

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”  
Departamento de Virología

**Detección temprana de la infección por Citomegalovirus y otros herpesvirus en población con riesgo de desarrollar infección congénita y en receptores pediátricos de trasplante cubanos.**

Tesis para optar por el Grado de Doctor en Ciencias Médicas

Consuelo Beatriz Correa Sierra, MsC.

La Habana  
2014

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”  
Departamento de Virología

**Detección temprana de la infección por Citomegalovirus y otros herpesvirus en población con riesgo de desarrollar infección congénita y en receptores pediátricos de trasplante cubanos.**

Tesis para optar por el Grado de Doctor en Ciencias Médicas

Autor: Dra. Consuelo Beatriz Correa Sierra, MsC.

Tutor: Dra. Vivian Kourí Cardellá, DrC.

Asesores: Lic. Lizet Sánchez Valdés, DrC.

Dr. Denis Verdasquera Corcho, DrC.

La Habana

2014

A mis padres

A mi esposo

A mi familia

A los profesores Pedro Más y Angel Goyenechea

### Listado de abreviaturas:

ABC: Área debajo de la curva  
Acs: Anticuerpos  
ADN: Ácido desoxiribonucleico  
ARN: Ácido ribonucleico  
°C: grados Celsius  
C<sub>0</sub>: Ciclosporinemia en tiempo cero  
C<sub>2</sub>: Ciclosporinemia a las dos horas  
CD: Grupo de diferenciación celular, siglas del inglés Cluster of differentiation  
cGy: centigray  
CIUR: Crecimiento intrauterino retardado  
cm: Centímetros  
CMV: Citomegalovirus  
dL: decilitro  
D/R: estado serológico del donante y el receptor  
ELISA: Ensayo inmunoenzimático, siglas del inglés Enzyme linked immunosorbent assay  
EUA: Estados Unidos de América  
HLA: Antígenos de histocompatibilidad leucocitaria, siglas del inglés

Histocompatibility leucocyte antigen  
HPUCH: Hospital Pediátrico Universitario de Centro Habana  
HPUWS: Hospital Pediátrico Universitario "William Soler"  
IC: Intervalo de confianza  
IgG: Inmunoglobulina G  
IgM: Inmunoglobulina M  
Kg: kilogramos  
LMV: leucoféresis de menor volumen  
LGV: leucoféresis de mayor volumen  
M: Molar  
m<sup>2</sup>: metro cuadrado  
mg: miligramos  
min: Minutos  
mL: Mililitro  
μL: Microlitro  
mM: Milimolar  
mm<sup>3</sup>: milímetro cúbico  
MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio  
ng: nanogramos  
NK: Células Asesinas naturales, siglas del inglés Natural Killer  
OR: proporción de desigualdades, siglas del inglés odds ratio  
PC: Punto de corte

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, siglas del inglés Polimerase chain reaction  
PCR-TR: PCR en tiempo real  
ROC: Características operativas del receptor, siglas del inglés receptor operative characteristics  
RP: Razón de prevalencia  
seg: Segundos  
sida: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida  
TCPH: Trasplante de células precursoras hematopoyéticas  
TH: Trasplante hepático  
TOS: Trasplante de órgano sólido  
TR: Trasplante renal  
VEB: Virus Epstein Barr  
VHB: Virus de la hepatitis B  
VHC: Virus de la hepatitis C  
VHH6: Virus Herpes humano 6  
VHH7: Virus Herpes humano 7  
VHH8: Virus Herpes humano 8  
VHS: Virus Herpes simple  
VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana  
VPR: Virus de la Pseudorabia porcina  
VVZ: Virus Varicela Zóster

## SÍNTESIS

Se presentan los resultados del diagnóstico y seguimiento de la infección por Citomegalovirus y otros herpesvirus en gestantes de tres municipios de La Habana (durante el 2007), neonatos seleccionados (durante cuatro años) y receptores de trasplante pediátricos (noviembre 2009-diciembre 2011), mediante técnicas serológicas, moleculares y la evolución clínica. El 85,2% de los trasplantados y el 92,7% de las gestantes estaban infectados por Citomegalovirus. Las gestantes menores de 20 años se asociaron a adquirir esta infección. El 2,4% de las gestantes presentó infección activa por Citomegalovirus, de las que nacieron 12 niños infectados congénitamente (1,1%). El 16,6% de los neonatos infectados congénitamente fueron sintomáticos y desarrollaron secuelas antes de los cuatro años de edad. El 93,1% de los trasplantados presentó detección herpesviral, fundamentalmente en saliva (86,2%) y el Citomegalovirus fue el virus más frecuente (75,9%). Las muestras de orina y suero pueden ser utilizadas para el diagnóstico precoz de la infección por Citomegalovirus en trasplantados. El 82,8% de los trasplantados desarrolló complicaciones, dos de estas fueron síndrome por Citomegalovirus y fueron tratadas oportunamente. La identificación de los pacientes en riesgo, así como el diagnóstico, seguimiento virológico y clínico de la infección por Citomegalovirus y otros herpesvirus permite una intervención clínica temprana y un tratamiento eficiente.

## TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
I INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Hipótesis de trabajo:.....	3
I.2 Objetivos.....	4
I.3 Novedad científica .....	4
I.4 Valor teórico.....	4
I.5 Valor práctico .....	5
I.6 Publicaciones científicas donde han sido expuestos los resultados de la tesis .....	6
I.7 Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis.....	6
II MARCO TEÓRICO.....	7
II.1 Historia.....	7
II.2 Clasificación, características generales y estructura de los herpesvirus.....	7
II.3 Patogenia.....	9
II.3.1 Patogenia de la infección congénita por CMV.....	10
II.3.2 Patogenia de las infecciones por herpesvirus en receptores de trasplante ..	12
II.4 Respuesta inmune frente a la infección por herpesvirus.....	13
II.5 Cuadro clínico .....	15
II.5.1 Cuadro clínico de la infección por CMV en gestantes y recién nacidos .....	16
II.5.2 Cuadro clínico de la infección herpesviral en receptores de trasplante .....	16
II.6 Epidemiología .....	18
II.6.1 Transmisión al feto y al recién nacido .....	18
II.6.2 Epidemiología de la infección por herpesvirus en receptores de trasplante ..	19

II.7 Diagnóstico.....	19
II.7.1 Diagnóstico de laboratorio en la infección congénita .....	21
II.7.2 Diagnóstico en receptores de trasplante .....	22
II.8 Tratamiento .....	23
II.8.1 Prevención en las gestantes y los recién nacidos.....	23
II.8.2 Prevención de la enfermedad por herpesvirus en receptores de trasplante .	23
II.8.3 Tratamiento antiviral.....	25
III CONTROL SEMÁNTICO.....	27
IV DISEÑO METODOLÓGICO .....	30
IV.1 Prevalencia de la infección por CMV en gestantes .....	30
IV.1.1 Diseño del estudio, universo y muestra .....	30
IV.1.2 Protocolo de estudio a las Gestantes.....	30
IV.1.3 Consideraciones éticas .....	30
IV.1.4 Muestras clínicas .....	31
IV.1.5 Técnica empleada.....	31
IV.1.6 Técnicas de análisis y procesamiento de la información para la prevalencia de la infección por CMV en gestantes.....	31
IV.2 Detección de la infección activa por CMV y otros herpesvirus en gestantes y de infección congénita en sus hijos .....	32
IV.2.1 Protocolo de seguimiento a las Gestantes .....	32
IV.2.2 Protocolo de estudio de los hijos de madres con infección activa por CMV.....	33
IV.2.3 Consideraciones éticas .....	34
IV.2.4 Muestras Clínicas.....	34
IV.2.5 Técnicas empleadas .....	35
IV.2.6 Técnicas de análisis y procesamiento de la información para el diagnóstico precoz de la infección por CMV y otros herpesvirus en gestantes y sus hijos .....	38
IV.3 Detección de Acs anti CMV, VEB y VHS de receptores pediátricos y sus donantes previo al trasplante .....	39
IV.3.1 Diseño del estudio, universo y muestra .....	39

IV.3.2 Protocolo de estudio para la detección de Acs anti CMV, VEB y VHS de receptores pediátricos y sus donantes previo al trasplante .....	39
IV.3.3 Consideraciones éticas del estudio de pacientes receptores de trasplante y sus donantes .....	39
IV.3.4 Muestras Clínicas.....	40
IV.3.5 Técnicas empleadas .....	40
IV.3.6 Técnicas de análisis y procesamiento estadístico de la información de la prevalencia de la infección por VEB, VHS y CMV en los receptores y sus donantes previo al trasplante .....	40
IV.4 Infecciones por herpesvirus en receptores pediátricos luego del trasplante .....	41
IV.4.1 Diseño del estudio, universo y muestra .....	41
IV.4.2 Protocolo de estudio de los pacientes trasplantados.....	41
IV.4.3 Consideraciones éticas .....	42
IV.4.4 Muestras Clínicas.....	42
IV.4.5 Técnicas empleadas .....	42
IV.4.6 Técnicas de análisis y procesamiento estadístico de la información de los pacientes trasplantados .....	45
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
V.1 Seroprevalencia de la infección por CMV en gestantes.....	47
V.1.1 Determinación de Acs IgG anti CMV en las gestantes analizadas .....	47
V.2 Detección de la infección activa por CMV y otros herpesvirus en gestantes y de la infección congénita en sus hijos .....	50
V.2.1 Seguimiento de las gestantes seronegativas e Infección activa en las gestantes.....	50
V.2.4 Infección congénita por CMV .....	57
V.2.5 Hallazgos clínicos en los hijos de madres con infección activa .....	60
V.2.6 Carga viral .....	62
V.3 Detección de Acs anti CMV, VEB y VHS de receptores y donantes previo al trasplante .....	63
V.4 Infecciones por herpesvirus en receptores pediátricos luego del trasplante.....	66
V.4.1 Detección viral en las muestras clínicas de los pacientes trasplantados .....	66
V.4.2 Co-infecciones en pacientes trasplantados.....	71



V.4.3 Relación del estado serológico del receptor previo al injerto y la detección de herpesvirus post-trasplante.....	73
V.4.4 Carga viral.....	74
V.4.5 Detección herpesviral en muestras de receptores pediátricos post-trasplante.....	78
V.4.6 Detección viral post-trasplante y su impacto clínico.....	80
VI DISCUSIÓN GENERAL.....	90
VII CONCLUSIONES.....	98
VIII RECOMENDACIONES.....	99
IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
X ANEXOS	

## I INTRODUCCIÓN

## I INTRODUCCIÓN

Los herpesvirus presentan una amplia circulación en las poblaciones humanas. La infección por herpesvirus rara vez produce síntomas en personas inmunocompetentes. Las enfermedades causadas por éstos generalmente ocurren en hospederos con algún compromiso en su sistema inmune, entre los que se incluyen los inmunocompetentes con enfermedades crónicas o agudas, los individuos infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), los trasplantados y los recién nacidos (1).

Las gestantes y los neonatos constituyen un grupo de interés para el estudio de las enfermedades provocada por estos virus. Se conoce que los principales virus que se transmiten y causan daño durante el embarazo son el Virus de la Rubéola, el Citomegalovirus (CMV) y el Virus Herpes Simple (VHS)(2). Una vez controlada la infección por el Virus de la Rubéola a través de la vacunación, se considera de mayor importancia al CMV, que actualmente es la causa principal de infección viral congénita y está presente en el 1 % de los recién nacidos vivos de países desarrollados. Además, es causa de sintomatología al nacer y secuelas, entre las que se encuentran el retraso mental y la sordera neurosensorial (3).

Otro grupo de pacientes susceptibles de desarrollar complicaciones secundarias a la infección con herpesvirus son los receptores de trasplante, debido al tratamiento inmunosupresor necesario para evitar el rechazo al injerto. Los virus de la familia *Herpesviridae* constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad infecciosa en los trasplantados en edad pediátrica (4). La adquisición de estas infecciones puede producirse de forma exógena, a través de los órganos del donante, mediante la transfusión de hemoderivados, por exposición en la comunidad o por la reactivación de agentes infecciosos endógenos que se encuentran de manera latente en el organismo (5).

Revello y Gerna (6) describen que: “la mayoría de los obstetras de Italia, Israel, Bélgica y Francia indican estudios complementarios para la búsqueda de la infección activa por CMV en las gestantes y diagnosticar así la infección congénita; mientras que en Austria, Suiza, Alemania y Japón se indica en determinadas circunstancias. En el Reino Unido y Holanda sólo se realiza el pesquizaje de la infección en casos sintomáticos”. Sin embargo, este diagnóstico resulta complejo, pues la infección activa en las gestantes no conlleva a la transmisión de la infección a todos los fetos, tampoco existe un tratamiento

aprobado para estas pacientes, los recién nacidos congénitamente infectados son en su mayoría asintomáticos y no todos desarrollan secuelas (7); por lo que en la actualidad no está establecida el pesquizaje de esta infección en la mayoría de los países. Las razones que apoyan el diagnóstico prenatal son: estudiar la historia natural de la infección congénita, preparar a la familia para que enfrente los problemas de salud del niño y determinar la presencia de marcadores de valor pronóstico de la enfermedad. El diagnóstico prenatal también puede representar el paso que precede la introducción de la terapia antiviral en el futuro (6).

El trasplante de órganos se realiza fundamentalmente en pacientes de países desarrollados o en hospitales privados de países en vías de desarrollo. Los receptores de trasplante necesitan un seguimiento que incluye la serología pre-trasplante de VIH, Virus de la hepatitis B (VHB), Virus de la hepatitis C (VHC), CMV y VHS del donante y del receptor, así como la detección y la cuantificación post-trasplante de la infección por CMV y otros agentes oportunistas (8-12).

El advenimiento de las técnicas moleculares cuantitativas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas del inglés Polimerase chain reaction) a Tiempo Real (PCR-TR) y la posibilidad de determinar la carga viral, ha hecho indispensable la implementación de estos métodos para el manejo clínico de los pacientes inmunodeprimidos (13-21). Los métodos moleculares han demostrado su utilidad con fines diagnósticos, en la toma de decisiones para iniciar un tratamiento oportuno y en la evaluación de la respuesta a la terapéutica (20-26). El PCR-TR en muestras seriadas permite determinar la dinámica de la replicación viral a diferencia de los métodos cualitativos donde no es posible precisarla. Por lo antes expuesto, es importante implementar esta tecnología para el diagnóstico y seguimiento de gestantes, sus recién nacidos y los receptores de trasplante.

El Ministerio de Salud Pública cubano cuenta con un Programa de Atención Materno Infantil y el Grupo Nacional de Trasplante, a los que se le dedican cuantiosos recursos económicos y profesionales de alta calificación, sin ningún costo para los pacientes (27, 28). A éstos pacientes se les ofrece una atención especializada y continua, con resultados visibles en las cifras anuales de mortalidad infantil decrecientes y de aumento de pacientes trasplantados, así como de los tipos de trasplante (29-31).

Desde el comienzo del Programa de Atención Materno Infantil y del Grupo Nacional de Trasplante se incorporaron complementarios para el diagnóstico temprano de enfermedades en éstos pacientes y se le otorga interés a la prevención y diagnóstico temprano de las infecciones. Por ejemplo, a todas las gestantes se le realizan varios estudios serológicos para detectar infecciones producidas por Treponema pallidum, VIH y VHB, gracias a estas determinaciones, la transmisión vertical de estas afecciones es casi nula (32-34). Sin embargo, en el 2011 se notificaron en Cuba 149 defunciones por

malformaciones congénitas o anomalías cromosómicas en menores de 1 año (tasa de 1,1x1 000 nacidos vivos) y no se precisa el dato de morbilidad o secuelas generadas por afecciones congénitas (31).

Aún más, en Cuba desde mediados de 1980 se realizaron, aproximadamente, unos 200 trasplantes en niños, en los que se incluyen los renales, hepáticos y de médula ósea (30, 35, 36). Actualmente, a los pacientes receptores de trasplante y sus donantes se les realiza un tamizaje serológico pre-trasplante frente a VIH, VHC y VHB y no se realiza la búsqueda de anticuerpos (Acs) pre-trasplante contra el VHS, el CMV y el Virus Epstein Barr (VEB) en la mayor parte de los casos, ni se realiza un seguimiento post-trasplante con relación a la aparición de la infección activa por los agentes virales más comunes; solo cuando el paciente presenta alguna sintomatología se le indica PCR cualitativo.

En la década de los 90, se realizó un estudio de seguimiento de infecciones causadas por algunos herpesvirus en receptores adultos de trasplante renal (TR) en Cuba. En esta investigación se emplearon métodos de cultivo e identificación viral así como PCR cualitativo, para la detección de herpesvirus y la asociación con complicaciones y se encontró al CMV asociado a inmunosupresión y al rechazo (37, 38).

La atención del sistema de salud cubano debe dirigirse a aquellas causas de morbilidad y mortalidad que se reportan como frecuentes a nivel internacional, como el CMV y otros herpesvirus (8-12, 39-41), en grupos de interés como las gestantes, los neonatos y los receptores de trasplante. El presente estudio está dirigido a conocer la frecuencia de la infección por herpesvirus y en particular del CMV lo que pudiera permitir en el futuro la implementación de una metodología de diagnóstico y seguimiento en las gestantes y sus neonatos, así como en pacientes trasplantados en edad pediátrica, lo que contribuirá a disminuir la morbi-mortalidad, a la mejoría de la calidad de vida de estos pacientes y al tratamiento oportuno de las complicaciones en estos pacientes.

### **I.1 Hipótesis de trabajo:**

La detección temprana en Cuba de la infección por CMV, considerado el principal agente herpesviral asociado a infección congénita y de morbilidad infecciosa en receptores de trasplante en edad pediátrica, permite una intervención precoz y el tratamiento oportuno de las complicaciones.

## **I.2 Objetivos**

- Determinar la prevalencia de anticuerpos anti CMV y su asociación con factores de riesgo seleccionados en una población de gestantes de tres municipios de La Habana, desde enero del 2007 a enero del 2008.
- Identificar la infección congénita por CMV y otros herpesvirus en recién nacidos de gestantes con infección activa por CMV y su asociación con variables clínicas y virológicas, de tres municipios de La Habana, desde junio del 2007 a diciembre del 2011.
- Determinar el estado serológico pre-trasplante frente al CMV, VHS y VEB en donantes y receptores pediátricos en Cuba, desde noviembre del 2009 a diciembre del 2011.
- Identificar el valor pronóstico de la cuantificación de herpesvirus en diferentes tipos de muestra, para el seguimiento y manejo clínico de pacientes receptores de trasplantes en edad pediátrica en Cuba, desde noviembre del 2009 a diciembre del 2011.

## **I.3 Novedad científica**

- Se realiza el primer estudio de prevalencia de la infección por CMV en gestantes cubanas.
- Se demuestra el impacto que tiene el CMV como agente productor de infección congénita en Cuba, reportándose cifras intermedias de incidencia y una alta transmisibilidad vertical.
- Se propone un algoritmo para el seguimiento de gestantes y recién nacidos en Cuba, con el objetivo de detectar tempranamente infección congénita por CMV, brindando la posibilidad de imponer tratamiento y seguimiento adecuado en estos niños.
- Se realiza un seguimiento de la carga viral de herpesvirus en receptores de trasplante pediátricos cubanos, demostrándose que el CMV constituye el herpesvirus que se excreta con mayor frecuencia en estos pacientes y que además se asocia a complicaciones.
- Se demuestra la importancia de contar con algoritmos de laboratorio útiles para el seguimiento de infecciones por herpesvirus en trasplantados pediátricos cubanos, posibilitando imponer tratamiento precoz (terapia anticipada) y evaluar respuesta al tratamiento antiviral.

## **I.4 Valor teórico**

- Se demuestra la elevada prevalencia de infección por CMV en la población de gestantes cubanas estudiadas y la asociación de algunos factores epidemiológicos con el riesgo de infección.
- Se reporta que la incidencia de infección congénita por CMV es intermedia y con una alta transmisibilidad vertical.

- Este estudio muestra la elevada frecuencia de activación y excreción de los herpesvirus en pacientes trasplantados pediátricos, particularmente el CMV, que además se asocia a viremia y complicaciones.
- Contribuye a conocer la dinámica de replicación viral de los herpesvirus en diferentes fluidos, en pacientes trasplantados y el valor que tiene la detección en orina de CMV como predictor de viremia.

### **I.5 Valor práctico**

- Se demuestra la necesidad de implementar protocolos de laboratorio para el diagnóstico temprano de CMV en gestantes cubanas con riesgo de desarrollar infección congénita.
- El diagnóstico temprano de la infección congénita por CMV permite realizar el seguimiento estrecho de los niños cubanos que nazcan infectados, poner tratamiento precoz si aparece alguna sintomatología y disminuir la posibilidad de secuelas.
- El poder contar con herramientas moleculares cuantitativas y con un protocolo de seguimiento de infecciones por herpesvirus en trasplantados pediátricos, ha posibilitado realizar diagnósticos tempranos efectivos, instaurar terapia específica y evaluar la respuesta a la misma, lo que redundó en una mejoría en la calidad de la vida del paciente trasplantado.
- El conocimiento del impacto de la infección por CMV en gestantes y recién nacidos así como en receptores de trasplante pediátricos, es de gran valor para nuestro sistema de salud, el Programa de Atención Materno Infantil y del Grupo Nacional de Trasplante, así como para elevar la calidad de los indicadores de salud.

Los resultados presentados en este documento han sido objeto de reconocimientos y premios: dos premios de la Academia de Ciencias de Cuba (2007 y 2010), mención en el concurso Central del Premio Anual de Salud del Ministerio de Salud Pública Cubano en la categoría de investigación básica (2009), Reconocimiento Nacional del Ministerio de Salud Pública Cubano (2010), Sello Forjadores del Futuro (2010), Premio en el Fórum Municipal y Provincial de Ciencia y Técnica (2008 y 2011).

Los estudios realizados formaron parte de tres tesis, dos de trabajo de terminación de la residencia en la especialidad de Microbiología y Genética y otra de Maestría en Virología. Además formó parte de dos proyectos internacionales: “Epidemiología de la infección congénita por CMV en Cuba y su diagnóstico prenatal, 2007-2009” e “Implementación en Cuba del seguimiento de los principales agentes virales que afectan a pacientes receptores de trasplante en edad pediátrica, 2009-2011”.

## I.6 Publicaciones científicas donde han sido expuestos los resultados de la tesis

- ✓ **Correa CB**, Kourí V, Verdasquera D, Martínez PA, Álvarez A, Aleman Y, Pérez L, Viera J, González R, Pérez E, Moro I, Navarro MA and Melin P. HCMV seroprevalence and associated risk factors in pregnant women, Havana City, 2007 to 2008. *Prenat Diagn.* 2010; 30: 888–892.
- ✓ **Correa CB**, Kourí V, Verdasquera D, Martínez PA, Alvarez A, Alemán Y, Pérez L, Golpe MA, Someilán T, Chong Y, Fresno C, Navarro MA, Pérez E, Moro I, Sanchez R, Llanusa C, Melin P. Diagnosis and screening for Cytomegalovirus infection in pregnant women in Cuba as prognostic markers of congenital infection in newborns. 2007-2008. *Pediatrc Infect Dis J.* 2010; 29 (6): 1105-1110.
- ✓ **Correa C**, Kouri V, Verdasquera D, Martinez PA, Alvarez A, Aleman Y, Perez L, Viera J, Gonzalez R, Perez E, Moro I, Navarro M, Melin P. Diagnosis and screening for congenital CMV infection in pregnant women in Cuba as prognostic markers of congenital cytomegalovirus in newborns. *Clinical Microbiology and Infection.* 2009;16 (Supplement 2): S326.

## I.7 Eventos científicos donde han sido expuestos los resultados de la tesis

- VI Congreso Nacional de Inmunología (2008, Cuba)
- XIV Jornada de médicos residentes del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). Premio relevante (2009, Cuba).
- Congreso 70 aniversario del IPK, VII congreso cubano de Microbiología y Parasitología. IV Congreso nacional de Medicina Tropical (2009, Cuba).
- XVII Jornada Científico estudiantil Provincial y VI de residentes. Premio relevante (2009, Cuba).
- XIV Congreso Nacional de Obstetricia y Ginecología (2010, Cuba).
- 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (2010, Austria).
- Congreso Nacional de Inmunología (2011, Cuba)
- VII Jornada de Infectología Pediátrica (2011, Cuba)
- Congreso de Hematología (2013, Cuba)

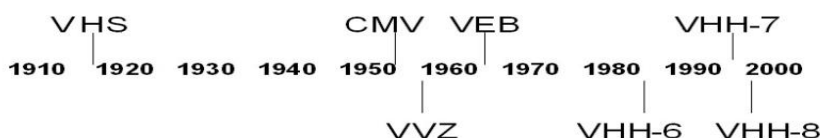


## **II MARCO TEÓRICO**

## II MARCO TEÓRICO

### II.1 Historia

Los herpesvirus son una familia de virus, en la que sus miembros se describieron a todo lo largo del siglo XX (Figura 1). A pesar de esto, los hallazgos clínicos y anatomopatológicos vinculados a estos virus se describen desde mucho antes en algunos casos, por ejemplo los cambios celulares asociados con CMV se detallaron por un grupo de científicos alemanes encabezados por Ribbert en 1881 y la enfermedad de inclusión citomegálica fue descrita mucho antes del descubrimiento de su origen (42).



**Figura 1.** Fechas de descripción de los diferentes herpesvirus que afectan a humanos.

Tomado de URL: <http://www.vivoysano.org.mx>.

Abreviaturas: CMV: Citomegalovirus, VHH6: Virus Herpes Humano 6, VEB: Virus Epstein Barr, VHS: Virus Herpes Simple.

El estudio de la mayoría de estos agentes (CMV, VHS y Virus Varicela Zóster [VVZ]) no avanzó hasta que se lograron aislar en cultivos celulares, momento desde el cual se comenzaron a estudiar con mayor profundidad. La técnica de aislamiento a partir del cultivo celular constituiría una herramienta de gran valor para los estudios del CMV y las infecciones provocadas por él (43).

### II.2 Clasificación, características generales y estructura de los herpesvirus

Los herpesvirus que afectan a los humanos pertenecen a la familia *Herpesviridae* y en ésta se agrupan en tres subfamilias *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gamamaherpesvirinae* teniendo en cuenta sus propiedades biológicas y su secuencia nucleotídica (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de los herpesvirus.

Subfamilia	Género	Ejemplos
<i>Alfaherpesvirinae</i>	Simplexvirus	VHS-1, VHS-2
	Varicelovirus	VVZ
<i>Betaherpesvirinae</i>	Citomegalovirus	CMV
	Roseolovirus	VHH6 y VHH7
<i>Gamamaherpesvirinae</i>	Linfocriptovirus	VEB
	Radinovirus	VHH8 Herpesvirus Saimiri

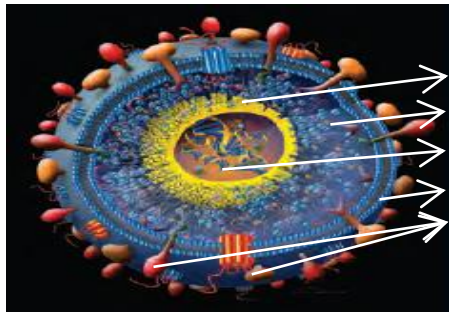
Abreviaturas: VHS: Virus Herpes Simple, VVZ: Virus Varicela Zóster, CMV: Citomegalovirus, VHH6: Virus del Herpes humano 6, VHH7: Virus del Herpes humano 7, VEB: Virus Epstein Barr, VHH8: Virus del Herpes humano 8.

Todos los herpesvirus comparten las siguientes características (44):

- Presentan una gran cantidad de enzimas necesarias para la síntesis de ácido desoxiribonucleico (ADN) y el procesamiento de proteínas. Estas enzimas varían en número y organización de un herpesvirus a otro.
- La síntesis del ADN viral y el ensamblaje de la cápside ocurren en el núcleo, mientras que el procesamiento del virión sucede en el citoplasma. La producción de la progenie viral siempre se acompaña de la destrucción de la célula infectada.
- Los herpesvirus permanecen latentes en sus hospederos naturales. En las células donde permanecen de esta forma, el genoma viral es una molécula circular cerrada y solo se expresa un número limitado de genes virales. A partir de los genomas latentes, los virus tienen la capacidad de replicarse y causar reactivación e inclusive enfermedad. No se conoce el mecanismo exacto por el cual ocurre la reactivación y puede ser diferente entre los diferentes virus. En la latencia no hay producción de virus, a diferencia de la infección crónica. Estos virus pueden permanecer latentes en unas células y activos en otras, lo que da lugar a varias situaciones: (a) todas las células están infectadas de forma latente; (b) excreción asintomática, que es la infección lítica en un grupo de células en ausencia de síntomas o signos (este es el estado más común para la mayoría de los virus de esta familia) y (c) enfermedad por la actividad lítica viral, en la que pueden permanecer algunas células en estado latente.

Los herpesvirus difieren en sus propiedades biológicas. El VHS infecta un amplio rango de células en el hospedero, posee una replicación eficiente y destruye rápidamente a las células infectadas. El VEB y el Virus del Herpes Humano 6 (VHH6) tienen poca variedad de células hospederas (fundamentalmente aquellas del sistema inmune). El CMV es específico para cada especie de hospedero y tiene un ciclo replicativo largo. Algunos de estos virus permanecen latentes en células específicas, las que varían de un virus a otro (44) y difieren en las manifestaciones clínicas que provocan, aunque varios de estos virus pueden causar un mismo cuadro clínico (44).

La estructura típica de un herpesvirus (Figura 2) está compuesta por el core, la nucleocápside, el tegumento y la envoltura (44). El CMV tiene la particularidad de poseer un mayor diámetro del virión (200 a 300 nm) y una envoltura más irregular (45).



Núcleo  
Cápside  
Tegumento  
Genoma  
Envoltura  
Glicoproteínas

**Figura 2.** Estructura de los herpesvirus.

Tomado de: (46)

Los viriones contienen una nucleocápside icosaédrica (45), que encierra al core, el cual contiene el ADN estrechamente unido a poliaminas (44). El genoma de los herpesvirus es una molécula de ADN lineal de doble cadena, de 120 a 250 kilo pares de base (kpb)(45). El CMV tiene el genoma de mayor tamaño y complejidad entre los virus que infectan al hombre (47).

Las proteínas del tegumento tienden a ser inmunogénicas, entre estas se encuentra la pp65 en el CMV (antígeno que se detecta en los ensayos de antigenemia) (44, 45).

### **II.3 Patogenia**

La infección primaria se inicia típicamente con la replicación en el epitelio de las mucosas, luego del contacto directo con las secreciones infectadas. Ocurre entonces la fase sistémica, que depende de la viremia y está acompañada de excreción viral en varios fluidos corporales (45). La viremia no se detecta en las infecciones causadas por alfa herpesvirus en individuos inmunocompetentes (48, 49).

Los herpesvirus exhiben un amplio rango de tropismo para células diferenciadas (Tabla 2), especialmente cuando la vigilancia inmune está comprometida. La distribución del CMV durante la fase aguda en individuos inmunocomprometidos abarca un amplio rango de células endoteliales, epiteliales y hematopoyéticas. Luego de la replicación inicial aparece la respuesta inmune que ejerce un efecto supresor en esta, pero el virus no es eliminado, se establece así la infección latente con ausencia de la replicación y la excreción viral (Tabla 2) (45).

Los herpesvirus son oportunistas y provocan enfermedad en individuos con un compromiso severo o ausencia de la respuesta inmune adaptativa. Estos virus se activan y replican en condiciones de inflamación, pero se desconocen los factores exactos que provocan la enfermedad. La infección por estos virus es ubicua debido a que la respuesta antiviral es fuerte, duradera y amplia en las personas con un sistema inmune normal o adecuado (45, 48-51).

**Tabla 2.** Características seleccionadas de los herpesvirus.

Nombre	Células que infecta	Latencia	Transmisión
VHS 1 y 2	Epitelio, mucosas	Neuronas	Contacto estrecho oral o genital
VVZ	Epitelio, mucosas	Neuronas	Contacto, respiratorio
VEB	Epitelio, linfocitos B	Linfocitos B	Saliva
CMV	Epitelio, linfocitos, monocitos	Monocitos, linfocitos, glándulas	Contacto, transfusiones, trasplante, vía vertical.
VHH6	Linfocitos T y otros	Linfocitos T y otros	Contacto, respiratoria
VHH7	Linfocitos T y otros	Linfocitos T y otros	Desconocida
VHH8	Células endoteliales	Desconocido	Sexual, ¿otros?

Abreviaturas: VHS: Virus Herpes Simple, VVZ: Virus Varicela Zóster, CMV: Citomegalovirus, VHH6: Virus del Herpes humano 6, VHH7: Virus del Herpes humano 7, VEB: Virus Epstein Barr, VHH8: Virus del Herpes humano 8.

La replicación persistente de los herpesvirus ocurre en las células epiteliales de las glándulas salivales, el CMV además se replica en el riñón, lo que conlleva a la excreción esporádica en los fluidos corporales durante la vida. Los alfa herpesvirus se encuentran latentes en los ganglios dorsales sensoriales, mientras que el VEB se localiza en linfocitos (52). Varios tipos celulares de progenitores mieloides han sido implicados en la latencia del CMV, aunque se desconoce cuándo el ADN de CMV detectado pertenece a una célula con infección latente y cuándo a una célula con reactivación de la infección.

### **II.3.1 Patogenia de la infección congénita por CMV**

En la infección materna primaria, la respuesta inmune antiviral comienza con la transmisión del virus al feto, mientras que en la recurrencia viral la transmisión hacia el feto ocurre en presencia de la respuesta inmune celular y humoral. Como resultado de lo anterior, la viremia ocurre con mayor frecuencia en los casos con infección primaria (6).

Las barreras de la respuesta inmune innata previenen parcialmente la transmisión vertical. Poco se conoce de los mecanismos de transmisión del CMV de la gestante al feto. El 15 % de las mujeres que tienen una infección primaria en los primeros meses de la gestación abortan espontáneamente, mostrando infección placentaria pero no fetal. Subsecuentemente, en el curso del embarazo la infección placentaria se asocia a infección fetal.

Durante la infección primaria de la madre, los leucocitos transportan virus infecciosos, que pueden transmitir la infección por CMV a las células endoteliales microvasculares. Estas células se encuentran en contacto directo con los citotroblastos de las vellosidades de anclaje, que invaden las arteriolas maternas y que forman híbridos de células maternas y fetales. Los citotroblastos infectados pueden

transmitir la infección a los tejidos subyacentes del corión velloso, incluidos los fibroblastos y células endoteliales fetales y entonces diseminarse al feto (6).

En el caso de la infección congénita luego de una recurrencia de la infección materna, se debe considerar la placenta como un semitrasplante que induce inmunosupresión local en el útero. La inmunosupresión local causa una reactivación del virus latente en los macrófagos de la pared uterina, con una transmisión de CMV a los citotrofoblastos invasores. Entonces, el virus se puede diseminar de una manera retrógrada a las vellosidades de anclaje y subsecuentemente al feto (6).

Como consecuencia de la infección placentaria, el CMV actúa sobre la diferenciación citotrofoblástica. Esto puede explicar los abortos que ocurren en las gestantes con infección primaria en los primeros meses del embarazo (6). La infección de la placenta puede conllevar a una transmisión al feto. La transmisión placentaria al feto ocurre en el 30-50 % de los casos, por lo que la infección congénita puede ser adquirida en el útero luego de una primoinfección o una reactivación viral (53, 54). El CMV es el único herpesvirus que posee una transmisión transplacentaria natural.

Poco se conoce de los mecanismos por los que el CMV daña al feto (55). Se plantea que la diseminación en el feto ocurre por la sangre y las células retículo endoteliales infectadas, las que pueden causar una vasculitis obliterante y lesiones inflamatorias en tejidos periféricos (53).

La susceptibilidad del feto a la infección por CMV es secundaria a la inmadurez en el sistema inmune. Se conoce poco la inmunidad fetal, algunos fetos presentan afecciones severas, que incluyen hepatitis, depresión de la médula ósea, pero poco o ningún daño en el SNC, mientras que otros presentan daño esencialmente en el SNC (46).

La patogénesis de la enfermedad en el niño infectado puede ser explicada por la replicación viral y el daño celular secundario. Sin embargo, una notable excepción es la enfermedad del SNC. La patología del SNC en niños con infección congénita es variable e incluye déficits de migración, calcificaciones, déficits en la celularidad, áreas de cerebritis local e hipoplasia cerebelar. Estas anomalías se encuentran en ambos hemisferios cerebrales de forma simétrica, lo que es consistente con la toma del neuroepitelio de la zona subventricular o la enfermedad secundaria a la vasculitis en el SNC. De forma alternativa la enfermedad puede ser secundaria a la inflamación del SNC (46).

Sin embargo, la patogénesis exacta del daño neurológico no ha sido elucidada. Se plantea que un posible blanco de la infección sean las células pluripotenciales neurales, que se encuentran en elevado número en el área ventricular y que su afectación es el responsable del daño encefálico (56).

En general, la enfermedad del SNC permanece estática en el período post natal con la excepción del sistema auditivo. Las anomalías auditivas se detectan en el 8 % de los casos con infección

congénita; las que pueden progresar en los seis primeros años de vida (46). No se conoce cuál es el origen de la progresión de la enfermedad luego del nacimiento, si esta se debe a una reactivación del virus, a una respuesta inmunológica tardía o a una presentación clínica tardía del daño que ya existía desde el momento de la infección inicial (46, 54).

### **II.3.2 Patogenia de las infecciones por herpesvirus en receptores de trasplante**

En los receptores de trasplante pueden ocurrir tres tipos de infección por herpesvirus: primaria, reactivación o reinfección, cualquiera de éstas puede provocar enfermedad. La infección primaria ocurre cuando se adquiere el virus, generalmente, a partir de transfusiones sanguíneas o del órgano trasplantado a partir de un donante seropositivo a un receptor seronegativo (estado serológico donante receptor [D/R]). Este tipo de infección causa enfermedad viral sintomática con elevada frecuencia (50-75 %) y es difícil de prevenir, además recurre con más frecuencia luego de ser tratada y es causa común de muerte al compararla con la reactivación (57).

La reactivación es causada por el herpesvirus que previamente causó infección en el receptor y entró a estado latente episomal, volviéndose activo luego de la supresión de las defensas del hospedero. La reinfección ocurre en aquellos pacientes que están infectados con una cepa de ese virus y se infectan con otra cepa. Si esta cepa es suficientemente diferente a la inicial y las defensas del hospedero están disminuidas, entonces puede ocurrir la enfermedad por el virus debido a la reactivación o la reinfección en el 10 al 20 % de los receptores; pero generalmente los síntomas son moderados o leves en comparación con aquellos que desarrollan enfermedad por infección primaria. No obstante, los pacientes seropositivos (D+/R+) tienen con frecuencia enfermedad viral, por lo que la reactivación y la reinfección son fenómenos comunes luego del trasplante (57).

Los herpesvirus producen efectos indirectos importantes, pues también provocan la pérdida del injerto y morbilidad-mortalidad. Un efecto frecuente es el incremento de otras infecciones oportunistas, la promoción de enfermedades tumorales, la disminución de la supervivencia del receptor, la pérdida del órgano trasplantado y el aumento a la susceptibilidad al rechazo, entre otras (52, 58-64).

La patogénesis de la enfermedad aguda parece guardar relación con la imposibilidad de limitar la replicación y diseminación viral, debido al fallo de la respuesta celular y humoral. El nivel de replicación y el nivel de su aumento, se correlacionan con la enfermedad, el daño al órgano y su diseminación; por esta razón tienen un valor pronóstico. La presencia del CMV en el órgano o en el individuo trasplantado es un elemento necesario para el rechazo agudo (46).

En contraste, la patogénesis de las manifestaciones asociadas a infecciones persistentes o crónicas aún no se conoce, pues la enfermedad suele estar localizada en un órgano o sistema de órganos. El

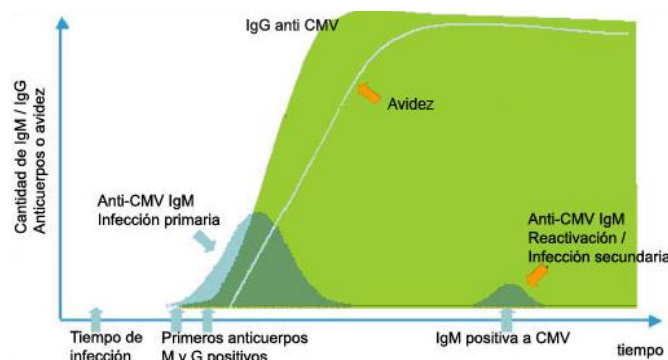
control de la infección persistente o crónica depende de la integridad del sistema inmune (45, 48-51). El CMV ataca a las células presentes en los sitios donde hay inflamación o mediadores de ésta y las citoquinas pro-inflamatorias inducen la replicación de los virus latentes (45, 46, 65). El CMV se replica en las células mononucleares y en los macrófagos y utiliza estas células para su diseminación. Estos dos hallazgos apoyan el concepto de que la respuesta inflamatoria y el virus tienen una relación co-dependiente que favorece la persistencia aún en presencia de la respuesta inflamatoria (46).

#### II.4 Respuesta inmune frente a la infección por herpesvirus

La infección primaria se encuentra bajo el control coordinado de la repuesta inmune innata y adaptativa. La respuesta adaptativa protectora se encuentra mediada por los linfocitos T y los Acs juegan un papel secundario, aunque importante, en la protección del hospedero. En la inmunidad innata las células asesinas naturales (NK, siglas del inglés Natural Killer) y el interferón son los elementos más importantes en el control de la replicación viral (44).

La cinética de la producción de inmunoglobulina M (IgM) contra los herpesvirus durante la infección primaria puede variar entre diferentes individuos. En general, el pico de la IgM puede ser detectado durante los primeros uno a tres meses luego del comienzo de la infección, luego el título comienza a disminuir, hasta su desaparición de forma general de seis a 12 meses (6). Aunque la IgM puede mantenerse por un período relativamente largo de tiempo (seis a 18 meses) en la infección primaria y en la activa no primaria, no debe ser usada como único indicador de infección primaria; pues se puede encontrar en niveles similares en la infección primaria y la reactivación o la reinfección en algunos individuos (45, 48-51).

La dinámica de la respuesta inmune humoral se puede apreciar a través del ejemplo de la respuesta frente al CMV en la Figura 3.



**Figura 3.** Dinámica de la respuesta inmune humoral frente al CMV.

Tomado de URL: [http://www.abbottdiagnostics.com/Your\\_Health/Infectious\\_Diseases/CMV/](http://www.abbottdiagnostics.com/Your_Health/Infectious_Diseases/CMV/)

Abreviaturas: CMV: Citomegalovirus, IgM: Inmunoglobulina M, IgG: Inmunoglobulina G.



Otro indicador del diagnóstico de infección primaria es la presencia de Acs inmunoglobulina G (IgG) de baja avidéz; la que se detecta durante los primeros tres meses luego de la infección. La alta avidéz se detecta en los pacientes que presentan una infección recurrente. Los niveles de avidéz son reportados como el índice de avidéz, expresando el porcentaje de Acs IgG que se unen al antígeno luego del tratamiento con agentes desnaturalizantes, como la urea 8 molar (M).

En el intervalo de cuatro a seis meses luego del comienzo de la infección, la mayor parte de los pacientes mantienen un valor de índice de avidéz intermedio, una menor parte de los casos mantienen un índice de avidéz bajo y otra parte presenta un índice de avidéz alto (6).

La infección por herpesvirus induce una respuesta de células T grupo de diferenciación celular (CD, siglas del inglés Cluster of differentiation) 4+ en hospederos inmunocompetentes, que participan en el control de la replicación viral, de la diseminación y de la enfermedad. Durante la infección viral persistente, ocurre una presión en la selección y en el reclutamiento de clones del repertorio de células T CD4+, las que se agotan rápidamente o el exceso de éstas queda en células de memoria (48-51, 66).

