Qiu, *et al.*,¹³ quienes con PCR dúplex en tiempo real empleando n cebadores y sondas específicas para dos virus de la hepatitis (A y E) en la misma reacción pudieron distinguir entre uno y otro.

En la actualidad se utiliza la PCR dúplex en tiempo real como un método para poder diferenciar cepas bacterianas, como *Anaplasma phagocytophilum* y *Ehrlichia chaffeensis*, en pacientes infectados.¹⁴ En 2011, Sun, *et al.*¹⁵ corroboraron la infección por virus de la hepatitis B en 69 de 100 muestras de suero sometidas a PCR dúplex en tiempo real al amplificar dos fragmentos del virus. Además, construyeron una «recta maestra» y cuantificaron el número de copias del virus de la hepatitis B. Estos datos fueron comparables a los resultados de la prueba COBAS Ampliprep/Cobas TaqMan (CAP/CTM) HBV assay, y superiores a la sensibilidad de la prueba antes mencionada.

Por otro lado, Kwon, *et al.*¹⁶ compararon la detección de CMV mediante PCR en tiempo real o mediante un ensayo de antigenemia. Utilizaron la plataforma semiautomatizada para PCR en tiempo real *Q-CMV real-time complete kit* (Nanogen Advanced Diagnostic, SrL, Italia), que amplificó una región del gen UL123. En el ensayo de antigenemia (*CMV antigenemia assay*, CINA Kit, ArgeneBiosoft, Francia) se identificó la proteína pp65. Dichos ensayos fueron probados en 479 muestras de plasma de pacientes que tenían alguna enfermedad inmunosupresora, y observaron que la PCR en tiempo real identificó como positivas 156 muestras, mientras que el ensayo de antigenemia identificó 99. Por lo tanto, se asumió que los resultados cuantitativos de la PCR en tiempo real tuvieron una buena correlación con los resultados del ensayo de antigenemia para

el CMV. Además, este resultado sugirió que la PCR en tiempo real podría ser un método eficaz para la detección temprana de la infección por CMV.

En nuestro ensayo, los resultados obtenidos fueron comparados con la prueba utilizada regularmente para la detección del CMV (COBAS AMPLICOR CMV MONITOR Test, CACM, Roche Molecular Systems, Alameda, CA). En esta prueba se amplificó por PCR en punto final una región del gen de la polimerasa del CMV y se generó un amplicón de 362 pb.^{17,18} Los límites de detección del ensayo fueron de 400 a 400,000 copias/ml de plasma.¹⁹ Esta prueba molecular se ha utilizado ampliamente para la detección viral en plasma de pacientes²⁰ y fue la de referencia en nuestro universo de muestras, ya que contamos con estos datos por un trabajo previo de nuestro grupo de investigación.⁶

La sensibilidad analítica de la prueba desarrollada en este trabajo pudo cuantificar de 1 a 4 millones de copias experimentalmente, lo que permitió identificar en el grupo de muestras analizadas menos copias virales por mililitro de plasma frente a la PCR en punto final. Por otro lado, identificar dos regiones virales (en una sola reacción) es importante (UL122 y UL83) porque permitió confirmar el resultado (las amplificaciones de las dianas), como ya se describió anteriormente para el virus de la hepatitis B.

Aunado a esto, en nuestra prueba PCR dúplex en tiempo real se puede obtener información acerca del estado de replicación del virus, debido a que el UL122 es un gen inmediato temprano, un regulador transcripcional activo y uno de los más importantes en este proceso de la biología viral,²¹ por lo que, al amplificarlo en la muestra, sería indicio de infección activa en el paciente. Respecto al gen UL83, este es un gen tardío, dependiente de la expresión del gen UL122, y codifica para la proteína principal del tegumento viral (pp65);²² la sola amplificación de este fragmento indicaría la presencia de CMV en el individuo. Debido a esto, identificar ambos genes en una sola reacción es importante para poder conocer la presencia del virus en la muestra e inferir sobre su estado de replicación, más las pruebas de serología correspondientes y la evaluación clínica del paciente.

