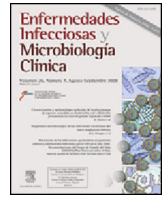




# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

## Utilidad del valor Ct en las infecciones respiratorias agudas causadas por el virus respiratorio sincitial A y B y los virus gripales A (H1N1)pdm09, A (H3N2) y B

Jordi Reina\*, Carmen Morales, María Busquets y Cristina Norte

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

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 9 de febrero de 2017

Aceptado el 26 de abril de 2017

On-line el 7 de junio de 2017

#### Palabras clave:

Infecciones respiratorias agudas  
Virus respiratorio sincitial  
Virus gripales  
Valor Ct  
Carga viral

### R E S U M E N

**Introducción:** Las infecciones respiratorias agudas de causa viral son unas entidades muy frecuentes. La dificultad para valorar la detección de un determinado virus en estas entidades podría solucionarse con la determinación de la carga viral.

**Métodos:** Se ha realizado un estudio prospectivo sobre el valor medio de los Ct (cycle threshold value) detectados frente al VRS-A, VRS-B y los virus gripales A (H1N1)pdm09, A(H3N2) y B en pacientes de diferente procedencia y edad. La detección se ha realizado mediante una técnica de amplificación molecular (RT-PCR) comercial.

**Resultados:** Se han detectado valores medios de Ct distintos para cada virus. En las infecciones por VRS, no se han observado diferencias entre las causadas por el VRS-A o VRS-B en pediatría. De acuerdo con la edad de los pacientes solo se ha observado significación estadística en los incluidos en los grupos de 0-4 meses para el VRS-A y este grupo y el de 5-12 meses para el VRS-B (valores más elevados). En los pacientes adultos se ha detectado una carga viral menor que en los pediátricos.

En las infecciones gripales no se ha observado significación estadística en los valores medios detectados en los pacientes procedentes de la Red Centinela, en los diagnosticados en las urgencias de adultos ni en los ingresados hospitalarios. En los pacientes adultos ingresados en la UCI solo se ha observado un valor medio algo más bajo en los infectados por el virus gripal A (H1N1)pdm09 pero sin significación estadística. No hubo ningún paciente ingresado en la UCI con infección por gripe B.

**Conclusión:** La detección de la carga viral podría ser una buena herramienta para la evaluación, seguimiento y pronóstico de las infecciones respiratorias agudas víricas. A excepción de las causadas por el VRS, no se han observado diferencias significativas en las infecciones gripales, salvo en los pacientes pediátricos de menor edad.

© 2017 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

## Usefulness of Ct value in acute respiratory infections caused by respiratory syncytial virus A and B and influenza virus A (H1N1)pdm09, A (H3N2) and B

### A B S T R A C T

**Introduction:** Acute respiratory infections of viral cause are very frequent entities. The difficulty in evaluating the detection of a virus in these entities could be solved by determining the viral load.

**Methods:** A prospective study on the mean Ct value (cycle threshold value) detected against RSV-A, RSV-B and influenza A (H1N1)pdm09, A (H3N2) and B viruses in patients of different origin and age was performed. Detection was performed using a commercial molecular amplification (RT-PCR) technique.

#### Keywords:

Acute respiratory infections  
Respiratory syncytial virus  
Influenza viruses  
Ct value  
Viral load

\* Autor para correspondencia.

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

**Results:** Different mean Ct values were detected for each virus. In RSV infections, no differences were observed between those caused by RSV-A or RSV-B in children. Depending on the patient's age, the only statistical significance was observed in those included in the 0–4 month groups for RSV-A and this group and the 5–12 months group for RSV-B (higher values). A lower viral load was detected in adult patients than in paediatric patients. In influenza infections, no statistical significance was observed in the mean values detected in patients from the Red Centinela («sentinel network», a Spanish network of doctors aimed at research and surveillance of diseases), those diagnosed in the adult emergency room or in hospital admissions. In the adult patients admitted to the ICU, only a slightly lower mean value was observed in those infected with influenza A (H1N1)pdm09, but without statistical significance. There were no patients admitted to the ICU with influenza B infection.