El conocimiento de las funciones inmunomoduladoras de los genes del CMV refuerza la importancia del interferón, las células NK, las células T y los Acs, como mecanismos aclaradores de la infección viral. El CMV ha evolucionado a estrategias de escape, desde la represión transcripcional primitiva, la muerte celular, la respuesta de interferón, las citoquinas innatas y la respuesta de las células NK que se encuentra en animales, hasta la respuesta adaptativa humoral y celular que sólo se observa en los mamíferos. Estas estrategias de escape han coevolucionado e interfieren con la respuesta del hospedero a la infección por múltiples mecanismos y en momentos diferentes del ciclo replicativo viral (45).

En el período perinatal la respuesta de CD8+ está alterada debido a la alta tasa de enfermedad en la infección congénita. La inmunidad celular no es completamente funcional en el feto (67-70).

Se desconoce si existe alguna diferencia clínica entre los fetos de madres con reinfección o reactivación por CMV, pues ambas pueden tener un hijo con una infección congénita sintomática. Siempre hay un porcentaje de mujeres con IgM e IgG en las que es imposible determinar si tienen una infección primaria o una reactivación/reinfección (67, 70).

La severidad de la enfermedad causada por la infección por herpesvirus, en particular por el CMV, es proporcional al grado de funcionamiento de la inmunidad celular en pacientes receptores de trasplante (45).

El sistema inmune no evolucionó al rechazo de tejidos transplantados, pero la respuesta frente a tejidos de individuos no relacionados genéticamente es potente. Esto se debe en parte, a que los receptores de células T reconocen los péptidos derivados del donante en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad propias, lo que se conoce como presentación indirecta. Además, ocurre la identificación de las moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad del donante presentadas en las células presentadoras de antígenos propias (71). Otro aspecto en la inmunidad del trasplante es que una molécula viral puede estimular un clon de células T por reactividad cruzada, debido a la estructura tridimensional del antígeno y alterar así la respuesta alo-inmune (71).

A través de los receptores de las células del sistema inmune innato se desencadena un sistema de señales (quimoquinas rápidas, citoquinas, aumento de la presentación de antígenos y el aumento de expresión de moléculas co-estimuladoras), que actúan aumentando la eficiencia y dirigen el carácter de la respuesta adaptativa. Si ocurre una infección concomitantemente con el trasplante o si ocurre en el órgano trasplantado, entonces los mecanismos innatos influyen la fuerza y el carácter de la respuesta inmune. La infección viral promueve el reclutamiento de las poblaciones policlonales de células T de memoria y el ambiente inflamatorio local de citoquinas también estimula la proliferación y activación de células T (71).

Las infecciones por herpesvirus provocan además linfopenia transitoria. Un concepto emergente es que la linfopenia (de causa viral o clínica) y la consecuente proliferación homeostática pueden aumentar la inmunopatología ya sea la autoinmunidad o el rechazo, así como la alo-inmunidad (71).

La restauración de la inmunidad de células T luego del proceso del trasplante de células precursoras hematopoyéticas (TCPH) es un proceso lento. El rebote del timo puede ser tardío y la contribución de las células T generadas durante los seis primeros meses puede ser poco eficaz. Entonces, la protección inicial frente a los virus depende de las células co-infundidas del donante o de las células T del receptor sobrevivientes a la mielo ablación condicionante. Este fenómeno adquiere relevancia en algunos pacientes que quedan desprotegidos si el donante es negativo, debido a que solo les quedarían las células T sobrevivientes al acondicionamiento (72).

## **II.5 Cuadro clínico**

La infección por herpesvirus es clínicamente silente en el individuo inmunocompetente y con menor frecuencia es causa de sintomatología. En casos sintomáticos los cuadros clínicos son muy variables y un mismo virus puede producir diversos síntomas y enfermedades. Diferentes virus pueden producir la misma enfermedad por lo que resulta difícil realizar el diagnóstico diferencial (45, 48, 50, 51).

### **II.5.1 Cuadro clínico de la infección por CMV en gestantes y recién nacidos**

El 90 % de las infecciones adquiridas en las gestantes son clínicamente silentes. En las sintomáticas se describe por orden de frecuencia: el síndrome mononucleósico, el síndrome febril, la parálisis de Bell (45), la debilidad, el dolor de garganta, la tos, los escalofríos, las mialgias, las náuseas, el polihidramnios, el oligoamnios y el adelgazamiento de la placenta (73).

Las infecciones congénitas sintomáticas y las secuelas del SNC son más frecuentes en los hijos de madres con primoinfección por CMV (45, 54). La infección materna afecta alrededor del 40 % de los fetos en cualquier momento del embarazo. El daño o riesgo del feto es mayor cuando la infección en la madre ocurre más temprano en el embarazo; sin embargo, solo el 5-10 % de los fetos nacen con síntomas. Efectos tardíos pueden esperarse en el 10 al 25 % de los niños asintomáticos (42, 54).

Los recién nacidos sintomáticos presentan manifestaciones que indican la afección de múltiples sistemas de órganos desde el crecimiento en el útero; lo que puede ocasionar una enfermedad severa, con prolongada hospitalización y muerte neonatal en el 10 % de los sintomáticos (45). Los principales hallazgos clínicos por orden de frecuencia son: petequias o púrpura, crecimiento intrauterino retardado (CIUR), hepatoesplenomegalia, ictero, anemia hemolítica, neumonía (45), hepatitis (con colestasis y calcificaciones) (42), trombocitopenia y corioretinitis; la mayoría de estos signos mejoran en semanas o meses. Pueden aparecer anomalías neurológicas en el 68 % de los casos, las que incluyen la microcefalia, la pobre alimentación, el letargo, la hipotonía generalizada, las convulsiones, la atrofia cortical, la lisencefalia y la ventriculomegalia. Las tomografías axiales computarizadas son anormales en el 75 % de los sintomáticos y la calcificación periventricular es el hallazgo más común (45).

El CMV es la causa infecciosa más frecuente de sordera neurosensorial y daño cerebral. Más del 50 % de los recién nacidos sintomáticos tendrán una combinación de déficit que incluye el retraso mental, la parálisis cerebral, la pérdida auditiva neurosensorial y la visión defectuosa. Las secuelas en el SNC ocurren en más del 90 % de los niños con infección congénita que son sintomáticos al nacimiento (45). La progresión de la enfermedad se detecta en algunos casos con secuelas. El 30-80 % de los niños con déficit auditivo unilateral desarrollan pérdida auditiva en el oído sano o experimentan una pérdida progresiva en el oído afectado. Esta progresión aparece en los niños de hasta 6 años, aunque también hay casos con una aparición más tardía (54).

### **II.5.2 Cuadro clínico de la infección herpesviral en receptores de trasplante**

La mayoría de los pacientes que desarrollan una infección sintomática por herpesvirus, presentan síntomas moderados de fiebre, mialgias, letargo y disnea moderada, acompañados de leucopenia.

Los síntomas más severos incluyen neumonitis, neumonía, sangramiento gastrointestinal, nefritis, hepatitis, pancreatitis y leucopenia severa. Los casos fatales, son aquellos con hipoxia severa y fallo respiratorio debido a una neumonitis progresiva, así como hipotensión, coagulación intravascular diseminada, hemorragia gastrointestinal masiva y fallo múltiple de órganos; que ocurren con poca frecuencia desde la introducción del tratamiento antiviral específico (57).

Las manifestaciones clínicas resultantes de la infección por CMV pueden ser agrupadas en tres categorías. La primera, es una enfermedad moderada que se manifiesta por fiebre, leucopenia, malestar general, con viremia sin invasión de órganos específicos. La segunda, proporcionada por el tropismo del CMV por el órgano trasplantado, que provoca nefritis en receptores renales, enfermedad coronaria en receptores cardíacos, neumonitis en pulmonares, pancreatitis en pancreáticos y enteritis en los intestinales. Por último, la invasión de uno o varios tejidos específicos luego de la viremia no tratada o controlada, se manifiesta frecuentemente como una neumonitis difusa o una neumonía; pero que puede involucrar a una parte del tracto gastrointestinal, mimetizando una gastritis erosiva, una hepatitis o una pancreatitis. La enfermedad localizada en el órgano trasplantado puede imitar al rechazo y ser indistinguible de otras enfermedades infecciosas o ulcerogénicas; por lo que es necesaria la obtención de tejido para el diagnóstico (57).

Un sitio poco frecuente de enfermedad en el receptor de trasplante es la retina, en la cual habitualmente la afectación es bilateral y puede resultar en una ceguera permanente (57).

En los trasplantados de órganos sólidos la infección o reactivación de ésta ocurre en el 44-85 %, comúnmente en los primeros tres meses luego del trasplante; pues es cuando la inmunodepresión es más severa. La enfermedad terminal orgánica afecta al 10-30 % de estos pacientes, con daños severos al órgano trasplantado; seguido de la diseminación y la toma de otros órganos (74).

La infección por el VHH6 en los trasplantados es más frecuente en las primeras dos a cuatro semanas post-trasplante y puede resultar en la afección del órgano trasplantado y en efectos indirectos (59). El VHH6 se asocia a la neumonía intersticial, la encefalitis, la hepatitis y la supresión del sistema inmune luego del TCPH (59). El VHH6 en la médula ósea se asocia a la supresión medular post-trasplante, al rechazo y al retraso en la producción de plaquetas en TCPH. Mientras que en los receptores de trasplante de órgano sólido (TOS), el VHH6 es causa de síndrome febril, disfunción hepática, leucopenia, neumonitis, encefalitis y otras complicaciones neurológicas (59).

Se describen síndromes febriles inespecíficos, neumonía intersticial y hepatitis asociada al VEB en receptores de trasplante, pero el aspecto más importante de la infección por este virus es el papel patogénico en el desarrollo del síndrome linfoproliferativo post-trasplante (SLP). El mecanismo

propuesto en la patogénesis del SLP, es que este agente promueve una respuesta policlonal o monoclonal de células B o con menor frecuencia de células T. Esta afección se puede localizar en los nódulos o ser extranodular y estar ubicada en el tracto gastrointestinal, los pulmones, el hígado, el SNC, el órgano trasplantado y en la piel (75).

Las manifestaciones más comunes de la infección por VHS son las ulceraciones en la mucosa oral o genital, que aparecen en las primeras tres semanas tras el trasplante. De manera excepcional, la infección por VHS puede presentarse con afectación de múltiples órganos, en ocasiones sin afectación mucocutánea. Estas formas graves de infección herpética, son letales en ausencia de tratamiento antiviral adecuado. Otras formas clínicas de infección herpética, como la encefalitis y la queratitis, son raras en el paciente trasplantado (76).

La incidencia de la infección sintomática por el VVZ en el receptor de trasplante oscila alrededor del 5-7 %. La primoinfección (varicela) se puede producir en cualquier momento luego del trasplante y es frecuente en los niños. En el trasplantado ocasiona un cuadro grave con afectación visceral (neumonía, hepatitis, encefalitis, trombocitopenia, pancreatitis, nefritis, esplenitis, esofagitis, miocarditis, enterocolitis) y las lesiones cutáneas son mayores y más numerosas; aunque puede presentarse en forma de hepatitis grave sin afectación cutánea. La reactivación del virus latente (herpes zóster) suele ocurrir después de transcurridos seis meses tras la cirugía (49, 76).

## **II.6 Epidemiología**

La prevalencia de la infección por herpesvirus se incrementa con la edad. La media de la edad de adquisición de la infección varía de acuerdo a las condiciones de vida, siendo menor en el estrato socioeconómico más bajo (45). Existen otros factores asociados a una mayor prevalencia, como son la etnicidad, el comportamiento sexual y la actividad profesional (53).

La transmisión ocurre en las personas susceptibles que se pongan en contacto directo con fluidos corporales de individuos que estén excretando el virus. Luego de la adquisición inicial por el hospedero susceptible, el virus infeccioso se puede excretar por meses a años en algunos de los fluidos y secreciones corporales de este, por ejemplo los niños que nacen infectados por CMV, permanecen excretando el virus en la orina por un promedio de cuatro a cinco años (73).

### **II.6.1 Transmisión al feto y al recién nacido**

Existen tres rutas de transmisión del CMV de la madre al feto o al recién nacido, la trasplacentaria, la intraparto y por la lactancia materna. La transmisión fetal varía de un 30 al 50 % para los casos con infección primaria y del 2 al 3 % para los que tienen infección recurrente. La incidencia de la infección congénita por CMV es del 0,3 al 2,4 % (53).

La transmisión intraparto está relacionada con la excreción local del virus en los genitales maternos, que ocurre en el 10 % de las gestantes. La vía más común de transmisión del CMV de la madre al niño es la lactancia materna. Estas dos últimas formas de transmisión no están asociadas con la morbilidad de la infección congénita (excepto en los recién nacidos prematuros bajo peso) y la excreción del virus puede ser detectada a partir de la sexta semana (74).

### **II.6.2 Epidemiología de la infección por herpesvirus en receptores de trasplante**

Los factores de riesgo para la enfermedad por CMV incluyen: recibir un órgano de un donante seropositivo (D+/R-), este factor aumenta el riesgo en cinco a siete veces; recibir un órgano de un fallecido; recibir tratamiento por rechazo agudo, particularmente con Acs anti-linfocíticos; ser mayor de 55 años y recibir un trasplante de páncreas (57).

El VHH6 tiene dos subtipos (A y B) y la primoinfección ocurre habitualmente en niños pequeños, por lo que los adultos están infectados en su mayoría. EL ADN de este virus es detectable en la saliva y en las células mononucleares en sangre periférica en el 90 % de los individuos saludables; en los que predomina el VHH6-B (59).

Más del 80 % de los receptores de trasplante son seropositivos para el VHS y aproximadamente el 40-50 % de ellos desarrollan una infección sintomática (76).

El VEB se detecta, fundamentalmente, luego de los seis meses de injertado el órgano, cuando existe una inmunosupresión moderada (76). La frecuencia del SLP es mayor en los receptores pediátricos de trasplante (mayor al 3-4 %) (75-77).

La incidencia del zóster en TCPH es mayor del 25 %, mientras que en los receptores de TOS es del 15 % en los cinco primeros años post-trasplante (49).

### **II.7 Diagnóstico**

El diagnóstico se realiza a través de la detección de Acs específicos o del virus o sus componentes. Otro método es el citológico, en el que se puede apreciar el efecto de la infección viral por CMV (células de inclusión citomegálicas)(45) o VHS (células gigantes multinucleadas en el VHS) (48) en los tejidos. Las tinciones que se pueden emplear son Papanicolau, Giemsa y Tzanck.

Las técnicas serológicas son útiles para determinar si una infección ocurrió en el pasado o de forma reciente, esta última a través de la presencia de seroconversión o de la IgM específica en un hospedero inmunocompetente. La presencia de IgM anti herpesviral indica infección activa reciente, aunque éste no debe ser el único indicador de infección primaria, pues puede aparecer en infecciones activas no primarias y su elevación no es constante (78). La prueba de determinación de la avidéz de IgG confirma el tipo de infección, a través de la medición de la fuerza con la que los Acs polivalentes se

unen a un antígeno polivalente. Los Acs de las fases tempranas de la infección primaria tienen una avidéz menor por el antígeno específico que los Acs producidos durante la respuesta activa no primaria. La baja avidéz se detecta hasta 18 a 20 semanas luego del comienzo de los síntomas. El grado de avidéz de la IgG se incrementa progresiva y lentamente, reflejando la maduración de la respuesta inmune. La presencia de IgM antiviral combinada con una baja o intermedia avidéz tiene el mismo valor pronóstico que la seroconversión (79). Las pruebas de Acs no son útiles para el diagnóstico en el hospedero severamente inmunocomprometido (45, 80).

Los herpesvirus se pueden detectar mediante la comprobación de la presencia viral (aislamiento e identificación) o de algunas de sus partes, entre las que se incluyen los antígenos o proteínas virales y el ADN viral. El aislamiento del CMV en cultivo de células es laborioso y en ocasiones toma más de dos semanas en aparecer el efecto citopático. El aislamiento viral en cultivo basado en el aumento de la infección de la monocapa celular por centrifugación de baja velocidad y la detección de antígenos con fluorescencia a las 24-48 horas (shell vial) es más rápido (45).

El aislamiento del VHS a partir de la inoculación en cultivo celular es el método de referencia. El efecto citopático se detecta a las 24 a 48 horas de inoculadas las células. La identificación de los subtipos 1 y 2 solo se realiza en estudios donde se necesite un análisis epidemiológico o de patogénesis (48).

El aislamiento e identificación del VVZ no se emplea con frecuencia pues el diagnóstico es clínico. En los inmunodeprimidos se emplean técnicas rápidas e informativas (cuantificación) en la evaluación de la efectividad del tratamiento antiviral, pues el aislamiento viral es un proceder lento (49).

El aislamiento de VEB y VHH6 a partir del cultivo celular es complejo, requiere de células de difícil obtención, así como de otras sustancias estimulantes de la replicación y multiplicación celular; por lo que no se utiliza como método diagnóstico (50, 51).

Los métodos moleculares para la detección de herpesvirus tienen mayor sensibilidad que el cultivo celular y se emplean con frecuencia (41, 81, 82). En inmunocomprometidos el manejo de la infección requiere de la detección y cuantificación en sangre por otros métodos diferentes al cultivo (41, 45, 81-83).

La antigenemia (detección del antígeno pp65) se usa para cuantificar el CMV en las células polimorfonucleares de la sangre, correlacionándose con el riesgo de la enfermedad. Este método tiene las desventajas que se debe realizar a pocas horas de tomada la muestra, no se pueden procesar un gran número de muestras, es laborioso y depende de la experiencia del que realiza la técnica. Sin embargo, es uno de los principales ensayos disponibles para el diagnóstico y seguimiento de la infección, a pesar de no ser un indicador directo de la replicación viral (84).

Varios métodos moleculares se emplean para la detección de CMV en muestras clínicas de pacientes inmunocomprometidos, entre los que se incluyen el PCR cualitativo y cuantitativo, amplificación basada en la secuenciación de ácidos ribonucleicos (ARN) mensajeros (NASBA) y detección por hibridación de ADN (45, 85). Estos métodos son más sensibles que la antigenemia. La correlación de los resultados cuantitativos con la ocurrencia de la enfermedad es más importante que la sensibilidad absoluta para la detección del virus (45).

El PCR-TR es un método rápido, que provee un resultado objetivo y cuantitativo. El PCR-TR es un ensayo en el que se miden los productos acumulados de ADN o ARN, a través de la medición de la sonda fluorogénica. La sonda emite una señal de fluorescencia en cada ciclo de amplificación si se encuentra unida a la secuencia blanco, con una señal que se intensifica en proporción a la cantidad de productos amplificados generados. La cantidad de ADN molde en la muestra puede ser calculada comparando el número del ciclo exacto (Punto de Corte o PC) en el cual los productos acumulados amplificaron sobre la línea base con un estándar cuantitativo. El método de PCR-TR tiene un rango grande y dinámico de cuantificación (al menos cinco órdenes de magnitud) de la molécula blanco que se encuentra en el comienzo. Las ventajas de este método incluyen: la velocidad, la simplicidad, la alta eficacia, la reproducibilidad, un posible intervalo largo entre las muestras y su procesamiento y el bajo costo de cada PCR debido a que lo que se consume es relativamente barato (73, 82, 86, 87).

### **II.7.1 Diagnóstico de laboratorio en la infección congénita**

Diagnóstico de la infección materna en el embarazo:

El diagnóstico prenatal de la infección congénita es complejo y existen varias pruebas que deben ser realizadas. La primera es la determinación de IgM anti CMV, que se utiliza en todas las gestantes en las que el estado serológico es desconocido. Luego se determina la avidéz de IgG anti CMV, que permite el diagnóstico de infección primaria o reactivación de la infección (79). La determinación de la avidéz antes de la semana 18 de la gestación identifica a todas las mujeres con infección primaria y mayor riesgo de transmitir el CMV al producto de la concepción (con una sensibilidad del 100 %). Luego de la semana 20 de la gestación la sensibilidad se reduce (62,5 %), por lo que una alta avidéz durante las primeras 12 a 16 semanas de gestación se considera un buen indicador de infección pasada (79). Por último, se pueden realizar pruebas para detectar el virus en cualquier fluido materno.

Diagnóstico de la infección fetal y del recién nacido:

La confirmación de la infección fetal por CMV se realiza en la sangre fetal o en el líquido amniótico a través de la detección del virus o alguno de sus componentes. Los principales métodos para la detección viral son el cultivo o el PCR en el líquido amniótico, los cuales pueden resultar negativos sino



se tiene en cuenta que el intervalo entre la infección materna y la amniocentesis debe ser mayor de seis semanas. El empleo de cualquier método de estudio del líquido amniótico es poco sensible si el embarazo tiene menos de 20 semanas. La IgM anti CMV se encuentra en el 60 % de los fetos infectados después de las 20 semanas y confirma la infección congénita. En conjunto, el diagnóstico prenatal permite el diagnóstico del 80 % de los casos después de las 20 semanas y entre el 40 y el 50 % de los casos antes de las 20 semanas (42, 53).

El diagnóstico postnatal se realiza por el cultivo o la detección del ADN viral, mediante PCR, en la orina, saliva y sangre durante las tres primeras semanas luego del nacimiento (42, 45, 79). La infección congénita también se diagnostica de forma retrospectiva, por PCR en gotas de sangre seca colectadas al nacer en papel de filtro que se emplea para la búsqueda de enfermedades metabólicas, detectándose en más del 75 % de los niños sintomáticos (45, 88, 89).

Cuando se desconoce si un feto está infectado congénitamente, las anomalías ultrasonográficas pueden predecir la infección sintomática en la tercera parte de los casos (90). La presencia de signos cerebrales o abdominales detectados por ultrasonido se asocia con una evolución desfavorable (91).

### **II.7.2 Diagnóstico en receptores de trasplante**

El diagnóstico en este grupo de pacientes requiere demostrar la presencia del virus y que éste es la causa de la enfermedad, debido a que ellos con frecuencia presentan viremia y excreción asintomática (45).

La cuantificación de IgM e IgG específicas a cada uno de estos virus no es un método útil para el diagnóstico en estos pacientes, debido a la depresión de la inmunidad humoral. Estas pruebas serológicas se recomiendan en el periodo pre-trasplante para conocer el estado de los pacientes frente a los herpesvirus y por tanto el riesgo de adquirirlos post-trasplante, lo cual es de importancia para aquellos receptores negativos cuyos donantes son positivos (D+/R-); lo que justificaría el empleo de profilaxis antiviral post-trasplante (57).

Los métodos de cultivo se utilizan para confirmar la sospecha clínica, el valor predictivo negativo de otros ensayos y la aparición de variantes resistentes al tratamiento antiviral (57).

El PCR cualitativo o de punto final es de utilidad porque se pueden emplear varios tipos de muestras; pero es un método muy sensible, lo que no siempre es una ventaja pues la excreción asintomática puede ser detectada y mal interpretada (57). Los PCR cuantitativos y la antigenemia proveen la ventaja de la cuantificación, que se correlaciona con el nivel de replicación y prevé el inicio de la enfermedad viral. Estos métodos cuantitativos tienen el inconveniente de que es necesaria una estandarización

precisa, para la evaluación de parámetros clínicos, en la cual aún no hay un consenso internacional (57).

No existe un diagnóstico de referencia para la detección del VHH6 y el VEB. El diagnóstico de laboratorio del VVZ y el VHS permite guiar la terapéutica antiviral (49). La carga viral permite definir la contribución o no de estos agentes a las complicaciones post-trasplante (59).

## **II.8 Tratamiento**

### **II.8.1 Prevención en las gestantes y los recién nacidos**

Es difícil diseñar un plan para la prevención debido a que la infección por herpesvirus es frecuente, clínicamente silente y la excreción se detecta por largos períodos de tiempo. La exposición a niños pequeños y la actividad sexual desprotegida en las gestantes se vincula a un mayor riesgo de infección por CMV. Las gestantes que trabajan con niños deben ser informadas sobre este riesgo, así como del posible riesgo para el recién nacido, de la importancia del lavado de las manos y de evitar el contacto con secreciones (42, 45, 92). La prevención también se realiza a través de la búsqueda de Acs anti CMV en gestantes y el asesoramiento a aquellas que son seronegativas. Una forma de prevención secundaria, en este caso del nacimiento de un feto con daños mayores, sería la búsqueda de signos de afectación por ultrasonido, en particular los signos cerebrales que implicarían la terminación del embarazo. La prevención terciaria se realiza a través de la búsqueda de recién nacidos infectados y de trastornos auditivos en los niños, lo que permitirá el manejo adecuado de estos pacientes (53).

Las preparaciones de globulina hiperinmune al CMV han sido evaluadas en la prevención en gestantes y su utilidad no ha sido demostrada (45, 93, 94).

Los intentos por lograr una vacuna anti CMV para la prevención de la infección en gestantes datan de 25 años, pero ninguna vacuna en la actualidad está aprobada (95).

### **II.8.2 Prevención de la enfermedad por herpesvirus en receptores de trasplante**

Debido al impacto de la infección por CMV en la evolución post-trasplante, se utilizan antivirales e inmunoglobulina anti-CMV en forma profiláctica como estrategia para disminuir el riesgo de infección (96). Esto implica prolongar la hospitalización posterior al trasplante, utilizar medicamentos no exentos de efectos adversos y toxicidad, aumentar el costo económico, la amenaza de desarrollo de resistencia al antiviral y un aumento de la incidencia de enfermedad por CMV de presentación tardía (59).

La mayoría de los centros internacionales de trasplante utilizan la profilaxis en el grupo de mayor riesgo (D+/R-)(97-99), logrando disminuir el riesgo de enfermedad por CMV hasta el 12 % con el uso de ganciclovir/valganciclovir durante los primeros tres meses posteriores al trasplante (100). Sin embargo, esto ha favorecido el desarrollo de enfermedad por CMV de presentación tardía al suspender la

profilaxis y el posible desarrollo de resistencia al antiviral, considerado de elección para el tratamiento de la enfermedad (101).

Atentan contra el uso de la profilaxis universal que la mayoría de los casos presentan una enfermedad leve o moderada y la posibilidad del empleo de la terapia anticipada a través de la vigilancia de la carga viral o la antigenemia (57). La terapia anticipada se basa en que sobre cierto umbral de viremia la probabilidad de desarrollar enfermedad sintomática aumenta en forma exponencial. Los pacientes son evaluados, en forma estricta, con mediciones periódicas de la carga viral y al superar el valor de corte establecido, deben recibir terapia antiviral (102). El éxito de esta modalidad requiere de un método diagnóstico de gran sensibilidad, que permita diferenciar los estados de virus latente y virus en replicación. La medición de la antigenemia tiene ciertas limitaciones como predictor de enfermedad, tales como: un inadecuado reflejo de la replicación viral, la necesidad de contar con un suficiente número de leucocitos para efectuar la lectura de inmuno-fluorescencia y ser un examen operador-dependiente. El PCR-TR es el método ideal, con un valor predictor positivo de 90 % y valor predictor negativo de 95 %; sin embargo, su alto costo dificulta disponer de esta técnica en la mayoría de los centros de trasplante. La eficacia de la modalidad de terapia anticipada se constata principalmente en grupos de menor riesgo, como aquellos receptores seropositivos para CMV (101).

No existe un protocolo universal de manejo, pero se recomienda el chequeo estricto de la carga viral posterior al trasplante, el uso de la profilaxis en los grupos de riesgo (D+/R-) (101, 102) y reservar la instauración de terapia anticipada para aquellos receptores seropositivos.

No existen estudios con grupos controles en los que se evalúe la prevención o el tratamiento de la infección por el VHH6; aunque hay reportes del empleo del ganciclovir, el foscarnet y el cidofovir en la encefalitis por este virus (59).

El tratamiento con aciclovir es eficaz para el control del VHS. El uso rutinario de la profilaxis con aciclovir a dosis bajas en las primeras semanas post-trasplante, disminuye la incidencia de esta infección. Se utilizan también el valaciclovir y el famciclovir para el tratamiento y la profilaxis de las infecciones por VHS y VVZ con buena tolerancia (76).

El aciclovir o el famciclovir constituyen el tratamiento de elección para la varicela. Dada la gravedad de la primoinfección por VVZ en el paciente trasplantado, la prevención de ésta es vital en el receptor seronegativo. En ese sentido, se recomienda la vacunación antes del trasplante en los candidatos seronegativos o con bajos títulos de Acs frente a VVZ. En caso de exposición accidental de un receptor seronegativo a un paciente con varicela o herpes zóster, se debe administrar inmediatamente la

inmunoglobulina específica anti-VVZ y el aciclovir durante las 2-3 semanas del período de incubación (76).

La vacuna de la VVZ es de virus vivo atenuado, se emplea en individuos inmunodeprimidos, sus contactos y en niños que no se han expuesto al germen. Esta es la única vacuna que existe para los miembros de la familia *Herpesviridae* (49).

### **II.8.3 Tratamiento antiviral**

Existen cuatro agentes antivirales aprobados para el tratamiento de la enfermedad por CMV, el ganciclovir, el valganciclovir, el foscarnet y el cidofovir. Estos medicamentos reducen o eliminan la viremia, la excreción y previenen o controlan la enfermedad. Debido a la significativa toxicidad de todas estas drogas sólo se utilizan en pacientes con compromiso para la vida o riesgo de invalidez (45, 103, 104).

El tratamiento antiviral de la infección congénita severa con ganciclovir previene la pérdida tardía de la audición. Los efectos adversos de este medicamento (neutropenia, posibilidad de carcinogenicidad y la toxicidad reproductiva) son la razón por la que no se han aprobado agentes antivirales para tratar la infección congénita (45, 104).

La emergencia de cepas resistentes al tratamiento antiviral específico, es un problema clínico en aumento en los pacientes con profilaxis antiviral de larga duración (105), aunque no se conoce la frecuencia de esta resistencia con exactitud (106).

El ganciclovir endovenoso es el medicamento de elección en la terapia anticipada y en el tratamiento de la enfermedad citomegálica. Es un análogo de nucleósido, que inhibe la replicación viral y se elimina por los riñones. La dosis es de 5 miligramos (mg)/kilogramo (Kg) dos veces al día por 15 días. En los casos con enfermedad con invasión de tejidos debe extenderse de tres a cuatro semanas de tratamiento parenteral, seguido del tratamiento oral. Este medicamento provoca efectos adversos en el 5 al 15 % de los pacientes tratados, por orden de frecuencia estos son: supresión de la médula ósea (neutropenia y trombocitopenia), náuseas, diarreas, fiebre, erupción, aumento de las enzimas hepáticas, nefrotoxicidad y cambios del estado mental (57).

El valganciclovir es un análogo de nucleósido, cuando se procesa por el intestino e hígado da origen al ganciclovir y tiene una biodisponibilidad diez veces mayor que el ganciclovir oral (59). El foscarnet es un inhibidor no nucleósido de la polimerasa viral. El foscarnet, tiene un efecto *in vitro* e *in vivo* contra el CMV, es nefrotóxico y es el tratamiento de elección en aquellos trasplantados que no responden al ganciclovir o al aciclovir, o en aquellos con cuadros severos de VHS, CMV o VVZ (57). El cidofovir es

un análogo nucleótido, con una prolongada actividad antiviral intracelular que provoca que se empleen dosis menos frecuentes y se indica en casos de resistencia al ganciclovir (107).

El aciclovir es un análogo nucleósido, con formulaciones orales, tópicas y parenterales. El valaciclovir, el penciclovir y el famciclovir, son medicamentos derivados del aciclovir con una mejor absorción y biodistribución (107).

### **III CONTROL SEMÁNTICO**

### III CONTROL SEMÁNTICO

Infección primaria o primoinfección: Infección por primera vez con un herpesvirus en un individuo seronegativo a este agente. Caracterizada en la mayor parte de los pacientes por la aparición de los Acs IgM específicos, seroconversión de Acs IgG, una baja avidéz de Acs IgG específicos y por la excreción del virus en algunos fluidos corporales (103).

Latencia por herpesvirus: Después de ocurrida la infección primaria, el virus se dirige a determinadas células del organismo y permanece en estado latente, sin replicarse. Durante este período no hay transmisión de la infección, ni excreción del virus en ningún fluido, ni síntomas o signos de enfermedad. Se caracteriza por la presencia de Acs IgG específicos con alta avidéz, sin IgM y con PCR o aislamiento negativo en fluidos corporales (44).

Infección recurrente por herpesvirus: Reactivación de una infección latente por alguno de los herpesvirus. Pertenece a las infecciones activas no primarias. Serológicamente se caracteriza por la presencia o no de IgM específica y de IgG específica con alta avidéz. Hay replicación y excreción viral en uno o varios fluidos corporales, por lo que puede haber detección o no en cada uno de los fluidos (45).

Reinfección por herpesvirus: Infección con otra variante viral de la misma especie en un hospedero que se encontraba infectado con anterioridad. Serológicamente y a través de las técnicas de detección viral (PCR) empleadas para el diagnóstico se comporta como una infección recurrente, de la que puede ser distinguida por técnicas moleculares específicas (detección de genotipos, análisis con enzimas de restricción o secuenciación de ácidos nucleicos) (44, 45).

Infección activa no primaria por herpesvirus: Infección recurrente o reinfección por alguno de estos virus (45).

Infección activa por herpesvirus: Presencia de infección herpesviral reciente sea primaria o no (44, 45), determinada por métodos serológicos o por la detección del ADN herpesviral.

Excreción herpesviral: Durante la infección activa puede ocurrir la detección de la excreción del herpesvirus en algún fluido corporal, sin que necesariamente exista una infección sintomática. Esta excreción se demuestra por la presencia del virus o alguna de sus estructuras, entre las que se

encuentran el ADN y los antígenos herpesvirales, utilizando varios métodos, los que incluyen el PCR, el cultivo y la identificación viral (45).

**Infección congénita por CMV:** Infección por el CMV del feto o recién nacido, adquirida intraútero, que puede ser sintomática o no. Caracterizada por la presencia del CMV en alguno de los fluidos corporales del feto o el neonato. Esta infección puede ser determinada en la etapa prenatal, por la realización de amniocentesis o cordocentesis y postnatalmente en las primeras tres semanas de vida extrauterina (45).

**Transmisión placentaria:** Transmisión de la infección por CMV a fetos de forma transplacentaria a partir de gestantes con infección activa por CMV.

**Infección congénita por CMV sintomática:** Dada por la presencia de alguno o varios de los siguientes signos: íctero, hepatomegalia, esplenomegalia, alteraciones neurológicas (microcefalia, calcificaciones cerebrales, periventriculares, retinitis, ceguera), trombocitopenia, petequias, CIUR; en un recién nacido, en el que se haya confirmado por métodos de laboratorio la presencia de la infección congénita por CMV (45).

**Sufrimiento fetal agudo:** Perturbación metabólica compleja debido a la disminución de los intercambios feto maternos, de evolución relativamente rápida que lleva a una alteración de la homeostasis fetal y puede provocar alteraciones titulares irreversibles o la muerte del feto. Caracterizada por alguno de los siguientes signos: bradicardia (< 120 latidos por minuto [min]), taquicardia (>160 latidos por min), irregularidades de los latidos independientemente de las contracciones uterinas, irregularidades de la frecuencia cardíaca fetal (desaceleraciones) (108).

**CIUR:** Recién nacido o feto cuyo peso al nacer se encuentra por debajo del décimo percentil de una curva preestablecida que relaciona el peso fetal y la edad gestacional (108).

**Óbito fetal:** Muerte fetal intrauterina (108).

**Trasplante:** Es un tratamiento para el reemplazo de órganos y tejidos no funcionales, por órganos o tejidos saludables. Técnicamente, el trasplante es el proceso de tomar células, tejidos u órganos de un individuo sano (denominado injerto) e implantarlo en otro individuo diferente.

**TCPH:** Es la infusión intravenosa de células progenitoras hematopoyéticas destinadas a establecer una función medular e inmune normal (109).

**Trasplante autólogo:** Injerto de una célula, tejido u órgano de un individuo al mismo individuo. El trasplante de TCPH es autólogo en el caso de que el paciente reciba su propia médula (el paciente es el donante y el receptor) (109).



Trasplante alogénico: Injerto de una célula, tejido u órgano entre dos individuos genéticamente diferentes de la misma especie y puede tener antígenos de histocompatibilidad leucocitaria (HLA, siglas del inglés Histocompatibility leucocyte antigen) idénticos, relacionados (el donante es un hermano HLA idéntico) o no relacionados (109).

Rechazo agudo: Ocurre cuando un receptor posee en el momento del implante aloanticuerpos contra el donante, produciendo una reacción aguda con microtrombosis y necrosis celular. Es más frecuente después de la primera semana hasta el primer mes. Es mediado principalmente por la inmunidad celular(110).

Rechazo crónico: Es un descenso progresivo de la función del injerto de causa inmunológica, que inicia después del tercer mes post-trasplante. Es mediado por inmunidad celular y, no se conoce en qué medida, humoral (110).

Enfermedad por CMV: Cuando el paciente infectado presenta síntomas o signos (síndrome por CMV o afectación de órgano). El síndrome por CMV se define por la presencia de fiebre (>38 grados Celsius [°C]) durante al menos dos días en un período de cuatro días, acompañada de neutropenia, trombocitopenia o elevación de transaminasas y de la detección del CMV en sangre (111) mediante el PCR-TR.

Tratamiento antiviral profiláctico universal: consiste en administrar un antiviral eficaz para prevenir el desarrollo de infección o enfermedad por CMV o VHS a todos los pacientes en ausencia de sospecha clínica y datos microbiológicos de infección luego del trasplante (111).

Tratamiento antiviral anticipado: Consiste en el inicio de un tratamiento antiviral ante la positividad de determinadas pruebas microbiológicas (carga viral, antigenemia) que indiquen infección activa en pacientes asintomáticos (111, 112).

Tratamiento antiviral curativo o terapéutico: Es el tratamiento de la enfermedad por CMV, por VHS o por VVZ (45, 111).

## **IV DISEÑO METODOLÓGICO**

## **IV DISEÑO METODOLÓGICO**

El estudio de otros herpesvirus se realizó para demostrar la importancia del CMV como causa de infección congénita y complicaciones en los receptores de trasplante.

### **IV.1 Prevalencia de la infección por CMV en gestantes**

#### **IV.1.1 Diseño del estudio, universo y muestra**

Se realizó un estudio de prevalencia. El universo estuvo constituido por todas las gestantes de La Habana, cuya captación de embarazo estuviera comprendida en el período de enero 2007 a enero 2008. Para el estudio se seleccionaron tres municipios: Regla, Centro Habana y Habana Vieja. La selección de los mismos se realizó teniendo en cuenta el criterio de expertos (reunión de Genética provincial) (113).

El tamaño de la muestra se calculó teniendo en cuenta que la incidencia esperada de la infección congénita por CMV oscila entre el 0,2 y 2 % (45). El tamaño calculado de la muestra fue de 850 gestantes, para una población de 18 108 recién nacidos en La Habana durante el 2006, con un intervalo de confianza del 99 %, igual a la proporción de la media (0,011) de la incidencia esperada  $\pm$  0,009. Además, se calculó un 25 % extra de gestantes por posibles pérdidas por lo que el número final de gestantes incluido fue de 1 131, distribuidas por municipios de la siguiente forma: Centro Habana: 345 gestantes; Habana Vieja: 508 gestantes y Regla: 278 gestantes. La selección de gestantes a incluir por cada municipio se realizó de forma aleatorizada (mediante tabla de números aleatorios) en la consulta de genética municipal a fin de que cada una de ellas tuviese la misma probabilidad de incluirse en la investigación.

#### **IV.1.2 Protocolo de estudio a las Gestantes**

A las gestantes se les determinó el estado serológico frente al CMV mediante la búsqueda de Acs IgG e IgM anti CMV.

#### **IV.1.3 Consideraciones éticas**

El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki (114) y lo establecido por las normas éticas, institucionales y regionales, de la medicina actual; contó con la aprobación de la Comisión de ética y científica del IPK, de los Centros Municipales de Genética Médica (de Regla, la Habana Vieja y

Centro Habana) y de Genética Provincial de La Habana. Las gestantes, después de haber recibido toda la información necesaria a través de charlas y material escrito, pudieron decidir si participarían o no en el estudio. El personal calificado le explicó a las gestantes cómo se realizaría el estudio, empleando un lenguaje claro y sencillo para facilitar su comprensión, así como la importancia del estudio para el desarrollo de la medicina y el beneficio para la gestante de conocer si tiene una infección activa por CMV durante el embarazo. Se le solicitó a cada gestante su Consentimiento Informado (Anexo 1) y se les informó que podrían retirarse del estudio sin perjuicio alguno. Se entregó una copia del consentimiento informado a cada participante. Además, a cada gestante que accedió a participar en el estudio se le realizó una entrevista según cuestionario previamente elaborado (Anexo 2). Toda la información individual relacionada con los sujetos quedó debidamente custodiada por los responsables del estudio, de forma tal que se garantizara la absoluta confidencialidad de los datos personales.

#### **IV.1.4 Muestras clínicas**

Se realizó la extracción de una muestra de sangre de 10 mililitros (mL) para la obtención del suero a todas las gestantes (1 131) durante el final del primer trimestre de gestación o inicios del segundo (menos de 16 semanas).

#### **IV.1.5 Técnica empleada**

##### **IV.1.5.A Determinación de IgG e IgM anti-CMV**

Para la determinación de IgG e IgM específica anti-CMV se utilizó un ensayo de tipo inmunoenzimático (ELISA, siglas del inglés Enzyme linked immunosorbent assay) cualitativo. Para procesar las muestras de suero se siguieron las recomendaciones del fabricante de cada uno de los estuches empleados al procesar las muestras de suero (DiaSorin, Italia): ETI-CYTOK-G PLUS P002033 y ETI -CYTOK-M reverse PLUS P002035.

El procedimiento se realizó siguiendo lo establecido en el manual de normas y procedimientos del laboratorio de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) del IPK, así como las normas de bioseguridad. Los resultados se informaron a las consultas municipales de genética.

#### **IV.1.6 Técnicas de análisis y procesamiento de la información para la prevalencia de la infección por CMV en gestantes**

El cálculo del tamaño muestral (1 131 gestantes) se realizó mediante el software PASS-NCSS 2006, como se explicó anteriormente. Se utilizó un formulario (Anexo 2) para la recolección de la información de las gestantes, previa coordinación con las autoridades sanitarias de cada uno de los municipios.

Se confeccionó una base de datos en el paquete estadístico SPSS versión 11.5 para el análisis de las diferentes variables (Anexo 3). Se calculó la seroprevalencia y seronegatividad, en cada uno de los municipios y de forma general.

Para determinar la asociación entre los diferentes factores de riesgos en las gestantes (seronegatividad al CMV, edad, embarazos anteriores y paridad) y la prevalencia o no de Acs IgG contra CMV se calculó la razón de prevalencia (RP) y se empleó la prueba estadística exacta de Fisher, considerando significativo los valores de  $RP > 1$  y  $p < 0,05$ , con un nivel de significación para el intervalo de confianza (IC) del 95 % (115). Además, se realizó un análisis univariado y multivariado mediante el método de regresión logística binaria, cuya variable dependiente fue la presencia o no de Acs anti CMV con las otras variables estudiadas (115) (Anexo 3).