Del total de las muestras ($n = 132$) de plasma de pacientes VIH, 117 (88.64%) fueron verdaderos negativos a CMV, debido a que no hubo amplificación en ninguno de los genes diana por dos métodos diferentes e independientes (PCR en tiempo real y PCR punto final). Las 15 (11.36%) muestras restantes fueron positivas a CMV en un rango de 1 a 254 copias/ml. Aunque los valores de cuantificación no fueron «altos», se

sugiere corroborarlos con la evaluación clínica y otros análisis, y dar seguimiento al paciente. En algunos casos de donadores o receptores de trasplantes de órganos, el valor de corte para dar tratamiento es de 400 copias de CMV/ml.²³

Aunque la identificación molecular mediante una PCR dúplex en tiempo real tiene una alta sensibilidad, en la actualidad no hay acuerdo sobre el punto de corte ideal para el diagnóstico de infección por CMV. Por lo tanto, las decisiones de tratamiento deben hacerse con precaución, teniendo en cuenta las tendencias de la carga viral y la sensibilidad de los métodos utilizados en los laboratorios, y no solo confiar en el valor absoluto de una sola prueba.¹⁶

Conclusiones

El diseño de esta prueba tiene ventajas sobre otras. La detección simultánea de dos blancos virales permite ratificar la detección de CMV en una sola reacción. La elección de los blancos virales que se proponen en este estudio son de regiones altamente conservadas y exclusivas del CMV cepa AD169 (la de mayor presencia en América), aunado a que es una prueba muy específica y sensible. Su rango de detección fue 10 veces más y 400 veces menos número de copias/ml de plasma frente a CACM. En cuanto a los blancos virales elegidos, UL122 y UL83, son genes que brindan información acerca del estado de replicación del virus, que es de vital importancia en pacientes cuyo sistema inmunitario está suprimido o deprimido. Finalmente, es una prueba rápida, ya que el resultado se obtiene en 4 horas, el gasto en recursos disminuye (en particular en la muestra biológica, la que regularmente es limitante) y permite optimizar el número de muestras analizadas por proceso.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Fondo de Investigación en Salud (Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social) por el financiamiento FIS/IMSS/ PROT/G10/820, y a la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Ciudad de México por el apoyo económico ICYTDF/240/2012 (PICSA 12-295) para la autora Martha E. Ruiz-Tachiquín, así como a la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS por la beca (número 2014-042) otorgada a N. Sánchez Nájera.

Conflicto de intereses

Los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflicto potencial de intereses del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado ninguno que tuviera relación con este artículo.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Referencias

- Gupta M, Shorman M. Cytomegalovirus. En: StatPearls. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459185/>
- Suárez PA, Monsalve-Castillo F, Romero AT, Costa-León L, Mindiola R, Castellano ME. Prevalencia de la infección por citomegalovirus en mujeres fértiles de comunidades indígenas Yukpa, estado Zulia, Venezuela. *Kasmera*. 2009;37(2):168-78.
- Alvarado-Esquivel C, Hernández-Tinoco J, Sánchez-Anguiano LF, Ramos-Nevárez A, Cerrillo-Soto SM, Estrada-Martínez S, et al. Seroepidemiology of cytomegalovirus infection in pregnant women in Durango City, Mexico. *BMC Infect Dis*. 2014;14:484.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV1 during 2000-2007. *AIDS*. 2011;25:679-89.
- Utrera-Barillas D, Valdez-Salazar HA, Gómez-Rangel D, Alvarado-Cabrero I, Aguilera P, Gómez-Delgado A, et al. Is human cytomegalovirus associated with breast cancer progression? *Infect Agent Cancer*. 2013;8(1):12. doi: 10.1186/1750-9378-8-12
- Ruiz-Tachiquín ME, Gómez-Delgado A, Valdez-Salazar HA, Aguilera P. Detection of cytomegalovirus by real-time PCR in HIV-positive plasm. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2014;52(6):624-9.
- Martínez-Rodríguez E. Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal. *Anuario Jurídico y Económico Escurialense*. 2005;38:315-32.
- Tse C, Capeau J. Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids. *Ann Biol Clin*. 2003;61(3):279-93.