**Conclusion:** The detection of viral load could be a good tool for the evaluation, monitoring and prognosis of acute viral respiratory infections. With the exception of those caused by RSV, no significant differences were observed in influenza infections except in younger paediatric patients.

© 2017 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

## Introducción

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) de causa viral son unas entidades que afectan a toda la población, aunque su mayor morbilidad se detecta en los extremos de la vida. La mayoría de estas infecciones se producen cada año durante la época invernal, dando lugar a las llamadas temporadas epidémicas, básicamente asignadas a las producidas por el virus respiratorio sincitial (VRS) en la población infantil<sup>1</sup> y a la causada por la gripe en la población general<sup>2</sup>.

Las técnicas de biología molecular aplicadas al establecimiento etiológico viral de las IRA ha permitido en los últimos años conocer el espectro de virus implicados en estas patologías<sup>3</sup>. A pesar de ello son el VRS y la gripe los virus con mayor impacto en salud pública y que deberían ser vigilados de una forma activa<sup>1,2</sup>.

La detección mediante técnicas moleculares, generalmente una RT-PCR, de un determinado virus en una muestra respiratoria de un paciente con IRA se considera en general de diagnóstico etiológico definitivo, ya que en los pacientes asintomáticos su detección es inferior al 2%<sup>4</sup>. Sin embargo la traducción clínica de este virus hace que su presencia pueda ser detectada tanto en procesos catarrales o respiratorios leves hasta cuadros respiratorios graves con riesgo de mortalidad asociada<sup>1,2</sup>.

Una posibilidad de intentar predecir o conocer la significación de un virus en estos pacientes sería la cuantificación de la carga viral en la muestra respiratoria. La hipótesis sería que a mayor carga viral mayor morbilidad o mortalidad asociada al proceso infeccioso<sup>5–7</sup>.

Desde hace tres años utilizamos para este diagnóstico viral una técnica de RT-PCR comercial que inicialmente es cualitativa, es decir da positividad o negatividad a los virus que detecta. Sin embargo en el resultado final se expone el valor Ct o valor umbral del ciclo (cycle threshold value), que expresa el ciclo en el que el sistema de detección considera que la muestra es positiva para un determinado virus (su valor oscila entre 0 y 40)<sup>3</sup>. De este modo las muestras con elevada carga viral presentan un valor Ct bajo y las de baja carga viral un valor Ct más elevado (necesitan más ciclos de amplificación para cruzar el umbral de positividad).

Con este concepto y el valor del Ct obtenido en cada muestra respiratoria hemos estudiado las IRA causadas por el VRS y los virus gripales y analizado su valor medio en diferentes grupos de edad y de localización hospitalaria.

## Material y métodos

Se ha realizado un estudio prospectivo sobre el valor medio de los Ct de los pacientes con IRA causados por el VRS y los virus gripales. Todas las muestras respiratorias, aspirados nasofaríngeos para

<3 años y frotis faríngeos para <3 años, fueron analizadas mediante una técnica molecular comercial, tipo RT-PCR, que detecta de forma simultánea y diferencial 19 virus respiratorios distintos (Allplex, Seegen; Corea del Norte). Además de la positividad de la muestra se anotó el valor Ct en el cual el sistema automatizado de detección consideraba positiva la muestra a un virus determinado. La detección antigénica frente al VRS se realizó en 77 muestras mediante una inmunocromatografía comercial (Binax RSV, Alere, Barcelona).