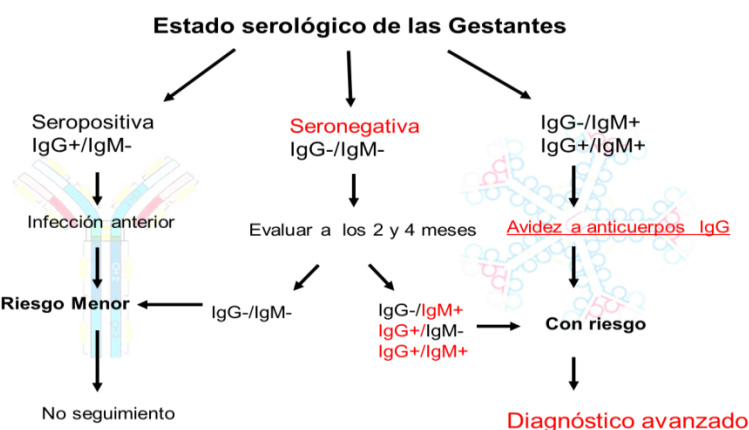
## IV.2 Detección de la infección activa por CMV y otros herpesvirus en gestantes y de infección congénita en sus hijos

Se realizó un estudio descriptivo longitudinal. El universo estuvo constituido por todas las gestantes estudiadas en la determinación de la prevalencia de la infección por CMV realizada con anterioridad, provenientes de tres municipios de La Habana.

La muestra quedó constituida por aquellas gestantes positivas para IgM anti CMV o aquellas seronegativas que seroconvirtieron durante el seguimiento en el embarazo. Se incluyeron los hijos de las mujeres con infección activa durante el embarazo.

### IV.2.1 Protocolo de seguimiento a las Gestantes

El protocolo de seguimiento de las gestantes se representa de forma esquemática en la figura siguiente.



**Figura 4.** Seguimiento del estado serológico frente a CMV en mujeres embarazadas.  
Abreviaturas: CMV: Citomegalovirus, IgM: Inmunoglobulina M, IgG: Inmunoglobulina G, +: positiva, -:negativo

Las gestantes con Acs IgG+ e IgM- anti CMV se consideraron de bajo riesgo y no se les realizó otro complementario como parte del estudio. Las seronegativas al CMV se les repitió la detección de Acs IgG e IgM anti CMV en muestras de suero tomadas al final del segundo y tercer trimestre de embarazo (24 y 36 semanas), si la seronegatividad persistió al inicio del tercer trimestre no se les realizó otro complementario como parte del estudio a las gestantes (Figura 4).

Las gestantes que inicialmente eran seronegativas y que en su seguimiento serológico seroconvirtieron a IgG o IgM anti CMV, se consideraron con primoinfección por CMV y se les realizó el diagnóstico avanzado.

A las muestras de suero que resultaron positivas de Acs IgM anti CMV, se les determinó la avidez de los Acs IgG anti CMV con el objetivo de diferenciar entre infección primaria e infección activa no primaria. A todas las gestantes con IgM anti CMV también se les realizó el diagnóstico avanzado (Figura 4).

El diagnóstico avanzado se realizó mediante la detección de un fragmento del genoma de CMV y otros herpesvirus en la orina y la saliva. La detección del genoma viral se realizó mediante PCR cualitativa y PCR-TR (artus CMV LC PCR Kit, QIAGEN, Alemania), lo que permitió además determinar la carga viral de CMV en dichas muestras. Además, a las gestantes con infección activa se les realizaron evaluaciones por ultrasonido cada cuatro semanas durante el seguimiento.

#### **IV.2.2 Protocolo de estudio de los hijos de madres con infección activa por CMV**

A los recién nacidos de madres con infección activa por CMV, menores de tres semanas de vida, se les determinó la presencia de un segmento del genoma viral mediante PCR cualitativo y PCR-TR en saliva y orina. Posteriormente, estos niños fueron evaluados en el consultorio médico de la familia, la consulta de genética médica y la de pediatría municipal por un período de cuatro años para identificar tempranamente las secuelas.

En las consultas mencionadas con anterioridad, la evaluación incluyó el examen físico general, regional y por aparatos, en los que se incluyó el peso y la talla (mediante tallímetro y pesa). Posteriormente, se clasificó el estado nutricional según las tablas de percentiles de peso/edad, talla/edad, peso/talla/edad. Se midió además la circunferencia cefálica, para su valoración se utilizó la tabla de percentiles de circunferencia según la edad. Se examinó el neurodesarrollo a través de la función motora gruesa y fina, el lenguaje, la afectividad y la socialización, para lo cual se aplicó la escala Terman-Merry (116) y los niños se interconsultaron con el logopeda y el psicólogo. Además se investigó la audición, la visión y el estado neurológico mediante análisis complementarios de audiometría y potenciales evocados, la exploración visual y el ultrasonido transfontanelar.

### **IV.2.3 Consideraciones éticas**

El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki (114) y lo establecido por las normas éticas, institucionales y regionales, de la medicina actual; se aprobó por la Comisión de ética y científica del IPK, de los Centros Municipales de Genética Médica (de Regla, la Habana Vieja y Centro Habana) y de Genética Provincial de La Habana. Las gestantes seronegativas o con infección activa durante el embarazo, después de haber recibido toda la información necesaria a través de charlas y material escrito, pudieron decidir si continuarían o no en el estudio. El personal calificado le explicó a las gestantes cómo se realizaría el estudio, así como la importancia de conocer si tenían una infección por CMV activa durante el embarazo y si su hijo tendría una infección congénita por CMV.

A los padres cuyos hijos fueron seleccionados para el estudio, se les solicitó otro Consentimiento Informado antes de que estos nacieran (Anexo 4). Se les hizo saber que podrían retirar a sus hijos de la investigación en cualquier momento, sin perjuicio alguno. En el caso de que uno de los padres estuviera ausente por reclusión penal, abandono del país o rechazara su condición, el otro padre se consideró capacitado para firmar el Consentimiento Informado. En caso de ausencia de la madre y el padre se tomó el consentimiento a aquellas personas consideraras tutores legales del recién nacido. Se recogieron datos de las gestantes, los recién nacidos y los niños hasta los cuatro años a partir de sus historias clínicas y mediante entrevistas, los que quedaron debidamente custodiados por los responsables del estudio de forma tal que se garantizara la confidencialidad de los datos personales (Anexo 5 y 6).

### **IV.2.4 Muestras Clínicas**

Para el estudio se utilizaron las muestras de sueros de las gestantes obtenidas en las primeras 16 semanas de embarazo que tuvieran IgM anti CMV, así como muestras de suero obtenidas durante el seguimiento (24 y 36 semanas o segundo y tercer trimestre de la gestación) de las gestantes seronegativas. Adicionalmente, se estudiaron muestras de saliva y orina de las gestantes que desarrollaron infección activa por CMV y de sus recién nacidos.

Las muestras de suero, orina y saliva de las gestantes y sus recién nacidos se obtuvieron en los Laboratorios Clínicos de los Policlínicos Municipales incluidos en el estudio. Se extrajeron en recipientes estériles: 4 mL de sangre a las gestantes para obtener 2 mL de suero, 2 mL de saliva y 2 mL de orina. Para la obtención de la muestra de orina de los recién nacidos se utilizaron colectores estériles. La muestra de saliva de éstos se coleccionó por frotación en la boca con un hisopo estéril que se almacenó en un frasco estéril. Todas las muestras se transportaron al IPK, en condiciones de refrigeración, para su posterior procesamiento.

## **IV.2.5 Técnicas empleadas**

### **IV.2.5.A Procedimiento para la determinación de avidéz de Acs IgG anti CMV**

El método empleado para la determinación de la avidéz de la IgG específica anti-CMV fue un ELISA. Se empleó el mismo estuche comercial utilizado para la determinación de la presencia de Acs IgG anti-CMV, según la estandarización y descripción de De Souza y col en el año 2003 (117).

Los niveles de avidéz se reportan como el índice de avidéz, que expresa el porcentaje de IgG que se une al antígeno luego del tratamiento con agentes desnaturizantes, en este caso urea 8M. Cuando el valor límite fue menor de 50 % se consideró baja avidéz, avidéz intermedia entre 50 y 60 % y mayor de 60 % alta avidéz.

### **IV.2.5.B Extracción del ADN**

El ADN de las muestras de la saliva y la orina para PCR se extrajo mediante el estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. A la muestra de saliva de los recién nacidos contenida en un hisopo almacenado en un frasco estéril, se le añadieron 200 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de agua libre de ARNasas y se le aplicó agitación mediante agitador durante un min. La cantidad de muestra utilizada para la extracción fue de 200  $\mu\text{L}$ . El ADN obtenido se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de tampón de elusión y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la realización del PCR cualitativo y la PCR-TR.

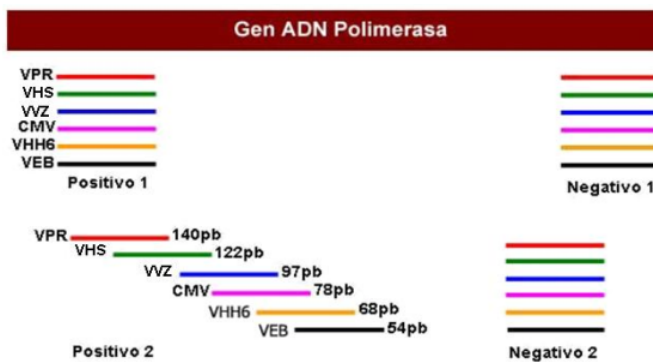
### **IV.2.5.C Procedimiento para la PCR cualitativa de herpesvirus**

Se realizó un PCR múltiple anidado, que permite detectar en un solo tubo de reacción la presencia de cinco virus de la familia de los herpesvirus (VHS, VVZ, CMV, VHH6 y VEB) siguiendo el protocolo desarrollado por Tenorio y col en el año 1993 (118). Para la primera reacción se utilizaron dos mezclas de oligonucleótidos de zonas conservadas dentro del genoma de los herpesvirus (gen de la ADN polimerasa viral), lo cual generó un producto de 194 pb. En la segunda reacción de amplificación se utilizó una mezcla de oligonucleótidos de otra zona conservada (negativa 2) y una segunda mezcla de oligonucleótidos no homólogos y tipo específicos seleccionados a partir de zonas variables dentro de este gen para los diferentes herpesvirus (positivo 2) (Figura 5). Por otra parte, para chequear el funcionamiento del PCR, se incluyó en la primera reacción de amplificación el ADN (100 copias/  $\mu\text{L}$ ) del Virus de la Pseudorabia Porcina (VPR), como control interno de la reacción de amplificación, así como los juegos de oligonucleótidos específicos en ambas reacciones de amplificación. Se emplearon 5 unidades/  $\mu\text{L}$  de la TaqADN polimerasa (Taq Pol, Promega, Estados Unidos de América [EUA]).



Las ampliaciones se realizaron en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Alemania). Los ciclos de amplificación estuvieron constituidos por: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguido 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94°C, 1 min para la hibridación a 53°C (primera reacción) o 47°C (segunda amplificación) y 1 min de extensión a 72°C, finalizando con un paso de extensión de 4 min a 72°C.

Posteriormente, 10 µL de cada producto de la segunda reacción de amplificación se aplicaron en un gel de agarosa al 4 % en una solución de TBE (Tris-borato 90 milimolar [mM], EDTA 2mM, pH 8.0) teñido con bromuro de etidio 0,5 mg/mL. Posteriormente se realizó una electroforesis para la detección de los productos amplificados durante 30 min a 110 Voltios. Las bandas del ADN se visualizaron a través del transiluminador de luz ultravioleta (Bibliock Scientific, Francia) y se definieron los tamaños de bandas del ADN viral amplificado empleando un patrón de peso molecular (100pb ADN ladder, Promega, EUA) y controles positivos previamente comprobados. Los tamaños esperados de las bandas a amplificar en la reacción anidada fueron de 140, 122, 97, 78, 68 y 54 pb para VPR, VHS, VVZ, CMV, VHH6 y VEB, respectivamente (Figura 5). Se emplearon controles positivos en cada ensayo constituidos por una muestra de orina de un caso con diagnóstico de infección congénita por CMV y una muestra de suero de un niño con mononucleosis infecciosa (VEB); como control negativo de cada ensayo se empleó agua bidestilada estéril.



**Figura 5.** Representación esquemática de las reacciones de amplificación y los productos de las mismas con el PCR cualitativo para herpesvirus.

Abreviaturas: ADN: ácido desoxirribonucleico, VPR: Virus de la Pseudorabia porcina, CMV: Citomegalovirus, VHH6: Virus Herpes Humano 6, VEB: Virus Epstein Barr, VHS: Virus Herpes Simple, VVZ: Virus Varicela Zóster, pb: pares de bases.

Para la realización de esta técnica se tuvieron en cuenta las medidas para evitar las contaminaciones de la PCR, como son: la utilización de puntas con barreras, guantes, así como materiales nuevos y estériles. Se emplearon diferentes locales (laboratorios) para realizar los pasos de preparación de

mezclas, extracción de ADN, primera y segunda reacción de amplificación y la electroforesis para la detección de los productos amplificados, así como micropipetas diferentes en cada paso.

#### IV.2.5.D Realización de PCR-TR en las muestras de las gestantes y recién nacidos

Con el empleo del estuche comercial artus CMV LC PCR Kit es posible detectar 0,49 copias/ $\mu\text{L}$  del ácido nucleico viral.

Primero se realizó una curva estándar con los estándares sintéticos del estuche comercial artus CMV LC PCR (QIAGEN, Alemania). Se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de cada estándar de cuantificación (CMV LC QS 1 hasta CMV LC QS 4, que contienen  $10\text{-}10^4$  copias/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$  del control interno y 2,5  $\mu\text{L}$  de la CMV LC Mg-Sol directamente a 12,5  $\mu\text{L}$  de la CMV LC Master. Se utilizó el equipo LightCycler 1.5 de la casa comercial Roche Diagnostics, Alemania. Los parámetros de los ciclos fueron los recomendados por la casa comercial, los cuales se describen a continuación.

- Activación inicial de la enzima (95°C por 10 min)
- Amplificación con rampa decreciente de temperatura (10 ciclos de: 95 °C por 5 segundos [seg], 65°C por 20 seg, 72°C por 15 seg)
- Amplificación del ADN (40 ciclos compuestos por: desnaturalización 95°C por 5 seg, hibridación 55°C por 20 seg, elongación 72°C por 15 seg).

Para el análisis de los resultados se empleó el método de la derivación secundaria máxima de la versión 3.3 del programa del LightCycler.

Para la cuantificación del ADN del CMV de las muestras clínicas mediante PCR-TR se añadieron 15  $\mu\text{L}$  de la mezcla Master Mix en cada capilar, posteriormente se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de ADN de cada muestra. Se utilizó como control positivo 10  $\mu\text{L}$  de al menos uno de los estándares de cuantificación (CMV LC QS 1-4) y como control negativo 10  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril libre de ARNasas y ADNasas. Los capilares se centrifugaron brevemente durante diez seg a un máximo de 400 gravedades (2 000 revoluciones por min).

Se utilizaron los mismos parámetros de amplificación mencionados en la construcción de la curva estándar. Al final de la reacción de PCR-TR se importó la curva externa estándar construida. Se calculó el número de copias en cada una de las muestras por medio del análisis de regresión lineal con el programa del LightCycler (versión 3.3). Las muestras clínicas se consideraron negativas si el valor del PC se obtuvo por encima del ciclo 35 de la PCR-TR o la carga viral era  $<0,49$  copias/ $\mu\text{L}$ , reportándose como casos con carga viral no detectables. Los resultados de la carga viral del CMV en las muestras de saliva y orina se informaron como número de copias/ $\text{mL}$ .

Resultado (copias/mL)= Resultado (copias/ $\mu$ L) x Volumen de elusión ( $\mu$ L)/ Volumen de la muestra que se extrae (mL) (artus CMV LC PCR Kit, QIAGEN, Alemania).

Para evitar las posibles contaminaciones se tuvieron en cuenta las siguientes medidas, para el procesamiento de los estándares y la mezcla se destinó un local específico de trabajo con todo el equipamiento y el instrumental necesario, se utilizaron puntas con barreras libres de ADNAsas y todas las muestras biológicas se procesaron siempre en gabinetes de bioseguridad. Para descartar las contaminaciones en el proceso de extracción se incluyeron 10  $\mu$ L de agua destilada estéril libre de ARNAsas y ADNAsas que se procesaron en las mismas condiciones que las muestras. Además, en cada uno de los ensayos realizados se incluyó un capilar como control negativo en el que se añadieron 10  $\mu$ L de agua destilada estéril libre de ARNAsas-ADNAsas. Todas las muestras se homogenizaron y posteriormente se centrifugaron brevemente.

#### **IV.2.6 Técnicas de análisis y procesamiento de la información para el diagnóstico precoz de la infección por CMV y otros herpesvirus en gestantes y sus hijos**

Se utilizaron formularios para la recolección de la información de los recién nacidos (Anexo 5), de los niños (Anexo 6) y de las gestantes (Anexo 2), previa coordinación con las autoridades sanitarias de cada uno de los municipios. Se revisaron las historias clínicas de los niños y las gestantes para la constatación del adecuado desarrollo o de alteraciones en su seguimiento.

Se confeccionó una base de datos en el paquete estadístico SPSS versión 11.5 para el análisis de las diferentes variables (Anexo 3 y 7). Se calcularon las frecuencias absolutas y porcentuales de la infección activa, la infección primaria por CMV, la recurrencia por CMV, la presencia de IgM por CMV en las gestantes, la transmisibilidad trasplacentaria, las secuelas y los signos al examen físico en los hijos de madres con infección activa por CMV u otro herpesvirus e infección congénita. Estas frecuencias se determinaron además en cada uno de los municipios.

Se determinó la asociación entre los factores maternos y la presencia de infección congénita en los recién nacidos, así como otras variables estudiadas (Anexo 3 y 7) para lo cual se realizaron tablas de contingencia y se utilizó la prueba estadística exacta de Fisher, considerando significativos los valores de la proporción de desigualdades (OR, siglas del inglés odds ratio) >1 y  $p < 0,05$ , con un nivel de significación para el IC del 95 % (115). Para determinar si existió relación entre la carga viral (como variable cuantitativa) de cada una de las muestras maternas y de los recién nacidos con otras variables (Anexo 3 y 7), se empleó la prueba descrita anteriormente. Estas relaciones fueron referidas en el texto como dependencias estadísticamente significativas o no (115). Se calcularon las correlaciones binarias no paramétricas de Spearman entre los dos tipos de PCR (como variable cualitativa) en cada una de

las muestras, de las gestantes, en los recién nacidos e infección primaria materna (115). Estas relaciones estadísticas fueron referidas en el texto como correlaciones estadísticamente significativas o no.

### **IV.3 Detección de Acs anti CMV, VEB y VHS de receptores pediátricos y sus donantes previo al trasplante**

#### **IV.3.1 Diseño del estudio, universo y muestra**

Se realizó un estudio de prevalencia. El universo estuvo constituido por todos los pacientes trasplantados pediátricos de hígado (TH), TR o TCPH de Cuba, atendidos en los servicios de trasplantología en estas especialidades de los Hospitales Pediátricos Universitarios de Centro Habana (HPUCH) y “William Soler” (HPUWS) y el Instituto Nacional de Hematología e Inmunología, cuyo procedimiento se realizó en el período de Noviembre del año 2009 a Diciembre del año 2011, así como por sus donantes.

Estos hospitales pediátricos se seleccionaron teniendo en cuenta que en ese momento eran los únicos servicios que se encontraban realizando trasplante en niños en Cuba. Se estudiaron 29 pacientes, los que se distribuyeron de la siguiente forma 19 de TH, 8 TR y 2 TCPH (uno alogénico y otro autólogo).

#### **IV.3.2 Protocolo de estudio para la detección de Acs anti CMV, VEB y VHS de receptores pediátricos y sus donantes previo al trasplante**

Una vez decretado el momento 0 para realizar el trasplante, se utilizó la muestra de suero extraída al donante y receptor (previa al trasplante) para detectar la presencia de Acs IgG e IgM específicos anti CMV, VEB y VHS tipo 1 y 2, mediante las técnicas de ELISA utilizando estuches comerciales, DiaSorin, Italia.

#### **IV.3.3 Consideraciones éticas del estudio de pacientes receptores de trasplante y sus donantes**

El estudio se aprobó por la Comisión de ética y científica del IPK, de los HPUCH, HPUWS y por el Instituto Nacional de Hematología e Inmunología. Según lo establecido por las normas éticas, institucionales y regionales de la medicina actual; se le solicitó a cada tutor, paciente y donante (en el caso que fuera posible) su consentimiento informado escrito para la participación de manera voluntaria y gratuita en el estudio (Anexo 8). Previamente, el médico les explicó a los tutores, al paciente receptor del órgano y a su donante, previo al trasplante cómo se realizaría el estudio con un lenguaje claro y sencillo para facilitar su comprensión. Respetando el principio de la voluntariedad, se les explicó la

importancia para el desarrollo de la medicina y el beneficio de conocer si tenían una infección por herpesvirus previa al trasplante, así como la infección activa por estos agentes en los primeros meses post-trasplante para el éxito del tratamiento. Se entregó una copia del consentimiento informado a los tutores de cada participante y a cada donante. Además se les realizó una entrevista según un cuestionario previamente elaborado (Anexo 9) y se revisaron las historias clínicas, cuyos datos quedaron debidamente custodiados por el responsable del estudio.

#### **IV.3.4 Muestras Clínicas**

Se estudiaron las muestras de suero de los pacientes receptores de TH, TR, TCPH y de sus donantes en el período pre-trasplante, o el momento 0 previo al proceder quirúrgico. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su traslado al IPK. Se extrajeron 4 mL de sangre a los pacientes para obtener 2 mL de suero, se cumplió con lo establecido por el manual de normas y procedimientos de cada laboratorio. La transportación se realizó cumpliendo con lo establecido por las normas de bioseguridad para el traslado de muestras biológicas refrigeradas.

#### **IV.3.5 Técnicas empleadas**

##### **IV.3.5.A Determinación de IgM e IgG específica anti-CMV, anti-VEB y anti-VHS**

Para determinar la presencia de IgG e IgM específica anti-CMV, anti-VEB y anti-VHS, se empleó el método de ELISA, para los Acs IgM se empleó un ELISA de captura, siguiendo las recomendaciones del fabricante para cada uno de los estuches empleados (DiaSorin, Italia):

- IgG CMV- ETI-CYTOK-G PLUS, P002033 e IgM CMV- ETI-CYTOK-M reverse PLUS, P002035 para CMV
- IgG VEB-ETI-VCA-G, P001606 e IgM VEB- ETI-VEB-M reverse, P001605 para VEB
- IgG VHS 1 y 2- ETI-VHSK-G ½, P002025 e IgM VHS 1 y 2- ETI-VHSK-M ½, P002023 para VHS

#### **IV.3.6 Técnicas de análisis y procesamiento estadístico de la información de la prevalencia de la infección por VEB, VHS y CMV en los receptores y sus donantes previo al trasplante**

Se estudiaron los receptores y los donantes en cuanto a su estado serológico, previa coordinación con las autoridades sanitarias de cada institución y con la aprobación del comité de ética y consejo científico de las mismas. Se confeccionó una base de datos utilizando el paquete estadístico SPSS versión 11.5 para el análisis de las diferentes variables (Anexo 10). Se calcularon las frecuencias absolutas y porcentuales de la presencia de Acs IgM e IgG para cada uno de los virus estudiados en los receptores y los donantes (113). Para determinar la asociación entre los diferentes factores de riesgos en los receptores de trasplante (sexo, edad, antecedentes patológicos personales, enfermedad causante del injerto, tipo de trasplante) y la presencia o no de Acs IgG contra CMV y el estado

serológico del receptor, se calculó la RP y se empleó la prueba estadística exacta de Fisher, considerando significativo los valores de  $RP > 1$  y  $p < 0,05$ , con un nivel de significación para el IC del 95 % (115).

#### **IV.4 Infecciones por herpesvirus en receptores pediátricos luego del trasplante**

##### **IV.4.1 Diseño del estudio, universo y muestra**

Se realizó un estudio descriptivo longitudinal. El universo estuvo constituido por todos los pacientes trasplantados pediátricos de hígado, riñón o TCPH cubanos descritos en el estudio transversal anterior. Las características demográficas y terapéuticas se encuentran en el Anexo 11. El tratamiento con inmunosupresores indicado a los receptores de TOS y TCPH se realizó siguiendo los protocolos establecidos de los diferentes grupos de trasplante: “Protocolo de Trasplante de Médula Ósea, 2006, Hospital Universitario Hermanos Ameijeiras e Instituto de Hematología e Inmunología”; “Protocolo de Trasplante Hepático en Pediatría, 2005, Hospital Pediátrico Universitario William Soler”; “Protocolo de Trasplante Renal, 1988, Hospital Pediátrico Universitario de Centro Habana” (Anexo 12, 13 y 14).

En el grupo de TCPH el esquema de inmunosupresión depende del tipo de TCPH realizado y está insertado en el régimen de acondicionamiento porque tiene que cumplir dos funciones, la de inmunosupresión y a la vez erradicar la enfermedad de base. Los dos tipos de trasplante (autólogo y alogénico) recibieron radiación previa al trasplante y metotrexate (en los días post-trasplante 1, 3, 6 y 11). En ambos tipos de trasplante se siguió lo descrito según el esquema de acondicionamiento descrito en la guía del “Protocolo de Trasplante de Médula Ósea, 2006, Hospital Universitario Hermanos Ameijeiras e Instituto de Hematología e Inmunología” para cada tipo de enfermedad de base (Anexo 14).

El tratamiento con antivirales se empleó en tres condiciones. La primera de forma profiláctica universal, a los receptores de TCPH y TH con aciclovir y a los receptores de TOS se les indicó ganciclovir o valganciclovir inmediatamente luego del trasplante (Anexo 11, 12, 13 y 14). La segunda como tratamiento anticipado (para los tres tipos de trasplantes) y la tercera en aquellos receptores que se trató la enfermedad causada por uno de los herpesvirus (para los tres tipos de trasplantes)(112). La duración del tratamiento antiviral para la enfermedad causada por el CMV o VHS fue según el criterio del médico de asistencia.

##### **IV.4.2 Protocolo de estudio de los pacientes trasplantados**

Inmediatamente después de realizado el trasplante, se estudiaron las muestras de suero, saliva, orina y heces, procedentes del receptor, siguiendo una frecuencia semanal durante el primer mes, quincenal

hasta los 3 meses y mensual hasta al menos el sexto mes para los receptores de TPCH y TR. Los receptores de TH tuvieron una frecuencia quincenal el segundo mes, luego mensual hasta al menos el sexto mes post-trasplante. En estas muestras se detectó la presencia de ADN de herpesvirus a través del PCR-TR (TIB MOLBIOL, Alemania) para determinar la carga viral y la respuesta a la terapia antiviral en los pacientes que llevaron tratamiento. Los casos en los que se indicó el tratamiento antiviral, el esquema de seguimiento fue semanal hasta la negativización del PCR.

#### **IV.4.3 Consideraciones éticas**

El estudio se aprobó por la Comisión de ética y científica del IPK, de los HPUCH, HPUWS y por el Instituto Nacional de Hematología e Inmunología. Según lo establecido por las normas éticas, institucionales y regionales de la medicina actual; se le solicitó a cada tutor y paciente su consentimiento informado escrito para la participación de manera voluntaria y gratuita en el estudio (Vease acápite IV.3.3 Consideraciones éticas del estudio de receptores de trasplante y sus donantes, Anexo 8), así como la actualización de los datos del receptor de trasplante (Anexo 9).

#### **IV.4.4 Muestras Clínicas**

Se estudiaron las muestras de los sueros, las salivas, las orinas y las heces de pacientes receptores de TH, TR y TCPH en el período post-trasplante (n=554), recogidas desde el momento 0 del proceder quirúrgico hasta al menos el sexto mes pos-trasplante.

Las muestras de los sueros, las salivas, las orinas y las heces se colectaron por los Laboratorios Clínicos y de Microbiología de los HPUCH y HPUWS. Se extrajeron 4 mL de sangre a los pacientes para obtener 2 mL de suero, se cumplió con lo establecido por el manual de normas y procedimientos de cada laboratorio. En el caso de las muestras de las orinas, las salivas y las heces, se obtuvieron en recipientes estériles 2 mL de orina, 2 mL de saliva y 1 mL o 10 g de heces, según lo establecido por las normas mencionadas anteriormente. Para los receptores menores de 5 años, la muestra de 2 mL de orina se obtuvo utilizando colectores estériles. La muestra de saliva de éstos se recogió por frotación en la boca con un hisopo de algodón estéril. Todas las muestras se conservaron a -20°C hasta su traslado al IPK. La transportación se realizó cumpliendo con lo establecido por las normas de bioseguridad para el traslado de muestras biológicas refrigeradas.

#### **IV.4.5 Técnicas empleadas**

##### **IV.4.5.A Extracción del ADN**

El ADN de las muestras de los sueros, las salivas, las orinas y las heces se extrajeron mediante el estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. A la muestra de saliva de los receptores menores de 5 años contenida en un hisopo, se le

añadió 200 µL de agua destilada estéril libre de ADNasas y ARNasas y se le aplicó agitación mediante agitador durante un min.

La cantidad de muestra de suero, saliva y orina utilizada para la extracción fue de 200 µL y la cantidad de heces fue de 0,1 mL o 1 g. El ADN obtenido se suspendió en 200 µL de Tampón de Elusión y se almacenó a -20° C hasta la realización del PCR-TR.

#### IV.4.5.B PCR-TR para el seguimiento de herpesvirus en trasplantados

Se utilizaron cinco estuches comerciales de PCR-TR para la detección y cuantificación de CMV, VEB, VHS (tipos 1 y 2), VHH6 y VVZ; siguiendo los protocolos descritos por los fabricantes (TIB MOLBIOL, Alemania), los cuales están diseñados para realizarse en la plataforma LightCycler (Roche, Alemania). Los estuches incluyen la mezcla (LightMix) de los cebadores de las zonas conservadas dentro del genoma de los virus estudiados (Tabla 3), las sondas específicas para cada virus mediante hibridación de fluorescencia, los cebadores y las sondas para el control interno, así como el fragmento del genoma del control interno que se amplifica. Los estándares (controles positivos de ADN específicos para cada herpesvirus) en un rango entre 10<sup>1</sup> a 10<sup>6</sup> copias/µL, que permitieron construir la curva estándar y cuantificar la carga viral de ADN presente en cada muestra de los pacientes, también se incluyen en el estuche.

**Tabla 3.** Regiones de genes amplificados para cada herpesvirus.

Tipo de virus	Región del genoma amplificada	Talla del producto amplificado (pb)	Talla del producto amplificado para el control interno (pb)
CMV	Gen de la Glicoproteína B (UL55)	226	278
VEB	No descrita	166	278
VHS	gen pol del VHS 1 y 2	214 y 215	278
VHH6	gen U11	272	658
VVZ	gen28	290	300

Abreviaturas: CMV: Citomegalovirus, VHH6: Virus Herpes Humano 6, VEB: Virus Epstein Barr, VHS: Virus Herpes Simple, VZ: Virus Varicela Zóster, pb: pares de bases.

Para la reacción se utilizaron las mezclas de los cebadores y las sondas para cada virus, su control interno y otra mezcla que contiene la enzima de la reacción (LightCycler FastStart DNA Master HybProbe). Para cada virus se utilizaron diferentes cantidades de reactivos (Roche, Alemania), por lo que en la Tabla 4 se describen la mezcla para una muestra de la reacción de PCR-TR en un rango en el que están comprendidos todos los virus estudiados. Las especificidades de cada reacción se describen en los manuales de normas y procedimientos del laboratorio de ITS del IPK siguiendo los protocolos establecidos por los manuales del fabricante para cada estuche.



**Tabla 4.** Mezcla de reactivos para la determinación de herpesvirus por PCR-TR.

Mezcla de la reacción	Volumen de la reacción (µL)
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,8-2,4
Cebadores y sondas del virus analizado	2-4
Cebadores y sondas del control interno, fragmento del genoma del control interno a amplificarse	2-4
Mezcla de enzima con buffer y deoxinucleótidos	2
Agua libre de ADNasas y ARN asas	2,6-7,0
ADN	5
<b>Total</b>	<b>20</b>

Abreviaturas: µL: microlitros, MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio, mM: milimolar, ADN: ácido desoxiribonucleico, ARN: ácido ribonucleico

El equipo LigtCycler 1.5 (Roche Diagnostics, Alemania) se programó siguiendo los parámetros de los ciclos recomendados por la casa comercial para cada tipo de virus (TIB MOLBIOL, Alemania) y se describen a continuación.

**Tabla 5.** Programación de equipo LightCycler para los protocolos de PCR-TR de herpesvirus.

Número de Ciclos	Etapas	Temperatura	Tiempo
<b>Pre-incubación</b>			
1		95°C	10 min
<b>Amplificación y cuantificación</b>			
45-50	Desnaturalización	95°C	5 seg
	Hibridación	56-62	5-10 seg
	Elongación	72°C	12-20 seg
<b>Curva de disolución</b>			
1	Desnaturalización	95°C	20 seg
	Hibridación	40°C	20 seg
	Separación	85°C	0 seg

Abreviaturas: seg: seg, min: minutos, °C: grados Celsius

La curva de disolución se utilizó para diferenciar la presencia de VHS tipo 1 y 2. La temperatura de disolución para VHS tipo 1 fue 67,1°C y 60,1°C para el VHS tipo 2 (canal de lectura: 640 nanómetros).

Para la construcción de la curva estándar de cada herpesvirus se utilizaron los estándares positivos sintéticos de ADN de cada agente en un rango entre 10<sup>1</sup> a 10<sup>6</sup> copias/µL suministrados por el fabricante del estuche LightMix específico para la detección de cada virus (TIB MOLBIOL, Alemania). Los estándares se prepararon según las instrucciones de cada estuche comercial y se montaron cada uno por duplicado para realizar la curva que grafica el PC versus la concentración logarítmica de cada estándar en una relación lineal. La curva estándar para cada tipo de virus se guardó en el equipo para posteriormente utilizarse como referencia en el momento de realizar la cuantificación de las muestras clínicas contra un PC pre-establecido.

Cuantificación del ADN de los herpesvirus en las muestras clínicas mediante PCR-TR

Se añadieron 15  $\mu$ L de la mezcla final de la reacción para la cuantificación de cada virus a ser determinado en cada capilar. Luego se añadieron 5  $\mu$ L de la extracción del ADN de cada muestra. Se empleó como control positivo 5  $\mu$ L de uno de los estándares de cuantificación de cada estuche comercial y como control negativo 5  $\mu$ L de agua (libre de ARNasas y ADNasas). Los capilares se centrifugaron brevemente durante diez seg a un máximo de 400 gravedades (2 000 revoluciones por min).

Se utilizaron los parámetros de los ciclos mencionados con anterioridad para cada virus. Al final de la reacción de PCR-TR de las muestras clínicas, se importó la curva externa estándar construida. Para el análisis y cuantificación del número de copias presentes en cada muestra se empleó el método de la derivación secundaria máxima de la versión 3.3 del programa automático del LightCycler. Los resultados se convirtieron a copias/mL según la fórmula citada con anterioridad.

Las muestras clínicas se consideraron negativas (carga viral no detectable) si el valor del PC sobrepasaba el ciclo 40 del PCR-TR o si la carga viral estuvo por debajo de 10 copias/mL, de acuerdo al límite de detección analítico descrito en el estuche comercial. Los resultados de carga viral positivos a: CMV, VEB, VHS, VHH6 o VVZ en las muestras se informaron como el valor de carga viral en número de copias/mL.

Para evitar las posibles contaminaciones se tuvieron en cuenta el uso de locales de trabajo independientes, el empleo de puntas con barreras libres de ADNasas, el procesamiento de las muestras biológicas en gabinetes de bioseguridad, entre otras medidas. Para descartar contaminaciones en el proceso de extracción y en cada uno de los ensayos se incluyó un control negativo (agua destilada estéril libre de ARNasas y ADNasas).

#### **IV.4.6 Técnicas de análisis y procesamiento estadístico de la información de los pacientes trasplantados**

Para la recolección de la información se utilizó un formulario (Anexo 9) donde se recogió la información demográfica y clínica de los receptores de TH, TR y TCPH, previa coordinación con las autoridades sanitarias de cada institución y con la aprobación del comité de ética y consejo científico de las mismas.

Además, se revisaron las historias clínicas de los receptores de trasplante durante el seguimiento.

Para el análisis de las diferentes variables se confeccionó una base de datos usando el paquete estadístico SPSS versión 17.0 (Anexo 10). El cálculo de frecuencias absolutas y porcentuales se realizó para cada tipo de TOS (TH y TR) y TCPH y en conjunto para los tres. Se realizaron tablas de contingencia y se utilizó la prueba estadística exacta de Fisher, el OR para las comparaciones entre los diferentes tipos de trasplante y la asociación con otras variables (Anexo 10). Se consideraron

significativos los valores de  $OR > 1$  y  $p < 0,05$  con un nivel de significación para el IC del 95 % (115). Estas relaciones se refirieron en el texto como la presencia de asociaciones o no.

Para determinar si existió relación entre la carga viral y los diferentes herpesvirus en una misma muestra, un mismo tipo de virus en diferentes muestras, así como para determinar la semana de aparición, se utilizó la prueba Kruskal-Wallis y Mann Whitney (GraphPad Prism 5.0)(119).

Para evaluar el poder discriminatorio del nivel de carga viral se usaron las curvas de las características operativas del receptor (ROC, siglas del inglés Receptor operative characteriscs). Su exactitud se utilizó para diferenciar entre los niveles de carga viral de un virus asociado con la detección de otro virus y para la evaluación del valor de corte de la carga viral de un virus en un fluido asociado con la excreción subsecuente del mismo virus en el otro fluido. El poder discriminatorio se clasificó según el valor del área bajo la curva (ABC) de ROC (120) en: no-informativo ( $ABC < 0,5$ ), menos exacto ( $0,5 < ABC < 0,7$ ), ligeramente exacto ( $0,7 < ABC < 0,9$ ), muy exacto ( $0,9 < ABC < 1$ ) o perfecto ( $ABC = 1$ ). El valor de la carga viral con la sensibilidad más alta y con especificidad mayor del 50 %, se tomó como el valor de corte óptimo para diferenciar de la detección de otro virus.

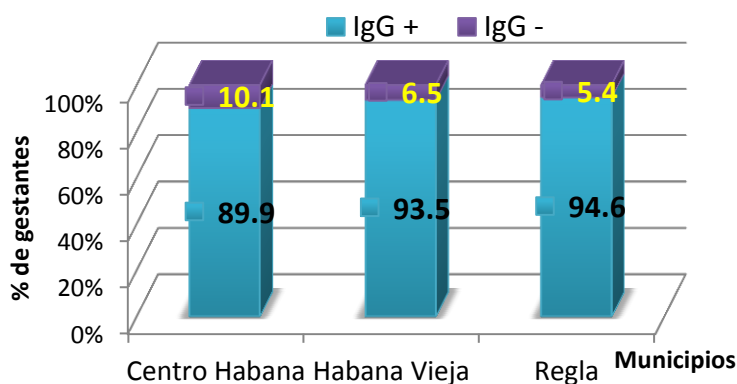
## V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1 Seroprevalencia de la infección por CMV en gestantes

#### V.1.1 Determinación de Acs IgG anti CMV en las gestantes analizadas

La seroprevalencia de Acs IgG en las gestantes durante las primeras 16 semanas de embarazo fue del 92,7 %. La seronegatividad fue del 7,3 % (83 gestantes IgM e IgG anti CMV negativas). Las gestantes del municipio Regla presentaron una alta seroprevalencia (94,6 %) al compararlas con las del municipio Centro Habana (89,9 %), detectándose un riesgo de que las gestantes del municipio Regla fueran seropositivas (263/278 versus 310/345, RP=1,05, IC=1,01-1,10, Figura 6). La elevada seroprevalencia pudo deberse a los hábitos y las conductas que predisponen a la infección por CMV desde edades tempranas de la vida, como besar para saludar a otras personas y a niños pequeños (al igual que ocurre en otros países en vías de desarrollo)(121-123), unido a las características del virus expuestas con anterioridad (vías de transmisión y recurrencia con excreción asintomática).



**Figura 6.** Seroprevalencia de Acs IgG anti CMV en las gestantes de tres municipios de La Habana, enero del 2007 a enero del 2008.

Abreviaturas: IgG+: Inmunoglobulina G positiva, IgG-: Inmunoglobulina G negativa

Estudios previos de determinación de Acs anti CMV realizados en Cuba, en pacientes considerados de riesgo de tener infección por CMV (hombres que tienen sexo con hombres, politransfundidos, donantes de sangre, receptores de TR, gestantes a término y recién nacidos) se obtuvo una prevalencia de Acs entre el 35 y el 70 % (124-126). Uno de los grupos analizados fue el de las gestantes a término, provenientes de tres hospitales maternos capitalinos, donde se encontró una seroprevalencia de IgG anti CMV del 55,3 % y de IgM anti CMV del 1 %, mientras que el 0,8 % de los

recién nacidos tenían IgM contra este virus. Este constituye el único estudio previo sobre la infección por CMV en gestantes y recién nacidos en Cuba (127).

Las cifras de Acs IgG anti CMV del presente estudio difieren de las encontradas en el trabajo anterior. La causa de las diferencias en cuanto a la seroprevalencia de IgG anti CMV en los dos trabajos se debe probablemente a que la determinación de Acs en el trabajo anterior se realizó con un método de menor sensibilidad (inmunofluorescencia). Otra posible causa es el incremento de esta infección por la incorporación de la mujer al trabajo y por lo tanto de los niños pequeños a guarderías infantiles. La seroprevalencia es menor (a pesar de que las gestantes estudiadas con anterioridad se encontraban al término de la gestación) pues se plantea que algunas gestantes pueden adquirir la infección durante el embarazo y la cifra de infectadas puede variar; de ahí que el momento del estudio de los Acs anti CMV, debe ser considerado para estimar la prevalencia de la infección (128).

El comportamiento de la prevalencia de los Acs anti CMV en la última década a nivel mundial, corrobora lo planteado. La prevalencia encontrada en el actual estudio es similar a la de países del área, como Colombia con una prevalencia del 92,9 % (129) y Panamá del 84 % (130). Un fenómeno similar ocurre en otros países en vías de desarrollo que presentan una alta seroprevalencia, como Taiwán (91,1 %), Ghana (93,2 %), Arabia Saudita (92,1 %), Turquía (94,9 y 98,5 %), algunas poblaciones de África y Asia que alcanzan hasta un 100 % de prevalencia (131-139). En los países desarrollados la seroprevalencia es menor, como Finlandia (56,3 %), Canadá (57 %), EUA (58 %), Australia (56,8 %), Francia (38 %) e Israel (85 %)(140-145). Los resultados de la prevalencia de Acs anti CMV materna pueden variar hasta un 29 % en estudios de infección congénita, según la población que se estudie (128).

La detección de Acs anti CMV es elevada (>50 %) en una población, debido a la fácil diseminación, las múltiples vías de transmisión y las características propias del virus, que incluyen la latencia, la reactivación y la excreción asintomática. Las variaciones en la seroprevalencia frente a este virus entre diferentes países y en áreas de un mismo país, también están relacionadas con algunos factores de riesgo, como son las malas condiciones higiénicas sanitarias que propician una mayor diseminación de la infección (45, 146, 147).

## **V.1.2 Factores de riesgo asociados a la prevalencia de Acs IgG anti CMV**

### **V.1.2.A Seroprevalencia y edad**

Las gestantes presentaron una media de edad de 27,2 años, el 16,5 % eran menores de 20 años y en este grupo se detectó un mayor riesgo de seronegatividad frente al CMV en comparación con las mayores de 20 años (22/83 versus 164/1048, RP= 1,69; IC=1,15-2,49).

