

# DIAGNÓSTICO DE CMV CONGÉNITO POR NESTED-PCR

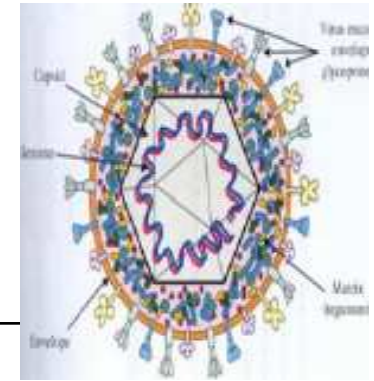
---

- Bertrand, María Victoria
- Flores, Antonio Ezequiel
- Goyechea, Roxana María Itatí
- Martínez, Silvina María



Inmunología Clínica 2009

# CITOMEGALOVIRUS: CARACTERISTICAS

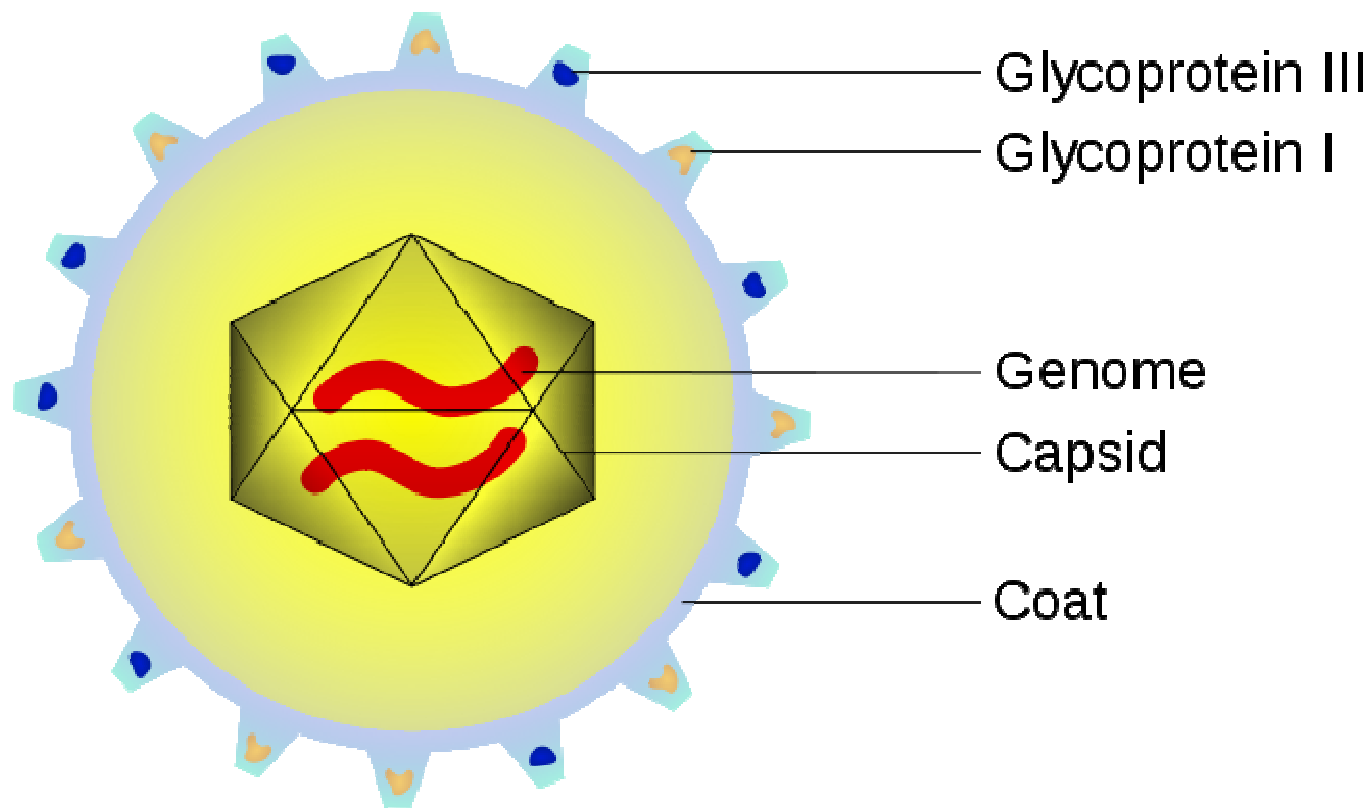


- Familia Herpesviridae
  - ✓ ADN lineal bicatenario
  - ✓ Cápside Icosaédrica de 80-100 nm
  - ✓ Tegumento
  - ✓ Envoltura trilaminar
  - ✓ Replicación y ensamblaje en el núcleo
- Subfamilia Betaherpesvirinae
  - ✓ Ciclo replicativo prolongado
  - ✓ Células diana: monocitos, linfocitos y epiteliales
  - ✓ Latencia en monocitos y Linfocitos
- Herpesvirus Humano 5