Para evitar sesgos se han analizado las primeras 150 muestras respiratorias positivas al VRS-A, VRS-B, gripe A (H1N1)pdm09, gripe A (H3N2) y gripe B (total 750 muestras). Para ello los valores de la gripe A (H1N1)pdm09 y gripe B correspondían a la temporada gripal 2015–2016 (por su predominio) y la gripe A (H3N2) a los casos de la temporada 2016–2017 (por el mismo concepto). Para evitar interferencias se eliminaron aquellas muestras que presentaron coinfecciones con alguno de los virus estudiados. Los valores Ct de los pacientes con VRS-A y VRS-B correspondían a ambas temporadas.

Los pacientes se han clasificado en función de la edad, pediátricos (<14 años) o adultos (>14 años). En las IRA causadas por el VRS se han clasificado entre los que presentaban una infección vírica única y los que presentaban una infección mixta (coinfección); así mismo se ha evaluado el valor medio de los Ct en relación con las muestras que fueron previamente positivas en la prueba de la detección antigénica (solo en pediatría).

Los pacientes con IRA causadas por los virus gripales han sido clasificados como los procedentes de la red centinela de vigilancia de la gripe (RC), los de urgencias hospitalarias de adultos (URGA), los ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y los pediátricos, en función de su localización en el momento que se detectó la positividad frente a estos grupos.

Los análisis estadísticos se han realizado mediante el programa SPSS 21 (<http://www.spss.com>) considerando  $p < 0,05$  como valor significativo.

## Resultados

El valor medio de los Ct detectado en las muestras positivas para el VRS-A ha sido de 23,75 (intervalo 17,02–33,76) y para el VRS-B de 24,49 (intervalo 15,29–36,68). En los pacientes con coinfección con otro virus respiratorio su valor medio ha sido de 22,94 para el VRS-A y de 23,44 para el VRS-B.

Se ha observado una diferencia significativa entre el valor medio de los Ct y el observado en los pacientes adultos infectados por el VRS-A (32,46;  $p < 0,05$ ) y por el VRS-B (27,85;  $p < 0,05$ ). También se ha observado esta significación en aquellas muestras que fueron positivas en la prueba de la detección

**Tabla 1**  
Valores de Ct detectados en las muestras con presencia del virus respiratorio sincitial

Virus	Ct-medio	Coinfección	Adultos	Ag-positivo*
VRS-A	(N = 150) 23,75	(N = 22) 22,94	(N = 31) 32,46	(N = 29) 19,18
VRS-B	(N = 150) 24,49	(N = 42) 23,44	(N = 48) 27,85	(N = 48) 19,16

VRS-A: virus respiratorio sincitial tipo A; VRS-B: virus respiratorio sincitial tipo B.

\* Ag-positivo: detección antigénica directa por inmunocromatografía.

**Tabla 2**  
Valores de Ct detectados en las muestras con presencia de virus gripales A y B

Virus gripal	Ct-medio	RC	URGA	ING	UCI	Ped
A (H1N1)pdm09	(N = 150) 31,02	(N = 29) 31,28	(N = 31) 32,14	(N = 38) 31,59	(N = 21) 29,86	(N = 31) 29,55
A (H3N2)	(N = 150) 31,03	(N = 27) 31,14	(N = 39) 30,35	(N = 32) 32,25	(N = 16) 31,01	(N = 36) 30,36
B	(N = 150) 28,87	(N = 18) 27,48	(N = 23) 29,32	(N = 22) 31,00	(N = 0) 00,00	(N = 87) 28,67

ING: pacientes ingresados; Ped: pacientes pediátricos (&lt;14 años); RC: red centinela; UCI: unidad de cuidados intensivos;URGA: urgencias adultos.

**Tabla 3**  
Valores medios de Ct detectados en las muestras positivas al virus respiratorio sincitial y a los virus gripales en los pacientes pediátricos

	VRS-A (N = 119)	VRS-B (N = 102)	A(H1N1)p (N = 31)	A(H3N2) (N = 36)	B (N = 87)
0-4 meses	20,53*	21,06*	30,51	30,66	23,79*
5-12 meses	22,80	21,98*	30,86	30,98	25,12*
1-2 años	23,05	24,96	31,15	31,01	26,52
3-14 años	24,54	28,08	31,54	31,18	29,89

VRS-A: virus respiratorio sincitial tipo A; VRS-B: virus respiratorio sincitial tipo B.