Los resultados encontrados son similares a lo descrito por otros autores, debido a que la seroprevalencia aumenta proporcionalmente con la edad (148-151); aunque de Ory y col e Iwasaki y col encuentran en algunos de los países más desarrollados resultados contrarios (152, 153). La seroprevalencia en Japón es del 67,7 % en las gestantes menores de 25 años y se incrementa con la edad, por lo que el 85,7 % de las mayores de 40 años están infectadas (154). Sin embargo, en países en vías de desarrollo como Gambia, la prevalencia de la infección no se incrementa con la edad, debido a que la misma se adquiere desde muy temprana edad pues el 85 % de los niños de 12 meses de edad están infectados (155).

A diferencia de lo descrito por la mayoría de los autores, Munro y col describen que en una cohorte de 600 gestantes australianas, el 56,8 % presentaban Acs IgG anti CMV y no se encontraron diferencias significativas entre la edad de las seropositivas y las seronegativas (143).

#### V.1.2.B Seroprevalencia y embarazos previos

Las 1 131 gestantes estudiadas presentaron un alto porcentaje de embarazos previos (866, 76,6 %), el 38,1 % (431) tenían hijos, de éstas el 77,5 % (334) tenían un solo hijo y 763 presentaron el antecedente de aborto. Las gestantes con embarazos previos presentaron un riesgo mayor de tener una infección anterior por el CMV comparado con aquellas que no habían estado embarazadas con anterioridad (816/866 versus 232/265, RP=2,32, IC=1,42-3,78,  $p<0,001$ ). Este riesgo también se encontró en las gestantes con antecedentes de abortos y con partos anteriores (RP=1,06, 1,02-1,10,  $p=0,002$  y RP=1,05, IC=1,02-1,08,  $p=0,007$ , respectivamente). Un resultado que apoya lo antes expuesto fue que mediante el análisis de regresión la nuligravidez fue un predictor independiente de seronegatividad (33/264 versus 50/867, OR=1,98, IC=1,23-3,18,  $p<0,001$ ). Esto puede deberse a que una de las vías de adquisición de la infección son los niños pequeños, pues los niños adquieren la infección en instituciones infantiles y la transmiten a los cuidadores y a los padres (156), por lo que las gestantes pueden transmitirla durante el embarazo (157). Los niños infectados transmiten el virus a otros niños en los centros de cuidado infantil, pues son capaces de excretar el virus en saliva y orina durante años. La transmisión en estos lugares es alta, por la frecuente introducción de las manos y juguetes en la boca y el contacto con los fluidos corporales que ocurre en el cuidado de los niños de esta edad (45, 141, 157, 158).

En Finlandia, Canadá y EUA la paridad se asocia a estar infectada con anterioridad por CMV (140, 141, 150), aún más algunos investigadores describen esta asociación vinculada a las condiciones socioeconómicas CMV (159-162), aún cuando Estripeaut y col no detectan esta asociación (130).

La elevada cifra de mujeres con antecedente de abortos se describe por otros autores cubanos (163, 164). El aborto provocado resulta de difícil discusión y deviene en debate político, social, religioso, moral, legal y médico (165). Las causas más frecuentes de los abortos provocados son la escasa edad de la mujer, el bajo nivel de escolaridad, no poseer las condiciones apropiadas de vivienda, como método de control de la natalidad (Aborto y anticoncepción guardan una estrecha relación, lo que hace difícil analizarlos por separado), la paridad, la estabilidad en las relaciones con su pareja, el uso y conocimiento de métodos anticonceptivos (163, 165). La infección por CMV adquirida en el primer trimestre de la gestación puede causar malformaciones incompatibles con la vida y provocar un aborto (122), aunque el CMV no es una causa frecuente de aborto (166). Otra posible causa es que las mujeres con abortos provocados han estado expuestas al CMV en hospitales y servicios de salud donde acuden a realizarse el proceder de la interrupción (167).

No se encontró que el antecedente de enfermedad previo al embarazo y los síntomas o signos durante la gestación constituyeran un riesgo para estar infectados con anterioridad por el CMV (Anexo 15). En Francia (168) y Polonia (169) tampoco se ha encontrado relación de gestantes con enfermedades crónicas o con síntomas o signos durante el embarazo y la presencia de infección anterior por CMV en estudios realizados.

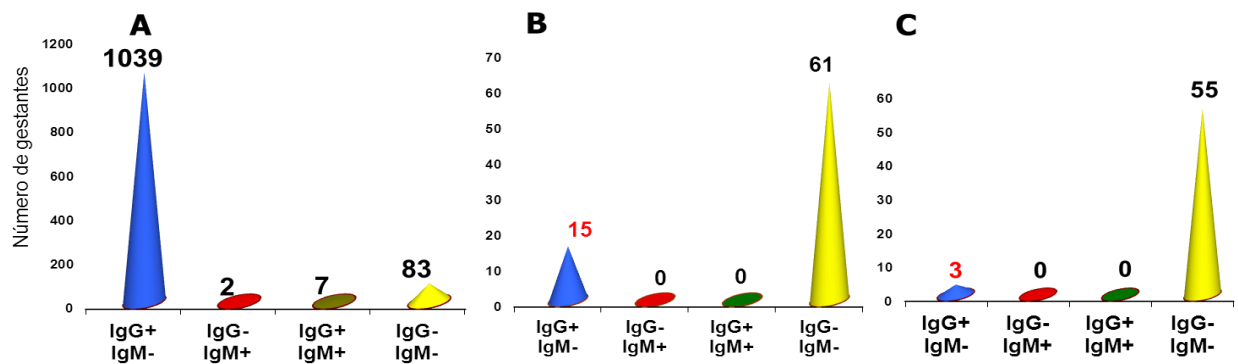
La importancia del temprano reconocimiento de las gestantes en riesgo de infectarse (seronegativas), o de los factores de riesgo asociados, radica en que este grupo de gestantes es posible realizar un estudio de seguimiento de la infección, posibilitando en una población más circunscrita, la identificación de la infección congénita y la evolución de estos niños.

## **V.2 Detección de la infección activa por CMV y otros herpesvirus en gestantes y de la infección congénita en sus hijos**

### **V.2.1 Seguimiento de las gestantes seronegativas e Infección activa en las gestantes**

De las 83 gestantes seronegativas, 18 seroconvirtieron (21,7 %) y diez no continuaron en el estudio en la toma de la segunda o tercera muestra de suero (Figura 7) debido al cambio del lugar de residencia, aborto o abandono voluntario. El 84,2 % de las gestantes seroconvirtieron en el segundo trimestre de la gestación y el 15,8 % en el tercer trimestre del embarazo (Figura 7). Estos resultados permiten plantear que las gestantes seronegativas estudiadas tuvieron una alta posibilidad de infectarse con el CMV durante el embarazo.





**Figura 7.** Resultados del estudio serológico anti CMV de la población de gestantes de tres municipios de La Habana, desde junio del 2007 a diciembre del 2011. **A:** Primer trimestre, **B:** segundotrimestre, **C:** tercertrimestre.

Abreviaturas: CMV: Citomegalovirus, IgM: Inmunoglobulina M, IgG: Inmunoglobulina G, -: negativo, +: positivo.

Se detectaron 27 gestantes (2,4 %) que desarrollaron infección activa por CMV. El municipio con la frecuencia más alta de infección activa (1,1 %, 12 gestantes) fue Centro Habana, este municipio presentó además la más baja seroprevalencia de Acs IgG anti CMV en el primer trimestre; lo que nos permite afirmar que en este municipio existían una mayor cantidad de mujeres susceptibles que se encontraban en riesgo de infectarse durante el embarazo. Por el contrario, el municipio Regla fue el municipio de más alta seroprevalencia y menor frecuencia de infección activa (0,4 %, 4 pacientes); mientras que la Habana Vieja tuvo una frecuencia de infección activa intermedia (0,9 %, 7 pacientes). Entre los municipios no se encontró diferencia significativa (Anexo 16).

Se constató una prevalencia de Acs IgM anti CMV del 0,8 % (9/1 131) en la presente investigación. En Turquía y Japón se describen cifras similares de prevalencia de Acs IgM en gestantes (136, 153, 170), aunque las cifras pueden oscilar del 0,4 al 5,5 % (131, 143, 171).

A las muestras de suero de las nueve gestantes con Acs IgM anti CMV, se le realizó la determinación de avididad de la IgG anti CMV, para poder determinar si se trataba de una infección activa primaria o no. Siete de las gestantes positivas a IgM presentaron una infección activa no primaria, además se detectaron 20 gestantes con infección primaria (1,8 %), 18 por seroconversión y 2 por detección de Acs IgM anti CMV y baja e intermedia avididad de IgG anti CMV.

En los países desarrollados se describe que la infección primaria ocurre entre el 1 al 5 % de las mujeres seronegativas durante el embarazo; pero no se le realiza un seguimiento en cada uno de los trimestres del embarazo, lo que puede conllevar a la no detección de todas las gestantes que seroconvierten durante el embarazo (42, 54, 170). La mayor parte de los trabajos realizados son de

países como Canadá, EUA, Japón, Finlandia y Australia (140, 141, 143, 150, 170, 171), que presentan cifras menores de seroprevalencia y por lo tanto una mayor posibilidad de infectarse durante el embarazo. Los resultados encontrados coinciden con las cifras encontradas anteriormente, aunque se encuentran cerca del valor mínimo.

La importancia del momento en el embarazo en que ocurre la infección primaria es crucial por las siguientes razones: en cuanto al pronóstico es de importancia pues la infección adquirida justo antes de la concepción representa un riesgo bajo de transmisión fetal, si la infección primaria se produce en los estadios iniciales del embarazo implica un mayor riesgo de infección congénita y una mayor probabilidad de que presente manifestaciones clínicas graves al nacer (6, 170, 172, 173). No obstante, el CMV es un virus altamente teratogénico y los fetos pueden resultar infectados en cualquier momento de la gestación (174). La edad gestacional es igualmente importante, porque posibilita la interrupción del embarazo antes de la semana 24 de gestación (143). Por estas razones es relevante la detección de la infección por CMV en los primeros estadios de la gestación.

La presencia de Acs IgM carece de especificidad para el diagnóstico de la infección primaria, por lo que es necesaria la determinación de la avidéz de los Acs IgG. La baja avidéz confirma la existencia de una infección primaria reciente (45). Las pruebas de avidéz se realizaron en las primeras muestras de suero obtenidas de las gestantes con Acs IgM anti CMV positivas al final del primer trimestre o inicios del segundo trimestre. No obstante, el alto índice de avidéz en el segundo trimestre del embarazo no excluye la posibilidad de una infección no primaria con transmisión al feto (175).

Revello y Gerna (6) plantean que el 16,7 % de las gestantes que presentan un bajo índice de avidéz de los Acs IgG anti CMV en el primer trimestre del embarazo transmiten la infección al feto, mientras que en el segundo y tercer trimestre del embarazo la transmisión es del 40 %.

En el presente estudio se encontraron siete gestantes (0,6 %) con infección activa no primaria (Acs IgG+, Acs IgM+ y alta avidéz de Acs IgG anti CMV). No se detectó la presencia de infecciones activas no primarias en las otras gestantes, pues hay individuos donde no se detectan los valores de Acs IgM anti CMV en casos de recurrencia o reinfección viral. Por lo tanto, una limitación de la actual investigación es que un grupo de embarazadas con infección activa no primaria podrían estar incluidas en las que inicialmente se determinaron como de bajo riesgo, pues presentaban una serología positiva a Acs IgG anti CMV y negativa a Acs IgM anti CMV. Si se conoce el estado serológico preconcepcional, es posible determinar las gestantes que seroconvierten en el primer trimestre del embarazo. Además se puede realizar la determinación de la avidéz de Acs IgG anti CMV a todas las

gestantes seropositivas en el primer trimestre del embarazo, para conocer si presentaron una infección primaria.

La importancia del tipo de infección materna radica en que el riesgo de infección fetal es del 30 al 40 % cuando es primaria y 0,2 al 2 % cuando es no primaria (45, 176). Otros autores informan cifras diferentes de infección fetal, 0,3 % en los hijos de las gestantes con infección primaria y 0,8 % de los hijos de las que tuvieron infección recurrente (137, 177).

Se sugiere realizar estudios serológicos en las gestantes que se encuentran en el primer trimestre o preconcepcional, para identificar aquellas con mayor riesgo de infectarse y transmitir la infección por CMV. Una vez identificadas dichas gestantes se podrían realizar estudios más avanzados para definir una conducta médica con estas embarazadas.

#### V.2.1.A Factores de riesgo de infección activa por CMV durante la gestación

Al analizar los posibles factores de riesgo que pudieran influir en la detección de la infección activa se encontró que no existieron diferencias significativas entre los antecedentes de enfermedad en la madre y los síntomas o signos durante la gestación, la historia de embarazos previos, el antecedente de hijo fallecido, con la infección activa de este virus detectada por pruebas serológicas (Anexo 16).

Las gestantes menores de 20 años presentaron un riesgo significativo de seroconversión, o sea, de adquirir la infección por CMV durante el embarazo en comparación con las mayores de 20 años (9/18 versus 13/65, OR=4,0; IC=1,16-14,00; p=0,01). Mediante el análisis de regresión logística la edad menor de 20 años fue un predictor independiente de seroconversión (OR=4,0, IC=1,32-12,09, p=0,014). Esto está en relación con la edad de adquisición de la infección, las personas jóvenes están no infectadas con mayor frecuencia y poseen mayor riesgo de adquirir la infección durante el embarazo. En estudios realizados en EUA se describió que las jóvenes menores de 25 años, tenían hijos con infección congénita (157). Fowler y col, Kharrazi y col y Nishimura y col detectaron un mayor riesgo de adquirir la infección durante el embarazo para las gestantes más jóvenes (154, 178-180).

#### V.2.2 Seguimiento clínico y ultrasonográfico de las gestantes

Se detectaron tres gestantes con infección activa con sintomatología que pudo ser atribuible a la infección; los síntomas referidos fueron cefalea (3), artralgia (2), faringitis (1) y fatiga (2). Los casos sintomáticos son los que habitualmente presentan infección primaria por CMV, de hecho las gestantes seroconvertoras se asociaron a sintomatología en comparación con las gestantes seronegativas (OR=13,11, IC=1,80-73,8, p=0,016). Debe tenerse en cuenta que la mayoría de los síntomas son inespecíficos y pueden ser atribuidos a múltiples causas (6).

Revello y Gema (6), describen una elevada frecuencia de sintomatología en gestantes con infección primaria por CMV (60 al 68,1%), los síntomas fueron de moderada intensidad (fiebre, fatiga y cefalea) e incluyeron en la sintomatología las alteraciones en las pruebas de funcionamiento hepático.

En la investigación realizada, las veintisiete embarazadas con infección activa por CMV se siguieron por ultrasonido, detectándose alteraciones en seis. Las anomalías fueron: dos macrofetos en el término de la gestación, dos óbitos fetales a las 32 y 37 semanas de gestación y dos sufrimientos fetales agudos, uno de ellos fue, además, un CIUR severo al término de la gestación.

El ultrasonido tiene la ventaja de ser un método no invasivo y descarta cualquier anomalía estructural o del crecimiento causada por la infección por CMV (181). Los hallazgos encontrados coinciden con otro estudio que plantea que las anomalías ultrasonográficas pueden predecir las alteraciones en el feto e inclusive la infección sintomática en la tercera parte de los casos (90). Lazzarotto y col detectaron una baja sensibilidad del ultrasonido como método de tamizaje, pues solo identificaron menos del 5 % de los fetos infectados (79); lo que se debe a la escasa frecuencia de recién nacidos infectados congénitamente sintomáticos al nacer (<10 %), por lo que el ultrasonido no detecta a estos casos sin alteraciones morfológicas y sí a aquellos con alteraciones físicas que posteriormente nacen con sintomatología. Por ejemplo Romanelli y col encontraron una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo del ultrasonido en la detección de fetos infectados que posteriormente nacieron sintomáticos del 80 %, 62,5 %, 57,1 % y 83,3 %, respectivamente (182).

En los dos casos de óbito fetal no se pudo confirmar el diagnóstico de la infección por CMV ya que no fue posible estudiar los tejidos fetales. El informe de la necropsia de uno de los fetos refería anoxia anteparto de causa no precisada, extrahospitalaria, con necrosis de los órganos y una maceración grado III, sin malformación cardiopulmonar (Autopsia 123/2007, Hospital González Coro). La madre de este feto tuvo infección primaria por CMV, con seroconversión en el segundo trimestre del embarazo.

El informe de la necropsia del segundo caso de óbito fetal refería una hidrocefalia debido a un sangramiento ventricular por hipoxia y el diagnóstico histopatológico de muerte fetal tardía por un hematoma retroplacentario severo, sin malformaciones congénitas y maceración grado I (Autopsia 31/2008, Hospital González Coro). En este caso la madre presentó una infección activa no primaria detectada en el primer trimestre del embarazo, lo que pudo ser la causa directa del óbito. Algunos autores plantean que la infección activa no primaria materna también pudiera ser causa de enfermedad congénita severa y en algunos casos de muerte fetal (183-185).

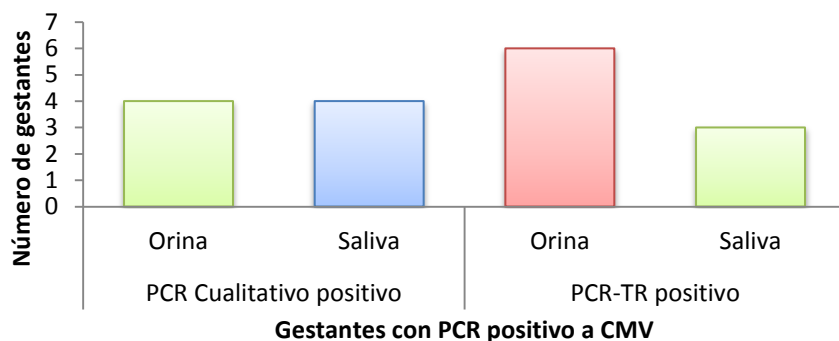
No existe un tratamiento específico aprobado para su uso en el embarazo, para aquellos fetos en los que se demuestra una infección congénita con daños constatables por ultrasonido se le sugiere a la embarazada la interrupción del embarazo (186). Ninguna de las gestantes estudiadas decidió la terminación precoz del embarazo, las causas que pueden atribuirse a esta decisión es que no se contaba con la certeza de la transmisión de la infección al feto, ni con la certeza de si éste presentaría signos de afectación, por lo que se recomienda que se establezca el diagnóstico temprano de la infección congénita en Cuba, esto garantizaría que se detecten las alteraciones incompatibles con la vida precozmente y se proceda a la interrupción de la gestación, aunque se debe ser cuidadoso en aconsejar la terminación del embarazo, cuando esta se base en los resultados de las pruebas iniciales de IgM e IgG anti CMV debido a que la mayoría de los recién nacidos infectados son asintomáticos.

Guerra y col, estudiaron 1 857 gestantes, de las que el 26 % de los casos tuvo infección primaria, el 16 % una infección activa no primaria y en el 4 % no se pudo precisar el tipo de infección; a estas gestantes se les realizó un seguimiento ultrasonográfico y se detectó que el 11,9 % de las embarazadas con infección primaria e infección congénita (estudio realizado por amniocentesis) decidieron interrumpir el embarazo (187).

El diagnóstico prenatal de la infección congénita por CMV es fundamental en la toma de decisiones para el manejo del embarazo y para la planificación de estrategias en el seguimiento de los recién nacidos infectados congénitamente.

### V.2.3 Infección activa materna y excreción viral

A las veintisiete gestantes con infección activa se les determinó la presencia de ADN de CMV en la orina y la saliva por dos métodos de PCR, uno cualitativo y otro cuantitativo (PCR-TR). De estas gestantes, el 33,3% fue positivo a la detección del ADN viral (Figura 8).



**Figura 8.** Excreción viral de CMV en gestantes con infección activa viral en tres municipios de La Habana, desde junio del 2007 a diciembre del 2011.

Abreviaturas: PCR: reacción en cadena de la polimerasa, PCR-TR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, CMV: Citomegalovirus.

Las gestantes con infección activa excretaron frecuentemente el CMV (9/27), de ahí el valor que tiene la realización de un algoritmo diagnóstico completo para el correcto análisis de las gestantes y de sus neonatos. La detección viral sin el estudio serológico, no constituye una prueba definitiva que indique el riesgo de transmisión intrauterina y de la severidad del daño fetal/neonatal. La tasa de predicción para la infección congénita y el daño fetal de madres que excretan el virus en orina o saliva es baja (57,1 y 29,2 %, respectivamente) (79). La excreción de CMV en fluidos no permite la diferenciación entre una infección primaria y una infección activa no primaria, por lo tanto no es un indicador definitivo de la transmisión uterina (6).

Tanto en las gestantes con infección primaria como en aquellas con re-activación de la infección se detectó excreción del CMV, por lo cual no se encontró asociación del tipo de infección con la detección viral (Anexo 16). Los pacientes, en este caso las gestantes, luego de la infección primaria excretan el CMV durante un periodo de tiempo que puede abarcar desde pocos meses hasta varios años, en varios de los fluidos corporales, de ahí que su detección sea un hallazgo frecuente (45).

En tres de los siete casos con infección activa no primaria por CMV, se constató la presencia del ADN viral mediante PCR y uno de los casos coincidió con un óbito fetal. Es de señalar que dicha gestante refirió la pérdida de un embarazo anterior debido a un óbito fetal, de causa no precisada. La excreción del CMV se incrementa en el 35 % durante la gestación, debido a la inmunosupresión fisiológica durante el embarazo y los tejidos uterinos tienen un 50 % de positividad a este virus (188) y esta pudiera ser la causa de la elevada frecuencia de detección de CMV en gestantes con infección activa no primaria. La excreción viral en las secreciones cervicales puede ser la fuente de diseminación a los tejidos uterinos, la placenta, al embrión o al feto (188), lo cual constituye una de las vías de adquisición de la infección fetal en las gestantes con infección activa no primaria.

Los resultados del presente trabajo no coinciden con lo planteado por Pass y col y Smith y col, que refieren que la presencia del virus o sus componentes solo puede ser recuperada de una pequeña parte de los casos seropositivos al CMV (189, 190).

En el presente estudio se encontró que tres gestantes con infección primaria por CMV presentaron excreción de VHH6 en saliva, una de las cuales presentó excreción simultánea de CMV. El VHH6 es de alta prevalencia a nivel mundial y la mayoría de los individuos adquieren la infección primaria antes de los dos años de edad. La detección del VHH6 en saliva es un hallazgo común, pues el mismo se excreta de forma intermitente y asintomática durante la vida. Este virus se reactiva con elevada frecuencia en individuos con compromiso de su sistema inmune (191-193), lo que podría implicar un

aumento de su excreción en las gestantes. Adicionalmente, aunque con baja frecuencia puede ocasionar trastornos neurológicos en el recién nacido o aborto en el primer trimestre de la gestación (194, 195).

En la presente investigación se constató una correlación entre las muestras estudiadas (la orina y saliva) por cada una de las técnicas de PCR empleadas (PCR cualitativo: coeficiente de correlación 0,385,  $p=0,043$  y PCR-TR: coeficiente de correlación 0,413,  $p=0,032$ ), lo que nos permitió plantear que las muestras positivas estuvieron relacionadas entre sí por ambos métodos de PCR. También se detectó una correlación entre ambos tipos de PCR, como variables cualitativas, en una misma muestra para las gestantes (en saliva: coeficiente de correlación 0,540,  $p=0,004$  y en orina: coeficiente de correlación 0,533,  $p=0,004$ ).

A pesar de las relaciones estadísticas encontradas no se apreció una positividad de todas las muestras por ambos métodos, pues se detectaron casos negativos en el PCR cualitativo y positivos en el PCR-TR; debido a que la sensibilidad del método cuantitativo es mayor, como ha sido descrito en la literatura anteriormente (196, 197). Igualmente, se detectaron muestras positivas por PCR cualitativo y negativas por PCR-TR, lo que probablemente se deba a que la afinidad de los cebadores y sondas puede ser diferente para cada una de las cepas de CMV, pues el segmento a amplificar puede tener una secuencia de ADN diferente debido a pequeñas variaciones genéticas (198-200). Otro aspecto a tener en cuenta es que un paciente puede estar infectado con varios genotipos de CMV y tanto los cebadores como la sondas pueden tener una afinidad diferente por éstos (201).

#### **V.2.4 Infección congénita por CMV**

La prevalencia de la infección congénita por CMV fue de 1,1 % (12 recién nacidos infectados) y la transmisión de la infección fue de 46,2 % para los hijos de las gestantes con infección activa. El diagnóstico a los recién nacidos se realizó a través del PCR cualitativo y del PCR-TR en la saliva y la orina. Nacieron 26 niños de las 27 gestantes con infección activa, debido a que se encontraron dos óbitos fetales y un embarazo gemelar.

Ambos métodos de PCR fueron útiles para el diagnóstico de la infección congénita, pues se detectó correlación entre ambas técnicas, como variables cualitativas, en una misma muestra de los recién nacidos (en saliva: coeficiente de correlación 0,389,  $p=0,049$  y en orina: coeficiente de correlación 0,463,  $p=0,02$ ). La similitud de los resultados positivos por ambas técnicas en muestras de saliva y orina fue menor a la encontrada por Yamamoto y col, que informan una alta similitud en el diagnóstico en las muestras de los neonatos, con un 99,7 % de concordancia en los resultados positivos por PCR y lo confirmado por aislamiento (202). Las diferencias de la presente investigación con la anterior

radican en que en el estudio brasileño se realizó un tamizaje por PCR y posteriormente se le recogieron muestras de saliva y orina a los neonatos, para la confirmación mediante PCR y aislamiento en cultivo celular, excluyéndose del estudio el 31,7 % de los casos por no poder obtenerse ambas muestras.

Las muestras de orina y saliva fueron útiles para el diagnóstico de la infección congénita, aunque solo cuatro neonatos presentaron excreción simultánea en ambas muestras, cuatro excretaron el CMV en saliva y cuatro en orina. La orina es la muestra de elección para el diagnóstico de la infección congénita por CMV utilizando diferentes técnicas entre las que se destacan el cultivo e identificación, el shell vial y el PCR (203-207). La saliva también se emplea para la detección de la excreción de CMV en múltiples estudios (208-212) y para el diagnóstico de la infección congénita (157, 213, 214).

En algunos países desarrollados se detectan cifras menores de infección congénita por CMV, por ejemplo Israel (0,7 %) (215), Suecia (0,5 %) (216), Bélgica (0,5 %) (217), Australia (0,3 %) (143) e Italia (0,2 %) (218), lo que también se encontró en Eslovenia (0,1 %) (219) y Panamá (0,6 %) (130). Los resultados encontrados tienen un valor intermedio y similar a lo encontrado en Portugal (1,1 %)(220). En países en vías de desarrollo, se describen cifras mayores de incidencia de esta afección, como por ejemplo Gambia (5,4 %) (221), Irán (2,6 %) (222) o en la montaña de Qinba (15 %), en la provincia de Shanxi, China, con una transmisión horizontal del 33,3 %, en la que se asocia a un alto índice de retraso mental (223).

Al analizar la influencia del tipo de infección materna primaria o no con la presencia de infección congénita por CMV, se encontró que no hubo diferencias entre los hijos de las gestantes con infección primaria o no, pues presentaron tasas de transmisión similares (infección primaria 47,4 %, 9/20 y activa no primaria 42,8 %, 3/7). Los resultados encontrados no coinciden con lo descrito por otros investigadores, que le confieren a la infección primaria un riesgo mayor (24-75 %) de transmitir la infección al producto de la concepción (174, 224, 225).

La transmisibilidad de la infección depende de otros factores, entre los que se incluyen la edad gestacional, la placenta, los factores genéticos sobre todo en el caso de los gemelos, los inmunológicos maternos (172). Algunas limitantes de la presente investigación pudieron incidir en que se detectara en menor medida la infección primaria, debido a que no fue posible detectar a las seroconvertoras del primer trimestre y a que no fue posible detectar a todas las que tuvieron infección recurrente sin elevación de IgM (para lo cual hubiese sido necesario hacerle a todas), lo que pudiera disminuir la transmisión en este grupo.



La transmisión de la infección activa no primaria ocurre en el 1 al 2,2 % de los casos (128). A este tipo de infección se le confiere menor relevancia porque los recién nacidos infectados congénitamente por CMV generalmente son asintomáticos. No obstante, existen evidencias de que las infecciones maternas activas no primarias pueden resultar en una infección severa sintomática en el recién nacido (183, 226, 227), esto puede deberse a la reinfección con una nueva cepa viral (208). La frecuencia de infección por una nueva cepa en mujeres seropositivas y las consecuencias de ésta no se conocen (128, 228). La mayoría de los recién nacidos congénitamente infectados son hijos de madres que tienen inmunidad previa al CMV debido a que este tipo de infección materna es más frecuente (157, 177, 184, 229, 230).

La presencia de excreción viral en las gestantes tuvo importancia en la transmisión de la infección congénita por CMV, pues la presencia del CMV en saliva materna se asoció a la niños congénitamente infectados (5/5 versus 7/21, OR indefinido,  $p=0,012$ ). Aún más, se detectó una correlación entre el PCR cualitativo de los recién nacidos y el PCR de las gestantes en saliva ( $p=0,046$  para el PCR cuantitativo y  $p=0,008$  para el PCR cualitativo maternos). La excreción viral en fluidos en las gestantes con infección primaria por CMV es frecuentemente detectada y este tipo de infección está vinculada a una mayor tasa de transmisión fetal (45, 172, 231), aunque en infecciones no primarias puede ocurrir excreción asintomática o no excretar el virus, estos fenómenos son frecuentes en pacientes con algún grado de compromiso de la respuesta inmune (45), como pudieran ser las gestantes (232). No se encontraron asociaciones entre otros factores maternos (tipo de parto, presencia de síntomas o signos en el embarazo y tipo de infección materna) y la infección congénita (Anexo 16).

Otros hallazgos del presente estudio se describen a continuación. Se detectó un embarazo gemelar dicigótico en una madre con infección primaria en el tercer trimestre de la gestación, del que resultó un recién nacido infectado (el primero en nacer) y uno no infectado, asintomáticos durante el seguimiento post-natal. La transmisión a uno de los fetos de un embarazo múltiple ocurre con mayor frecuencia en gemelos dicigóticos con independencia del momento de la infección materna (6). Las manifestaciones clínicas de los gemelos infectados también son diferentes, mientras que en los gemelos monocigóticos ambos resultan afectados severamente o subclínicamente, en los casos dicigóticos la presentación clínica es más variable (6). La variabilidad en la transmisión y en la presentación clínica de los gemelos infectados, indica que la placenta juega un papel importante en la transmisión o en la protección de la infección (6, 233).

### **V.2.5 Hallazgos clínicos en los hijos de madres con infección activa**

Se encontraron dos recién nacidos infectados congénitamente sintomáticos al nacimiento (16,7 %), un CIUR severo que presentó sufrimiento fetal agudo (hijo de una madre con una infección primaria), lo que representó el 50 % de los casos sintomáticos, similar a lo descrito anteriormente (45). El otro caso sintomático debutó con íctero agravado, que requirió tratamiento con fototerapia y era hijo de una madre con infección activa no primaria sin excreción viral. El íctero es un hallazgo frecuente en los niños congénitamente infectados, el cual se presenta en el 38 % de los casos sintomáticos (45).

Los resultados de la presente investigación (11,8 %) muestran cifras similares a estudios previos, los cuales plantean que el 10 % de los niños que nacen de madres con infección primaria son recién nacidos sintomáticos (45), lo que pudiera deberse a que la mayor parte de las infecciones primarias ocurrieron en el segundo y tercer trimestre del embarazo.

El 14,2 % de los hijos de las gestantes con infección activa no primaria fue sintomático, lo que coincide con otros estudios (130, 234); aunque no existe un consenso en cuanto a la frecuencia de la sintomatología en los hijos de estas gestantes (143, 216). La variabilidad de esta frecuencia está dada por la cantidad de factores que pueden influir en que el niño nazca con síntomas o no, entre los que se encuentran (6, 172, 235):

- La detección y cuantificación del CMV en suero, saliva u orina maternos, que se encuentra en relación con el momento de la infección.
- La edad gestacional al infectarse, que a medida que aumenta se eleva la transmisión y disminuye la sintomatología y viceversa.
- El momento de la transmisión intrauterina de la infección, pues es más grave en aquellos casos en los que esta ocurre en los primeros meses de la gestación.
- El momento del diagnóstico prenatal, debido a que la detección puede ocurrir después de un cambio del estado serológico o antes, durante o después de la transmisión o del daño fetal.
- La imposibilidad del seguimiento de la infección durante la vida fetal, en el que no se puede detectar el daño microscópico ni la evolución de la infección fetal.
- La carga viral o el nivel en que el CMV se replica y se detecta en el suero y orina del feto/neonato, encontrándose los altos niveles asociados a sintomatología.
- La definición de sintomático, en la que algunos autores incluyen resultados de pruebas de laboratorio, como son las alteraciones en los valores de transaminasas o la trombocitopenia, que pueden aumentar la frecuencia en un 38-57 % (182, 236).

En el seguimiento hasta los cuatro años de edad, se encontraron dos niños con secuelas (16,7 %), uno con alteraciones en la socialización y otro en el lenguaje, para una prevalencia general de 0,4 %. Los niños con estas alteraciones coincidieron con los que presentaron síntomas al nacer, es decir, el que debutó con el íctero agravado posteriormente desarrolló dislalia, con seguimiento por el logopeda y el caso con el CIUR presentó alteraciones en la socialización, siendo retraído y poco sociable. No se detectó asociación entre el tipo de infección materna y la presencia de sintomatología en el neonato, ni en la aparición de secuelas (Anexo 16).

En la evolución de la relación talla/edad, peso/edad y peso/talla/edad de los niños con infección congénita durante cuatro años, se detectaron percentiles adecuados para su edad (10 al 75), por lo que no se establecieron relaciones estadísticas. Tampoco se encontraron signos dismórficos en número de tres o más (que se asocian al retraso mental (237)), malformaciones congénitas, alteraciones en el examen físico, defectos en la función motora fina o gruesa, o en la esfera afectiva, ni modificaciones en los complementarios en los que se estudiaron las funciones auditivas, visuales y neurológicas.

Es de gran importancia el seguimiento de los recién nacidos infectados congénitamente con CMV por la elevada posibilidad de la aparición de secuelas. Los resultados encontrados coinciden con lo planteado por Lazzarotto y col (172), los cuales describen en su trabajo que el 10 % de los infectados congénitamente nacen sintomáticos y de éstos el 90 % manifiesta secuelas en el seguimiento clínico y neurológico. La mayoría de los infectados congénitamente no desarrollan manifestaciones fenotípicas de infección prenatal (172, 238) y al parecer son niños sin alteraciones, pero con el paso del tiempo presentan retrasos y trastornos de diversa índole que le impiden tener un desarrollo adecuado desde el punto de vista físico o intelectual.

Las secuelas son más frecuentes mientras más temprano se adquiera la infección en el feto (173), aunque puede aparecer algún grado de daño del SNC en infecciones adquiridas tardíamente (239), este daño es poco común (240). Odeberg y col (241) y Mutnal y col (242) afirman que la infección por el CMV de las neuronas y sus precursores, así como su consecuente disrupción de la proliferación, diferenciación o migración pudiera ser el mecanismo primario para el desarrollo de las anomalías estructurales y funcionales del SNC.

Considerando la edad preescolar (cuatro años) de los niños investigados, no se pudieron precisar alteraciones más profundas en el neurodesarrollo, por lo que el seguimiento a más largo plazo es esencial. Algunos de los déficits neurológicos mejoran con el tiempo mientras que otros en la esfera

cognitiva se evidencian durante el período escolar e incluso más tardíamente en relación con funciones superiores del SNC. Entre los déficits en la esfera cognitiva se encuentran las discapacidades en el aprendizaje, la dislexia, el síndrome por déficit de atención con hiperactividad y las alteraciones del comportamiento (243).

En un estudio realizado en China, se compararon los niños infectados congénitamente nacidos asintomáticos con niños aparentemente sanos, durante seis años. El resultado reveló que no hubo diferencias en cuanto al peso, talla, o circunferencia cefálica, sin embargo, el desarrollo intelectual se encontró afectado en la esfera del lenguaje en los congénitamente infectados; lo que constituye un factor importante en el desarrollo del lenguaje como función cognitiva tardía (244).

Es de gran importancia la valoración integral de cada niño que nazca con infección congénita, para detectar cualquier alteración desde etapas tempranas con el objetivo de actuar sobre ellas para evitar, en la medida que sea posible, la progresión de las mismas; lo que contribuirá a elevar la calidad de vida de los casos afectados.

#### **V.2.6 Carga viral**

La disponibilidad de los PCR cuantitativos en muestras de fetos o de recién nacidos con infección congénita incrementa el interés en el papel potencial de éstos como predictores de la sintomatología o de la gravedad al nacer, el desarrollo de secuelas (87, 245, 246) y el seguimiento de la respuesta a la terapia antiviral (188, 247, 248).

Se detectó una dependencia significativa entre el PCR-TR, como variable cuantitativa y el PCR cualitativo (en orina de las gestantes,  $p=0,011$  y en saliva de los recién nacidos,  $p=0,039$ ), es decir, que a medida que aumenta la carga viral aumenta la probabilidad de la positividad del PCR cualitativo. No se encontró una relación estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre la carga viral y el examen físico positivo al nacer, las secuelas de los infectados congénitamente o la infección materna primaria. No obstante, podemos plantear que de dos gestantes con carga viral  $>10^5$  copias/mL, en al menos una de sus muestras (orina o saliva), nacieron dos niños infectados que presentaron una carga viral  $>10^4$  copias/mL. Además, el paciente con CIUR, bajo peso y sufrimiento fetal agudo presentó una alta carga viral ( $>10^5$  copias/mL).

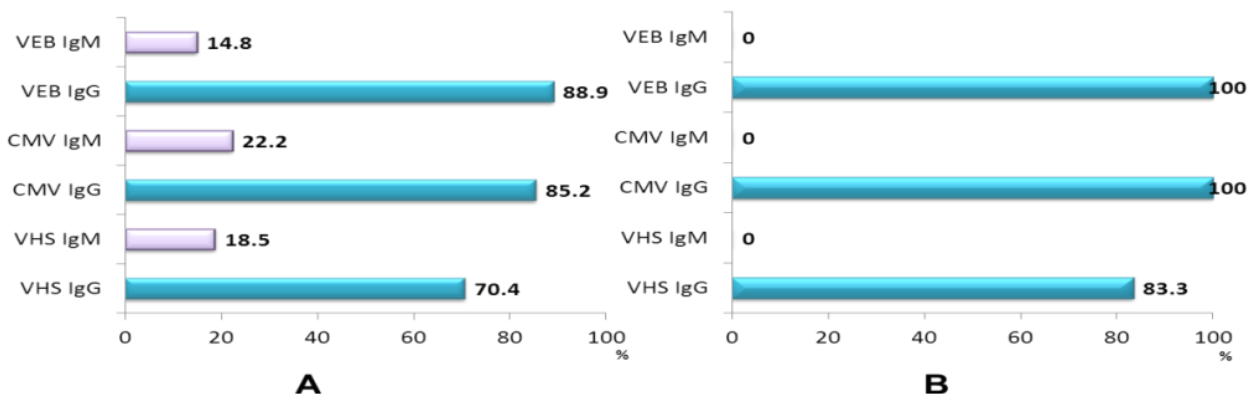
Los resultados encontrados coinciden con los obtenidos por otros investigadores (182, 249, 250) que no encuentran asociación entre la carga viral y la predicción sobre la presencia de sintomatología o no en el recién nacido, así como en la aparición de secuelas. Los resultados de la asociación entre la carga viral y otros factores son variables. Existen investigaciones que documentan la asociación de la sintomatología al nacer con los altos niveles de carga viral en el líquido amniótico (187, 251-254). En

los recién nacidos infectados congénitamente el valor de la carga viral también puede predecir diferentes riesgos de secuelas (253) y es otro elemento predictivo independiente en el uso del consejo y opciones terapéuticas (255, 256).

El estudio de la frecuencia de infección de los herpesvirus y particularmente del CMV, en las gestantes y sus recién nacidos es de importancia para la detección precoz de los pacientes con riesgo de adquirir o reactivar estas infecciones. Conociendo los pacientes con riesgo de desarrollar alteraciones posteriores se pueden diseñar estrategias de seguimiento, diagnóstico y tratamiento temprano. La instauración precozmente de estos procedimientos también se aplica a los niños con enfermedades terminales que requieren de un trasplante de órgano para su sobrevivencia.

### V.3 Detección de Acs anti CMV, VEB y VHS de receptores y donantes previo al trasplante

La seropositividad de Acs IgG pre-trasplante en los receptores analizados (27/29) fue del 85,2 %, 88,9 % y 70,4 % para CMV, VEB y VHS, respectivamente (Figura 9 A). Se obtuvieron muestras de donantes en solo seis trasplantes (20,7 %, 6/29), las que tuvieron Acs previos contra CMV y VEB (100 %), mientras que el 83,3 % (5/6) presentaba infección anterior por VHS (Figura 9 B).



**Figura 9.** Detección de IgG e IgM anti CMV, VEB y VHS previo al trasplante de los receptores (A, n=27) y de los donantes (B, n=6) en Cuba, desde noviembre del 2009 a diciembre del 2011.

Abreviaturas: CMV: Citomegalovirus, VEB: Virus Epstein Barr, VHS: Virus Herpes Simple, IgM: Inmunoglobulina M, IgG: Inmunoglobulina G

En el momento del trasplante nueve receptores no se habían infectado por uno o varios de los herpesvirus (IgG negativa para al menos uno de los herpesvirus estudiados), lo cual fue analizado mediante detección de Acs por ELISA. Dos pacientes no se habían expuesto al CMV (receptores hepáticos), seis al VHS (tres receptores renales y tres hepáticos) y tres al VEB (un receptor hepático y dos renales), siendo dos receptores renales simultáneamente seronegativos a VHS y VEB (Figura 9). La edad mayor de 10 años se asoció a estar infectados previamente por CMV y VEB en comparación con los menores de 10 años (17/19 versus 1/8, RP=7,16, IC=1,14-45,06, p<0,001 y 19/19 versus 5/8,

RP=1,60, IC=0,94-2,74, p=0,019, respectivamente), aunque esta relación no se encontró para el VHS (Anexo 17). No se encontró asociación entre el sexo, el tipo de trasplante y la presencia de Acs anti herpesvirus previos al injerto (Anexo 17).

Se encontró una alta seroprevalencia de Acs IgG a CMV, VEB y VHS en la muestra pre-trasplante de los receptores, lo que indica que los pacientes estudiados adquirieron estos virus más temprano durante la niñez; no obstante, los más jóvenes estuvieron infectados con menos frecuencia por el CMV y el VEB. No existen estudios previos de seroprevalencia en población pediátrica en Cuba, sin embargo, en estudios previos realizados en hemodializados, gestantes e individuos con VIH/ Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), se observaron cifras de seroprevalencia mayores del 85 % (257, 258).

En los países en vías de desarrollo, existe una alta seroprevalencia de Acs específicos a estos tres herpesvirus en la población general, a los que se adiciona el hecho de que los receptores de trasplante tienen una mayor exposición a estos agentes en el ambiente hospitalario, así como una inmunidad deficiente; lo que implica que las tasas en este grupo sean mayores. Por ejemplo en un estudio realizado en Egipto, en niños con leucemia linfoblástica aguda y en controles sanos adultos donde se detectaron Acs IgG contra VHS, CMV y VEB en el 69 %, 100 %, 83 % y en el 80 %, 100 %, 95 %, respectivamente (259).