# CITOMEGALOVIRUS

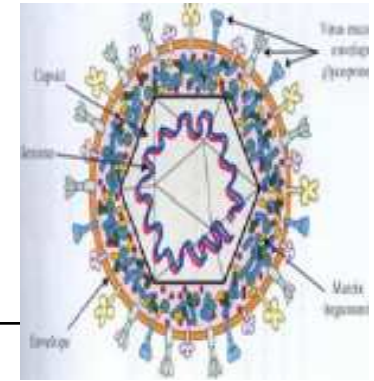
---

## Scheme of a CMV virus



# MODOS DE TRANSMISIÓN

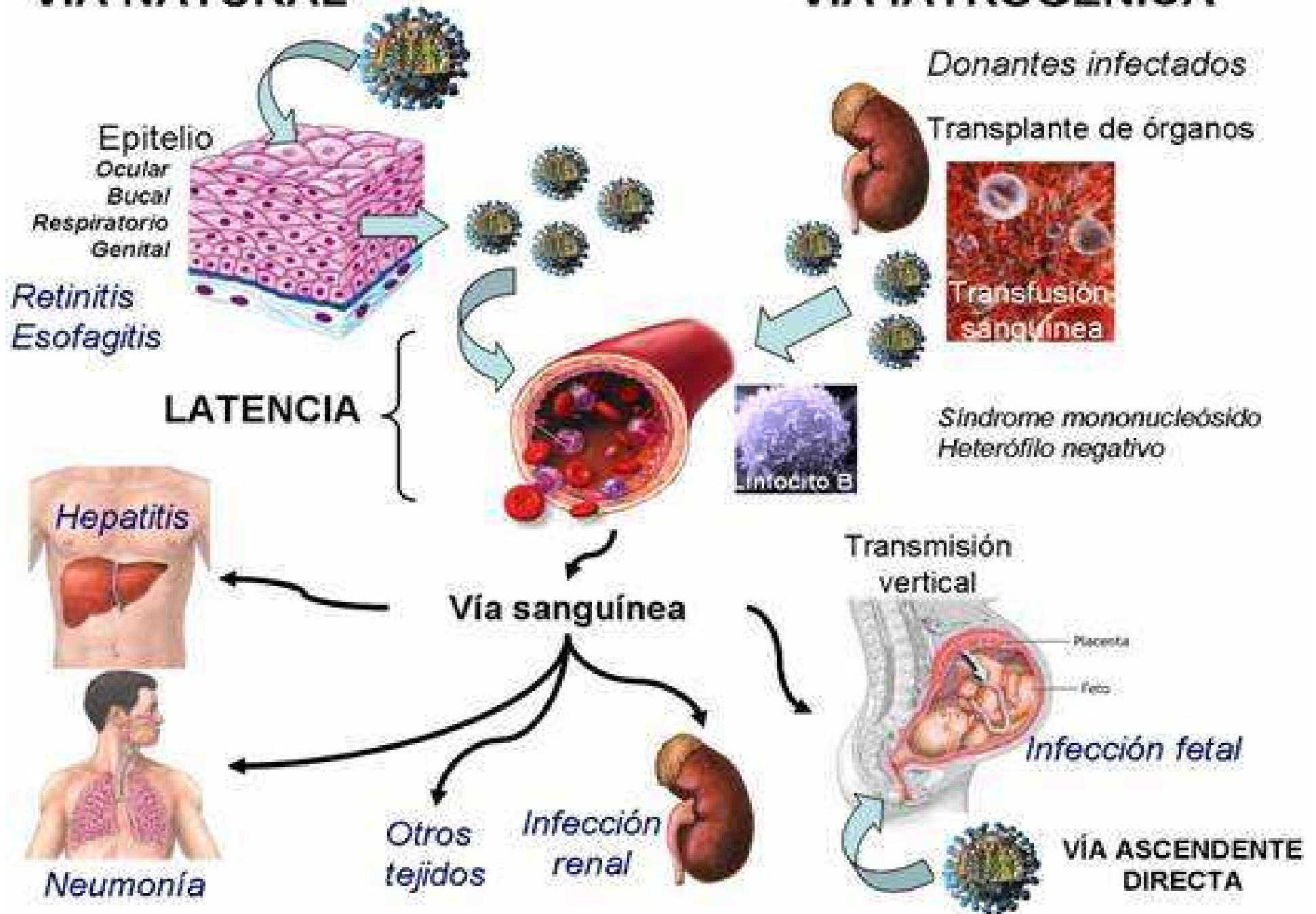
---



- **Recién Nacido:** Transmisión transplacentaria, Infección intrauterina, secreciones cervicales
- Lactante/Niño: leche materna, saliva, lagrimas, orina.
- Adulto: oral/respiratorio, semen, transfusiones, transplante de órganos.