\* p &lt; 0,05 en comparación valor Ct medio.

antigénica, tanto para el VRS-A (19,18; p < 0,05) como para el VRS-B (19,16; p < 0,05) (tabla 1).

El valor medio de los Ct observado en los pacientes con infección causada por el virus gripal A (H1N1)pdm09 ha sido de 31,02 (intervalo 19,09-38,59), para el virus gripal A (H3N2) de 31,03 (intervalo 21,74-39,34) y para el virus gripal B de 28,87 (intervalo 21,16-38,72).

En las infecciones gripales no se ha observado significación estadística en los valores medios detectados en los pacientes procedentes de la RC, de los diagnosticados en URGA ni en los ingresados hospitalarios. En los pacientes adultos ingresados en la UCI solo se ha observado un valor medio algo más bajo en los infectados por el virus gripal A (H1N1)pdm09 pero sin significación estadística. No hubo ningún paciente ingresado en la UCI con infección por gripe B (tabla 2).

De acuerdo con la edad de los pacientes pediátricos solo se ha observado significación estadística en el valor medio de los Ct de los pacientes incluidos en los grupos de 0-4 meses para el VRS-A y este grupo y el de 5-12 meses para el VRS-B (tabla 3).

Las infecciones gripales pediátricas tampoco han mostrado globalmente diferencias significativas en los valores de Ct. Por grupos de edad solo los pacientes incluidos en los grupos de 0-4 meses y de 5-12 meses e infectados por el virus gripal B han mostrado un valor medio inferior (p > 0,05) (tabla 3).

## Discusión

Los valores medios de los Ct detectados en las IRA causadas por el VRS-A y B han mostrado resultados similares sin diferencias significativas. Es difícil comparar estos valores con los comunicados en otros estudios ya que probablemente los valores puedan variar en cada sistema de detección molecular. A pesar de ello, Fuller et al.<sup>6</sup>

han obtenido un valor medio de 27,20 para el VRS sin diferenciar el tipo viral.

En el estudio realizado por Borg et al.<sup>8</sup> se establece una relación entre la carga del VRS (copias/ml) y el valor del Ct obtenido en el proceso de amplificación. De acuerdo con este estudio un valor medio de 24 (parecido al nuestro) le correspondería una carga media de  $1 \times 10^5$  copias/ml<sup>8</sup>. Utilizando también el número copias/ml Do et al.<sup>5</sup> también comprueban que la carga de VRS es más elevada en los pacientes pediátricos que requieren ingreso en cuidados intensivos ( $3,8 \times 10^7$  copias/ml) que los que no ingresan ( $2,5 \times 10^6$  copias/ml).

En nuestro estudio no hemos podido observar valores de Ct del VRS-A o VRS-B inferiores en las coinfecciones por otros virus respiratorios como comunican otros estudios<sup>9</sup>; aunque no hemos comprobado el valor del virus asociado.

Las IRA causadas por el VRS en la población adulta sigue siendo una entidad poco frecuente aunque parece que se está incrementado, probablemente por la utilización de técnicas moleculares de detección<sup>10</sup>. Los valores medios de Ct detectados en los pacientes adultos con IRA por el VRS han mostrado ser significativamente más elevados, tanto para el VRS-A como VRS-B, que el valor medio de los mismos. Este dato parece indicar que la carga viral en este grupo de pacientes es menor que la observada en los pacientes pediátricos y que probablemente las patologías de base de estos pacientes constituyen el factor predisponente de estas infecciones.

Sin embargo Lee et al.<sup>11</sup> en un estudio sobre 123 pacientes han observado que los adultos hospitalizados presentaban elevadas concentraciones del RNA del VRS en el momento del ingreso y además que la mayor carga viral se relacionaba con el desarrollo de complicaciones e ingresos en la UCI.