En países desarrollados se encuentran cifras menores de prevalencia de infección por herpesvirus previo al trasplante, como ejemplo se encuentran los receptores pediátricos españoles de TR, el 56 % de los cuales y el 34,7 % de los donantes no estaban infectados por CMV (260) y en niños norteamericanos que se trasplantarán de intestino la prevalencia de infección por VEB fue del 50 % (261). La seroprevalencia de Acs anti CMV, VEB y VHS entre los receptores adultos de trasplante es alta, inclusive en países desarrollados donde la población tiene menores niveles de seroprevalencia; por ejemplo en Montreal, Canadá, el 77,9 % de los receptores de TCPH tienen Acs IgG contra el VEB (262), en California, EUA el 55,1 % tienen Acs contra el CMV (263) y en Alemania el 88,3 % de los receptores de TOS tienen Acs anti VHS (264). Resultados similares se obtuvieron en receptores franceses de TCPH (68,6 % de Acs anti CMV) (265).

De forma general, las infecciones por herpesvirus son adquiridas en la niñez y la seroprevalencia a estos agentes es directamente proporcional con la edad (266, 267), de ahí que los niños mayores estén infectados en mayor medida que los menores de 10 años. El sexo y el tipo de trasplante no se asociaron a la infección previa por herpesvirus, pues ésta se encuentra relacionada con el tratamiento

de la enfermedad causante del trasplante que incluye las transfusiones, diálisis e ingresos hospitalarios (260, 267-269).

La mayoría de los receptores del presente estudio no contaron con el estudio serológico del donante, por lo que no se conoció el riesgo que tuvieron estos pacientes de adquirir alguno de estos virus mediante el injerto, lo que constituye una limitante de la investigación. No se recogieron las muestras de suero de los donantes debido a que está protocolizado el envío de estas muestras hacia los laboratorios donde se realizan las determinaciones de Acs anti VIH, VHB, VHC y VDRL previo al trasplante, posteriormente y basado en estos resultados se procede al injerto, luego de lo cual las muestras de los donantes fueron descartadas. El estado serológico frente a estos virus previo al trasplante y en particular del CMV y el VHS, es un aspecto importante pues el estado de D+/R- es un factor de riesgo para la adquisición de la infección y de la enfermedad por estos agentes (270). El desconocimiento del estado del donante frente a estos herpesvirus es un problema y es una de las líneas en las que se debe trabajar en el país, para poder realizar un protocolo de seguimiento adecuado y garantizar mejor calidad de vida a los pacientes trasplantados cubanos, así como el éxito del trasplante (59, 271-273).

El 33,3 % (9/27) de los receptores presentaron evidencias serológicas de infección activa reciente (IgM positiva) frente a uno de los tres virus estudiados. Cuatro de estos pacientes tuvieron detección de IgM contra uno de estos virus (tres TH y un TR); mientras que los cinco restantes presentaron Acs IgM contra varios de estos virus (dos receptores de TH con IgM anti CMV y VHS, dos con IgM anti CMV y VEB, un TH, uno TR y un TCPH con IgM a los tres virus).

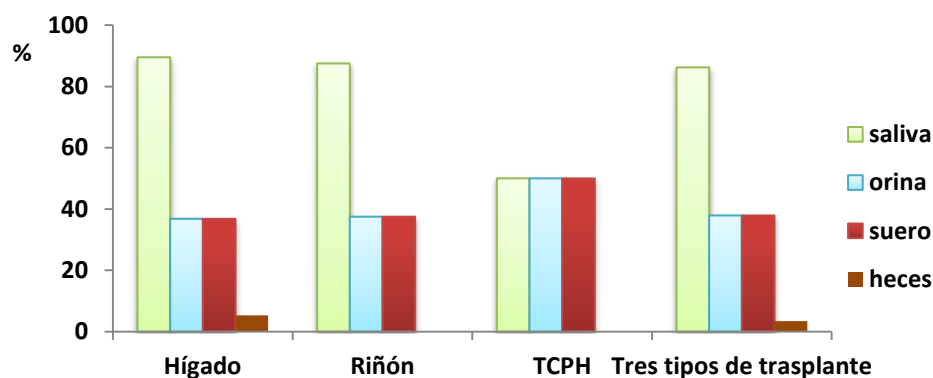
La detección de Acs IgM a estos virus se considera de poco interés para la mayoría de los investigadores, pues la importancia radica en si el paciente y su donante tienen la infección o no y por tanto inmunidad previa, y de ahí el valor protector y pronóstico de los Acs IgG específicos (41, 100, 274, 275).

A pesar del valor de la determinación de Acs en el periodo pre-trasplante, la misma tiene un valor limitado en el seguimiento de los trasplantados (45, 48, 51, 276, 277), por lo que actualmente los métodos de PCR-TR se consideran con mayor sensibilidad y especificidad para predecir qué pacientes desarrollarán una enfermedad causada por un virus específico. No obstante, la presencia de Acs neutralizantes específicos pre-trasplante tiene valor, pues los pacientes con Acs neutralizantes tienen menor incidencia de complicaciones por los virus a los que están infectados (28, 41, 100, 274, 278).

## V.4 Infecciones por herpesvirus en receptores pediátricos luego del trasplante

### V.4.1 Detección viral en las muestras clínicas de los pacientes trasplantados

El 93,1 % de los pacientes (27/29) y el 26,2 % de las muestras analizadas (145/554) fueron positivas a la detección de un segmento del ADN viral de al menos uno de los seis herpesvirus examinados durante los seis meses de seguimiento. La saliva (86,2 %) y la orina (37,9 %) fueron las muestras de los pacientes con mayor positividad, también se encontraron herpesvirus en las muestras de suero (37,9 %) y en las heces (3,4 %) (Figura 10). Las muestras de saliva se encontraron asociadas a tener detección herpesviral en comparación a las muestras de suero (100/140 versus 17/156, OR: 20,4, IC: 10,5-40,2,  $p < 0,001$ ).



**Figura 10.** Porcentaje de receptores pediátricos positivos por PCR-TR según tipo de trasplante y muestra, Cuba, noviembre del 2009 a diciembre del 2011.

Abreviatura: TCPH: trasplante de células precursoras hematopoyéticas.

Todos los receptores de TH fueron positivos a la detección de un segmento del ADN herpesviral (19/19), así como el 24,4 % de sus muestras, mientras que en los receptores de TR fueron positivos en el 87,5 % (7/8) y el 31,7 % de sus muestras resultaron positivas y en el 50 % de los pacientes con TCPH y el 15,4 % de sus muestras se detectó algún herpesvirus (Figura 10).

No se encontraron diferencias entre el sexo, la edad, la enfermedad causante del trasplante y la detección de herpesvirus en receptores de trasplante (Anexo 18).

El presente estudio se focalizó en el seguimiento longitudinal de los receptores de trasplante pediátricos cubanos, encontrándose una detección de un segmento del ADN a algún virus mayor a la descrita por otros autores. Este hallazgo puede explicarse debido a que se incluyeron diferentes tipos de trasplante y de muestras, se analizaron seis herpesvirus y a que el seguimiento de cada paciente se



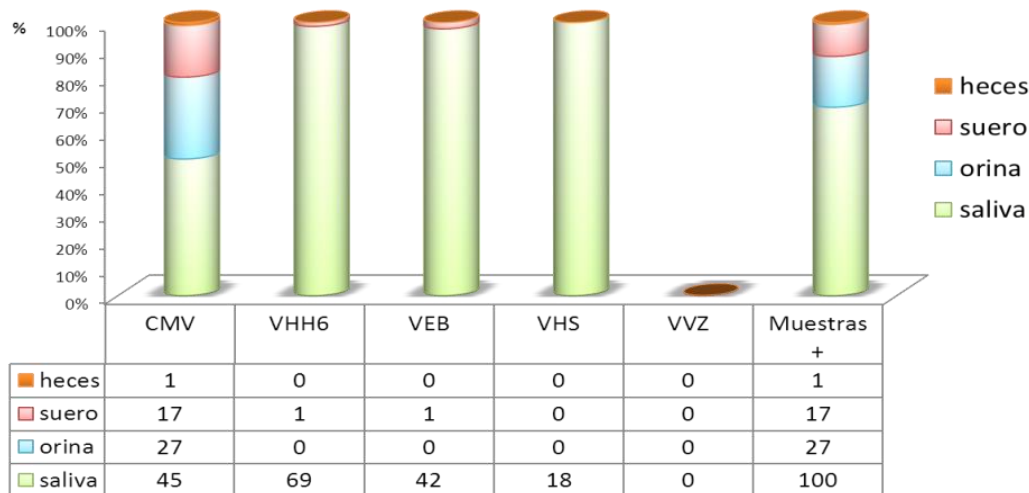
realizó durante un período de seis meses. Otros estudios analizan un solo tipo de trasplante, muestras de suero, uno o dos virus en períodos de tiempo menores (25, 279-284).

La frecuencia de detección de herpesvirus es variable en otros estudios y depende de: tipo de trasplante analizado, la edad y cantidad de pacientes estudiados, las muestras empleadas para el seguimiento (células mononucleares de sangre periférica, suero, sangre, orina, saliva), el tiempo de seguimiento (3, 6 meses o 1 año), la cantidad de virus estudiados, la seroprevalencia y la relación D/R, la presencia de otras complicaciones (quirúrgicas, infecciosas, tumorales) y otros aspectos del trasplante (el estado de los pacientes, el nivel de inmunosupresión, la compatibilidad con el D) (285-287).

La principal causa del porcentaje de positividad obtenido en el presente estudio fue que la detección de los herpesvirus se realizó en la saliva, la vía de excreción y diseminación por excelencia de estos virus, hecho común en inmunocompetentes (45, 48-51). Por esta razón, ésta es una muestra poco utilizada y recomendada para el diagnóstico en pacientes inmunodeprimidos, en los que la excreción en saliva es aún mayor (112, 209). No obstante, se describen investigaciones con la importancia de esta muestra para el diagnóstico de algunas enfermedades (288), su valor pronóstico (209, 289, 290) o en la valoración de la respuesta al tratamiento (291). La saliva se utilizó para el seguimiento de las infecciones por herpesvirus en niños luego del injerto, pues es una muestra de fácil obtención que no conlleva procedimientos agresivos.

Otros factores que influyeron en la elevada frecuencia de detección en la presente investigación fueron: la escasa cantidad de pacientes estudiados, la inclusión de tres tipos de trasplante y el estudio de cinco herpesvirus. En un estudio realizado en 40 receptores pediátricos de TCPH alemanes, se obtuvo una positividad del 63 % a alguno de los virus estudiados (CMV, VEB, VHH6, VBK y ADV) (25). Otros estudios obtienen igualmente cifras menores en receptores de TH o TR, por ejemplo en un estudio en 159 receptores adultos de TR, la incidencia de la infección de etiología viral fue del 45,9 % (292).

El CMV fue el virus detectado con mayor frecuencia en la presente investigación (en 22 pacientes, para el 75,9 % y en el 62,1 % de las muestras positivas, 90/145). Se encontró un segmento del ADN de VHH6, VEB y VHS casi en su totalidad en saliva (47,6 %, 29 % y 12,4 %, respectivamente, de las muestras positivas) (Figura 11). Todos los pacientes positivos a VHS fueron VHS tipo 1 (17/18), a excepción de un niño de 2 años que tuvo VHS tipo 2 en la saliva. No se detectó el VVZ en ninguna muestra.



**Figura 11.** Porcentaje de muestras positivas de receptores pediátricos de trasplante según tipo de herpesvirus, Cuba, noviembre 2009 a diciembre 2011.

\*El número de muestras positivas no coincide siempre con el total de virus detectados individualmente, pues en una muestra se pudo analizar la presencia de varios virus.

Abreviaturas: CMV: Citomegalovirus, VHH6: Virus Herpes Humano 6, VEB: Virus Epstein Barr, VHS: Virus Herpes Simple, VVZ: Virus Varicela Zóster, Muestras +: muestras positivas.

Al analizar la asociación del tipo de trasplante con la detección de herpesvirus, se encontró que el ser receptor de TOS se asoció a tener detección herpesviral en saliva en comparación con los receptores de TCPH (97/131 versus 3/9, OR=5,71, IC=1,18-30,78, p=0,017). Solo se estudiaron dos pacientes con TCPH, uno de los que evolucionó favorablemente sin detección herpesviral (autólogo), lo cual incidió en una menor frecuencia de herpesvirus al analizarlo por tipo de trasplante.

Los porcentajes de positividad detectados en el presente estudio, para cada virus, son mayores al compararlo con otras investigaciones; a pesar de esto, todos coinciden en que el CMV constituye el agente viral detectado con mayor frecuencia. Por ejemplo, en un estudio realizado en 109 receptores adultos de TH, se detectó el VHS (6 %), el VVZ (3 %), el virus de la influenza (1 %) y el CMV en el 21 % (293). Los resultados obtenidos en 159 receptores adultos de TR españoles, son similares a los del trabajo europeo antes mencionado, pues la incidencia de infección por CMV fue del 22,7 % (292). En 31 receptores pediátricos de TR canadienses se encontraron cifras mayores de detección de CMV (35 %)(294). Sin embargo, en receptores pediátricos de TCPH, aunque la positividad a CMV fue del 28 % también se encontró el VEB en el 48 % de los casos, siendo rara la detección de VHH6 (5 %) (25).

La presente investigación coincide con la frecuencia de detección de ADN viral descrita en un estudio realizado en 121 receptores adultos de TH en Pennsylvania, EUA, donde se obtuvieron cifras de

infección por CMV de 59 %, de VHS (35 %), VEB (25 %), sin embargo, para el VVZ la detección fue mayor (75 %) (295).

La excreción de VHS 1 en la saliva en niños es frecuente al compararla con la excreción del VHS 2, pues el VHS 1 habitualmente ocasiona las infecciones orofaríngeas (48, 296). Al analizar la infección por VVZ en 255 receptores pediátricos japoneses de donante vivo hepático, ocasionó varicela en el 23,9 % y zóster en el 0,8 % de los casos (297) durante cuatro años de seguimiento. Esta infección tiene una baja prevalencia debido a la introducción de la vacunación en países desarrollados y ésta puede ser la causa de la mayor frecuencia de la varicela en el estudio japonés. En una revisión de los trasplantes realizados durante 38 años en Croacia, encuentran la incidencia de esta infección en el 3,5 % de los TR (298).

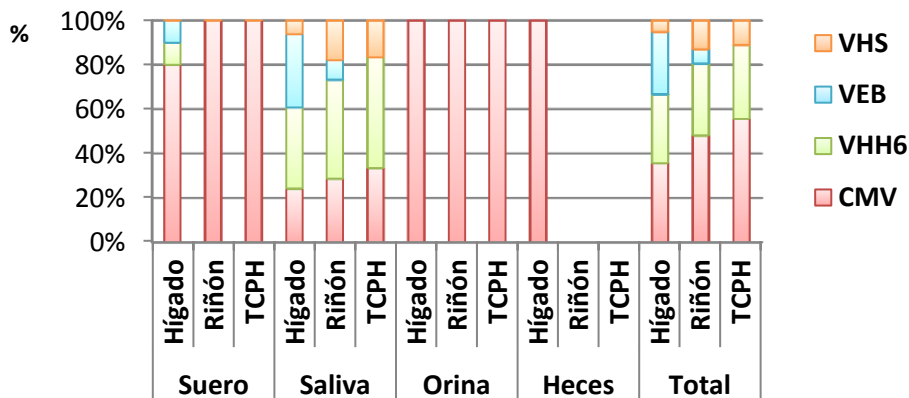
El zóster puede ser frecuente en trasplantados, a pesar de la vacunación (>25 % en TCPH, 5-15 % en TOS), pero generalmente se detecta luego de los primeros 3 a 6 meses y antes de los 5 años post-trasplante (49, 299). Como señalamos anteriormente, en el presente estudio no se detectó el VVZ por lo que el tiempo de seguimiento puede ser uno de los factores a tener en cuenta en la frecuencia de esta infección, así como la alta incidencia de la varicela en la población cubana (31).

El VEB en la saliva se detectó exclusivamente en los receptores de TOS y se asoció al trasplante de TH (37/81 versus 5/37, OR=5,38, IC=1,76-17,58, p=0,001, Figura 12). El VEB es un patógeno que debe estudiarse por la potencialidad de provocar enfermedades oncogénicas en receptores de trasplante (300-302). No se encontró en los receptores de TCPH, debido al pequeño tamaño de la muestra estudiada, pues solo se estudiaron dos receptores de TCPH. Adicionalmente, no se detectó otra asociación entre el tipo de trasplante y la detección de un herpesvirus en general (Anexo 18).

En el presente estudio se detectaron durante el seguimiento: el CMV, el VEB y el VHH6 en suero en al menos una ocasión. Sin embargo, el CMV se encontró en el 37,9 % de los sueros de los pacientes estudiados (11/29 pacientes y 17/156 muestras), encontrándose una asociación entre CMV y viremia, en comparación con los otros agentes virales (17/28 versus 0/49, OR indefinido, p<0,001). En los receptores de TH se detectaron tres virus en suero, mientras que en los de TR y TCPH solo se detectó el CMV.

Otro resultado encontrado fue que en 13 pacientes se detectó CMV en varias muestras. Aquellos que tuvieron CMV en la saliva o en la orina estuvieron asociadas a tener viremia por este virus en ese momento (17/53 versus 0/103, OR indefinido, p<0,001). Además la excreción de CMV en orina fue predecesora o predictiva del posterior desarrollo de la viremia (6/24 versus 8/102, OR=3,92, IC=1,21-

12,65,  $p=0,027$ ). Las enfermedades causantes de los trasplantes y el tipo de donante no se asociaron a la detección de CMV (Anexo 18).



**Figura 12.** Porcentaje de detección de herpesvirus en las muestras positivas según tipo de muestra y trasplante de receptores pediátricos de trasplante cubanos, noviembre del 2009 a diciembre del 2011. Abreviaturas: TCPH: trasplante de células precursoras hematopoyéticas, CMV: Citomegalovirus, VHH6: Virus Herpes Humano 6, VEB: Virus Epstein Barr, VHS: Virus Herpes Simple.

La aparición de ADN herpesviral en sangre se encuentra determinada por la capacidad del sistema inmune de controlar la replicación viral. Consistentemente, en el presente estudio la mediana de detección de la viremia fue a las 14 semanas post-trasplante (rango 2-43 semanas). El suero o la sangre son las muestras de elección para la determinación de las infecciones de forma precoz y para el diagnóstico de la enfermedad viral diseminada (111).

La incidencia de la infección por CMV en los receptores de trasplante muestra gran variabilidad entre los centros de trasplantología; además los trabajos se refieren a la viremia por CMV y no a la excreción o detección de este virus en otros fluidos (como la orina o la saliva). Las cifras de detección del CMV en pacientes con TOS alcanzan hasta el 75 % durante el primer año post cirugía (101, 303, 304). La variabilidad de las frecuencias de infección publicadas se puede explicar por la presencia de factores que predisponen o aumentan el riesgo de desarrollar la infección (305).

En la presente investigación se obtuvo un porcentaje similar al encontrado en un estudio prospectivo de niños alemanes con TCPH, el que describe la detección de ADN de uno o varios virus en el 62,5 % de los receptores, la viremia por CMV se encontró en el 28 % de los pacientes estudiados, mientras que otros virus, como por ejemplo el VHH6, fueron menos frecuentes (25).

En los países latinoamericanos se describen frecuencias variables de detección de CMV, por ejemplo en México, el 63,8 % de los pacientes pediátricos con TCPH presentó una infección activa por CMV (306). En un estudio multicéntrico en Chile, la infección por CMV se encontró en el 18 % de 98

pacientes pediátricos con TR (307) y en el 29,9 % en 107 niños con TH (308). Igualmente en ese país, en una investigación de seguimiento realizado hasta el sexto mes post-trasplante, se describió una incidencia total de infección activa por CMV del 36 %, con una frecuencia de 32 % en el grupo de receptores renales y 45 % en el grupo hepático (309).

La detección de CMV en diferentes muestras o fluidos orgánicos es frecuente, dentro de ellos la detección en la orina y en el suero reviste gran importancia. El CMV es el virus detectado con más frecuencia en trasplantados (41, 111, 281, 310, 311), se plantea que del 50 al 75 % de los receptores de TOS desarrollan una infección por CMV (57).

En la orina se excreta comúnmente el CMV (45) por lo que su detección en este tipo de muestra es frecuente. Es de destacar el valor de la viruria como predictora de viremia por CMV, pues se puede monitorear a los pacientes asintomáticos, sin necesidad de repetidas extracciones de sangre; sobre todo si se tiene en cuenta el incremento de la carga viral (312).

Las heces pueden contener este virus cuando se produce una infección intestinal, lo que se aprecia en inmunodeprimidos. La detección de CMV en heces constituye una vía no invasiva para el diagnóstico (313, 314).

El universo del presente estudio fue pequeño, con tres tipos de trasplante y por tanto con una variedad de enfermedades causantes del trasplante, además de una mayoría de donantes fallecidos (85,2 %), por lo que no se detectó asociación con la infección por CMV con estas variables. Las enfermedades causantes del trasplante no tienen una frecuencia de complicaciones infecciosas diferente, la evolución exitosa depende de otras características entre las que se incluyen el estado del paciente, la presencia de complicaciones, la compatibilidad con el donante y el tratamiento inmunosupresor empleado (285, 315, 316). Además el donante vivo se asocia a un mejor resultado en la evolución post-trasplante en el TOS, pues la cirugía con el donante vivo tiene un menor tiempo de espera, la edad de los donantes habitualmente es menor, menor frecuencia de complicaciones inmunológicas y tienen menor incidencia de infecciones (317, 318), mientras que la del donante fallecido habitualmente es de urgencia y se encuentra vinculada a un mayor tiempo de isquemia en frío del injerto, requerimientos transfusionales mayores (317, 319).

#### **V.4.2 Co-infecciones en pacientes trasplantados**

La presencia de infecciones mixtas entre agentes virales y no virales ha sido descrita con anterioridad (28, 320). En el presente estudio se encontró que 25 receptores (86,2 %) tuvieron co-infecciones (virales y no virales) y estas se detectaron en un mismo momento en el 79,3 % (23/29) de los pacientes (Anexo 19). La mayoría de las co-infecciones (91,9 %, 57/62) se encontraron en saliva; en la

que se detectó el VHS y el CMV asociados (13/18 versus 40/123, OR indefinido,  $p=0,002$ ). El CMV estuvo presente en el suero de todos los casos en los que se detectó viremia, mientras que solo se encontraron otros herpesvirus en dos de las 17 muestras de suero con viremia (Figura 11).

Los métodos moleculares permiten el diagnóstico de infecciones múltiples y la detección de co-infecciones o infecciones mixtas entre agentes virales y no virales, principalmente en pacientes inmunodeprimidos. Estos resultados se han descrito en estudios de infecciones del SNC, en receptores de TR y en pacientes con síndrome mononucleósico (37, 321-324).

Las co-infecciones se detectan frecuentemente en pacientes inmunocomprometidos debido a que la afectación de la respuesta inmune contribuye a la reactivación de varios virus latentes así como a las infecciones con otros virus, bacterias, parásitos y hongos (325, 326). Las implicaciones exactas de las infecciones mixtas en la patogénesis de las enfermedades asociadas no está dilucidada (323, 324). No obstante, la detección del CMV en las co-infecciones, puede explicarse pues la replicación del CMV aumenta el riesgo de la aparición de otras infecciones oportunistas (63).

La presencia de las co-infecciones en los pacientes trasplantados es de importancia, pues un agente patógeno sobreañadido puede ser la causa de la pérdida del injerto o de la muerte del paciente, como por ejemplo el VHH6, que causa disfunción del injerto en receptores de TH cuando co-infecta a pacientes con CMV (327); sin embargo, los resultados encontrados en el presente estudio y en otros reportes sugieren que el VHH6 no causa enfermedad por sí mismo (280, 328, 329), pero pudiera actuar como co-adyuvante al facilitar la emergencia de varios patógenos como el CMV (280, 330, 331). En el presente trabajo, se encontró una co-infección polimicrobiana en un paciente, el mismo presentó una peritonitis tabicada de etiología micótica (*Cándida* spp, que respondió al tratamiento con anfotericin B liposomal) y detección simultánea de tres herpesvirus en saliva (VEB, CMV y VHH6). Algunos virus como el CMV, el VHH6 y el VHC, tienen un efecto inmunomodulador que puede ser un potencial predictor de infecciones fúngicas invasivas (332). García-Prado y col en un estudio de receptores adultos de TH, describen que el 12 % de las infecciones encontradas son polimicrobianas (293).

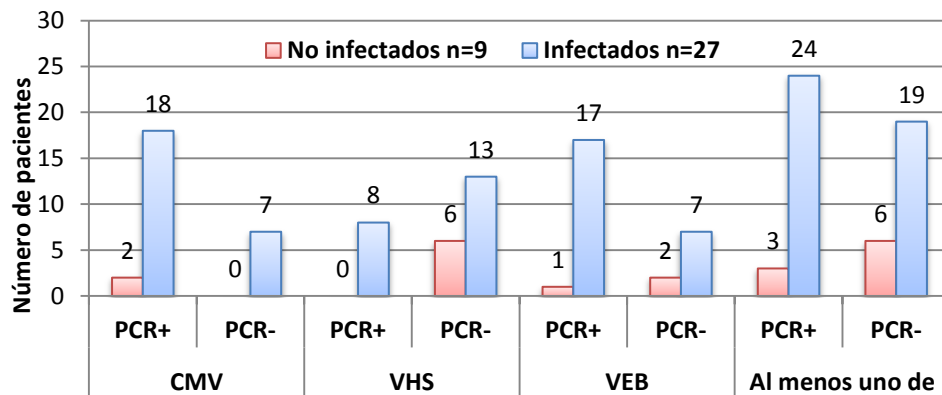
Otros hallazgos de co-infecciones virales son los descritos por Schönberger y col, donde 11 de 40 receptores desarrollaron viremia por CMV y en siete de ellos se detectó simultáneamente otro virus en sangre, fundamentalmente el VEB (25). De forma similar, Wada y col desarrollaron un método de cuantificación simultánea de varios herpesvirus en muestras de plasma de 46 trasplantados (27 TCPH y 19 TH), el ADN viral se encontró en el 39,1 % de los casos y se detectaron co-infecciones en el 10,9 % de los pacientes; la co-infección CMV-VEB fue la de mayor frecuencia (82).

### V.4.3 Relación del estado serológico del receptor previo al injerto y la detección de herpesvirus post-trasplante.

La mayor parte de los receptores pediátricos estaban infectados por CMV y VEB antes del trasplante y excretaron al menos uno de estos virus en el seguimiento (Figura 13). Por el contrario la excreción de VHS fue escasa (18 muestras, 8 pacientes, Figura 13). No se encontró asociación entre estar infectado por CMV, VEB o VHS y tener detección posterior de estos virus post-trasplante (Anexo 18).

De todos los pacientes con infección anterior hubo un grupo que tuvo IgM detectable (ya sea con patrón serológico pre-trasplante de recurrencia/reinfección o de infección primaria) que durante el seguimiento no excretaron el herpesvirus para el que tenían Acs IgM. La presencia de una infección reciente previa al trasplante ocasiona un aumento de los Acs específicos antivirales circulantes, que pueden contribuir a mantener el control de la infección herpesviral (333-335).

A la mayoría de los pacientes seronegativos (6/9) no se les detectó el virus al que eran seronegativos durante el seguimiento (5 seronegativos a VHS y 2 a VEB, siendo uno de estos simultáneamente seronegativo a ambos virus), por lo que se mantuvieron no infectados por estos virus. Dos receptores seronegativos a CMV y uno al VEB (receptor renal, también seronegativo al VHS), excretaron CMV (en la décima semana) y VEB (en la sexta semana), respectivamente (Figura 13), durante el seguimiento; lo que implica que adquirieron una infección primaria en este período.



**Figura 13.** Relación de la inmunidad previa al trasplante frente al CMV, VHS y VEB y la excreción viral de los receptores pediátricos, Cuba, noviembre del 2009 a diciembre del 2011.

\*n= 27. Se tuvo en consideración el estado en que se clasifica para al menos un virus, al igual que la excreción, pues cada paciente puede tener un estado serológico diferente frente a cada uno de los virus estudiados.

Abreviaturas: PCR+: Reacción en cadena de la polimerasa positiva a ese herpesvirus, PCR-: Reacción en cadena de la polimerasa negativa a ese herpesvirus, CMV: Citomegalovirus, VHS: Virus del Herpes Simplex, VEB: Virus Epstein Barr.

Los resultados encontrados coinciden con lo reportado por Verderguer y col, que plantean que la mayor parte de los receptores pediátricos de TCPH seropositivos al CMV tienen detección posterior de este virus (40); al igual que Indolfi y col en 62 niños receptores hepáticos seropositivos al CMV y al VEB

(39). En otros estudios también se encuentra una alta frecuencia de detección de virus en pacientes con infección anterior al trasplante, como por ejemplo en Taiwán (336) y en Corea (337) detectan viremia por CMV en el 45,3 % de TCPH alogénicos adultos y en el 55,7 % de los TH, respectivamente. Apoyando estos resultados van Ree y col concluyen que el estado de latencia al CMV es un factor de riesgo para el fallo del injerto renal a largo plazo (338).

Los resultados encontrados en la presente investigación coinciden con los reportes anteriores, donde la mayoría de los pacientes eran seropositivos a CMV y VEB y tienen una elevada frecuencia de detección viral posterior. Los resultados positivos de detección viral del presente estudio fueron en varias muestras, fundamentalmente en saliva, lo que se tradujo en una alta positividad de pacientes; en contraste, con los de otros estudios que fueron en sangre (336, 337).

En niños que no tienen inmunidad previa a herpesvirus y particularmente en los receptores pediátricos de trasplante, existe un mayor riesgo de adquirir la infección por estos virus durante el injerto o posterior a este momento y cursar con una enfermedad primaria que puede llegar a ser severa (45, 48, 51, 339). Por ejemplo en Niigata, Japón, en un estudio de 32 niños receptores de TH, se detectaron seis pacientes seronegativos al VEB y cinco de éstos se infectaron por este virus (340). En contraste, la población pediátrica estudiada seronegativa a VHS o VEB al comienzo del estudio, exceptuando un paciente, no excretó estos virus durante el seguimiento.

Los pacientes que se infectaron durante el seguimiento realizado, recibieron el injerto de donantes de los que se desconocía su estado serológico frente a los herpesvirus estudiados y pudieron adquirir la infección mediante el tejido trasplantado, lo que refuerza la importancia del estudio del donante en cuanto a su estado serológico.

Smets y col encuentran que el 80 % de 38 receptores pediátricos de TH seronegativos, desarrollan una infección primaria por herpesvirus virus en los 15-90 días posteriores al injerto (302) y en Canadá, los niños receptores de TR presentan este tipo de infección en el 35,5 % (294). En receptores adultos (341) y en los TCPH (342) la frecuencia de infección primaria post-trasplante es menor, lo que se debe a que estos pacientes en el transcurso de su enfermedad de base están expuestos al virus y por tanto a adquirir la infección pre-trasplante.

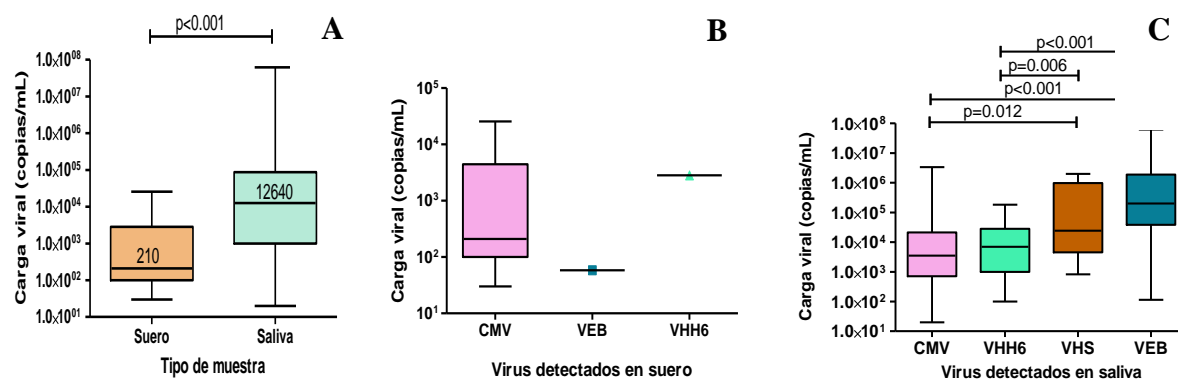
#### **V.4.4 Carga viral**

Los valores menores de carga viral se obtuvieron para el CMV y el VHH6 (CMV: mediana  $1,8 \times 10^3$  copias/mL; rango de  $2,0 \times 10^1$  a  $5,9 \times 10^8$  copias/mL y VHH6: mediana  $6,8 \times 10^3$  copias/mL; rango de  $1,0 \times 10^2$  a  $1,8 \times 10^5$  copias/mL) a pesar que fueron los virus más frecuentes (90 y 70 muestras, respectivamente). Sin embargo, el VHS y el VEB se detectaron con menor frecuencia (18 y 43



muestras, respectivamente) y mostraron mayores niveles de carga viral (VHS: mediana  $3,3 \times 10^4$  copias/mL; rango de  $8,3 \times 10^1$  a  $2,0 \times 10^6$  copias/mL y VEB: mediana  $1,2 \times 10^5$  copias/mL; rango de  $1,1 \times 10^2$  a  $6,2 \times 10^7$  copias/mL).

Los herpesvirus detectados en suero (CMV, VEB y VHH6) presentaron menores valores de carga viral al compararlos con la carga viral detectada en saliva (mediana de la carga viral en suero:  $2,1 \times 10^2$  y en saliva:  $1,3 \times 10^4$ ,  $p < 0,001$ , Figura 14 A). No se estableció la comparación de los niveles de viremia de cada uno de los herpesvirus, pues solo en dos muestras se detectaron otros herpesvirus diferentes al CMV (Figura 14 B). Los niveles de carga viral de los virus en la saliva fueron significativamente diferentes (mediana CMV:  $3,0 \times 10^3$  copias/mL; VHH6:  $7,0 \times 10^3$  copias/mL; VHS:  $3,3 \times 10^4$  copias/mL; VEB:  $1,4 \times 10^5$  copias/mL,  $p < 0,001$ , Figura 14C).



**Figura 14.** Mediana de la carga viral según el tipo de muestra y herpesvirus en receptores de trasplante, Cuba, noviembre del 2009 a diciembre del 2011. **A** Carga viral en las muestras de suero y orina. **B** Niveles de carga viral de los herpesvirus en el suero. **C** Niveles de carga viral de herpesvirus en la saliva.

Abreviaturas: CMV: Citomegalovirus, VHH6: Virus Herpes Humano 6, VEB: Virus Epstein Barr, VHS: Virus Herpes Simple.

La mediana de la carga viral de CMV en la orina fue  $2,0 \times 10^3$  copias/mL, rango  $1,0 \times 10^2$  a  $1,0 \times 10^6$  copias/mL. La muestra con menores valores de carga viral de CMV fue el suero (mediana  $2,1 \times 10^2$  copias/mL, rango de  $3,0 \times 10^1$  a  $2,5 \times 10^4$  copias/mL) y las heces tuvieron una sola detección con carga viral muy elevada ( $5,9 \times 10^8$  copias/mL). Al analizar el nivel de carga viral en orina y saliva a partir del cual se cumple la asociación con la detección de viremia por CMV, se encontró el PC en 255 copias/mL y 60 copias/mL, respectivamente, con un ABC ligeramente exacto para la orina y exacto para la saliva (ABC de 0,774 y 0,920, sensibilidad de 62 y 93 % y especificidad de 92 y 62 %, respectivamente).

La importancia de determinar los niveles de viremia de los herpesvirus en los pacientes trasplantados radica en que los valores elevados se asocian a complicaciones post-trasplante (39, 343-345) y los

niveles de viremia a su vez tienen factores de riesgo, entre los que se encuentran la seropositividad a CMV en el receptor o el donante, la irradiación corporal total y el uso de globulina anti-timocítica en los receptores pediátricos luego del TCPH (344). En los receptores de TOS el riesgo aumenta cuando hay un estado serológico de alto riesgo (D+/R-), cuando se trata de un paciente retrasplantado, o existe una sepsis bacteriana post-trasplante, así como cuando se utilizan sueros anti-linfocíticos o elevadas concentraciones de esteroides en el tratamiento del rechazo agudo (76).

La implementación de métodos de PCR-TR permite la cuantificación de los herpesvirus, proporcionando un método altamente sensible y específico que conduce a la predicción de qué paciente desarrollará una enfermedad y la evaluación de la respuesta al tratamiento antiviral (346-348). El valor predictivo de la viruria de CMV en el comienzo de su viremia, unido al valor de carga viral en orina o saliva asociado a la subsecuente detección de CMV en suero, son aspectos importantes a considerar en el seguimiento de los trasplantados. Por ello y en concordancia con otros reportes, el presente estudio refuerza la necesidad de incluir métodos de PCR-TR en orina y suero para el manejo y el seguimiento de infecciones virales en trasplantados (349-351). No obstante, Sola y col plantean que la positividad de la orina a CMV no está relacionada con la viremia a este agente en TR (352). La presencia de CMV en saliva también ha sido considerada por Correia-Silva y col una posible predictora de la infección en los receptores de TCPH alogénicos, particularmente luego de los 100 días post-trasplante (209).

Los niveles de carga viral de cada virus en diferentes muestras no están bien establecidos y varían según la metodología empleada (353), por lo que cada sistema se debe estandarizar en cada centro en el que se use y debe utilizarse el mismo método en el seguimiento de los pacientes. Las cifras de carga viral de estos agentes no son extrapolables entre los diferentes sistemas de PCR-TR, por lo que este aspecto debe ser manejado con cuidado.

El valor del seguimiento de la carga viral radica en poder determinar el momento óptimo en el que un paciente debe ser tratado antes de que surjan las complicaciones, es decir, con tratamiento anticipado. El Grupo de Estudio de la Infección en el Trasplante establece que el valor de corte en muestras de suero para el tratamiento anticipado de la infección por CMV debe ser entre 400 y 5 000 copias/mL en receptores de TOS y de una copia en TCPH (112). En las Guías del Consenso Internacional para el manejo del CMV en el TOS, se establece que debido a que los altos valores de carga viral se correlacionan con un incremento del riesgo de la enfermedad por CMV, se debe especificar que los

cambios menores de cinco veces de la carga viral en sangre de receptores de TOS no deben ser considerados significativos (2).

Una revisión de los casos de carga viral realizados en los laboratorios Emery, encuentran que el 7,9 % de las muestras de plasma de receptores de trasplante tienen CMV, de éstas el 58,7 % tuvo valores menores de 1 000 copias/mL, el 25,2 % se encontró entre 1 000 y 10 000 copias/mL, el 9,4 % entre 10 000 y 100 000 copias/mL, mientras que sólo el 6,7 % presentó cifras mayores de 100 000 copias/mL. Las cargas virales bajas de CMV en suero fueron frecuentes (< 1 000 copias/mL) y no se conoce el significado de este fenómeno, mientras que los altos niveles son raros y aparecen en pacientes con inmunodepresión severa e infección viral primaria (346).

Un estudio multicéntrico que abarcó 33 laboratorios en EUA, Europa y Canadá, demostró que la variabilidad en los valores de carga viral de CMV en una misma muestra puede ir desde 2,0 log<sub>10</sub> a 4,3 log<sub>10</sub> copias/mL, por ejemplo una muestra en un laboratorio tenía 100 000 copias/mL mientras que en otro tuvo 100 copias/mL; lo que refuerza que las comparaciones entre los valores o niveles de carga viral deben ser evitados (354). Desde el 2010, expertos de la Organización Mundial de la Salud se encuentran desarrollando un estándar internacional de CMV, que permitirá calibrar los procedimientos de PCR-TR (346).

Los problemas de la variabilidad en los niveles de carga viral en sangre, suero o plasma se aplican también para el VEB, VHS, VHH6 y VVZ, pues no existe un sistema internacional único, ni uniformidad en los métodos empleados para su cuantificación, extracción de ADN ni en el periodo de conservación de la muestra. Hasta el momento se plantea que el aumento de la carga viral de los herpesvirus durante el seguimiento de los receptores de trasplante es el aspecto fundamental a tener en cuenta en la toma de decisiones diagnósticas y terapéuticas (40, 355, 356).

Sin embargo, se pueden apreciar tendencias o valores similares en algunas investigaciones. Por ejemplo, Smith y col refieren que los valores de la mayor parte de las muestras (95 %) con viremia por VEB se encuentran por debajo de  $5,5 \times 10^4$  copias/mL y el 50 % es menor de  $2,0 \times 10^3$  copias/mL (81). Wada y col encuentran rangos de carga viral para CMV, VEB y VHH6 en plasma de 2,0 a  $8,5 \times 10^4$ , 2,5 a  $7,5 \times 10^4$  y 2,9 a  $1,1 \times 10^4$  copias/mL, respectivamente. Estos autores describen que los pacientes sintomáticos y los asintomáticos no tienen diferencias en los valores de carga viral (82). Onozawa y col detectan un aumento de la carga viral de VVZ en aquellos casos que desarrollan infección diseminada o localizada en uno o varios dermatomas (34). Dziecitzkowski y col detectan VHH6 en plasma con valores entre 700 y 1 600 copias/mL, siendo detectado fundamentalmente en el primer mes.

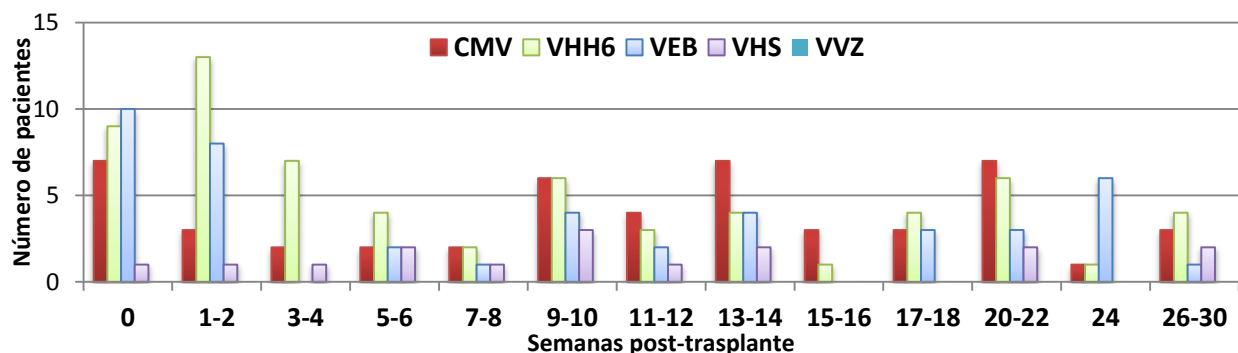
Tampoco existen estudios de los niveles de carga viral de herpesvirus en muestras de saliva, orina o heces y su valor para el receptor de trasplante. En un estudio de carga viral a herpesvirus en saliva de pacientes con VIH/sida, se encontró que el CMV (mediana  $1,5 \times 10^3$  copias/mL) generalmente se detecta con menores niveles en comparación con el VEB y el VHS (medianas  $3,0 \times 10^5$  y  $1,5 \times 10^4$ , respectivamente)(115).

El virus con mayor carga viral en la saliva fue el VEB, lo que resulta de interés pues los altos niveles de carga viral de este agente están asociados al desarrollo posterior de la SLP. Otros estudios han encontrado esta asociación en relación con el nivel de viremia (340, 357, 358). Tanaka y col (301) evaluaron la carga viral en 13 niños luego del injerto renal durante un periodo de tres meses y encontraron altos niveles de viremia independientemente de la aparición de SLP. Es importante el seguimiento de los niveles de la carga viral frente a este virus para intervenir y poder evitar la aparición de SLP.