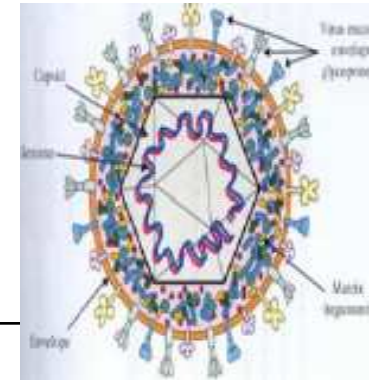
# VÍA NATURAL

# VÍA IATROGÉNICA



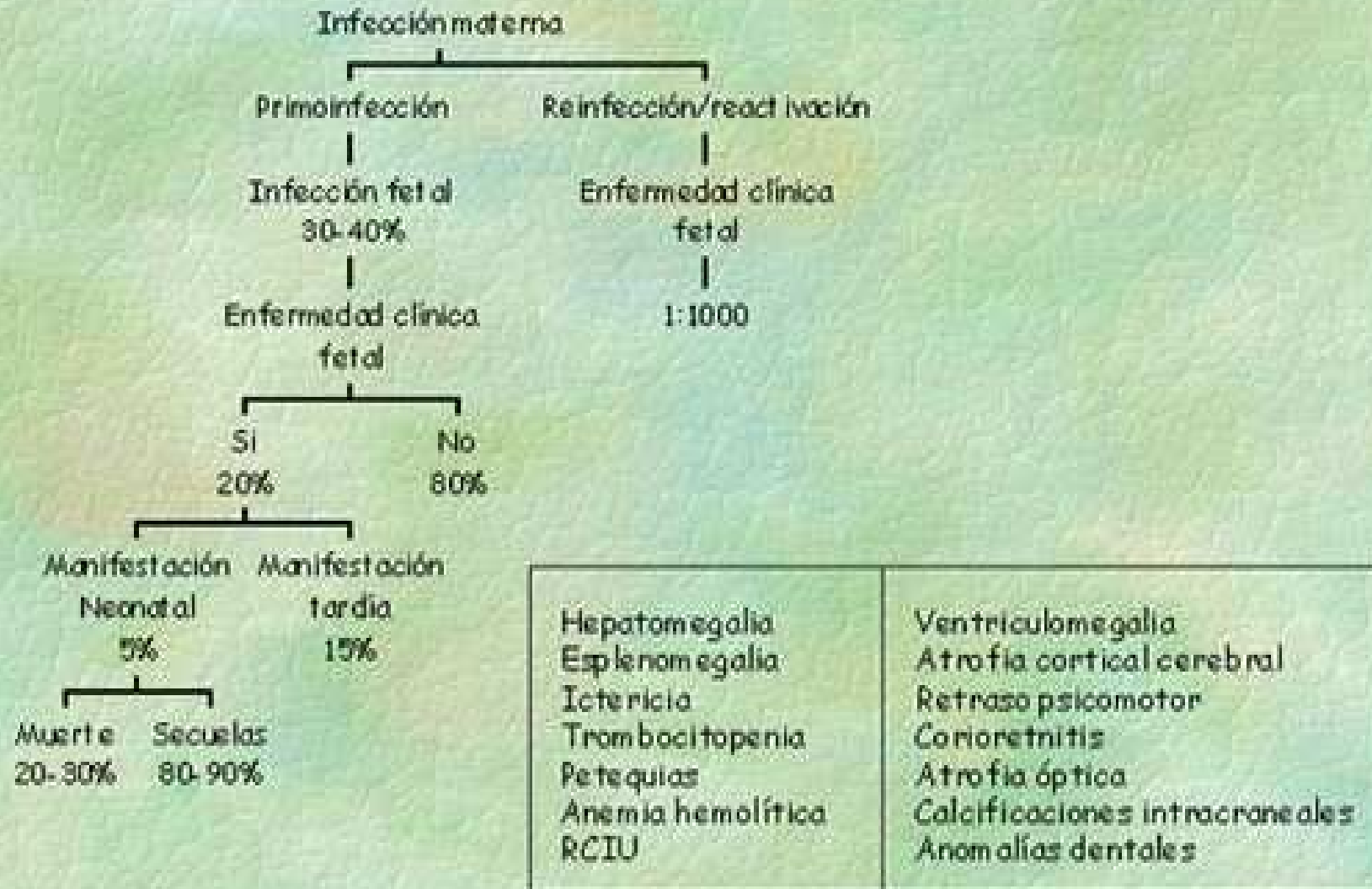
# CMV CONGÉNITO

---



La infección por CMV es la infección por virus más frecuente en el período de vida intrauterina y perinatal. La infección es a menudo asintomática, pero puede ser sintomática y en ocasiones grave en los niños pretérmino.

#### 4. Repercusión feto-neonatal de la infección por CMV



# CMV CONGÉNITO

---



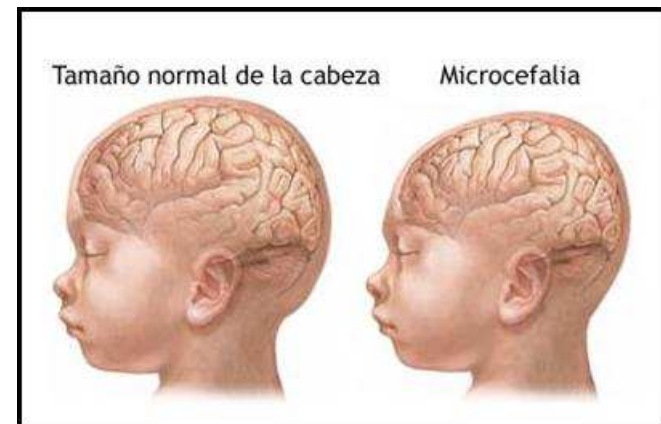
Recién nacido con hematomas múltiples y sangrado por boca, trombocitopenia severa en infección congénita por citomegalovirus.



# CMV CONGÉNITO



Recién nacido con infección congénita por citomegalovirus que presenta microcefalia severa, facies inexpresiva, y mirada perdida con ojos en puesta de sol. Debido a la incoordinación succión-deglución es necesaria la alimentación con sonda nasogástrica.



# CMV CONGÉNITO

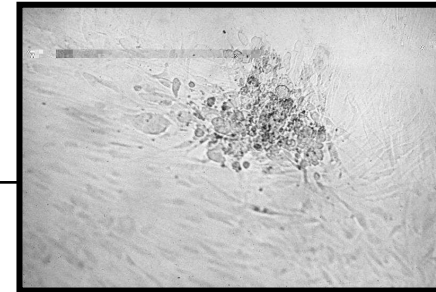
---



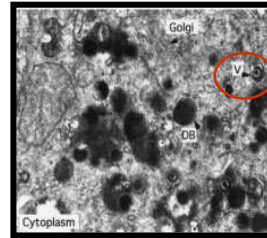
Gestación de 34 semanas.  
Radiografía anteroposterior  
cráneo de feto con infección  
congénita por  
citomegalovirus, en la que se  
observan calcificaciones  
intracraneales.