Hemos estudiado el valor medio de los Ct detectados en aquellos pacientes pediátricos con detección antigénica positiva antes

de realizar la amplificación molecular. El valor medio ha sido muy similar en los dos VRS (19,18 vs. 19,16) y significativamente inferior, por lo tanto con una mayor carga viral, al valor medio general. Este resultado es lógico ya que la sensibilidad de la mayoría de técnicas rápidas no es muy elevada. De acuerdo con el estudio de Borg et al.<sup>8</sup> a este valor medio le corresponderían  $1 \times 10^6$  copias/ml que podría ser el límite de detección de nuestra técnica antigénica. En el estudio de Moesker et al.<sup>12</sup> en el que utilizan el mismo sistema comercial que nosotros en la detección antigénica frente al VRS, establecen que las muestras falsamente-negativas se deben a valores de Ct elevados, es decir a cargas virales bajas, confirmando nuestros resultados.

No hemos encontrado estudios que permitan comparar los resultados obtenidos frente al VRS en diferentes segmentos de edad. Nuestros datos apoyan la idea general de que a menor edad mayor carga viral y esto parece ser confirmado en este estudio. Los grupos etarios con menor valor medio de Ct, con respecto al global, se sitúan por debajo de los 12 meses tanto para el VRS-A como VRS-B.

En nuestro estudio el valor medio de los Ct de los virus A (H1N1)pdm09 y A (H3N2) ha sido muy parecido; mientras que el observado para el virus gripal B (28,87) ha sido inferior, aunque probablemente no deben compararse entre sí por utilizar dianas de amplificación distintas. No se ha observado tampoco diferencias en los pacientes procedentes de la comunidad (red centinela, RC) con valores medios parecidos a los detectados en los pacientes que eran diagnosticados en las URGA. Spencer et al.<sup>7</sup> han observado que el valor medio de los Cts de los pacientes con gripe A, sin especificar, fue de 26,9 y con gripe B de 25,3; tal y como se ha mencionado el empleo de técnicas moleculares diferentes no permite realizar comparaciones.

Tampoco hemos observado diferencias entre los pacientes ingresados y los atendidos en URGA. Solo aquellos pacientes que precisaron de ingreso en la UCI han mostrado un valor medio de los Cts algo más bajo para el virus gripal A (H1N1)pdm09 pero no para el A (H3N2). Estos datos parecen indicar que el valor de la carga viral presente en las muestras respiratorias no es el elemento determinante del ingreso hospitalario o en la UCI, sino probablemente la edad y las patologías de base que presentan estos pacientes<sup>13</sup>.

En el caso de la gripe B tampoco se han observado diferencias significativas en ninguno de los grupos estudiados, incluso en los pacientes ingresados el valor medio de los Ct era algo superior a la media (menor carga viral). Al igual que con la gripe A, Lee et al.<sup>14,15</sup> también han comunicado una mayor carga de este virus en los pacientes con ingreso hospitalario. No hemos analizado ningún paciente con gripe B ingresado en la UCI por afectar preferentemente a la población pediátrica.

El análisis de las infecciones gripales en la edad pediátrica no ha mostrado diferencias significativas en ninguno de los tipos gripales. Para los virus gripales A el valor fue algo inferior pero no significativo y para el virus B casi coincidente con el valor medio. Este hecho se debe a que en este estudio el 58% de todos los pacientes tenían una edad inferior a los 14 años.

Al analizar las infecciones gripales pediátricas por grupos etarios solo se ha observado diferencias significativas en el virus gripal B en los segmentos de 0-4 meses y de 5-12 meses. Es decir los pacientes menores de un año parece que presentan una carga viral más elevada que el resto. No se han encontrado otros estudios en los que se analice la carga viral de los pacientes pediátricos con

gripe B, de modo que estos datos no pueden compararse con otros previos.