En el presente estudio, el VHH6 se detectó fundamentalmente en la saliva, no se conoce la importancia de los niveles de carga viral de este agente en los trasplantados (50). Sin embargo, en un receptor de TH se detectó viremia por VHH6 ( $2,8 \times 10^3$  copias/mL) y por CMV ( $9,0 \times 10^2$  copias/mL) y un cuadro de sepsis con un desenlace fatal. Estos agentes pudieron haber contribuido al fallecimiento del paciente, que sobrevivió ocho días luego de injertado el hígado con una complicación infecciosa post-quirúrgica (paciente 3 TH) y pueden haberse reactivado secundariamente a la sepsis del receptor. El papel de la co-infección entre el VHH6 y el CMV no ha sido determinado aún para los receptores de trasplante (359).

#### **V.4.5 Detección herpesviral en muestras de receptores pediátricos post-trasplante**

La Figura 15 muestra el resultado del seguimiento longitudinal de las muestras de los 29 pacientes trasplantados, durante un periodo de 30 semanas. En el momento del trasplante (muestra 0) se detectaron virus fundamentalmente en la saliva de los pacientes (VHH6: 31,0 %, VEB: 34,5 % y CMV: 24,1 %). Posteriormente, se observó una reducción en la detección de CMV debido al uso de la profilaxis con ganciclovir por uno a tres meses, a diferencia del VHH6 que se mantuvo detectable durante todo el período estudiado. En las semanas 9 a la 14 y entre la 20 a la 22 se observaron otros incrementos en la frecuencia de detección de CMV, VEB y VHH6. Después de la semana 30 en la mayoría de los pacientes (más del 90 %) no se detectaron herpesvirus en sus muestras (datos no mostrados).



**Figura 15.** Detección de herpesvirus en receptores pediátricos de trasplante según semana post-trasplante, Cuba, noviembre del 2009 a diciembre del 2011.

Abreviaturas: CMV: Citomegalovirus, VHH6: Virus Herpes Humano 6, VEB: Virus Epstein Barr, VHS: Virus Herpes Simple, VVZ: Virus Varicela Zóster.

Los herpesvirus detectados tuvieron medianas de comienzo de la detección significativamente diferentes entre sí (VHH6: 1 semana, VEB: 0 semana, VHS: 7 semanas y CMV: 6 semanas,  $p=0,035$ ), al igual que la mediana de la detección en cada una de las muestras estudiadas (saliva y heces: 0 semanas, orina: 10 semanas y suero: 11 semanas,  $p<0,001$ ).

El VHS fue el virus detectado con menor porcentaje durante el seguimiento (menor al 15 %). El VHS se detecta con poca frecuencia (menos de un 5-15 %) en receptores de trasplante, debido a la aplicación de una terapia viral específica, no obstante, pueden producirse complicaciones severas en este grupo de pacientes (48, 360, 361), por lo que debe realizarse un seguimiento fundamentalmente en la valoración de la efectividad del tratamiento (362).

El análisis de las muestras de los pacientes estudiados, mostró la detección de varios virus al momento del trasplante; indicando que la no utilización de la profilaxis universal puede poner en peligro el éxito del trasplante. Este hallazgo y el seguimiento virológico por métodos cuantitativos, corroboran la importancia del uso de la profilaxis antiviral universal con ganciclovir/valganciclovir durante al menos tres semanas post-injerto, lo que se ha planteado por otros autores (25, 111, 363).

Otro de los hallazgos del presente estudio fue que la excreción del VHH6 no disminuye luego de la profilaxis antiviral; lo que confirma los resultados de estudios previos que demuestran que algunas cepas de VHH6 B son la causa más común de infección por VHH6 post-trasplante (364, 365) y pueden ser resistentes al ganciclovir (366). En investigaciones de seguimiento post-injerto realizadas en receptores de TCPH pediátricos holandeses, se obtuvo que la reactivación del VHH6 es común en este tipo de pacientes, pues el 67 % de 58 pacientes excretan el virus durante el seguimiento, la mayoría en el primer mes post-trasplante, sin asociarse a un aumento de la morbilidad o la mortalidad (367).

En la presente investigación se evidenció que entre los dos y los tres meses post-trasplante se incrementó la detección viral en los pacientes estudiados; debido probablemente a la detención de la profilaxis antiviral unido al régimen de inmunosupresión, lo que conduce a un aumento de la replicación viral y su excreción en fluidos (ya sea por infecciones primarias, reactivaciones o reinfecciones). Estos resultados han sido descritos previamente por otros autores (45, 48, 51, 368).

En un estudio realizado en Japón, se detectó la carga viral de CMV, VEB y VHH6 en los sueros de 34 receptores de TH post-trasplante, como resultados se detectaron CMV y VHH6 fundamentalmente en la segunda semana y el VEB (14,7 %) fue el más frecuente después de la cuarta semana. En el 23,5 % de los casos se encontraron co-infecciones virales, siendo la combinación CMV y VHH6 la más frecuente. En éste estudio los pacientes no se trataron con profilaxis universal lo que pudo incidir en una detección precoz de la viremia (369). En otro estudio realizado en 197 adultos receptores de TH, se observó que el período de mayor detección de la viremia por VEB (72 %) son los primeros 100 días luego del injerto (269).

Algunos autores plantean que el período de mayor detección herpesviral son los primeros tres a cuatro meses post-trasplante, como por ejemplo Garcia-Prado y col que reportan la mayoría de los eventos infecciosos en receptores adultos españoles de TH en los primeros cuatro meses (58,3 %), de los que el 34 % son de origen vírico, que incluye al VHS, el VVZ, el virus de la influenza y el CMV (293). Igualmente, el seguimiento de 1 398 receptores de TR, demostró que el CMV se encuentra mayoritariamente en los primeros tres meses de estudio (370). Estos estudios avalan los resultados obtenidos en la presente investigación, con relación al tiempo de seguimiento realizado en los pacientes trasplantados pediátricos cubanos y refuerzan que es importante realizar el seguimiento durante seis meses post-trasplante.

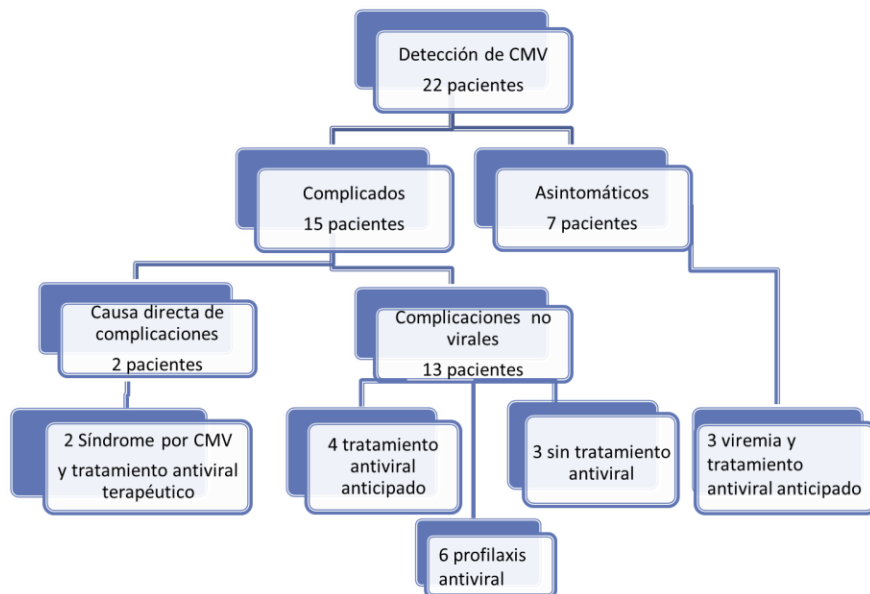
#### **V.4.6 Detección viral post-trasplante y su impacto clínico**

De los resultados obtenidos se demostró que 24 receptores presentaron complicaciones durante el seguimiento. Las complicaciones se presentaron fundamentalmente en el período inmediato post-injerto y estuvieron relacionadas directamente con la intervención quirúrgica (4 pacientes), las infecciones bacterianas (13 pacientes), las infecciones virales (2 pacientes), el rechazo agudo y crónico (4 pacientes) y otras causas (5 pacientes), entre las que se encuentra el síndrome febril de etiología no precisada, la reactivación de la enfermedad de base, la infección con VHC y la encefalopatía hepática. Dos receptores presentaron infecciones bacterianas (*Escherichia coli* en líquido abdominal- peritonitis

tabicada por *Cándida albicans* e infección del tracto urinario por *Pseudomona spp*) en el periodo inmediato post-trasplante y posteriormente desarrollaron rechazo del órgano trasplantado.

El CMV fue el virus que se detectó con mayor frecuencia en pacientes que desarrollaron alguna complicación durante el seguimiento (15 receptores, aunque esta relación no fue significativa, Anexo 18). De ellos, en dos pacientes se encontró como causa directa de complicaciones (síndrome por CMV en los pacientes 23 TH y 15 TR, en el 15 TR se presentó en dos episodios); ambos se trataron con antivirales terapéuticos. Este virus también se detectó en trece pacientes que tenían complicaciones bacterianas, episodios de rechazo, estenosis biliar y síndrome febril. De éstos receptores, cuatro se trataron anticipadamente con antivirales (pacientes 5 TH, 10 TH, 18 TR y 22 TH), otros seis se encontraban con tratamiento profiláctico universal y en los restantes tres pacientes solo se trataron las otras complicaciones (Figura 16).

El CMV también se detectó en siete pacientes asintomáticos, tres de los cuales desarrollaron viremia y recibieron tratamiento antiviral anticipado (pacientes 1 TH, 8 TH y 12 TR, Figura 16 y Anexo 20). También recibió tratamiento antiviral anticipado con Aciclovir el paciente 17 TCPH debido a que se le encontró detección de altos niveles de VHS en saliva, en la cuarta semana post-trasplante (Anexo19).



**Figura 16.** Pacientes receptores de trasplante pediátricos tratados con terapia antiviral anticipada o curativa según detección de CMV y complicaciones, 2009-2011.

\*Fuente: Encuesta de datos de receptores de trasplante e historias clínicas.

Abreviaturas: CMV: Citomegalovirus

El VHS, el VEB y el VHH6 se detectaron en cinco, 12 y 13 pacientes con otras complicaciones respectivamente. Estos herpesvirus se encontraron en co-infección simultánea (en el mismo

momento) o durante el seguimiento (durante las 30 semanas) en 14 de éstos pacientes. Estos agentes se detectaron fundamentalmente en saliva y no se encontró como causa de la complicación en un ningún paciente.

El CMV fue la causa principal de morbilidad infecciosa viral en el presente estudio y se plantea por otros autores que es la causa más frecuente de complicaciones infecciosas en receptores de trasplante (37, 280, 371). La incidencia de la enfermedad por CMV en receptores de trasplante muestra gran variabilidad, se describe aproximadamente entre el 44 al 65 % de enfermedad en los grupos de mayor riesgo (D+/R-)(303). Estas cifras han disminuido a menos del 10 %, en aquellos centros de trasplante con mayor experiencia, debido a la utilización de la profilaxis o a la modalidad de la terapia anticipada (101, 304).

Algunos receptores presentaron sintomatología con el compromiso del injerto y la detección viral, lo cual se expondrá a continuación. Por ejemplo, el paciente 15 TR, presentó en la semana 12 del seguimiento una gastroenteritis aguda, seguida de una neumonía nosocomial y un Cushing secundario al tratamiento esteroideo, estas complicaciones fueron debidamente tratadas; en la semana 14 apareció el síndrome por CMV que requirió tratamiento con valganciclovir por un mes. Posteriormente, en la semana 22 se le detectaron simultáneamente varios herpesvirus en la saliva y el CMV en la orina. Este paciente presentó rechazo crónico y síndrome por CMV (Anexo 20); por lo que requirió tratamiento antiviral terapéutico nuevamente, al cual respondió de forma satisfactoria.

La aparición de la enfermedad por CMV en los receptores con factores de riesgo tales como el uso de una alta dosis de esteroides y las complicaciones infecciosas, ha sido descrito con anterioridad (13); así como la asociación al rechazo (372). Además, se ha descrito que los pacientes receptores de trasplante que han sido tratados por una enfermedad debida al CMV tienen una mayor probabilidad de recurrir a esta enfermedad luego de completar la terapia antiviral (57).

Dos pacientes presentaron síndrome febril de origen desconocido (receptores 5 TH y 10 TH) y fueron positivos a la detección de herpesvirus en saliva (VHH6-CMV y VHS-VHH6-VEB-CMV, respectivamente); por lo que los médicos de asistencia decidieron tratarlos con antivirales (valganciclovir). Posteriormente, la fiebre desapareció y la carga viral disminuyó o se negativizó. En estos dos pacientes no se confirmó la causa viral de su sintomatología mediante la detección de la viremia, pero la respuesta positiva al tratamiento antiviral indicó que la causa fue una infección herpesviral.



Al analizar la frecuencia de las complicaciones según el tipo de trasplante no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos (Anexo 18). Se plantea que del 15 al 25 % de los receptores de TOS desarrollan la enfermedad por este virus (que es la tercera parte de los que desarrollan la infección activa)(57). En los países latinoamericanos se describen frecuencias variables de complicaciones por CMV. En México, el 6,6 % de los pacientes pediátricos con TCPH desarrollan complicaciones por CMV (306). En Chile los receptores pediátricos de TH y TR, presentan una incidencia de la enfermedad por CMV del 52 %; el 60 % de los cuales presentó síntomas de afectación visceral, en dicho trabajo la proporción de enfermos por éste virus fue mayor en los sometidos a TH (7/9,78 %) en comparación con los receptores de TR (5/14, 36 %) (309). En receptores franceses de TR o de riñón-páncreas se demostró que la presencia de la viruria o viremia estaba asociada a una enfermedad citomegálica de mayor gravedad (373).

En el presente trabajo se detectó VHS en ocho pacientes, a pesar de que a dichos pacientes se les aplicó la profilaxis universal con ganciclovir, valganciclovir o aciclovir. Seis de éstos casos se trataron con antivirales, cinco con ganciclovir o valganciclovir (debido a la presencia de complicaciones y excreción simultánea de CMV) y uno con aciclovir (Anexo 20). La excreción viral en los dos pacientes restantes fue asintomática y desapareció espontáneamente. La frecuencia de la detección de este virus fue baja debido al empleo del tratamiento profiláctico, el que incide en el período de máxima detección de este agente, o sea, en el primer mes post-trasplante.

El VHS está asociado con enfermedad severa en receptores que presentan otros factores de riesgo, entre los que se incluye la inmunodepresión de los TCPH (324, 374). Otro ejemplo es un estudio realizado donde se empleó el OKT3 en 121 receptores de TH, en estos casos la mayoría de las infecciones por VHS fueron reactivaciones orales o genitales y solo tres casos desarrollaron hepatitis debido a la infección primaria por VHS. Las reactivaciones sintomáticas por VHS ocurrieron significativamente con mayor frecuencia en los receptores seropositivos tratados con OKT3 del estudio anterior, por lo que el empleo de algunos inmunodepresores en particular puede ser la causa de la alta incidencia de la morbilidad debido al VHS (295).

La importancia del hallazgo del VEB, radica fundamentalmente en el desarrollo de SLP (375, 376). En el estudio realizado no se encontró esta enfermedad, lo que pudiera estar relacionado con que el debut de SLP es tardío (375, 376). Estos resultados se confirman en un estudio realizado en 38 receptores pediátricos de TH, en el que el VEB causó complicaciones cercanas al momento del injerto en los pacientes seronegativos, los cuales desarrollaron posteriormente SLP (302).

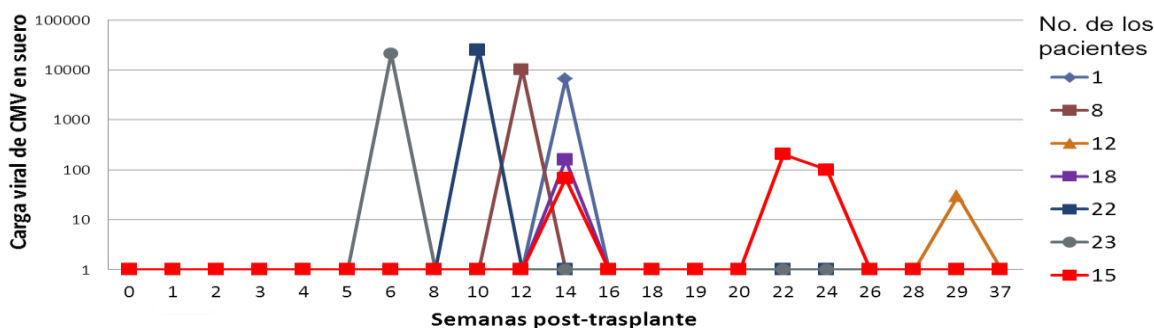
El VHH6 también produce complicaciones en este grupo de pacientes y está asociado al desarrollo de enfermedad neurológica, neumonitis intersticial, manifestaciones gastrointestinales y hepatitis (284, 377, 378). Ninguna de estas enfermedades se confirmó en los receptores analizados, a pesar de la frecuente detección de estos virus en la saliva.

Otra investigación en la que se realizan determinaciones de varios herpesvirus en 40 receptores de TCPH pediátricos, describe cuatro casos con viremia por VEB y neumonía, hepatitis o gastritis, en los que no se detectó SLP a pesar del empleo de la globulina anti-timocítica en el 75 % de éstos. Los niveles de viremia a CMV o VEB se asociaron al tratamiento con la globulina anti-timocítica, la cual fue menor y limitada en aquellos que no la recibieron. Además, dos pacientes con viremia por VHH6 recibieron tratamiento con ganciclovir, uno de ellos por neumonía. De manera general este agente tuvo bajos niveles de carga viral sin asociarse con ninguna sintomatología y desapareció sin tratamiento específico (25).

No se encontró relación entre el tratamiento inmunosupresor empleado (micofenolato mofetil o anti CD25) con la detección del CMV o la viremia por CMV en los receptores de TOS (Anexo 18). Estos resultados pudieran estar en relación con que el 88,9 % de los TOS se trataron con micofenolato mofetil y solo tres receptores de este grupo no utilizaron este medicamento, mientras que nueve pacientes usaron anti CD25 (33,3 %). Algunos autores describen la relación entre el empleo del micofenolato mofetil y el anti CD 25 con la detección del CMV (111, 379).

#### V.4.5.A Respuesta al tratamiento antiviral

Todos los pacientes se trataron con la profilaxis universal y 10 receptores recibieron tratamiento anticipado o terapéutico con aciclovir, ganciclovir o valganciclovir. Los pacientes mostraron una mejoría clínica y una disminución de la frecuencia de detección herpesviral luego de la terapia antiviral. Las muestras de los pacientes se negativizaron de forma significativa luego del tratamiento antiviral profiláctico, anticipado o curativo (para la viremia de CMV en receptores tratados con ganciclovir o valganciclovir  $OR=4,04$ ,  $IC=1,01-18,84$ ,  $p=0,049$ , Figura 17 y para la detección de VHS en los pacientes con aciclovir, ganciclovir o valganciclovir  $OR=4,28$ ,  $IC=1,30-14,52$ ,  $p=0,012$ ). No se confirmó una asociación entre las complicaciones producidas por la infección herpesviral y los niveles de carga viral en el suero (Anexo 17), lo que probablemente se debe al seguimiento estricto y al comienzo temprano del tratamiento antiviral, que impidió el incremento de la carga viral y la aparición de las complicaciones debidas a estos agentes. Lo anteriormente expuesto demuestra la importancia de la detección herpesviral mediante técnicas sensibles y específicas como el PCR-TR para el manejo de éste grupo de pacientes.



**Figura 17.** Seguimiento de la viremia por CMV en los receptores de trasplante pediátricos con tratamiento antiviral anticipado o curativo, 2009-2011.

Abreviatura: CMV: Citomegalovirus, No. de los pacientes: Número de los pacientes.

A pesar del uso de antivirales en la profilaxis universal o en el tratamiento anticipado, las infecciones son una causa importante de morbilidad y mortalidad entre los receptores de trasplante; siendo los miembros de la familia *Herpesviridae* frecuentes en este tipo de pacientes (373).

Otros estudios detectan fallo a la terapia antiviral, principalmente asociado a la resistencia, como por ejemplo Couzi y col, los cuales encontraron que la terapia anticipada en pacientes de alto riesgo (D+/R-) y alta carga viral de CMV ( $5,3 \log_{10}$  copias/mL) se asociaba con la aparición de fallo terapéutico y este a su vez con la resistencia antiviral (380). Ljungman y col describieron que la no disminución de la carga viral luego del tratamiento anticipado se asociaba con la enfermedad por CMV (381). Sin embargo, van der Beek y col describieron que los adultos con TCPH desarrollaban fallo a la terapia antiviral en el 55 % de los tratados de forma anticipada y en el 45 % de los tratados terapéuticamente, asociándose con el uso de inmunosupresores y encuentran que el 4 % de los pacientes presentaba resistencia a los antivirales, confiriéndole mayor relevancia a la respuesta lenta a la terapia antiviral (382).

#### V.4.5.B Complicaciones durante el seguimiento según el momento de aparición

Al analizar la aparición de las complicaciones durante el seguimiento de los pacientes estudiados, se encontró que los períodos de mayor frecuencia de complicaciones coincidieron con los períodos de mayor detección herpesviral, es decir, aparecieron en el primer mes, asociados con complicaciones quirúrgicas y con el estado de deterioro físico pre-trasplante del paciente y posteriormente en la semana 9 a la 14 y de la 20 a la 22 en relación con el período de máxima inmunosupresión (Figura 17). La mediana del tiempo de aparición de las complicaciones (0 semanas) fue diferente ( $p=0,021$ ), encontrándose las bacterianas, las post-quirúrgicas y otras causas en el momento del trasplante (0

semanas), la muerte a las 1,5 semanas, la pérdida del órgano trasplantado a las 2 semanas y las complicaciones de origen viral a las 14 semanas.

El período de seguimiento de las infecciones seleccionado en el presente estudio es un aspecto a tener en cuenta al comparar los resultados encontrados en otros estudios. Durante el primer mes post-trasplante son frecuentes las complicaciones relacionadas con la cirugía, incluyendo las infecciones bacterianas y fúngicas de la herida quirúrgica, las infecciones biliares, las infecciones con punto de partida de un catéter, la neumonía, la peritonitis y la bacteriemia. El segundo período, que comprende entre el segundo y el sexto mes, se caracteriza por la aparición de infecciones por patógenos oportunistas derivados de la máxima inmunodepresión celular, entre las que predominan las infecciones por CMV (con un pico de incidencia entre los 2 y los 4 meses) (57), las infecciones del tracto urinario, aquellas relacionadas con el injerto como los abscesos y las infecciones localizadas en el injerto (293). El tercer período comienza luego de los seis meses post-trasplante donde la inmunosupresión es moderada y cobran mayor relevancia las infecciones por virus hepatotrópos, VEB, VVZ y otras causadas por microorganismos adquiridos en la comunidad(76).

Kute y col describieron que el 71,2 % de los pacientes presentan viremia por CMV en los primeros seis meses post-trasplante, la mayoría ocurre en los primeros tres meses (383). Charfeddine y col plantean que el 48 % de las complicaciones infecciosas aparecieron en el primer mes post-injerto renal, el 36 % en el segundo período del segundo al sexto mes y el 18 % tardíamente, luego del sexto mes; pero solo el 30 % de estas complicaciones tuvieron un origen viral y dentro de ellas el 70 % por CMV, siendo más frecuente en los primeros seis meses (80 %)(384).

#### V.4.5.C Relación del estado serológico pre-trasplante y las complicaciones post-trasplante

Al relacionar el estado serológico con la adquisición de la infección y la presencia de síntomas, se encontró que los dos pacientes que no estaban infectados en el momento 0, los cuales desarrollaron una infección primaria con CMV, se mantuvieron asintomáticos; mientras que el que adquirió la infección por VEB (detectada en saliva) previamente presentó fiebre de origen desconocido y rechazo crónico. La razón por la cual dos receptores presentaron infección primaria asintomática post-trasplante puede deberse a que los pacientes se trataron con antivirales específicos de forma profiláctica por lo que la infección cursó inadvertida desde el punto de vista clínico. Otra causa que explica dicho hallazgo, son los resultados falsos negativos que pueden obtenerse en las técnicas serológicas debido a la disminución de los niveles de Acs por el deterioro inmune secundario a su enfermedad de base (385).

En el presente estudio el pequeño número de pacientes con enfermedad por CMV (n=2) y las estrategias de profilaxis aplicadas en los mismos no permitieron establecer variables predictoras de riesgo; otro aspecto a tener en cuenta es el pequeño tamaño muestral y la variedad de trasplantes.

Los pacientes seropositivos a CMV previo al trasplante del presente estudio no se asociaron a la aparición de complicaciones (Anexo 17). Emery y col encontraron que la enfermedad por CMV ocurría en el 20,5 % de los pacientes de alto riesgo (D+/R-), mientras que para los pacientes de bajo riesgo la incidencia fue del 9 %, encontrando diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) (386).

Ugarte-Torres y col describieron que la reactivación de la infección, la enfermedad por CMV y la mortalidad son significativamente menos frecuentes en los pacientes con estado serológico de menor riesgo (D+/R+) al compararlos con los de mayor riesgo (387), aunque Kim y col establecieron que los receptores de menor riesgo también están expuestos a la infección y la enfermedad por CMV y que éstos constituyen factores de riesgo para el rechazo, la pérdida del injerto y la mortalidad (337).

#### V.4.5.D Rechazo al trasplante y detección herpesviral

En la presente investigación se detectaron cuatro pacientes con rechazo al trasplante (pacientes 15 TR, 7 TH, 24 TR y 27 TR). Uno de estos casos (paciente 24 TR, excreción en saliva de VHH6-CMV) presentó rechazo agudo o mediado por Acs, una semana luego de injertado el riñón que implicó la pérdida del injerto en la semana siguiente. Otro receptor, el paciente 27 TR, excretó el VHH6 en saliva en el primer mes post-trasplante, desarrollando un rechazo mediado por células o túbulo-intersticial ligero y síndrome febril de etiología no precisada (semana 4) y una infección primaria por VEB detectada en la semana 6. El paciente 15 TR presentó un síndrome por CMV que fue tratado con antivirales (semana 14), posteriormente tuvo VHS-VHH6-CMV en saliva y CMV en suero y orina con rechazo crónico (semana 22). El único paciente de TH que debutó con rechazo (paciente 7 TH) ocurrió como consecuencia de la suspensión voluntaria de la terapia inmunosupresora en la semana 20 post-trasplante, con detección previa de VHS-VVH6-VEB-CMV en saliva y CMV en suero. El establecimiento de asociaciones de detección viral y rechazo no fue posible, dada la variedad de tipos de rechazo y a que en los pacientes 24 TR y 7 TH la replicación herpesviral no parecen estar en relación con esta complicación, mientras que en los otros dos receptores (pacientes 15 TR y 27 TR) los herpesvirus pudieran haber tenido algún papel en la aparición del rechazo, pero no se controlaron otros factores, por lo que no es posible afirmar que esta fue la causa.

La aparición del rechazo es un fenómeno multifactorial. La causa más importante de rechazo es la histocompatibilidad, pues mientras mayor compatibilidad exista entre el receptor y el injerto habrá menor posibilidad de rechazo. Otros factores asociados al rechazo son el nivel de inmunosupresión del

receptor y la presencia de las infecciones virales (388). En Cuba, la compatibilidad al momento del estudio de los receptores de TH era de grupo sanguíneo, los de TR de donante fallecido por crossmatch y los TCPH por tipificación HLA A, B y DR (119); estos sistemas de compatibilidad no son los ideales pues no están completos y se asocian al rechazo (389-391). Además no se realiza la cuantificación de inmunosupresores de forma estable. No se relacionó la presencia del rechazo con la presencia de infección herpesviral debido a que no se conocían el estado de los otros factores asociados.

Viklicky y col plantearon que el rechazo agudo se detecta en el 15 % de los receptores renales y que aparece en los primeros tres meses post-trasplante (392). La mitad de los receptores renales presentan rechazo agudo asociado a la enfermedad por CMV, al uso de tacrolimus o al empleo de micofenolato mofetil, también se describe la enfermedad por CMV posterior al rechazo agudo en el 53,8 % de los pacientes (384). Watcharananan y col encontraron que la sintomatología provocada por el CMV se asocia al rechazo y a la necrosis tubular aguda (343). Kute y col refirieron que los episodios de rechazo se asocian a la enfermedad por CMV (383). Sin embargo, Indolfi y col describieron que el 32,3 % de los receptores pediátricos hepáticos desarrollaron rechazo agudo y que el rechazo no se asoció a la detección del CMV o el VEB (39). Erdbruegger y col plantearon que la relación entre el CMV y el rechazo es mucho menos significativa de lo que se creía (393).

#### V.4.5.E Éxito del trasplante

El presente estudio presentó dos limitaciones, no se conocían los datos serológicos para el CMV, el VHS y el VEB del donante y el bajo número de casos reclutados, en especial de TCPH. El 69 % (20/29) de los pacientes tuvieron éxito en el trasplante y completaron el seguimiento. Los mejores resultados se observaron en el TH (78,9 %, 15/19 pacientes). El 20,7 % de los receptores murió inmediatamente o unos días post-trasplante (media de 25 días, rango de 8 a 48 días), debido a complicaciones vinculadas con la cirugía o debido a la baja puntuación en la escala de Kamofsky al momento del trasplante (120, 394). Las infecciones originaron el 16,7 % de la mortalidad global (un paciente con sepsis por *Escherichia coli*). Tres pacientes (10,3 %) perdieron el trasplante, uno por rechazo agudo (TR), uno con rechazo por abandono voluntario de la terapia inmunosupresora (TH) y uno por trombosis vascular (TR)(Tabla 6).

**Tabla 6.** Receptores pediátricos según el éxito del trasplante en seis meses de seguimiento, en Cuba desde noviembre del 2009 a diciembre del 2011.

	Total de pacientes	Hígado	Riñón	Trasplante de células precursoras hematopoyéticas
Pérdida del injerto	3	1	2	0
Fallecido	6	3	2	1
Trasplante exitoso	20	15	4	1

El sexo, la edad o la detección de CMV no se asociaron con la pérdida del trasplante o con la muerte (Anexo 17). El factor de mayor importancia en la ocurrencia del éxito del trasplante parece ser el estado físico de los pacientes en el período previo al injerto, que influye en la supervivencia temprana (menor de seis meses) luego del trasplante, en niños receptores de TCPH (395), de TH (396) y de TR (397). Los pacientes con hepatopatías, nefropatías o enfermedades hematológicas crónicas y agudas en situación terminal presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo de infecciones bacterianas, fúngicas y virales latentes (398). Por otra parte, las complicaciones quirúrgicas que pueden surgir en relación con la anastomosis de la vía excretoras y las complicaciones vasculares (trombosis arterial) se originan con frecuencia por infecciones bacterianas o fúngicas (399). Éstas parecen ser las principales causas de los fallecimientos en el estudio actual, pues dos pacientes fallecieron por trombosis vascular, otro por hemorragia pulmonar y otro por CID, además se detectó una reactivación de la enfermedad de base y un caso con sepsis.

Existen otros factores que influyen en la sobrevida del TOS, entre los que se incluye la técnica quirúrgica, el tiempo de duración de la intervención, la isquemia en frío del injerto, el tiempo de uso de ventilación mecánica, el tiempo de diálisis pre y post-operatoria, las unidades de sangre y de albúmina empleadas, el re-trasplante, el esquema inmunosupresor empleado, entre otros (398, 400).

La cifra de éxito post-trasplante en TOS encontrada en el presente estudio es similar a las tasas de supervivencia de países en vías de desarrollo, ejemplo de esto es la India, en la que sobrevivieron el 71 % de los 28 receptores pediátricos de TH (396), mientras que en China describen una sobrevida del 75 % en una serie de ocho casos (401). Resultados similares se obtuvieron en receptores adultos de TR (tasas de supervivencia de 78,6 %, 50,2 %, 33,3 % y 18,8 % al 1, 3, 5 y 10 años) en Macedonia (402), en este estudio los autores sugieren que el donante fallecido puede constituir un factor de riesgo en la disminución de la sobrevida, al compararlos con aquellos que reciben el injerto de donantes vivos, lo que ocurre también en otros tipos de trasplante (402, 403).

En los países desarrollados la supervivencia de TOS es mayor, como se aprecia en un estudio de TH realizado en adultos españoles, con una tasa de 90, 85 y 75 % a uno, dos y cuatro años post-trasplante, respectivamente (398) y en receptores pediátricos de TR japoneses con una tasa supervivencia/sobrevida del injerto de 97,9 /88,8 % y 96,2 /79,4 % a los 5 y 10 años (404).

En cuanto a los receptores de TCPH, la sobrevida es superior al 65 % en el primer año post-trasplante, como por ejemplo un estudio realizado en Chile (405) y en España (40). El análisis de la supervivencia del TCPH es complejo, pues depende del estadio de la enfermedad causante del injerto, el tipo de trasplante, la técnica empleada, el tratamiento mieloablativo y los inmunosupresores utilizados(406, 407).

A pesar de que el éxito del trasplante no fue óptimo, el seguimiento virológico de los receptores pediátricos de trasplante demostró ser importante en la prevención de las complicaciones y por tanto en la evolución favorable del trasplante.

## **VI DISCUSIÓN GENERAL**

Los individuos inmunodeprimidos son susceptibles en mayor grado a las infecciones (408). Los virus son una causa frecuente de complicaciones en este grupo de individuos (409). Entre los virus que afectan al inmunodeprimido se encuentran los herpesvirus, que tienen una amplia circulación a nivel global y están dentro de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en estos pacientes (52, 409). En Cuba no se conoce la frecuencia de infección por éstos agentes en los pacientes inmunodeprimidos. El presente estudio permitió conocer la frecuencia de infección, excreción y replicación viral, particularmente del CMV así como realizar el diagnóstico temprano de las infecciones herpesvirales activas; que condujo al tratamiento preventivo y oportuno de dos grupos de pacientes cubanos con compromiso de la respuesta inmune.

El estudio serológico realizado en las muestras de las gestantes y los receptores de trasplante pediátricos tuvo como objetivo conocer la frecuencia de esta infección, así como la asociación con algunos factores de riesgo, que inciden en la adquisición de la infección durante el embarazo o post-trasplante.

La prevalencia de la infección por los herpesvirus estudiados fue alta, tanto en las gestantes como en los receptores de trasplante en edad pediátrica. La importancia de conocer el estado serológico de estas poblaciones radica en la detección de aquellos pacientes que se encuentran en riesgo de adquirir la infección durante el embarazo o post-trasplante, lo que permite realizar un seguimiento, diagnóstico y tratamiento oportuno; aún más si se detectan o se conocen los factores de riesgo que



pueden incidir en un resultado desfavorable. Los pacientes que se encuentran con riesgo de adquirir la infección, es decir los pacientes no infectados, son aquellos que con mayor frecuencia pueden transmitir la infección a su descendencia o desarrollar complicaciones post-trasplante. De hecho, se detectó un grupo de gestantes no infectadas por CMV al inicio del embarazo las cuales adquirieron la infección posteriormente. Entre las variables asociadas a adquirir el CMV durante el embarazo se encontró la edad (menor de 20 años).

Los estudios de países con buenas condiciones higiénico sanitarias establecen que algunos factores influyen en un mayor riesgo de adquirir la infección por CMV durante el embarazo. Entre estos factores se encuentran las malas condiciones de vida, el estado socio económico, la edad, la presencia de hijos pequeños, entre otros (410, 411). La mayor parte de estos factores son de improbable modificación por los médicos de asistencia. Este hecho unido a la no existencia de un tratamiento específico aprobado durante el embarazo, han provocado que los sistemas de salud no garanticen una solución efectiva para las embarazadas infectadas activamente con CMV y que por lo tanto no se realice la búsqueda de las pacientes en riesgo (412).

En el grupo de los pacientes receptores de trasplante pediátricos se detectaron pacientes no infectados por CMV, VEB o VHS y la menor parte (un tercio) de éstos se infectaron durante el seguimiento post-trasplante. No se estudió la presencia de la infección anterior por herpesvirus en los donantes, debido a factores ajenos al diseño del estudio.

El conocimiento del estado serológico pre-trasplante del D/R frente a los herpesvirus y particularmente frente al CMV, es de gran utilidad en el manejo terapéutico y clínico de los receptores, pues se reconoce que D+/R- es el factor de riesgo más importante para desarrollar la infección y la enfermedad viral durante el período post-trasplante (274, 413). No obstante, la mayoría de los receptores estudiados que no estaban infectados por los herpesvirus antes del injerto no adquirieron la infección durante el seguimiento y aunque probablemente la mayoría de los donantes estaban infectados, el uso de la profilaxis antiviral universal pudo evitar la replicación viral y por tanto de la detección de la infección.

El uso de la profilaxis universal es defendido por varios grupos de trasplantología de varios países (380, 383), aunque existe una preferencia hacia la búsqueda o detección precoz de la viremia, que permita la instauración del tratamiento antiviral específico anticipado a la aparición de complicaciones post-trasplante con el objetivo de limitar la aparición de posibles genotipos resistentes al tratamiento (97). También se aboga por la modificación de los niveles de inmunosupresores empleados, para aquellos

agentes virales que no tienen tratamiento antiviral específico (52, 58). El consenso radica en tratar con la profilaxis antiviral universal a los pacientes de alto riesgo (D+/R-) y realizar el seguimiento de la carga viral al resto de los pacientes, para evaluar el uso de terapia anticipada (414). En la presente investigación la profilaxis universal se empleó en todos los receptores de trasplante pediátricos cubanos y fue útil tanto para los pacientes que estaban infectados antes del injerto así como para los que no estaban infectados.

El objetivo principal de la búsqueda de pacientes con mayor riesgo de transmitir (gestantes) o adquirir/reactivar (receptores de trasplante) la infección, es evitar y detectar tempranamente la afección para emplear el tratamiento adecuado por lo que en el presente estudio se investigaron todos aquellos factores virológicos que pudieran incidir en el aumento de resultados desfavorables.

En el presente estudio se encontró que la tercera parte de las gestantes con infección activa tenían excreción de CMV y este aspecto se correlacionó con los neonatos infectados. No se detectaron asociaciones con otras variables estudiadas. Mediante el seguimiento de las gestantes en riesgo o la determinación de la infección activa es posible conocer los niños con riesgo de nacer infectados (415).

La mayoría de los receptores de trasplante fueron positivos a herpesvirus durante el seguimiento post-trasplante, lo que demuestra que éstos agentes se replicaban en este período. La replicación se encontró fundamentalmente en las muestras de saliva, en las que también se presentaron coinfecciones herpesvirales; lo que permitió obtener una frecuencia elevada de pacientes positivos a los herpesvirus. Las infecciones producidas por estos agentes ocurrieron mediante la reactivación de agentes infecciosos endógenos que se encontraban de manera latente en el organismo o la adquisición de nuevas cepas, tal como se describe en otros estudios (39, 416).

Liu y col refirieron que el 91,7 % de los receptores de TCPH eran seropositivos al CMV previo al trasplante y que el 45,3 % desarrolló la infección por CMV (336), es decir, la reactivación de la infección es común en receptores de trasplante, si se tiene en cuenta que la excreción de herpesvirus en saliva y orina se encuentra incrementada en los pacientes inmunodeprimidos (289, 290, 417).

El seguimiento de ambos grupos de pacientes permitió la detección precoz de la replicación viral, así como realizar las acciones médicas necesarias para la prevención de complicaciones post-trasplante y la terapéutica oportuna. El seguimiento ultrasonográfico de las gestantes no demostró la presencia de complicaciones severas o malformaciones.

El diagnóstico de las gestantes con infección activa por CMV con riesgo de transmitir la infección a sus fetos debe basarse en la realización de la amniocentesis con los requisitos adecuados para su indicación y el pesquizaje neonatal (418). El ultrasonido es un predictor poco eficaz de la infección

congénita sintomática debido a que el 47 % de los infectados no tienen alteraciones detectables por ultrasonido, pero algunos marcadores como la ventriculomegalia, microcefalia, hiperecogenicidad intestinal, hepatoesplenomegalia, calcificaciones intracraneales o abdominales, CIUR y aumento del tamaño placentario, están asociados a la infección (419). El empleo de globulinas hiperinmunes específicas a las gestantes como prevención de la transmisión de la infección al feto se encuentra aún bajo investigación (420).

El seguimiento longitudinal de los receptores de trasplante demostró el aumento de la frecuencia de detección de herpesvirus y particularmente del CMV, a partir del segundo mes hasta el quinto mes post-injerto y que la detección del CMV durante el seguimiento en muestras de saliva y orina se asoció a su viremia y la excreción en orina precedió a la viremia por CMV. La detección del CMV en la saliva y particularmente en la orina pudieran facilitar una estrategia de seguimiento sin tener que proceder a la extracción de sangre frecuente, así como la detección de pacientes en riesgo de complicarse, e instaurar cambios en el tratamiento medicamentoso de forma precoz.

Los resultados obtenidos confirman que el período intermedio (de dos a seis meses) es el de máxima replicación viral (10) y que el uso de muestras no invasivas para la detección herpesviral, las cuales se consideraban poco útiles, reviste gran importancia en el seguimiento de los trasplantados (288, 409).

El objetivo fundamental de la atención médica es detectar o prever los pacientes que potencialmente puedan complicarse para realizar el tratamiento oportunamente. El seguimiento y diagnóstico de ambos grupos de pacientes permitió detectar a niños con riesgo de desarrollar complicaciones, de ahí que los niños congénitamente infectados con signos físicos al nacer, posteriormente desarrollaron secuelas neurológicas hasta los cuatro años de vida por lo que asisten a consultas especializadas para su rehabilitación.

La infección congénita, la sintomatología y las secuelas de los casos infectados congénitamente se presentaron en una frecuencia similar a la de países desarrollados (3). Los resultados encontrados en la investigación realizada le confieren gran importancia al diagnóstico precoz y oportuno de la infección congénita por CMV, particularmente en el diagnóstico prenatal, pues a través de la presente investigación se detectaron las gestantes de alto riesgo y por lo tanto realizarle un seguimiento estrecho a ellas y sus neonatos. Posteriormente, a los hijos de estas gestantes se les realizó el diagnóstico natal de la infección y un seguimiento clínico neurológico a los niños infectados para detectar los signos de infección al nacimiento, así como las posibles secuelas, lo que permitió la prevención de las complicaciones secundarias o las secuelas de aparición tardía.

La importancia del diagnóstico prenatal radica en que las pruebas prenatales representan una opción importante en el caso de decisión de la terminación del embarazo ante la presencia de posibles daños fetales (6). Todas las mujeres continuaron con el embarazo a pesar de tener conocimiento de su infección activa, lo que indica que la razón principal por la que las gestantes se realizan el diagnóstico prenatal no es solo por la decisión de la terminación del embarazo ante la positividad del diagnóstico sino también para si existió transmisión de la infección.

La búsqueda de Acs antivirales de forma universal en las gestantes, según el análisis realizado por Cahill y col, es el método con mejor relación costo-efectividad (421). La posibilidad de realizar intervenciones justifica la búsqueda de pacientes en riesgo, pues se pueden establecer tres niveles de prevención, la primaria relacionada con la prevención de la adquisición de la infección por aquellas gestantes no infectadas, la secundaria o sea la prevención de transmisión de la infección de las madres con infección activa a los fetos y la terciaria que permite la prevención de las secuelas en los niños infectados congénitamente (418).

La prevención primaria se realizaría en gestantes seronegativas de riesgo, que sean jóvenes, nulíparas y que vivan o trabajen con niños pequeños que excreten el CMV. A estas gestantes se les explicaría la importancia de las medidas higiénicas, fundamentalmente aquellas relacionadas con la exposición de los fluidos corporales potencialmente contaminados, el lavado de las manos con agua y jabón, no compartir la comida o los utensilios de comer, evitar el contacto con la saliva al besar a los niños y lavar los juguetes que hayan estado en contacto con la orina o la saliva de los niños. La prevención secundaria consiste en el uso de un tratamiento antiviral, aunque aún no existe ningún antiviral aprobado para su empleo en gestantes. La prevención terciaria se realizaría a través de la búsqueda de los elementos predictivos de la sintomatología, como puede ser la carga viral prenatal y postnatal, el uso del ultrasonido prenatal y se realizaría la búsqueda activa de las secuelas, lo que conduciría al establecimiento de un tratamiento antiviral adecuado y la rehabilitación (418).