# Técnicas de Diagnóstico: directo

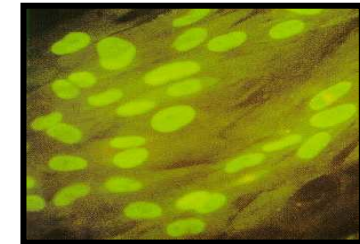
- ✓ **Cultivo celular:** línea de fibroblastos humanos, inoculación de la muestra, se sigue por 28 días con un pasaje a ciegas en día 14. observo efecto citopático focal . Muestras: orina, saliva, sangre, lavado bronco-alveolar o biopsia estéril



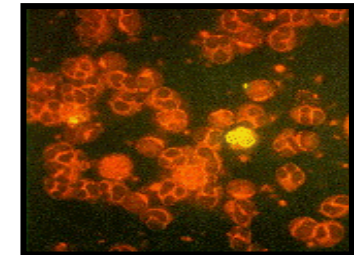
- ✓ **Microscopía electrónica:** infección congénita. No es rápida, operador entrenado, caro. Muestra: orina.



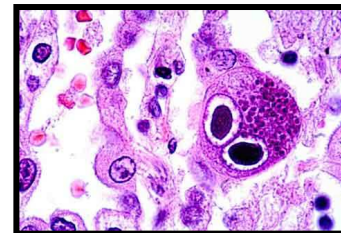
- ✓ **Detección de antígenos tempranos en focos de infección por fluorescencia (DEAFF o shell via):** se inocula la muestra sobre un cultivo de fibroblastos humanos sobre soporte especial, a las 24 hs se realiza inmunofluorescencia con Ac. anti-CMV (anti-pp72). Muestras: orina, saliva, sangre, lavado bronco-alveolar.



- ✓ **Antigenemia:** detección en la superficie de las células polimorfonucleares de sangre periférica de la proteína temprana CMV : antígeno pp65. Muestra: sangre,

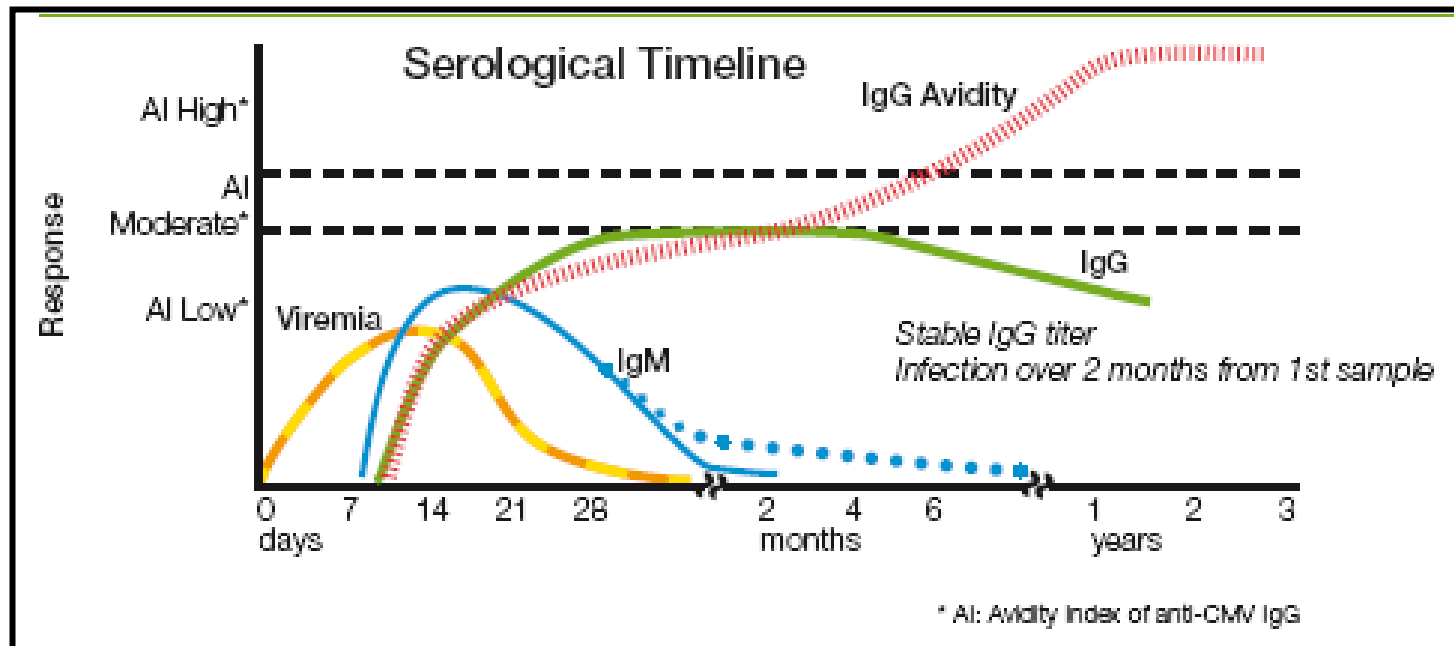


- ✓ **Histopatología:** observación de inclusiones citomegálicas típicas con apariencia de “ojo de búho” en biopsias. También se puede realizar IFI con ac. anti-CMV. Muestra: biopsia estéril