9. Candeias JA, Stewien KE, Barbosa V. Estudo sorológico de infecções ocasionadas por citomegalovírus. *Revista Saúde Pública*. 1974;8(3):257-63.
10. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*. 1997;23(3):504-11.
11. Shum J, Paul N. Chemically modified primers for improved multiplex polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 2009;388(2):266-72.
12. Lee SH, Joung M, Yoon S, Choi K, Park WY, Yu JR. Multiplex PCR detection of waterborne intestinal protozoa: microsporidia, Cyclospora, and Cryptosporidium. *Korean J Parasitol*. 2010;48(4):297-301.
13. Qiu F, Cao J, Su Q, Yi Y, Bi S. Multiplex hydrolysis probe real-time PCR for simultaneous detection of hepatitis A virus and hepatitis E virus. *Int J Mol Sci*. 2014;15(6):9780-8.
14. Dong T, Qu Z, Zhang L. Detection of *A. phagocytophilum* and *E. chaffeensis* in patient and mouse blood and ticks by a duplex real-time PCR assay. *PLoS One*. 2013;8(9):e74796.
15. Sun S, Meng S, Zhang R, Zhang K, Wang L, Li J. Development of a new duplex real-time polymerase chain reaction assay for hepatitis B viral DNA detection. *Virology*. 2011;8:227.
16. Kwon S, Jung BK, Ko SY, Lee CK, Cho Y. Comparison of quantitation of cytomegalovirus DNA by real-time PCR in whole blood with the cytomegalovirus antigenemia assay. *Ann Lab Med*. 2015;35(1):99-104.
17. Kouzarides T, Bankier AT, Satchwell SC, Weston K, Tomlinson P, Barrell BG. Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene. *J Virol*. 1987;61(1):125-33.
18. PilailukAO, Suksomboon T, Peungpa A, Pholampaisathit S, Sawanpanyalert P. Comparison of HCMV loads using in-house quantitative CMV PCR, Artus CMV TM PCR and COBAS Amplicor CMV Monitor Test. *Silpakorn U Science & Tech J*. 2010;4(1):24-35.
19. Caliendo AM, St. George K, Kao SY, Allega J, Tan BH, LaFontaine R, et al. Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV antigenemia assay: clinical utility of the prototype AMPLICOR CMV MONITOR test in transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 2000;38(6):2122-7.
20. Binnicker MJ, Espy ME. Comparison of six real-time PCR assays for qualitative detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2013;51(11):3749-52.
21. Pizzorno MC, Mullen MA, Chang YN, Hayward GS. The functionally active IE2 immediate-early regulatory protein of human cytomegalovirus is an 80-kilodalton polypeptide that contains two distinct activator domains and a duplicated nuclear localization signal. *J Virol*. 1991;65(7):3839-52.
22. Arcangeletti M, Rodighiero I, Mirandola P, De Conto F, Covan S, Germini D, et al. Cell-cycle-dependent localization of human cytomegalovirus UL83 phosphoprotein in the nucleolus and modulation of viral gene expression in human embryo fibroblasts in vitro. *J Cell Biochem*. 2011;112(1):307-17.
23. Torre-Cisneros J, Castón-Osorio JJ, Martín C, Rivero A, Doblaz A, Rojas R, et al. Impact of initial cytomegalovirus viral load on efficacy of preemptive therapy with ganciclovir in allogeneic stem cell transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(1):6-12.

Cómo citar este artículo:

Valdez-Salazar HA, Sánchez-Nájera N, Ribas-Aparicio RM, Pompa-Mera EN, Mata-Marín JA, Gómez-Delgado A, et al. Detección de citomegalovirus en plasma de pacientes VIH mediante PCR dúplex en tiempo real. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2020;58(2):154-160.