Esta investigación constituye el primer estudio realizado en Cuba sobre el seguimiento de las gestantes y sus recién nacidos con el objetivo de determinar tempranamente la infección congénita por CMV.

La frecuencia de las secuelas en niños con infección congénita por CMV es alta (alrededor al 40 %), siendo esta la primera causa de sordera neurosensorial (422) y la segunda de retraso mental en los países desarrollados (423), por lo que reviste particular importancia la detección precoz de esta afección, en la prevención de los daños posteriores o las secuelas. Se investigan posibles candidatos vacunales, así como la evaluación de tratamientos antivirales para evitar la progresión de la replicación

y del daño fetal y pre-escolar, pero aún no existe una medida eficaz en la gestante o el niño infectado que garantice que no progrese la enfermedad (424, 425). No es posible ignorar el problema de la frecuente aparición de secuelas en este grupo de niños por lo que se puede realizar un diagnóstico precoz, que permita brindar mayor información del riesgo a los padres, rehabilitar y promover la estimulación de los órganos afectados para mejorar la calidad de vida del niño y su familia.

La prevalencia general de la infección es del 0,7 % según los datos procedentes de 15 estudios con un total de 117 986 niños investigados, de los cuales el porcentaje de niños infectados con síntomas al nacer fue de 12,7 y de estos presentaron secuelas permanentes del 40 al 58 %. El porcentaje de niños asintomáticos al nacimiento que desarrollaron secuelas permanentes fue de 13,5 (426).

Por otro lado, el CMV es la causa principal de morbilidad y mortalidad infecciosa en receptores de trasplante (427). Los resultados encontrados en el presente estudio coinciden con dicha aseveración debido a que fue el virus detectado con mayor frecuencia asociado a viremia y a las complicaciones post-trasplante durante el seguimiento. Los receptores de trasplante se trataron terapéuticamente o de forma anticipada a la complicación, mostrando una mejoría clínica y virológica luego de la terapia antiviral, demostrada a través del seguimiento de la carga viral. De hecho, los receptores que perdieron el injerto o la vida se debieron a otros factores relacionados con su estado físico o la cirugía.

Conocer si un receptor de trasplante se encuentra en riesgo de desarrollar una enfermedad por CMV es de importancia clínica, porque la instauración o cambios en el tratamiento de forma precoz conllevan a una disminución de la frecuencia de las complicaciones directas e indirectas que ocasiona este virus (383, 414, 428). La disminución del efecto nocivo del CMV sobre el receptor de trasplante y el injerto provoca un aumento de la sobrevida y de la calidad de vida del paciente e inclusive de sus familiares (429).

En los países desarrollados el diagnóstico de las infecciones por herpesvirus y particularmente del CMV en gestantes/neonatos y en receptores de trasplante se le concede importancia por las implicaciones descritas con anterioridad (246, 430, 431).

En Cuba se le otorga gran valor social y político a la salud pública y en el sistema de salud cubano se establece prioridad para estos grupos poblacionales. Desde los inicios del Programa de Atención Materno Infantil y del Grupo Nacional de Trasplante se han incorporado diversos estudios que permiten realizar el diagnóstico temprano de afecciones en estos grupos poblacionales; dentro de ésta pesquisa es de especial interés a la prevención y diagnóstico temprano de las infecciones.

La atención del sistema de salud cubano entonces debe dirigirse a aquellas enfermedades que incidan en los índices de morbilidad y mortalidad, las cuales se describen internacionalmente como frecuentes, como es la infección por CMV (28, 98, 432).

En base a los resultados encontrados en el presente estudio, se sugiere que se investigue con mayor atención la infección por herpesvirus y particularmente por CMV en los grupos de riesgo, como son las gestantes/neonatos y los receptores pediátricos de trasplante que puedan infectarse. Debe realizarse también un proyecto para el diagnóstico y seguimiento de las infecciones virales en estos grupos de pacientes; que permita detectar tempranamente las complicaciones que pueden aparecer por estas infecciones y evaluar la respuesta del tratamiento.

La implementación de los métodos de PCR-TR permitió la cuantificación de éstos virus, proporcionando un método altamente sensible y específico que condujo a la predicción de qué paciente desarrollará la enfermedad y la evaluación de la respuesta al tratamiento antiviral. Además, se determinó la dinámica de la replicación viral, datos que los métodos cualitativos no permiten precisar. Los métodos serológicos y cuantitativos fueron útiles no sólo con fines diagnósticos, sino que además resultaron efectivos en la toma de decisiones, para realizar un seguimiento clínico, iniciar un tratamiento oportuno y posteriormente para la evaluación de la respuesta a la terapéutica, en los casos en los que se aplicó. La posibilidad de realizar un seguimiento virológico a las gestantes/infectados congénitamente y a los receptores de trasplante pediátricos favorece el aumento cuantitativo y cualitativo de los indicadores de salud nacionales y de los individuos afectados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos sugerimos, que se realice la educación del personal de salud cubanos que se relacionan directamente con estos dos grupos de riesgo, en el conocimiento de estas entidades, realizando énfasis en las medidas de prevención. En segundo lugar que sea valorada la posibilidad de desarrollar una tecnología de producción nacional que permita el diagnóstico serológico de los pacientes en mayor riesgo de adquirir o tener una infección activa, que permita la identificación de estos pacientes por el personal de genética médica municipal y provincial, así como de los grupos de trasplante de todo el país. En tercer lugar realizarle el diagnóstico con PCR-TR u otra técnica cuantitativa a todos aquellos casos, de los grupos de riesgo, que presenten sintomatología que pueda ser atribuida a a estos agentes así como el seguimiento herpesviral y particularmente del CMV en muestras de orina y suero a los receptores pediátricos de trasplante, siguiendo un esquema similar al empleado en la presente investigación. En cuarto lugar mantener la profilaxis antiviral con ganciclovir/valganciclovir durante tres meses en los receptores de trasplante pediátricos. Esta

estrategia permitirá un tratamiento precoz, tanto preventivo como terapéutico en los individuos afectados.

## **VII CONCLUSIONES**



## VII CONCLUSIONES

- La seroprevalencia frente a CMV en gestantes de los municipios estudiados es elevada y en las seronegativas, la edad menor de 20 años constituye un factor de riesgo para adquirir la infección por CMV durante el embarazo; lo cual resalta la importancia de las medidas preventivas y el seguimiento de este grupo.
- La mayoría de los recién nacidos infectados congénitamente por CMV, hijos de madres con infección activa, son asintomáticos al nacer; no obstante, en el seguimiento clínico se detectan secuelas, de ahí que sea necesario el diagnóstico temprano y seguimiento de éste grupo.
- El estudio del estado serológico pre-trasplante en receptores pediátricos demuestra que la mayoría de los pacientes estaban infectados con CMV, VEB y VHS antes del trasplante, de ahí que se encontraron en menor riesgo de desarrollar enfermedad grave por infección primaria.
- La mayoría de los receptores pediátricos de trasplante estudiados tuvieron infección activa por uno o varios herpesvirus ya sea secuencial o de forma simultánea, lo que confirma la importancia del uso de la profilaxis antiviral universal.
- El seguimiento de la carga viral de herpesvirus y particularmente del CMV en la orina y el suero constituye una estrategia necesaria en los receptores pediátricos de trasplante, permitiendo una intervención clínica temprana y un tratamiento eficiente.

## **VIII RECOMENDACIONES**

## VIII RECOMENDACIONES

- Alertar a las autoridades del Programa de Atención Materno Infantil sobre la importancia de implementar la detección temprana de la infección congénita por CMV en gestantes y el seguimiento a recién nacidos.
- Alertar a las autoridades del Grupo Nacional de Trasplante, sobre la importancia del estudio del estado serológico del donante/receptor pre-trasplante y del monitoreo de infecciones por herpesvirus y particularmente del CMV, en receptores de trasplante pediátricos en la prevención de las complicaciones y el tratamiento oportuno.
- Genotipar las muestras positivas a CMV de madres e hijos con infección congénita y receptores de trasplante para conocer si existe asociación entre algún genotipo en particular, o co-infecciones de estos y la ocurrencia de complicaciones, severidad del cuadro clínico y la carga viral.

## **IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schleiss MR. Congenital Cytomegalovirus Infection: Update on Management Strategies. *Curr Treat Options Neurol.* 2008;10(3):186-92.
2. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Snyderman DR, et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation.* 2010;89:779-95.
3. Adler SP. Human CMV vaccine trials: What if CMV caused a rash? *J Clin Virol.* 2008;41(3):231-6.
4. Rubin RH. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2001;3 Suppl 2:1-5.
5. Caston JJ, Cisneros JM, Torre-Cisneros J. Effects of viral infection on transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25(8):535-48. Epub 2007/10/05.
6. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of Human Cytomegalovirus infection in the mother, fetus and newborn infant. *Clinical Microbiology Reviews.* 2002;15(4):680-715.
7. Schlesinger Y. Routine screening for CMV in pregnancy: opening the Pandora box? *Isr Med Assoc J.* 2007;9(5):395-7.
8. Anderson EJ. Viral diagnostics and antiviral therapy in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Pharm Des.* 2008;14(20):1997-2010. Epub 2008/08/12.
9. Lee SO, Razonable RR. Current concepts on cytomegalovirus infection after liver transplantation. *World J Hepatol.* 2010;2(9):325-36. Epub 2010/12/17.
10. Gerna G, Lilleri D, Chiesa A, Zelini P, Furione M, Comolli G, et al. Virologic and immunologic monitoring of cytomegalovirus to guide preemptive therapy in solid-organ transplantation. *Am J Transplant.* 2011;11(11):2463-71. Epub 2011/08/11.
11. Lu Y, Wu T, Cao XY, Wang JB, Sun Y, Zhao YL, et al. Monitoring of early Epstein-Barr virus reactivation and preemptive therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2011;50(5):383-7. Epub 2011/06/01.
12. Ljungman P. Prophylaxis against herpesvirus infections in transplant recipients. *Drugs.* 2001;61(2):187-96.
13. Gerna G, Lilleri D, Furione M, Baldanti F. Management of human cytomegalovirus infection in transplantation: validation of virologic cut-offs for preemptive therapy and immunological cut-offs for protection. *New Microbiol.* 2011;34(3):229-54. Epub 2011/08/04.
14. Lautenschlager I. CMV infection, diagnosis and antiviral strategies after liver transplantation. *Transpl Int.* 2009;22(11):1031-40. Epub 2009/07/22.
15. Boutolleau D, Deback C, Geli J, Ait-Arkoub Z, Angleraud F, Gautheret-Dejean A, et al. Evaluation of the LightCycler 480 real-time PCR system for the measurement of CMV, EBV, HHV-6 and BKV viral loads in whole blood. *Pathol Biol.* 2010;58(2):166-9. Epub 2009/11/07.
16. Niesters HG, van Esser J, Fries E, Wolthers KC, Cornelissen J, Osterhaus AD. Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):712-5. Epub 2000/02/03.
17. Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods.* 2001;25(4):419-29. Epub 2002/02/16.
18. van Esser JW, Niesters HG, Thijsen SF, Meijer E, Osterhaus AD, Wolthers KC, et al. Molecular quantification of viral load in plasma allows for fast and accurate prediction of response to therapy of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2001;113(3):814-21. Epub 2001/06/19.
19. Istaş AS, Demmler GJ, Dobbins JG. Surveillance for congenital cytomegalovirus disease: a report from the National Congenital Cytomegalovirus Disease Registry. *Clin Infect Dis.* 1995;20(3):665-70.
20. Baquero-Artigao F. Consensus document from the Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases (SEIP) on the diagnosis and treatment of congenital cytomegalovirus infection. *An Pediatr (Barc).* 2009;71(6):535-47. Epub 2009/10/10.
21. Baquero-Artigao F, Romero Gomez MP. Prolonged treatment with valganciclovir in an infant with congenital cytomegalovirus infection. *An Pediatr (Barc).* 2009;70(6):578-81. Epub 2009/05/09.
22. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-Time Quantitative PCR Assays for Detection and Monitoring of Pathogenic Human Viruses in Immunosuppressed Pediatric Patients. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004;42(11):5189-98.
23. Ebner K, Suda M, Watzinger F, Lion T. Molecular detection and quantitative analysis of the entire spectrum of human adenoviruses by a two-reaction real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3049-53. Epub 2005/07/08.

24. Atkinson C, Emery VC. Cytomegalovirus quantification: where to next in optimising patient management? *J Clin Virol.* 2011;51(4):223-8. Epub 2011/05/31.
25. Schönberger S, Meisel R, Adams O, Pufal Y, Laws HJ, Enczmann J, et al. Prospective, comprehensive, and effective viral monitoring in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(10):1428-35.
26. Kasztelewicz B, Jankowska I, Pawlowska J, Teisseyre J, Grenda R, Pronicki M, et al. Epstein-Barr virus DNA load in peripheral blood mononuclear cells and whole blood from pediatric transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2011;13(5):471-9. Epub 2011/06/22.
27. Bao L, Cowan MJ, Dunham K, Hom B, McGuirk J, Gilman A, et al. Adoptive Immunotherapy With CMV-specific Cytotoxic T Lymphocytes for Stem Cell Transplant Patients With Refractory CMV Infections. *J Immunother.* 2012;35(3):293-8. Epub 2012/03/17.
28. Cordero E, Casasola C, Ecarma R, Danguilan R. Cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients: incidence, clinical profile, and risk factors. *Transplant Proc.* 2012;44(3):694-700. Epub 2012/04/10.
29. Abdo Cuza A. Trasplantes de órganos en Cuba: Reseña histórica. La Habana: infomed; 2010 [cited 2013 7 Enero]; Available from: <http://www.sld.cu/sitios/trasplante/temas.php?idv=8214>.
30. Carrillo Soriano S, Villamil Martínez R, Endis Miranda M, Thomas Olivares P. Cirugía hepatobiliar, relatoria del evento de cirugía pediátrica de occidente. Mesa redonda sobre particularidades de los trasplantes pediátricos en Cuba; Salón de Eventos del Hotel Ambos Mundos, La Habana. 2012.
31. Anuario estadístico de salud. La Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud; 2012 [cited 2013 Sept 18]. Available from: <http://www.sld.cu/sitios/dne/>.
32. Gonzalez Nunez I, Diaz Jidy M, Perez Avila J. La transmisión materno infantil del VIH/SIDA en Cuba. *Rev Cub de Med Trop [Internet].* 2000 26 Febrero 2013; 52(3). Available from: [http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602000000300012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602000000300012&script=sci_arttext).
33. Valderrama R, Urquia Bautista MA, Galvan Orlich G, Siman Siri R, Osimani ML, Abreu H, et al. Sífilis materna y sífilis congénita: definiciones de caso. *Boletín Epidemiológico Organización Panamericana de Salud [Internet].* 2005; 26(1). Available from: [www.paho.org/spanish/dd/ais/be\\_v26n1-sp-sifilis.htm](http://www.paho.org/spanish/dd/ais/be_v26n1-sp-sifilis.htm).
34. Onozawa M, Hashino S, Takahata M, Fujisawa F, Kawamura T, Nakagawa M, et al. Relationship between Preexisting Anti-Varicella-Zoster Virus (VZV) Antibody and Clinical VZV Reactivation in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients. *J Clin Microbiol* 2006;44(12):4441-3.
35. Dorticós-Balea E, Jaime-Fagundo JC, Pavón-Morán V, Reboredo-Domínguez M, Hernández-Ramírez P. Actualización en trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en pacientes pediátricos en los últimos 15 años. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia [Internet].* 2011. Available from: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol27\\_01\\_11/hih10111.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol27_01_11/hih10111.htm).
36. Latin American Registry of Pediatric Renal Transplantation 2004-2008. *Pediatr Transplant.* 2010;14(6):701-8. Epub 2010/06/08.
37. Kourí V, Resik S, Enamorado A, Moreno D, García S, Acosta B, et al. Longitudinal Study of Herpesviruses in Kidney Transplant Recipients in Cuba. *Clin Inf Dis.* 2003;36:818-21.
38. Resik Aguirre S, Enamorado Casanova A, Kouri Cardella V, Suarez Moran C, Garcia Infante S. Monitoring of cytomegalovirus infection in patients with kidney transplantation: the first experience in Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2000;52(3):203-10.
39. Indolfi G, Heaton N, Smith M, Mieli-Vergani G, Zuckerman M. Effect of early EBV and/or CMV viremia on graft function and acute cellular rejection in pediatric liver transplantation. *Clin Transplant.* 2012;26(1):E55-61. Epub 2011/10/11.
40. Verdeguer A, de Heredia CD, Gonzalez M, Martinez AM, Fernandez-Navarro JM, Perez-Hurtado JM, et al. Observational prospective study of viral infections in children undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a 3-year GETMON experience. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(1):119-24. Epub 2010/03/17.
41. Comoli P, Ginevri F. Monitoring and managing viral infections in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol.* 2012;27:705-17.
42. Dort J, Sedlacek D, Hadravská S, Tobmanova H, Mukensnabl P. Congenital cytomegalovirus infection. *Cas Lek Cesk.* 2003;142(7):432-6.
43. Vonka V, Benyesh-Melnick M. Interactions of human cytomegalovirus with human fibroblasts. *J Bacteriol.* 1966;91(1):213-20.

44. Pellett PE, Roizman B. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2480-97.
45. Mocarski ES, Shenk T, Pass R. Cytomegaloviruses. In: P.M. H, Knipe DM, editors. *Fields Virology*, 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 2702-57.
46. Britt W. Human Cytomegalovirus Infections and Mechanisms of Disease. In: Reddehase MJ, editor. *Cytomegaloviruses Molecular Biology and Immunology*. Mainz: Caister Academic Press; 2006. p. 2-43.
47. Davison AJ, Dolan A, Akter P, Addison C, Dargan DJ, Alcendor DJ, et al. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol*. 2003;84:17-28.
48. Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2503-601.
49. Cohen JI, Straus SE, Arvin AM. Varicella-Zoster Virus Replication, Pathogenesis, and Management. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2775-818.
50. Yamanishi K, Mori Y, Pellett PE. Human Herpesviruses 6 and 7. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2820-45.
51. Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr Virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2657-700.
52. Zamora MR. DNA viruses (CMV, EBV, and the herpesviruses). *Semin Respir Crit Care Med*. 2011;32(4):454-70. Epub 2011/08/23.
53. Collinet P, Subtil D, Houfflin-Debarge V, Kacet N, Dewilde A, Puech F. Routine CMV screening during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;114(1):3-11.
54. Michaels MG. Treatment of congenital cytomegalovirus: where are we now? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5(3):441-8.
55. Arvin AM, Fast P, Myers M, Plotkin S, Rabinovich R. Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: report from the National Vaccine Advisory Committee. *Clin Infect Dis*. 2004;39(2):233-9.
56. Zhou YF, Fang F, Dong YS, Zhou H, Zhen H, Liu J, et al. Inhibitory effect of murine cytomegalovirus infection on neural stem cells' differentiation and its mechanisms. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2006;44(7):505-8.
57. Britt WJ. Primate models: Pros and cons. In: Reddehase MJ, editor. *Cytomegaloviruses: Pathogenesis, Molecular Biology, and Infection Control*. Norfolk: Caister Scientific Press; 2006. p. 591-606.
58. Shiley K, Blumberg E. Herpes viruses in transplant recipients: HSV, VZV, human herpes viruses, and EBV. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011;25(1):171-91. Epub 2011/01/18.
59. Mocarski ES. Cytomegalovirus biology and replication. In: Roizman B, Whitley R, Lopez C, editors. *The Human Herpesviruses*. New York: Raven Press; 1993. p. 173-226.
60. De Keyzer K, Van Laecke S, Peeters P, Vanholder R. Human cytomegalovirus and kidney transplantation: a clinician's update. *Am J Kidney Dis*. 2011;58(1):118-26. Epub 2011/06/21.
61. Freeman RB, Jr. The 'indirect' effects of cytomegalovirus infection. *Am J Transplant*. 2009;9(11):2453-8. Epub 2009/10/22.
62. Rubin RH. The indirect effects of cytomegalovirus infection on the outcome of organ transplantation. *JAMA*. 1989;261:3607-9.
63. Rubin RH. The pathogenesis and clinical management of cytomegalovirus infection in the organ transplant recipient: the end of the 'silo hypothesis'. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20:399-407.
64. Kranz B, Vester U, Wingen AM, Nadalin S, Paul A, Broelsch CE, et al. Acute rejection episodes in pediatric renal transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Pediatr Transplant*. 2008;12(4):474-8.
65. Hummel M, Zhang Z, Yan S, DePlaen I, Golia P, Varghese T, et al. Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes in vivo: a model for reactivation from latency. *J Virol*. 2001;75(10):4814-22.
66. Price DA, Bitmansour AD, Edgar JB, Walker JM, Axthelm MK, Douek DC, et al. Induction and evolution of cytomegalovirus-specific CD4+ T cell clonotypes in rhesus macaques. *J Immunol*. 2008;180(1):269-80.
67. Wodarz D, Siero S, Kleneman P. Dynamics of killer T cell inflation in viral infections. *J R Soc Interface*. 2007;4(14):533-43.
68. Elbou Ould MA, Luton D, Yadini M, Pedron B, Aujard Y, Jacqz-Aigrain E, et al. Cellular immune response of fetuses to cytomegalovirus. *Pediatr Res*. 2004;55(2):280-6.
69. Hassan J, Dooley S, Hall W. Immunological response to cytomegalovirus in congenitally infected neonates. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(3):465-71.

70. Bolovan-Fritts CA, Spector SA. Endothelial damage from cytomegalovirus-specific host immune response can be prevented by targeted disruption of fractalkine-CX3CR1 interaction. *Blood*. 2008;111(1):175-82.
71. Koehn B, Shivaprakash G, Miller JD, Ahmed R, Larsen CP. Patients, Pathogens, and Protective Immunity: The Relevance of Virus-Induced Alloreactivity in Transplantation. *The Journal of Immunology*. 2006;176(5):2691-9.
72. Chalandon Y, Degermann S, Villard J, Arlettaz L, Kaiser L, Vischer S, et al. The pre-transplant CMV-specific T-cells protect recipients of T-cell depleted grafts against cytomegalovirus related complications. *Blood*. 2006;107(1):389-96.
73. Damato EG, Winnen CW. Cytomegalovirus infection: perinatal implications. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2002;31(1):86-92.
74. Steining C. Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(10):953-63.
75. Takahashi S, Watanabe D, Miura K, Ozawa H, Tamada Y, Hara K, et al. Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disorder presenting with skin involvement after CD34-selected autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Eur J Dermatol*. 2007;17(3):242-4.
76. Aguado JM, Garcia-Reyne A, Lumberras C. Infections in liver transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(6):401-10. Epub 2007/06/23.
77. Green M, Michaels MG. Loads, lungs, and lymphoproliferative disorders: role of Epstein-Barr virus and limitations of what we know. *Transpl Infect Dis*. 2010;12(4):281-3. Epub 2010/08/24.
78. Trincado DE, Rawlinson WD. Congenital and perinatal infections with cytomegalovirus. *J Paediatr Child Health*. 2001;37(2):187-92.
79. Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol*. 2008;41(3):192-7.
80. Naumnik B, Malyszko J, Chyczewski L, Kovalchuk O, Mysliwiec M. Comparison of serology assays and polymerase chain reaction for the monitoring of active cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 2007;39(9):2748-50.
81. Smith TF, Espy MJ, Mandrekar J, Jones MF, Cockerill FR, Patel R. Quantitative real-time polymerase chain reaction for evaluating DNAemia due to cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and BK virus in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2007;45(8):1056-61. Epub 2007/09/21.
82. Wada K, Kubota N, Ito Y, Yagasaki H, Kato K, Yoshikawa T, et al. Simultaneous quantification of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human herpesvirus 6 DNA in samples from transplant recipients by multiplex real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2007;45(5):1426-32.
83. Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP, Osnes K, Leivestad T, Foss A, et al. Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int*. 2004;66(1):329-37.
84. Percivalle E, Genini E, Chiesa A, Gerna G. Comparison of a new Light Diagnostic trade mark and the CMV Britetrade mark to an in-house developed human cytomegalovirus antigenemia assay. *J Clin Virol*. 2008;43(1):13-7.
85. Mhiri L, Arrouji Z, Slim A, Ben Redjeb S. Detection of DNA human cytomegalovirus of a molecular methods: hybrid capture DNA CMV by immunocompromised. *Tunis Med*. 2006;84(10):644-6.
86. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(3):190-212.
87. Arav-Boger R, Pass R. Viral load in congenital cytomegalovirus infection. *Herpes*. 2007;14(1):17-22.
88. Soetens O, Vauloup-Fellous C, Foulon I, Dubreuil P, De Saeger B, Grangeot-Keros L, et al. Evaluation of different cytomegalovirus (CMV) DNA PCR protocols for analysis of dried blood spots from consecutive cases of neonates with congenital CMV infections. *J Clin Microbiol*. 2008;46(3):943-6.
89. Ogawa H, Baba Y, Suzutani T, Inoue N, Fukushima E, Omori K. Congenital cytomegalovirus infection diagnosed by polymerase chain reaction with the use of preserved umbilical cord in sensorineural hearing loss children. *Laryngoscope*. 2006;116(11):1991-4.
90. Guerra B, Simonazzi G, Puccetti C, Lanari M, Farina A, Lazzarotto T, et al. Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(4):380e1-7. PMID:18191802.
91. Maruyama Y, Sameshima H, Kamitomo M, Ibara S, Kaneko M, Ikenoue T, et al. Fetal manifestations and poor outcomes of congenital cytomegalovirus infections: possible candidates for intrauterine antiviral treatments. *J Obstet Gynaecol Res*. 2007;33(5):619-23.
92. Ross DS, Victor M, Sumartojo E, Cannon MJ. Women's Knowledge of Congenital Cytomegalovirus: Results From the 2005 HealthStyles() Survey. *J Womens Health (Larchmt)*. 2008;17(5):849-58.



93. Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 2005;353(13):1350-62.
94. Moxley K, Knudtson EJ. Resolution of hydrops secondary to cytomegalovirus after maternal and fetal treatment with human cytomegalovirus hyperimmune globulin. *Obstet Gynecol.* 2008;111(2 Pt 2):524-6.
95. Griffiths P, Plotkin S, Mocarski E, Pass R, Schleiss M, Krause P, et al. Desirability and feasibility of a vaccine against cytomegalovirus. *Vaccine.* 2013;31 Suppl 2:B197-203. Epub 2013/04/26.
96. Opelz G, Dohler B, Ruhenstroth A. Cytomegalovirus prophylaxis and graft outcome in solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant.* 2004;4(6):928-36.
97. Reischig T. Advances in cytomegalovirus-preventive strategies in solid organ transplantation: defending pre-emptive therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(1):51-61. Epub 2011/12/14.
98. Kim SI, Kim CJ, Kim YJ, Son H, Kim YE, Kim MS, et al. Antiviral prophylaxis versus preemptive therapy to prevent cytomegalovirus infection and related death in liver transplantation: a retrospective study with propensity score matching. *Transplant Proc.* 2012;44(3):787-90. Epub 2012/04/10.
99. Luan FL, Kommareddi M, Ojo AO. Universal prophylaxis is cost effective in cytomegalovirus serology-positive kidney transplant patients. *Transplantation.* 2011;91(2):237-44. Epub 2010/12/21.
100. Razonable RR. Cytomegalovirus infection after liver transplantation: Current concepts and challenges. *World J Gastroenterol.* 2008;14(31):4849-60.
101. Sun HY, Wagener MM, Singh N. Prevention of posttransplant cytomegalovirus disease and related outcomes with valganciclovir: a systematic review. *Am J Transplant.* 2008;8(10):2111-8.
102. Humar A, Michaels M. American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am J Transplant.* 2006;6:262.
103. Biron KK. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* 2006;71(2-3):154-63.
104. Andrei G, De Clercq E, Snoeck R. Novel inhibitors of human CMV. *Curr Opin Investig Drugs.* 2008;9(2):132-45.
105. Scott GM, Weinberg A, Rawlinson WD, Chou S. Multidrug resistance conferred by novel DNA polymerase mutations in human cytomegalovirus isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(1):89-94.
106. West P, Schmiedeskamp M, Neeley H, Oberholzer J, Benedetti E, Kaplan B. Use of high-dose ganciclovir for a resistant cytomegalovirus infection due to UL97 mutation. *Transpl Infect Dis.* 2008;10(2):129-32.
107. Coen DM, Richman DD. Antiviral Agents. In: Knipe DMH, Peter M, editor. *Fields Virology, 5th Edition.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 448-85.
108. Aguila Setién S, Delgado Calzado J, Breto García A, Cabezas Cruz E, Santiesteban Alba S. *Temas de Actualización en Obstetricia y Perinatología.* La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2011.
109. Rao M, Ahrlund-Richter L, Kaufman DS. Concise review: Cord blood banking, transplantation and induced pluripotent stem cell: success and opportunities. *Stem Cells.* 2012;30(1):55-60. Epub 2011/11/10.
110. Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG. *Heptinstall's Pathology of the Kidney 6<sup>o</sup> ed.* In: Kluwer W, editor. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1347-490.
111. de la Torre-Cisneros J, Farinas MC, Caston JJ, Aguado JM, Cantisan S, Carratala J, et al. GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(10):735-58. Epub 2011/09/20.
112. Torre-Cisneros J, Fortún J, Aguado JM, de la Cámara MR, Cisneros JM, Gavalda J, et al. Recomendaciones GESITRA-SEIMC y RESITRA sobre prevención y tratamiento de la infección por citomegalovirus en pacientes trasplantados. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23(7):424-37.
113. Sanchez R. Reunión del grupo provincial de Genética Médica de Ciudad de la Habana. In: Kouri Cardella V (ed). *Centro Provincial de Genética Médica de Ciudad de la Habana.* 2006.
114. Riis P. Perspectives on the Fifth revision of the Declaration of Helsinki. *Jama.* 2000;284(23):3045-8.
115. Miller CS, Berger JR, Mootoor Y, Avdiushko SA, Zhu H, Kriscio RJ. High Prevalence of Multiple Human Herpesviruses in Saliva from Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Clin Microbiol.* 2006;44(7):2409-15.
116. Millá MG, Mulas F. Diagnóstico interdisciplinar en la atención temprana. *Revista de Neurología.* 2002;34(1):103-7.

117. de Souza S, Bonon SH, Costa SC, Rossi CL. Evaluation of an in-house specific immunoglobulin G (IgG) avidity ELISA for distinguishing recent primary from long-term human cytomegalovirus (HCMV) infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45(6):323-6.
118. Tenorio A, Echevarria JE, Casas I, Echevarria JM, Tabarés E. Detection and typing of human herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 1993;44:261-9.
119. Chang Monteagudo A. Compatibilidad en el trasplante en Cuba. In: Correa Sierra CB (ed). Centro de trasplante, Instituto Nacional de Hematología e Inmunología. La Habana. 2013.
120. Yates JW, Chalmer B, McKegney FP. Evaluation of patients with advanced cancer using the Karnofsky performance status. *Cancer*. 1980;45(8):2220-4.
121. Hannachi N, Marzouk M, Harrabi I, Ferjani A, Ksouri Z, Ghannem H, et al. Seroprevalence of rubella virus, varicella zoster virus, cytomegalovirus and parvovirus B19 among pregnant women in the Sousse region, Tunisia. *Bull Soc Pathol Exot*. 2011;104(1):62-7. Epub 2011/01/19.
122. Bagheri L, Mokhtarian H, Sarshar N, Ghahramani M. Seroepidemiology of cytomegalovirus infection during pregnancy in Gonabad, east of Iran: a cross-sectional study. *Journal of research in health sciences*. 2012;12(1):38-44. Epub 2012/08/15.
123. Cannon MJ, Westbrook K, Levis D, Schleiss MR, Thackeray R, Pass RF. Awareness of and behaviors related to child-to-mother transmission of cytomegalovirus. *Preventive medicine*. 2012;54(5):351-7. Epub 2012/04/03.
124. Alfonso Valdés ME, Macias Abraham C, Lorigados L, Fonte L, Orbeal L, Basanta P, et al. Presencia de anticuerpos contra CMV en pacientes politransfundidos. III Congreso Nacional de Microbiología y Parasitología. Ciudad de La Habana. 1986. p. 440.
125. Lorigados L, Aranda RE, Rivero RA, Salas M, Rojas AB, Ballester JM. Presencia de anticuerpos contra CMV en donantes de sangre. III Congreso Nacional de Microbiología y Parasitología. Ciudad de La Habana. 1986. p. 442.
126. Rivero R, Lorigados L, Machado H, Alvares PL, Hernandez A, Ballester JM. Anticuerpos anti-citomegalovirus en embarazadas a término y recién nacidos. III Congreso Nacional de Microbiología y Parasitología. Ciudad de la Habana. 1986. p. 441.
127. Silva Cabrera E. Determinación de Anticuerpos anti-citomegalovirus por una técnica de ELISA en grupos de riesgo [tesis de especialista]. La Habana: ISCM-H; 1986.
128. Omoy A, Diav-Citrin O. Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reprod Toxicol*. 2006;21(4):399-409.
129. Pordeus V, Barzilai O, Sherer Y, Luiz RR, Blank M, Bizzaro N, et al. A latitudinal gradient study of common anti-infectious agent antibody prevalence in Italy and Colombia. *Isr Med Assoc J*. 2008;10(1):65-8.
130. Estripeaut D, Moreno Y, Ahumada Ruiz S, Martinez A, Racine JD, Saez-Llorens X. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in puerperal women and its impact on their newborns. *An Pediatr (Barc)*. 2007;66(2):135-9.
131. Chen MH, Chen PC, Jeng SF, Hsieh CJ, Su FC, Liao HF, et al. High perinatal seroprevalence of cytomegalovirus in northern Taiwan. *J Paediatr Child Health*. 2007;44(4):166-9.
132. Adjei A, Armah H, Narter-Olaga E. Seroprevalence of cytomegalovirus among some voluntary blood donors at the 37 military hospital, accra, ghana. *Ghana Med J*. 2006;40(3):99-104.
133. Ghazi HO, Telmesani AM, Mahomed MF. TORCH agents in pregnant Saudi women. *Med Princ Pract*. 2002;11(4):180-2.
134. Taechowisan T, Suttthent R, Lousirotchanakul S, Puthavathana P, Wasi C. Immune status in congenital infections by TORCH agents in pregnant Thais. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 1997;15:93-7.
135. Pultoo A, Meetoo G, Pyndiah MN, Khittoo G. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in Mauritian volunteer blood donors. *Indian J Med Sci*. 2001;55:73-8.
136. Ocak S, Zeteroglu S, Ozer C, Dolapcioglu K, Gungoren A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, rubella and cytomegalovirus among pregnant women in southern Turkey. *Scand J Infect Dis*. 2007;39(3):231-4.
137. Satilmis A, Gura A, Ongun H, Mendilcioglu I, Colak D, Oygur N. CMV seroconversion in pregnant women and the incidence of congenital CMV infection. *Turk J Pediatr*. 2007;49(1):30-6.
138. Akinbami AA, Rabiun KA, Adewunmi AA, Wright KO, Dosunmu AO, Adeyemo TA, et al. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies amongst normal pregnant women in Nigeria. *Int J Womens Health*. 2011;3:423-8. Epub 2012/01/17.
139. Tabatabaee M, Tayyebi D. Seroepidemiologic study of human cytomegalovirus in pregnant women in Valiasr Hospital of Kazeroon, Fars, Iran. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009;22(6):517-21. Epub 2009/04/08.

140. Alanen A, Kahala K, Vahlberg T, Koskela P, Vainionpaa R. Seroprevalence, incidence of prenatal infections and reliability of maternal history of varicella zoster virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus and parvovirus B19 infection in South-Western Finland. *Bjog*. 2005;112(1):50-6.
141. Joseph SA, Beliveau C, Muecke CJ, Rahme E, Soto JC, Flowerdew G, et al. Risk factors for cytomegalovirus seropositivity in a population of day care educators in Montreal, Canada. *Occup Med (Lond)*. 2005;55(7):564-7.
142. Marshall GS, Stout GG. Cytomegalovirus seroprevalence among women of childbearing age during a 10-year period. *Am J Perinatol*. 2005;22(7):371-6.
143. Munro SC, Hall B, Whybin LR, Leader L, Robertson P, Maine GT, et al. Diagnosis of and screening for cytomegalovirus infection in pregnant women. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4713-8.
144. Bonnard A, Le Huidoux P, Carricaburu E, Farnoux C, Berrebi D, Aigrain Y, et al. Cytomegalovirus infection as a possible underlying factor in neonatal surgical conditions. *J Pediatr Surg*. 2006;41(11):1826-9.
145. Stein O, Sheinberg B, Schiff E, Mashiach S, Seidman DS. Prevalence of antibodies to cytomegalovirus in a parturient population in Israel. *Isr J Med Sci*. 1997;33:53-8.
146. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*. 2010;20(4):202-13. Epub 2010/06/22.
147. Vilbic-Cavlek T, Ljubin-Stemak S, Ban M, Kolaric B, Sviben M, Mlinaric-Galinovic G. Seroprevalence of TORCH infections in women of childbearing age in Croatia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011;24(2):280-3. Epub 2010/05/19.
148. Boeke CE, Pauly ME, Hatch-Stock H, Jackson JB. CMV antibody prevalence and seroincidence in plateletpheresis donors. *J Clin Apher*. 2008;23(2):63-5. PMID: 18181166.
149. Staras SA, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis*. 2006;43(9):1143-51.
150. Sheevani, Jindal N, Aggarwal A. A pilot seroepidemiological study of cytomegalovirus infection in women of child bearing age. *Indian J Med Microbiol*. 2005;23(1):34-6.
151. Seale H, MacIntyre CR, Gidding HF, Backhouse JL, Dwyer DE, Gilbert L. National serosurvey of cytomegalovirus in Australia. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13(11):1181-4.
152. de Ory F, Ramirez R, Garcia Comas L, Leon P, Sagues MJ, Sanz JC. Is there a change in cytomegalovirus seroepidemiology in Spain? *Eur J Epidemiol*. 2004;19(1):85-9.
153. Iwasaki S, Yamashita M, Maeda M, Misawa K, Mineta H. Audiological outcome of infants with congenital cytomegalovirus infection in a prospective study. *Audiol Neurootol*. 2007;12(1):31-6.
154. Nishimura N, Kimura H, Yabuta Y, Tanaka N, Ito Y, Ishikawa K, et al. Prevalence of maternal cytomegalovirus (CMV) antibody and detection of CMV DNA in amniotic fluid. *Microbiol Immunol*. 1999;43(8):781-4.
155. Miles DJ, van der Sande M, Jeffries D, Kaye S, Ismaili J, Ojuola O, et al. Cytomegalovirus infection in Gambian infants leads to profound CD8 T-cell differentiation. *J Virol*. 2007;81(11):5766-76.
156. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. 2006;6:130.
157. Fowler KB, Pass RF. Risk Factors for Congenital Cytomegalovirus Infection in the Offspring of Young Women: Exposure to Young Children and Recent Onset of Sexual Activity. *Pediatrics*. 2006;118(2):286-92.
158. Stelma FF, Smismans A, Goossens VJ, Bruggeman CA, Hoebe CJ. Occupational risk of human Cytomegalovirus and Parvovirus B19 infection in female day care personnel in the Netherlands; a study based on seroprevalence. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008; 28(4):393-397.
159. Vaudry W, Rosychuk RJ, Lee BE, Cheung PY, Pang X, Preiksaitis JK. Congenital cytomegalovirus infection in high-risk Canadian infants: Report of a pilot screening study. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2010;21(1):e12-9. Epub 2011/03/02.
160. Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin Infect Dis*. 2010;50(11):1439-47. Epub 2010/04/30.
161. Bristow BN, O'Keefe KA, Shafir SC, Sorvillo FJ. Congenital cytomegalovirus mortality in the United States, 1990-2006. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(4):e1140. Epub 2011/05/05.
162. Das S, Ramachandran VG, Arora R. Cytomegalovirus and rubella infection in children and pregnant mothers—a hospital based study. *J Commun Dis*. 2007;39(2):113-7.
163. Gran Álvarez MA. Interrupción voluntaria de embarazo y anticoncepción: Dos métodos de regulación de la fecundidad. Cuba. 1995 – 2000 [Tesis Doctoral]. Ciudad de La Habana: Ministerio de Salud Pública; 2004.

164. Castañeda Abascal I, Molina Estévez M. Factores biosociales que influyen en la aparición del aborto provocado. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 1999; 25(1):55-60.
165. Dinámica demográfica y cambio social. México: Fondo de Población, Naciones Unidas. *Rev salud pública*. 2010;12(4):91-108.
166. Spano LC, Vargas PR, Ribeiro FS, Leite JP, Nascimento JP. Cytomegalovirus in human abortion in Espírito Santo, Brazil. *J Clin Virol*. 2002;25 Suppl 2:S173-8. Epub 2002/10/04.
167. Stowell JD, Forlin-Passoni D, Din E, Radford K, Brown D, White A, et al. Cytomegalovirus survival on common environmental surfaces: opportunities for viral transmission. *J Infect Dis*. 2012;205(2):211-4. Epub 2011/11/26.
168. Picone O, Vauloup-Fellous C, Cordier AG, Guitton S, Senat MV, Fuchs F, et al. A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome. *Prenat Diagn*. 2013:1-8. Epub 2013/04/05.
169. Gaj Z, Rycel M, Wilczynski J, Nowakowska D. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the population of Polish pregnant women. *Ginekol Pol*. 2012;83(5):337-41. Epub 2012/06/20.
170. Tagawa M, Minematsu T, Masuzaki H, Ishimaru T, Moriuchi H. Seroepidemiological survey of cytomegalovirus infection among pregnant women in Nagasaki, Japan. *Pediatr Int*. 2010;52(3):459-62. Epub 2009/11/19.
171. Theiler RN, Caliendo AM, Pargman S, Raynor BD, Berga S, McPheeters M, et al. Umbilical cord blood screening for cytomegalovirus DNA by quantitative PCR. *J Clin Virol*. 2006;37(4):313-6.
172. Lazzarotto T, Guerra B, Gabrielli L, Lanari M, Landini MP. Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(9):1285-93. Epub 2011/06/03.
173. Enders G, Daiminger A, Bader U, Exler S, Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol*. 2011;52(3):244-6. Epub 2011/08/09.
174. Omoy A. Fetal effects of primary and non-primary cytomegalovirus infection in pregnancy: are we close to prevention? *Isr Med Assoc J*. 2007;9(5):398-401.
175. Senok AC, Giacometti L, Botta G. Human cytomegalovirus infections in pregnancy and the newborn: epidemiology, laboratory diagnosis and medico legal aspects. *Kuwait Medical Journal*. 2006;38(2):85-93.
176. Pkhakadze ID, Kvachadze TI, Turava NG, Goginashvili LE, Tsagareli ZG. The placental histo- and ultrastructure peculiarities during the cytomegalovirus infection in pregnant. *Georgian Med News*. 2007(142):46-9.
177. Wang C, Zhang X, Bialek S, Cannon MJ. Attribution of congenital cytomegalovirus infection to primary versus non-primary maternal infection. *Clin Infect Dis*. 2011;52(2):e11-3. Epub 2011/02/04.
178. Fowler KB, Stagno S, Pass RF. Maternal age and congenital cytomegalovirus infection: screening of two diverse newborn populations, 1980–1990. *J Infect Dis*. 1993;168:552–6.
179. Fowler KB, Stagno S, Pass RF. Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *JAMA*. 2002;289:1008–11.
180. Kharrazi M, Hyde T, Young S, Amin MM, Cannon MJ, Dollard SC. Use of screening dried blood spots for estimation of prevalence, risk factors, and birth outcomes of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2010;157(2):191-7. Epub 2010/04/20.
181. Coll O, Benoist G, Ville Y, Weisman LE, Botet F, Anceschi MM, et al. Guidelines on CMV congenital infection. *J Perinat Med*. 2009;37(5):433-45. Epub 2009/08/14.
182. Romanelli RM, Magny JF, Jacquemard F. Prognostic markers of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Braz J Infect Dis*. 2008;12(1):38-43.
183. Gaytant MA, Rours GI, Steegers EA, Galama JM, Semmekrot BA. Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection: case reports and review of the literature. *Eur J Pediatr*. 2003;162(4):248-53.
184. Fowler KB, Stagno S, Pass RF. Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *Jama*. 2003;289(8):1008-11.
185. Witters I, Van Ranst M, Fryns JP. Cytomegalovirus reactivation in pregnancy and subsequent isolated bilateral hearing loss in the infant. *Genet Couns*. 2000;11(4):375-8.
186. Duff P. A thoughtful algorithm for the accurate diagnosis of primary CMV infection in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(3):196-7.
187. Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, Lanari M, Bovicelli L, Nicolosi A. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183:476-82.