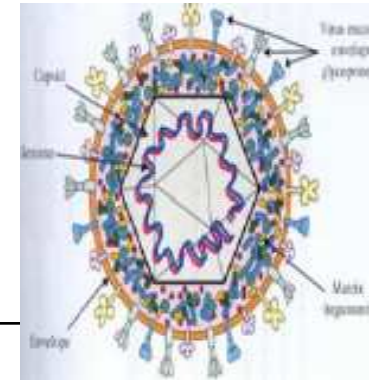


- ✓ **PCR ADN viral:** es rápida y sensible pero la presencia de genomas de CMV latentes en diversos tejidos dificulta la comprensión del resultado. Es crítico ajustar su sensibilidad. Útil en diagnóstico congénito en liquido amniótico o sangre de cordón Muestras: orina, saliva, sangre, lavado bronco-alveolar o biopsia estéril

# Infección Congénita: Serología Materna



# DIAGNÓSTICO



- Detección directa de CMV en orina, sangre o saliva en las primeras tres semanas luego del nacimiento. Ej. antigenuria por PCR o *shell vial*
- Presencia de IgM anti-CMV en el neonato.
- Detección de inclusiones citomegálicas en los tejidos afectados (raramente se realiza).
- Monitoreo con estudios clínicos



# NESTED-PCR

---

- Es una variación de la técnica de PCR tradicional (reacción en cadena de la polimerasa), que consiste en una segunda amplificación del primer producto mediante cebadores “primers” que flanquean un segmento ADN interno de este producto, aumentando aún más la sensibilidad y especificidad.



# NESTED-PCR:

## Preparación de la tarjeta de recolección

---

- Agregar 1-2 gotas de sangre entera en la tarjeta, asegurándose que el círculo demarcado quede saturado de sangre.
- Repetir el paso con dos o tres círculos más.
- Dejar secar la gota a temperatura ambiente por tres horas como mínimo.
- Almacenar en bolsas plásticas a 4°C o a temperatura ambiente en un lugar fresco.
- Realizar este almacenamiento en bolsas separadas para evitar la contaminación cruzada



# NESTED-PCR: Extracción del DNA

---

- Remover tres discos de 3mm de diámetro de las tarjetas con sacabocados y clocarlos en tubos eppendorf.
- Agregar 30 ml de MEM (medio mínimo de mantenimiento) sin aditivos a cada tubo.
- Antes de pasar a la próxima tarjeta ( próxima muestra), descontaminar el sacabocados por lavado con etanol 70% y flameado.
- Realizar un tubo control cada cinco muestras, de la misma forma, con tres discos tomados de una tarjeta blanco (sin sangre).
- Dejar en heladera hasta el día siguiente.
- Calentar los tubos a 55°C, durante 1 hora, y luego a 100°C por 7 minutos. Enfriarlos a 4°C rápidamente y centrifugar a 10000 rpm por 3 minutos.
- Transferir el sobrenadante a otro tubo eppendorf y llevar a -80°C por lo menos 1 hs o over night a -20 °C. El sobrenadante está listo para ser usado como molde en la reacción de PCR.
- Almacenar el sobrenadante a -20°C





# Preparación de la master mix

---

- Esta solución posee diversos componentes en concentraciones finales de:
- PCR Buffer: 1X
- Mg Cl<sub>2</sub>: 1.5mM
- dNTPs: 200μM
- Primer 1: 1μM
- Primer 2: 1μM
- Enzima Taq Polimerasa: 1U
- Agua destilada estéril: 28,5 ul
- Muestra: 5 ul
- los cebadores (*primers*) corresponden a la región gB (glicoproteína B), zona conservada de la región UL55 del gen viral.