En resumen en el caso de las IRA por VRS hemos podido comprobar cómo la carga viral parece ser mal elevada en los niños que en los adultos y que la detección antigénica directa solo podría ser positiva con valores por debajo de la media. En la infección gripal apenas hemos detectado diferencias entre los diferentes valores de Ct de los grupos estudiados.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Queremos expresar el agradecimiento a todo el personal técnico que durante los últimos veintitrés años han colaborado con la Unidad de Virología del Hospital Universitario Son Dureta/Son Espases.

## Bibliografía

- Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010;375:1545–55.
- Taubenberger JK, Morens DM. Influenza viruses: breaking all the rules. *mBio*. 2017;4:e00365–413.
- Huh HJ, Kim JY, Kwon HJ, Yun SA, Lee MK, Lee NY, et al. Performance evaluation of allplex respiratory panels 1, 2 and 3 for detection of respiratory viruses and influenza A virus subtypes. *J Clin Microbiol*. 2017;55:479–84.
- Brittain-Long R, Westin J, Olofsson S, Lindh M, Andersson LM. Prospective evaluation of a novel multiplex real-time PCR assay for detection of fifteen respiratory pathogens-duration of symptoms significantly affects detection rate. *J Clin Virol*. 2010;47:263–7.
- Do LAH, van Doorn HR, Bryant JE, Nghiem MN, Nguyen Van VC, Vo CK, et al. A sensitive real-time PCR for detection and subgrouping of human respiratory syncytial virus. *J Virol Meth*. 2012;179:250–5.
- Fuller JA, Njenga MK, Bigogo G, Aura B, Ope MO, Nderitu L, et al. Association of the ct values of real-time PCR of viral upper respiratory tract infection with clinical severity, Kenya. *J Med Virol*. 2013;85:924–32.
- Spencer S, Chung J, Thompson M, Piedra PA, Jewell A, Avadhanula V, et al. Factors associated with real-time RT-PCR cycle threshold values among medically attended influenza episodes. *J Med Virol*. 2016;88:719–23.
- Borg I, Rohde G, Löseke S, Bittscheidt J, Schultze-Werninghaus G, Stephan V, et al. Evaluation of a quantitative real-time PCR for the detection of respiratory syncytial virus in pulmonary diseases. *Eur Respir J*. 2003;21:944–51.
- Franz A, Adams O, Willems R, Bonzel L, Neuhausen N, Schweizer-Krantz S, et al. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. *J Clin Virol*. 2010;48:239–45.
- Reina J, Iñigo A, Rubio R, López-Causapé C. El virus respiratorio sincitial como causante de infecciones respiratorias agudas en el adulto ¿una enfermedad emergente? *Rev Clin Esp*. 2015;215:418–9.
- Lee N, Chan MC, Lui GC, Rity RL, Wong K, Yung IMH, et al. High viral load and respiratory failure in adults hospitalized for respiratory syncytial virus infections. *J Infect Dis*. 2015;212:1237–40.
- Moesker FM, van Kampen JJA, Aron G, Schutten M, van de Vijver DAMC, Koopmans MPG, et al. Diagnostic performance of influenza viruses and RSV rapid antigen detection test in children in tertiary care. *J Clin Virol*. 2016;79:12–7.
- Ngaosuwanukul N, Noisumdaeng P, Komolsiri P, Pooruk P, Choekphaibulkit K, Chotpitayasunondh T, et al. Influenza A viral loads in respiratory samples collected from patients infected with pandemic H1N1, seasonal H1N1 and H3N2 viruses. *Virol J*. 2010;7:75.
- Lee N, Chan PKS, Hui DS, Rainer TH, Wong E, Choi KW, et al. Viral loads and duration of viral shedding in adult patients hospitalized with influenza. *J Infect Dis*. 2009;200:492–500.
- Lee N, Chan PKS, Rainer TH, Hui D, Choi KW, Cockram CS. Influenza virus load in hospitalized patients. *Hong Kong Med J Virol*. 2013;19. S3-15-8.