# Amplificación del DNA viral extraído mediante la reacción de Nested- PCR

---

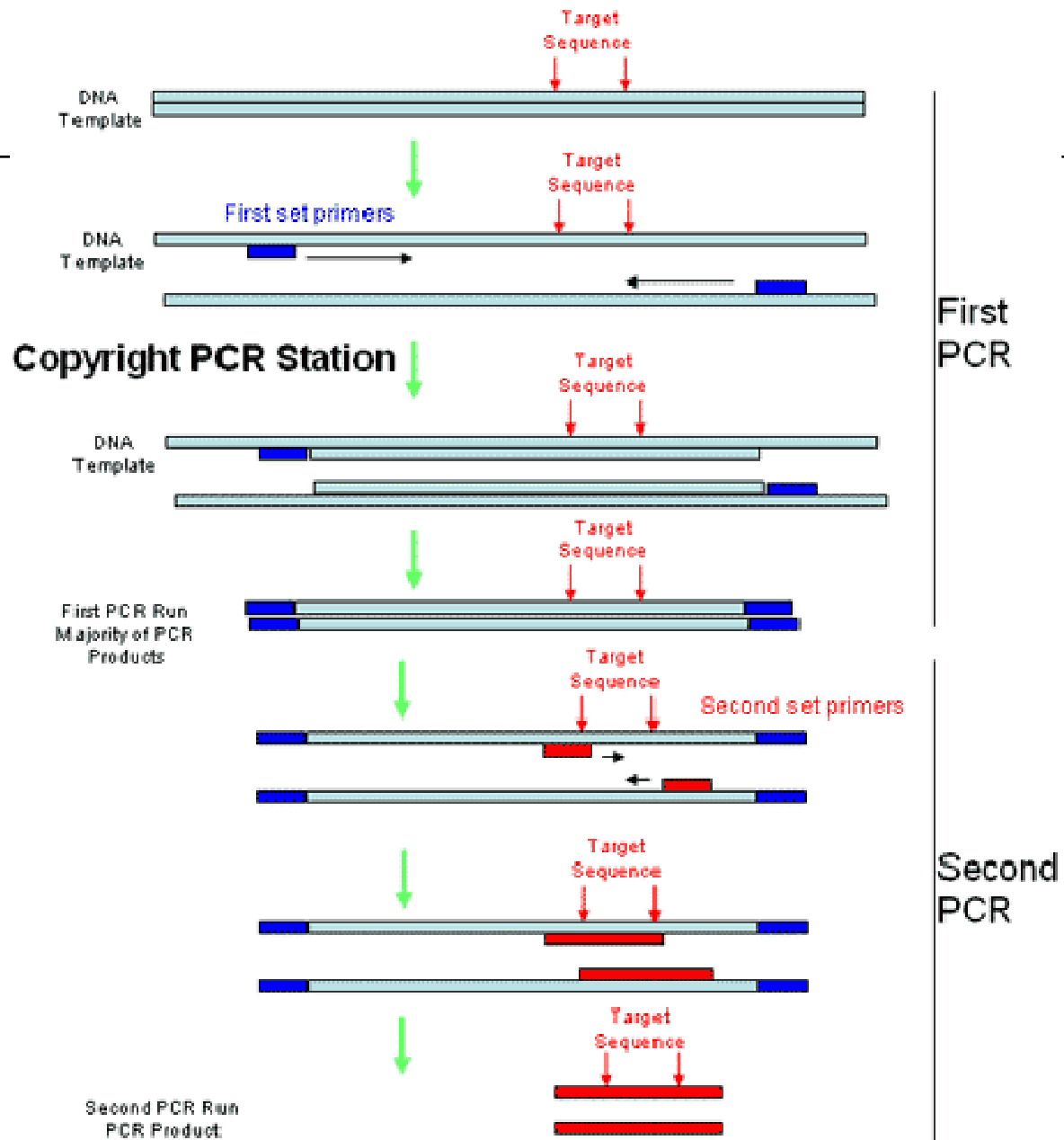
- **Primer ciclo de amplificación**

- Colocar los tubos de reacción (master mix, 90  $\mu$ l + muestra, 10 $\mu$ l) en el termociclador el siguiente tiempo:
- \_ 2 min. a 94°C
- \_ 35 ciclos de : 15 seg. a 94°C, 15 seg. a 58°C y 15 seg. a 72°C
- \_ un ciclo de elongación de 5 minutos a 72°C.
- Tamaño del primer amplificado 150pb.

- **Segundo ciclo de amplificación**

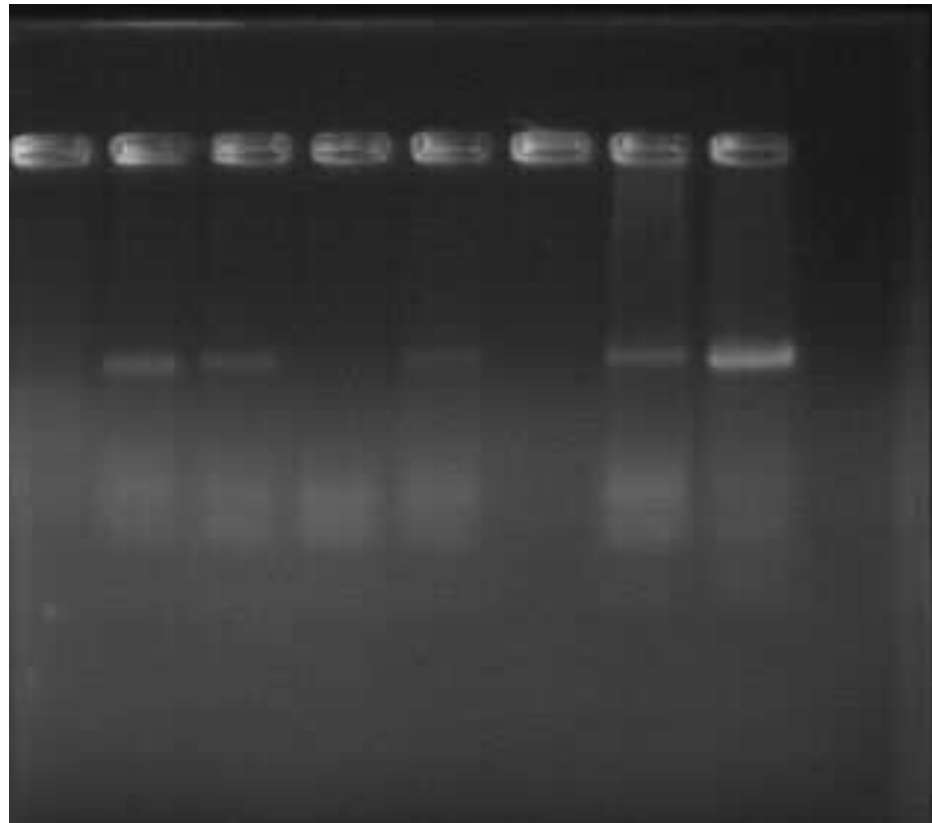
- Transferir 10  $\mu$ l, del producto amplificado anteriormente, a una nueva master mix que contiene los mismos componentes que la anterior pero esta vez se agregan dos primers internos que reemplazan a los anteriores.
- \_ 2 min. a 94°C;
- \_ 30 ciclos de : 15seg. a 94°C, 15seg. a 50°C y 15seg. a 72°C
- \_ un ciclo de elongación de 5 min. a 72°C.
- Tamaño del segundo amplificado 100pb

# NESTED PCR



# *Análisis de los productos de PCR*

Alícuotas de 18  $\mu$ l de cada producto amplificado se corren en geles de agarosa al 2%, con bromuro de etidio (0,5 $\mu$ g/ml), durante 40 min a 130 voltios, y se observan con luz ultravioleta en el transiluminador.





# Bibliografía

---

- CARBALLAL- OUBIÑA .Virología Médica.. 2º Edición. Capítulo 19: 327-334.
- DISTÉFANO, A.L.; ALONSO, A.; MARTIN, F.; PARDON, F. *Human Cytomegalovirus: detection of congenital and perinatal infection in Argentina*. BMC Pediatr. 2004 jun 23; 4 (1): 11.
- Archivos Argentinos de Pediatría.ISSN 0325 0075.
- Diagnóstico molecular de infección congénita por citomegalovirus (CMV) en las ciudades de Resistencia y Corrientes. Marín, Héctor M. - Gorodner, Jorge O. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006.
- Familia Herpesviridae: Virus de Epstein Barr Citomegalovirus. Dra. María Victoria Preciado. Laboratorio de Biología Molecular. División Anatomía Patológica. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Buenos Aires, Argentina

# GRACIAS!!!