188. Biri A, Bozdayi G, Cifti B, Dinc B, Yucel A, Rota S. The detection of CMV in amniotic fluid and cervicovaginal smear samples by real-time PCR assay in prenatal diagnosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2006;273(5):261-6.
189. Pass RF, Stagno S, Dworsky ME, Smith RJ, Alford CA. Excretion of cytomegalovirus in mothers: observations after delivery of congenitally infected and normal infants. *J Infect Dis.* 1982;146:1-6.
190. Smith KL, Kulski JK, Cobain T, Dunstan RA. Detection of cytomegalovirus in blood donors by polymerase chain reaction. *Transfusion.* 1993;33:497-503.
191. Collot S, Petit B, Bordessoule D, Alain S, Touati M, Denis F, et al. Real-Time PCR for quantification of human Herpesvirus 6 DNA from lymph nodes and saliva. *Journal of Clinical Microbiology.* 2002;40(7):2445-51.
192. Pereira CM, Gasparetto PF, Corrêa ME, Costa FF, de Almeida OP, Barjas-Castro ML. Human herpesvirus 6 in oral fluids from healthy individuals. *Arch Oral Biol.* 2004;49(12):1043-6.
193. Caserta MT, McDermott MP, Dewhurst S, Schnabel K, Camahan JA, Gilbert L, et al. Human herpesvirus 6 (HHV6) DNA persistence and reactivation in healthy children. *J Pediatr.* 2004;145(4):432-5.
194. Nikkels AF, Piérard GE. Herpesvirus 6. What attention does it deserve in general practice? *Rev Med Liege.* 2006;61(5-6):317-21.
195. Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, Boetrich C, McDermott MP, Lofthus GK, et al. Congenital infections with human herpesvirus 6 (HHV6) and human herpesvirus 7 (HHV7). *J Pediatr.* 2004;145(4):472-7.
196. Kanaan A, Cour I, Alvarez-Lafuente R, Benedicto M, Culebras E, Prats D, et al. Significance of nested PCR and quantitative real time PCR for cytomegalovirus detection in renal transplant recipients. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;24(5):455-62.
197. Drago L, Lombardi A, De Vecchi E, Giuliani G, Bartolone R, Gismondo MR. Comparison of nested PCR and real time PCR of Herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients. *BMC Infect Dis.* 2004;4:55.
198. Pol S, Romana CA, Richard S, Amouyal P, Desportes-Livage I, Camot F, et al. Microsporidia infection in patients with the human immunodeficiency virus and unexplained cholangitis. *N Engl J Med.* 1993;328(2):95-9.
199. Lengerova M, Racil Z, Volfova P, Lochmanova J, Berkovcova J, Dvorakova D, et al. Real-Time PCR Diagnostics Failure Caused by Nucleotide Variability within Exon 4 of the Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Gene. *Journal of Clinical Microbiology.* 2007;45(3):1042-4.
200. Ross SA, Novak Z, Pati S, Patro RK, Blumenthal J, Danthuri VR, et al. Mixed infection and strain diversity in congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis.* 2011;204(7):1003-7. Epub 2011/09/02.
201. Arav-Boger R, Willoughby RE, Pass RF, Zong JC, Jang WJ, Alcendor D, et al. Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis factor-alpha and beta-chemokine receptors in congenital CMV disease. *J Infect Dis.* 2002;186(8):1057-64.
202. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Marin LJ, Brito RM, Oliveira PF, Coelho TB. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? *J Clin Virol.* 2006;36(3):228-30.
203. Bale JF, Jr., Murph JR, Demmler GJ, Dawson J, Miller JE, Petheram SJ. Intrauterine cytomegalovirus infection and glycoprotein B genotypes. *J Infect Dis.* 2000;182(3):933-6.
204. Zwegberg Wirtgart B, Brytting M, Linde A, Wahren B, Grillner L. Sequence variation within three important cytomegalovirus gene regions in isolates from four different patient populations. *J Clin Microbiol.* 1998;36(12):3662-9.
205. Pass RF. Congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *Herpes.* 2005;12(2):50-5.
206. Virtanen M, Syvanen AC, Oram J, Soderlund H, Ranki M. Cytomegalovirus in urine: detection of viral DNA by sandwich hybridization. *J Clin Microbiol.* 1984;20(6):1083-8.
207. de Vries JJ, 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(2):167-70. Epub 2011/12/20.
208. Miller CS, Berger JR, Mootoor Y, Avdiushko SA, Zhu H, Kryscio RJ. High prevalence of multiple human herpesviruses in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol.* 2006;44(7):2409-15.
209. Correia-Silva JdF, Victória JM, Guimarães AL, Salomão UE, de Abreu MH, Bittencourt H, et al. Cytomegalovirus shedding in the oral cavity of allogeneic haematopoietic stem cell transplant patients. *Oral Dis.* 2007;13(2):163-9.
210. Flaitz CM, Hicks MJ, Carter AB, Rossmann SN, Demmler GJ, Simon CL, et al. Saliva collection technique for cytologic, microbiologic and viral evaluation in pediatric HIV infection. *ASDC J Dent Child.* 1998;65(5):318-24.

211. Gautheret-Dejean A, Aubin JT, Poirel L, Huraux JM, Nicolas JC, Rozenbaum W, et al. Detection of human Betaherpesvirinae in saliva and urine from immunocompromised and immunocompetent subjects. *J Clin Microbiol.* 1997;35(6):1600-3.
212. Balcarek KB, Warren W, Smith RJ, Lyon MD, Pass RF. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection by detection of virus in saliva. *J Infect Dis.* 1993;167(6):1433-6.
213. Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels MG, et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med.* 2011;364(22):2111-8. Epub 2011/06/03.
214. Belec L, Brogan TV. Real-time PCR-based testing of saliva for cytomegalovirus at birth. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(12):1119-24. Epub 2011/11/26.
215. Schlesinger Y, Reich D, Eidelman AI, Schimmel MS, Hassanin J, Miron D. Congenital cytomegalovirus infection in Israel: screening in different subpopulations. *Isr Med Assoc J.* 2005;7(4):237-40.
216. Ahlfors K, Ivarsson SA, Harris S. Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of prospective studies available in the literature. *Scand J Infect Dis.* 1999;31(5):443-57.
217. Casteels A, Naessens A, Gordts F, De Catte L, Bougateg A, Foulon W. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infections. *J Perinat Med.* 1999;27(2):116-21.
218. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Calvario A, Germinario C, Bozzi A, et al. Multicity Italian study of congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25(2):156-9.
219. Paradiz KR, Seme K, Puklavec E, Paro-Panjan D, Poljak M. Prevalence of congenital cytomegalovirus infection in Slovenia: a study on 2,841 newborns. *J Med Virol.* 2012;84(1):109-15. Epub 2011/10/27.
220. Paixao P, Almeida S, Gouveia P, Vilarinho L, Vaz Osorio R. Prevalence of human cytomegalovirus congenital infection in Portuguese newborns. *Euro Surveill.* 2009;14(9):13-5. Epub 2009/03/26.
221. van der Sande MA, Kaye S, Miles DJ, Waight P, Jeffries DJ, Ojuola OO, et al. Risk factors for and clinical outcome of congenital cytomegalovirus infection in a peri-urban West-African birth cohort. *PLoS ONE.* 2007;2(6):e492.
222. Samileh N, Ahmad S, Mohammad F, Framarz M, Azardokht T, Jomeht E. Role of cytomegalovirus in sensorineural hearing loss of children: a case-control study Tehran, Iran. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2008;72(2):203-8.
223. Zhang JP, Li F, Yu XW, Sheng Q, Shi XW, Zhang XW. Trace elements and cytokine profile in cytomegalovirus-infected pregnancies: a controlled study. *Gynecol Obstet Invest.* 2008;65(2):128-32.
224. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol.* 2007;17(4):253-76.
225. Carlson A, Norwitz ER, Stiller RJ. Cytomegalovirus infection in pregnancy: should all women be screened? *Rev Obstet Gynecol.* 2010;3(4):172-9. Epub 2011/03/03.
226. Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics.* 1999;104(1 Pt 1):55-60.
227. Pusztai R. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Orv Hetil.* 2009;150(21):963-8. Epub 2009/05/16.
228. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med.* 2001;344(18):1366-71.
229. Omoy A, Diav-Citrin O. Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reprod Toxicol.* 2006;21:399-409.
230. Ross SA, Fowler KB, Ashrith G, Stagno S, Britt WJ, Pass RF, et al. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J Pediatr.* 2006;148(3):332-6.
231. Adler SP. Screening for cytomegalovirus during pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2011;2011:1-9. Epub 2011/08/13.
232. Reynolds DW, Dean PH, Pass RF, Alford CA. Specific cell-mediated immunity in children with congenital and neonatal cytomegalovirus infection and their mothers. *J Infect Dis.* 1979;140(4):493-9. Epub 1979/10/01.
233. Chen FP, Teng LF, Chen JY, Lee N. Congenital cytomegalovirus infection in 1 twin with a pericardial effusion: a case report. *J Reprod Med.* 2007;52(4):317-9.
234. Numazaki K, Fujikawa T. Chronological changes of incidence and prognosis of children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection in Sapporo, Japan. *BMC Infect Dis.* 2004;4:22.
235. Bonalumi S, Trapanese A, Santamaria A, D'Emidio L, Mobilil L. Cytomegalovirus infection in pregnancy: review of the literature. *Journal of prenatal medicine.* 2011;5(1):1-8. Epub 2011/01/01.
236. Enders G, Bader U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn.* 2001;21(5):362-77.

237. Sosa Marin M. La práctica del aborto voluntario en Cuba. In: Correa Sierra CB (ed). Sociedad Cubana de Desarrollo de la Familia (SOCUDEP). La Habana. 2013.
238. Diaz Martinez AG, Valdez Abreu MC, Resik Aguirre S. Infecciones por Citomegalovirus. Rev Cub de Med Gen Integ [Internet]. 1998 8 Dic 2012; 14(3). Available from: [http://bvs.sld.cu/revistas/mqi/vol14\\_3\\_98/mqi12398.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/mqi/vol14_3_98/mqi12398.htm).
239. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Stagno S. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. J Clin Virol. 2006;35(2):216-20.
240. Gindes L, Teperberg-Oikawa M, Sherman D, Pardo J, Rahav G. Congenital cytomegalovirus infection following primary maternal infection in the third trimester. Bjog. 2008;115(7):830-5.
241. Odeberg J, Wolmer N, Falci SP, Westgren M, Seiger A, Soderberg C. Human cytomegalovirus inhibits neuronal differentiation and induces apoptosis in human neural precursor cells. Journal of Virology. 2006;80(18):8929-39.
242. Mutnal MB, Cheeran MC, Hu S, Lokensgard JR. Murine cytomegalovirus infection of neural stem cells alters neurogenesis in the developing brain. PLoS ONE. 2011;6(1):e16211. Epub 2011/01/21.
243. Kylat RI, Kelly EN, Ford-Jones EL. Clinical findings and adverse outcome in neonates with symptomatic congenital cytomegalovirus (SCCMV) infection. Eur J Pediatr. 2006;165(11):773-8.
244. Zhang XW, Li F, Yu XW, Shi XW, Shi J, Zhang JP. Physical and intellectual development in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection: a longitudinal cohort study in Qinba mountain area, China. J Clin Virol. 2007;40(3):180-5.
245. 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. Epub 2012/03/17.
246. Kadambari S, Williams EJ, Luck S, Griffiths PD, Sharland M. Evidence based management guidelines for the detection and treatment of congenital CMV. Early Hum Dev. 2011;87(11):723-8. Epub 2011/10/04.
247. Yilmaz Ciftdogan D, Vardar F. Effect on hearing of oral valganciclovir for asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. J Trop Pediatr. 2011;57(2):132-4. Epub 2010/06/26.
248. Amir J, Wolf DG, Levy I. Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection with intravenous ganciclovir followed by long-term oral valganciclovir. Eur J Pediatr. 2010;169(9):1061-7. Epub 2010/03/17.
249. Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Baldanti F, Gerna G. Quantification of human cytomegaloviral DNA in amniotic fluid of mothers of congenitally infected fetuses. J Clin Microbiol. 1999;37:3350-2.
250. Goegebuer T, Van Meensel B, Beuselindk K, Cossey V, Van Ranst M, Hanssens M, et al. Clinical predictive value of real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples. J Clin Microbiol. 2009;47(3):660-5. Epub 2008/12/26.
251. Gouarin S, Gault E, Vabret A, Cointe D, Rozenberg F, Grangeot-Keros L, et al. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. J Clin Microbiol. 2002;40(5):1767-72. Epub 2002/05/01.
252. Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Baldanti F, Gerna G. Quantification of human cytomegaloviral DNA in amniotic fluid of mothers of congenitally infected fetuses. J Clin Microbiol. 1999;37:3350-2.
253. Teissier N, Delezoide AL, Mas AE, Khung-Savatovsky S, Bessieres B, Nardelli J, et al. Inner ear lesions in congenital cytomegalovirus infection of human fetuses. Acta Neuropathol. 2011;122(6):763-74. Epub 2011/10/29.
254. Lazzarotto T, Guerra B, Spezzacatena P, Varani S, Gabrielli L, Pradelli P, et al. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. J Clin Microbiol. 1998;36(12):3540-4.
255. 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(1):e76-83.
256. Ross SA, Novak Z, Fowler KB, Arora N, Britt WJ, Boppana SB. Cytomegalovirus blood viral load and hearing loss in young children with congenital infection. Pediatr Infect Dis J. 2009;28(7):588-92. Epub 2009/05/30.
257. Marrero M, Alvarez M, Suárez L, Jidi M, Kourí V. Estudio de la respuesta serológica a algunos herpesvirus en un grupo de pacientes infectados con el VIH. Rev Cub Med Trop. 1992;44:208-11.
258. Resik S, Enamorado A, Tallo Y, Suárez C, Kourí V, Acosta B, et al. Prevalencia de anticuerpos contra virus herpes simple, virus Epstein-Barr y Citomegalovirus en una población de pacientes hemodializados. Rev Cub Med Trop. 1999;51(3):172-6.
259. Loutfy SA, Alam EHDin HM, Ibrahim MF, Hafez MM. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus in children with acute lymphoblastic leukemia in Egypt. Saudi Med J. 2006;27(8):1139-45.

260. Fijo-Lopez-Viota J, Espinosa-Roman L, Herrero-Hernando C, Sanahuja-Ibanez MJ, Vila-Santandreu A, Praena-Fernandez JM. Cytomegalovirus and paediatric renal transplants: is this a current issue? *Nefrologia*. 2013;33(1):7-13. Epub 2013/02/01.
261. Lau AH, Soltys K, Sindhi RK, Bond G, Mazariegos GV, Green M. Chronic high Epstein-Barr viral load carriage in pediatric small bowel transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2010;14(4):549-53. Epub 2010/01/28.
262. Trotter H, Buteau C, Robitaille N, Duval M, Tucci M, Lacroix J, et al. Transfusion-related Epstein-Barr virus infection among stem cell transplant recipients: a retrospective cohort study in children. *Transfusion*. 2012;52(12):2653-63. Epub 2012/03/17.
263. Behrendt CE, Rosenthal J, Bolotin E, Nakamura R, Zaia J, Forman SJ. Donor and recipient CMV serostatus and outcome of pediatric allogeneic HSCT for acute leukemia in the era of CMV-preemptive therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(1):54-60.
264. Rabenau HF, Buxbaum S, Preiser W, Weber B, Doerr HW. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and type 2 in the Frankfurt am Main area, Germany. *Med Microbiol Immunol*. 2002;190(4):153-60. Epub 2002/05/15.
265. El-Cheikh J, Devillier R, Crocchiolo R, Furst S, Camels B, Faucher C, et al. Impact of pretransplant donor and recipient cytomegalovirus serostatus on outcome for multiple myeloma patients undergoing reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013;5(1):e2013026. Epub 2013/05/15.
266. Lopo S, Vinagre E, Palmilha P, Paixao MT, Nogueira P, Freitas MG. Seroprevalence to cytomegalovirus in the Portuguese population, 2002-2003. *Euro Surveill*. 2011;16(25):34-41. Epub 2011/07/05.
267. de Matos SB, Meyer R, Lima FW. Seroprevalence and serum profile of cytomegalovirus infection among patients with hematologic disorders in Bahia State, Brazil. *J Med Virol*. 2011;83(2):298-304. Epub 2010/12/25.
268. Sepehrvand N, Khameneh ZR, Eslamloo HR. Survey the seroprevalence of CMV among hemodialysis patients in Urmia, Iran. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2010;21(2):363-7. Epub 2010/03/17.
269. Schaffer K, Hassan J, Staines A, Coughlan S, Holder P, Tuite G, et al. Surveillance of Epstein-Barr virus loads in adult liver transplantation: associations with age, sex, posttransplant times, and transplant indications. *Liver Transpl*. 2011;17(12):1420-6. Epub 2011/08/13.
270. Martin JM, Danziger-Isakov LA. Cytomegalovirus risk, prevention, and management in pediatric solid organ transplantation. *Pediatr Transplant*. 2011;15(3):229-36. Epub 2011/01/05.
271. Gentil Govantes MA, Pereira Palomo P. Assessment and selection of kidney living donors. *Nefrologia*. 2010;30 Suppl 2:47-59. Epub 2011/02/26.
272. Dominguez-Gil B, de la Oliva Valentin M, Martin Escobar E, Cruzado JM, Pascual J, Fernandez Fresnedo G. Present situation of living-donor kidney transplantation in Spain and other countries: past, present and future of an excellent therapeutic option. *Nefrología*. 2010;30 Suppl 2:3-13. Epub 2011/02/26.
273. Beghetto E, Paolis FD, Spadoni A, Del Porto P, Buffolano W, Gargano N. Molecular dissection of the human B cell response against cytomegalovirus infection by lambda display. *J Virol Methods*. 2008;151(1):7-14.
274. George B, Pati N, Gilroy N, Ratnamohan M, Huang G, Kerridge I, et al. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl Infect Dis*. 2010;12(4):322-9. Epub 2010/05/22.
275. Ohashi M, Sugata K, Ihira M, Asano Y, Egawa H, Takada Y, et al. Human herpesvirus 6 infection in adult living related liver transplant recipients. *Liver Transpl*. 2008;14(1):100-9. Epub 2007/12/29.
276. Heli P. Quantitative PCR in the diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in organ transplant patients [tesis doctoral]. Sweden: University of Helsinki; 2004.
277. Xue W, Liu H, Yan H, Tian P, Ding X, Pan X, et al. Methodology for monitoring cytomegalovirus infection after renal transplantation. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(2):177-81. Epub 2009/02/05.
278. Focosi D, Boggi U. Pretransplant screening for donor-specific antibodies and graft loss. *Transplantation*. 2011;92(4):e15; author reply e-6. Epub 2011/08/05.
279. Verdeguer A, de Heredia CD, González M, Martínez AM, Fernández-Navarro JM, Pérez-Hurtado JM, et al. GETMON: Spanish Working Party for Blood and Marrow Transplantation in Children. Observational prospective study of viral infections in children undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a 3-year GETMON experience. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46(1):119-24.
280. Costa FA, Soki MN, Andrade PD, Bonon SH, Thomasini RL, Sampaio AM, et al. Simultaneous monitoring of CMV and human herpesvirus 6 infections and diseases in liver transplant patients: one-year follow-up. *Clinics*. 2011;66(6):949-53.



281. Schonberger S, Meisel R, Adams O, Pufal Y, Laws HJ, Enczmann J, et al. Prospective, comprehensive, and effective viral monitoring in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(10):1428-35. Epub 2010/04/20.
282. Shigeta T, Imadome K, Sakamoto S, Fukuda A, Kakiuchi T, Matsuno N, et al. Epstein-Barr virus infection after pediatric living-related liver transplantation—management and risk factors. *Transplant Proc.* 2010;42(10):4178-80. Epub 2010/12/21.
283. Razonable RR, Zerr DM. HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* 2009;9 Suppl 4:S97-100. Epub 2010/01/28.
284. Abdel Massih RC, Razonable RR. Human herpesvirus 6 infections after liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2009;15:2561-9.
285. Srinivasan A, Wang C, Srivastava DK, Burnette K, Shenep JL, Leung W, et al. Timeline, epidemiology, and risk factors for bacterial, fungal, and viral infections in children and adolescents after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(1):94-101. Epub 2012/08/28.
286. Kosmadakis G, Daikos GL, Pavlopoulou ID, Gobou A, Kostakis A, Tzanatou-Exarchou H, et al. Infectious complications in the first year post renal transplantation. *Transplant Proc.* 2013;45(4):1579-83. Epub 2013/06/04.
287. Munoz P, Fernandez NS, Farinas MC. Epidemiology and risk factors of infections after solid organ transplantation. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30 Suppl 2:10-8. Epub 2012/05/11.
288. Pink R, Simek J, Vondrakova J, Faber E, Michl P, Pazdera J, et al. Saliva as a diagnostic medium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009;153(2):103-10. Epub 2009/09/23.
289. Nikoobakht M, Beitollahi J, Nikoobakht N, Aloosh M, Sahebjamie M, Rezaeidanesh M, et al. Evaluation of Epstein-Barr virus load in saliva before and after renal transplantation. *Transplant Proc.* 2011;43(2):540-2. Epub 2011/03/29.
290. Correia-Silva Jde F, Victoria JM, Guimaraes AL, Salomao UE, de Abreu MH, Bittencourt H, et al. Cytomegalovirus shedding in the oral cavity of allogeneic haematopoietic stem cell transplant patients. *Oral Dis.* 2007;13(2):163-9.
291. Ljungman P, Dahl H, Xu YH, Larsson K, Brytting M, Linde A. Effectiveness of ganciclovir against human herpesvirus-6 excreted in saliva in stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39(8):497-9. Epub 2007/03/06.
292. Mocarski ES. Cytomegaloviruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* New York: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 2447-92.
293. Garcia-Prado E, Cordero E, Alamo JM, Gomez MA, Pascasio JM, Sanchez M, et al. Descriptive study of infectious complications in 109 consecutive liver transplant recipients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(4):199-205. Epub 2009/04/14.
294. Renoult E, Clermont MJ, Phan V, Buteau C, Alfieri C, Tapiero B. Prevention of CMV disease in pediatric kidney transplant recipients: evaluation of pp67 NASBA-based pre-emptive ganciclovir therapy combined with CMV hyperimmune globulin prophylaxis in high-risk patients. *Pediatr Transplant.* 2008;12(4):420-5.
295. Singh N, Dummer JS, Kusne S, Breinig MK, Armstrong JA, Makowka L, et al. Infections with cytomegalovirus and other herpesviruses in 121 liver transplant recipients: transmission by donated organ and the effect of OKT3 antibodies. *J Infect Dis.* 1988;158(1):124-31. Epub 1988/07/01.
296. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(2):107-21. Epub 2008/01/17.
297. Mizuta K, Urahashi T, Ihara Y, Sanada Y, Wakiya T, Yamada N, et al. Varicella zoster virus disease after pediatric living donor liver transplantation: is it serious? *Transplant Proc.* 2012;44(3):780-3. Epub 2012/04/10.
298. Mustapic Z, Basic-Jukic N, Kes P, Lovcic V, Bubic-Filipi L, Mocos I, et al. Varicella zoster infection in renal transplant recipients: prevalence, complications and outcome. *Kidney Blood Press Res.* 2011;34(6):382-6. Epub 2011/06/10.
299. Sifkin M, Doron S, Snyderman DR. Viral prophylaxis in organ transplant patients. *Drugs.* 2004;64(24):2763-92.
300. Sampaio MS, Cho YW, Shah T, Bunnapradist S, Hutchinson IV. Impact of Epstein-Barr virus donor and recipient serostatus on the incidence of post-transplant lymphoproliferative disorder in kidney transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(7):2971-9.
301. Tanaka E, Sato T, Ishihara M, Tsutsumi Y, Hisano M, Chikamoto H, et al. Asymptomatic high Epstein-Barr viral load carriage in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transplant.* 2011;15(3):306-13. Epub 2011/04/16.

302. Smets F, Bodeus M, Goubau P, Reding R, Otte JB, Buts JP, et al. Characteristics of Epstein-Barr virus primary infection in pediatric liver transplant recipients. *J Hepatol.* 2000;32(1):100-4. Epub 2000/02/15.
303. Ho M. *Cytomegalovirus: Biology and Infection.* 2nd ed. New York: Plenum Publishing; 1991.
304. Preiksaitis JK, Brennan DC, Fishman J, Allen U. Canadian society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *Am J Transplant.* 2005;5(2):218-27.
305. Mocarski ES, Hahn G, White KL. Myeloid cell recruitment and function in pathogenesis and latency. In: Reddehase MJ, editor. *Cytomegaloviruses: Pathogenesis, Molecular Biology, and Infection Control.* Norfolk: Caister Scientific Press; 2006. p. 465-82.
306. Arellano-Galindo J, Vazquez-Meraz E, Jimenez-Hernandez E, Velazquez-Guadarrama N, Mikeler E, Hamprecht K, et al. The role of cytomegalovirus infection and disease in pediatric bone marrow transplant recipients in Mexico City in the context of viral drug resistance. *Pediatr Transplant.* 2011;15(1):103-11. Epub 2011/01/05.
307. Wills MR, Carmichael AJ, Sinclair JH. HCMV: immunobiology and host response. In: Arvin A, Mocarski, ES, Moore, P, editor. *Human Herpesviruses Biology, Therapy and Immunoprophylaxis.* Cambridge: Cambridge Press; 2006. p. 760-74.
308. Uribe M, Buckel E, Ferrario M, Godoy J, Gonzalez G, Hunter B, et al. Pediatric liver transplantation: ten years of experience in a multicentric program in Chile. *Transplant Proc.* 2005;37(8):3375-7. Epub 2005/11/22.
309. Salazar EM, Alba GA, Deluchi BA, Hunter MB, Godoy LJ, Ferrario BM, et al. Cytomegalovirus infection and disease in pediatric solid organ transplantation. Experience in a Chilean multiorgan transplantation center. *Rev Chilena Infectol.* 2009;26(4):311-7. Epub 2009/10/06. I
310. Jaskula E, Dlubek D, Sedzimirska M, Duda D, Tamowska A, Lange A. Reactivations of cytomegalovirus, human herpes virus 6, and Epstein-Barr virus differ with respect to risk factors and clinical outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Proc.* 2010;42(8):3273-6. Epub 2010/10/26.
311. Kanter J, Pallardo L, Gavela E, Escudero V, Beltran S, Morales A, et al. Cytomegalovirus infection renal transplant recipients: risk factors and outcome. *Transplant Proc.* 2009;41(6):2156-8. Epub 2009/09/01.
312. Emery VC. Viral dynamics during active cytomegalovirus infection and pathology. *Intervirology.* 1999;42(5-6):405-11.
313. Herfarth HH, Long MD, Rubinas TC, Sandridge M, Miller MB. Evaluation of a non-invasive method to detect cytomegalovirus (CMV)-DNA in stool samples of patients with inflammatory bowel disease (IBD): a pilot study. *Dig Dis Sci.* 2010;55(4):1053-8. Epub 2010/02/19.
314. Arslan H, Inci EK, Azap OK, Karakayali H, Torgay A, Haberal M. Etiologic agents of diarrhea in solid organ recipients. *Transpl Infect Dis.* 2007;9(4):270-5.
315. Sinha A, Hari P, Guleria S, Gulati A, Dinda AK, Mehra NK, et al. Outcome of pediatric renal transplantation in north India. *Pediatr Transplant.* 2010;14(7):836-43. Epub 2010/10/16.
316. Xu L, Xu MQ, Yan LN, Li B, Wen TF, Wang WT. Causes of mortality after liver transplantation: a single center experience in mainland china. *Hepatogastroenterology.* 2012;59(114):481-4. Epub 2011/09/24.
317. Sandhu L, Sandroussi C, Guba M, Selzner M, Ghanekar A, Cattral MS, et al. Living donor liver transplantation versus deceased donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma: comparable survival and recurrence. *Liver Transpl.* 2012;18(3):315-22. Epub 2011/12/06.
318. Lee S, Kim J, Shin M, Kim E, Moon J, Jung G, et al. Comparison of outcomes of living and deceased donor kidney grafts surviving longer than 5 years in Korea. *Transplant Proc.* 2010;42(3):775-7. Epub 2010/05/01.
319. Bispo M, Marcelino P, Marques HP, Martins A, Perdigoto R, Aguiar MJ, et al. Domino versus deceased donor liver transplantation: association with early graft function and perioperative bleeding. *Liver Transpl.* 2011;17(3):270-8. Epub 2011/03/09.
320. Linares L, Sandelemente G, Cervera C, Hoyo I, Cofan F, Ricart MJ, et al. Influence of cytomegalovirus disease in outcome of solid organ transplant patients. *Transplant Proc.* 2011;43(6):2145-8. Epub 2011/08/16.
321. Kouri V, Suárez C, Resik S, García S. Herpesvirus detection in immunocompromised patients with meningoencephalitis by the polymerase chain reaction technic. *Rev Cub Med Trop.* 1998;50(3):186-90.
322. Yamamoto T, Nakamura Y. A single tube PCR assay for simultaneous amplification of HSV-1/-2, VZV, CMV, HHV-6A/-6B, and EBV DNAs in cerebrospinal fluid from patients with virus-related neurological diseases. *J Neurovirol.* 2000;6(5):410-7.
323. Martinez PA, Diaz R, Gonzalez D, Oropesa L, Gonzalez R, Perez L, et al. The effect of highly active antiretroviral therapy on outcome of central nervous system herpesviruses infection in Cuban human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Neurovirol.* 2007;13(5):446-51.

324. Abdo A, Kourí V, Burgos D, Urquiza A, Limonta D, Alfonso C, et al. Norwegian Scabies Associated With Herpes Simplex Infection in a Renal Transplant Patient. *Transplantation*. 2009;87(6):943-4.
325. Zawilinska B, Kosz-Vnenchak M, Piatkowska-Jakubas B, Kopec J, Daszkiewicz E, Skotnicki AB. Herpesviruses mixed infections in allogeneic stem cell recipients (allo-HSCT). *Przegl Epidemiol* 2008;62(1):39-46.
326. Razonable RR, Paya CV. The impact of human herpesvirus-6 and -7 infection on the outcome of liver transplantation. *Liver Transpl*. 2002;8(8):651-8.
327. Washington K. Update on post-liver transplantation infections, malignancies, and surgical complications. *Adv Anat Pathol*. 2005;12(4):221-6.
328. Humar A, Kumar D, Caliendo AM, Moussa G, Ashi-Sulaiman A, Levy G, et al. Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation*. 2002;73(4):599-604.
329. Griffiths PD, Clark DA, Emery VC. Betaherpesviruses in transplant recipients. *J Antimicrob Chemother*. 2000;45 Suppl T3:29-34.
330. Loutfy SA, Fawzy M, El-Wakil M, Moneer MM. Presence of human herpes virus 6 (HHV6) in pediatric lymphomas: impact on clinical course and association with cytomegalovirus infection. *Virology*. 2010;7:287. Epub 2010/10/29.
331. Griffiths PD, Ait-Khaled M, Bearcroft CP, Clark DA, Quaglia A, Davies SE, et al. Human herpesviruses 6 and 7 as potential pathogens after liver transplant: prospective comparison with the effect of cytomegalovirus. *J Med Virol*. 1999;59(4):496-501.
332. Reeves MB, MacAry PA, Lehner PJ. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(11):4140-5.
333. Essa S, Pacsa A, Said T, Nampoory MR, Raghupathy R, Johny KV, et al. Is combined pretransplantation seropositivity of kidney transplant recipients for cytomegalovirus antigens (pp150 and pp28) a predictor for protection against infection? *Med Princ Pract*. 2008;17(1):66-70.
334. Mitwalli AH, Nazmi A, Al Ghonaim M, Shaheen F, Kfoury H. Cytomegalovirus disease in a renal transplant recipient: the importance of pre-transplant screening of the donor and recipient. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2013;24(1):80-5. Epub 2013/01/29.
335. Jaksch P, Wiedemann D, Kocher A, Murakozy G, Augustin V, Klepetko W. Effect of cytomegalovirus immunoglobulin on the incidence of lymphoproliferative disease after lung transplantation: single-center experience with 1157 patients. *Transplantation*. 2013;95(5):766-72. Epub 2013/02/01.
336. Liu YC, Lu PL, Hsiao HH, Chang CS, Liu TC, Yang WC, et al. Cytomegalovirus infection and disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: experience in a center with a high seroprevalence of both CMV and hepatitis B virus. *Ann Hematol*. 2012;91(4):587-95. Epub 2011/10/15.
337. Kim JM, Kim SJ, Joh JW, Kwon CH, Song S, Shin M, et al. Is cytomegalovirus infection dangerous in cytomegalovirus-seropositive recipients after liver transplantation? *Liver Transpl*. 2011;17(4):446-55. Epub 2011/03/30.
338. van Ree RM, de Vries AP, Zelle DM, de Vries LV, Oterdoorn LH, Gans RO, et al. Latent cytomegalovirus infection is an independent risk factor for late graft failure in renal transplant recipients. *Med Sci Monit*. 2011;17(11):CR609-17. Epub 2011/11/01.
339. Frank J, Jenkins FJ, Rowe DT, Rinaldo CR. Herpesvirus Infections in Organ Transplant Recipients. *Clin and diagn lab immun*. 2003;10:1-7.
340. Suzuki T, Ikezumi Y, Okubo S, Uchiyama M, Takahashi K, Shiraga H, et al. Epstein-Barr virus DNA load and seroconversion in pediatric renal transplantation with tacrolimus immunosuppression. *Pediatr Transplant*. 2007;11(7):749-54. Epub 2007/10/04.
341. Helanterä I, Lautenschlager I, Koskinen P. The risk of cytomegalovirus recurrence after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2011;24(12):1170-8. Epub 2011/09/10.
342. Rossini F, Terruzzi E, Cammarota S, Morini F, Fumagalli M, Verga L, et al. Cytomegalovirus infection after autologous stem cell transplantation: incidence and outcome in a group of patients undergoing a surveillance program. *Transpl Infect Dis*. 2005;7(3-4):122-5.
343. Watcharananan SP, Louhapanawat S, Chantratita W, Jirasiritham S, Sumethkul V. Cytomegalovirus viremia after kidney transplantation in Thailand: predictors of symptomatic infection and outcome. *Transplant Proc*. 2012;44(3):701-5. Epub 2012/04/10.
344. Kullberg-Lindh C, Mellgren K, Friman V, Fasth A, Ascher H, Nilsson S, et al. Opportunistic virus DNA levels after pediatric stem cell transplantation: serostatus matching, anti-thymocyte globulin, and total body irradiation are additive risk factors. *Transpl Infect Dis*. 2011;13(2):122-30. Epub 2011/04/05.

345. Martin-Gandul C, Perez-Romero P, Sanchez M, Bernal G, Suarez G, Sobrino M, et al. Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection. *J Clin Virol*. 2013;56(1):13-8. Epub 2012/11/08.
346. Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting Quantitative Cytomegalovirus DNA Testing: Understanding the Laboratory Perspective. *Clin Infect Dis*. 2012;54(12):1793-7.
347. Chen YH, Zhao XS, Liu KY, Xu LP, Liu DH, Chen H, et al. Relationship between copies of cytomegalovirus in plasma and cytomegalovirus disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009; 89(22):1540-3.
348. Farfan UM, Torres TJ, Vergara AA, Donoso WG, Alba GA, Paris DC, et al. Comparison of real-time polymerase chain reaction and antigenemia assay to detect cytomegalovirus in pediatric transplants. *Rev Chilena Infectol*. 2011;28(2):113-7. Epub 2011/07/02.
349. Kotton C. Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6:711-21.
350. Girmanova E, Brabcova I, Bandur S, Hribova P, Skibova J, Viklicky O. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 120 Czech renal transplant recipients. *J Med Virol*. 2011;83(8):1395-400.
351. 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(1-2):131-4.
352. Sola R, Rabella N, Guirado LL, Diaz JM, Facundo C, Garcia R. Relation between pp65 antigenemia, RT-PCR and viremia for cytomegalovirus detection in kidney transplant recipients. *Transplant Proc*. 2005;37(9):3768-9.
353. Hirsch HH, Lautenschlager I, Pinsky BA, Cardenoso L, Aslam S, Cobb B, et al. An international multicenter performance analysis of cytomegalovirus load tests. *Clin Infect Dis*. 2013;56(3):367-73. Epub 2012/10/26.
354. Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Miller GG, Caliendo AM, Preiksaitis JK. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant*. 2009;9(2):258-68. Epub 2009/01/31.
355. Bai X, Rogers BB, Harkins PC, Sommerauer J, Squires R, Rotondo K, et al. Predictive value of quantitative PCR-based viral burden analysis for eight human herpesviruses in pediatric solid organ transplant patients. *J Mol Diagn*. 2000;2(4):191-201.
356. Karlsson T, Mannonen L, Loginov R, Lappalainen M, Hockerstedt K, Lautenschlager I. Development of a new quantitative real-time HHV-6-PCR and monitoring of HHV-6 DNAemia after liver transplantation. *J Virol Methods*. 2012;181(1):25-36. Epub 2012/02/04.
357. Toyoda M, Moudgil A, Warady BA, Puliyananda DP, Jordan SC. Clinical significance of peripheral blood Epstein-Barr viral load monitoring using polymerase chain reaction in renal transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2008;12(7):778-84. Epub 2008/03/12.
358. Orentas RJ, Schauer DW, Jr., Ellis FW, Walczak J, Casper JT, Margolis DA. Monitoring and modulation of Epstein-Barr virus loads in pediatric transplant patients. *Pediatr Transplant*. 2003;7(4):305-14. Epub 2003/08/02.
359. Pischke S, Gosling J, Engelmann I, Schlue J, Wolk B, Jackel E, et al. High intrahepatic HHV-6 virus loads but neither CMV nor EBV are associated with decreased graft survival after diagnosis of graft hepatitis. *J Hepatol*. 2012;56(5): 1063-9.
360. Basse G, Mengelle C, Kamar N, Ribes D, Selves J, Cointault O, et al. Disseminated herpes simplex type-2 (HSV-2) infection after solid-organ transplantation. *Infection*. 2008;36(1):62-4. Epub 2008/01/01.
361. Amenabar JJ, Duran MI, Montejo M, Lampreabe I. Herpes simplex virus encephalitis in a renal transplant patient. *Nefrologia*. 2006;26(2):270-3. Epub 2006/07/01.
362. Ambrosioni J, Kaiser L, Giostra E, Meylan P, Mentha G, Toso C, et al. Herpes simplex virus load to monitor antiviral treatment after liver transplantation for acute herpetic hepatitis. *Antivir Ther*. 2012;17(2):401-4. Epub 2012/02/01.
363. Razonable RR, Emery VC. Management of CMV infection and disease in transplant patients. 27-29 February 2004. *Herpes*. 2004;11(3):77-86.
364. Razonable RR, Brown RA, Humar A, Covington E, Alecock E, Paya CV. Herpesvirus infections in solid organ transplant patients at high risk of primary cytomegalovirus disease. *J Infect Dis*. 2005;192(8):1331-9.
365. Singh N, Carrigan DR. Human Herpesvirus-6 in transplantation: An emerging pathogen. *Ann Intern Med*. 1996;124:1065-71.
366. Takahashi K, Suzuki M, Iwata Y, Shigeta S, Yamanishi K, De Clercq E. Selective activity of various nucleoside and nucleotide analogues against human herpesvirus 6 and 7. *Antivir Chem Chemother* 1997;8:24-31.

367. de Pagter PJ, Schuurman R, Visscher H, de Vos M, Bierings M, van Loon AM, et al. Human herpes virus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(7):831-9.
368. Imperiale MJ, Major EO. Polyomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2264-98.
369. Ono Y, Ito Y, Kaneko K, Shibata-Watanabe Y, Tainaka T, Sumida W, et al. Simultaneous monitoring by real-time polymerase chain reaction of epstein-barr virus, human cytomegalovirus, and human herpesvirus-6 in juvenile and adult liver transplant recipients. *Transplant Proc.* 2008;40(10):3578-82.
370. Fortun J, Martin-Davila P, Pascual J, Cervera C, Moreno A, Gavaldà J, et al. Immunosuppressive therapy and infection after kidney transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2010;12(5):397-405. Epub 2010/06/18.
371. Betts RF, Freeman RB, Douglas RGJ, Talley TE. Clinical manifestations of renal allograft derived primary cytomegalovirus infection. *Am J Dis Child.* 1977;131:759-63.
372. Zaydfudim V, Feurer ID, Landman MP, Moore DE, Wright JK, Pinson CW. Reduction in corticosteroids is associated with better health-related quality of life after liver transplantation. *J Am Coll Surg.* 2012;214(2):164-73. Epub 2011/12/06.
373. Pouteil-Noble C, Ecochard R, Bosshard S, Lacavalerie B, Donia A, Landrison G, et al. Cytomegalovirus (CMV) excretion as a factor in the severity of CMV disease in kidney and simultaneous kidney and pancreas transplantation. *Transpl Int.* 1992;5 Suppl 1:S26-9. Epub 1992/01/01.
374. Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *NEngl J Med.* 2007;357:2601.
375. Green M. Management of Epstein-Barr virus-induced post-transplant lymphoproliferative disease in recipients of solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2001;1:103-8.
376. Opelz G, Dohler B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant Proc.* 2003;4:222-30.
377. Fischer SA. Emerging viruses in transplantation: there is more to infection after transplant than CMV and EBV. *Transplantation.* 2008;86(10):1327-39.
378. Clark DA, Griffiths PD. Human herpesvirus 6: relevance of infection in the immunocompromised host. *Br J Haematol.* 2003;120:384-95.
379. Brennan DC, Legendre C, Patel D, Mange K, Wiland A, McCague K, et al. Cytomegalovirus incidence between everolimus versus mycophenolate in de novo renal transplants: pooled analysis of three clinical trials. *Am J Transplant.* 2011;11(11):2453-62. Epub 2011/08/05.
380. Couzi L, Helou S, Bachelet T, Moreau K, Martin S, Morel D, et al. High incidence of anticytomegalovirus drug resistance among D+R- kidney transplant recipients receiving preemptive therapy. *Am J Transplant.* 2012;12(1):202-9. Epub 2011/10/05.
381. Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J, Avetisyan G, Sparrelid E, Aschan J, et al. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2006;91(1):78-83.
382. van der Beek MT, Marijt EW, Vossen AC, van der Blij-de Brouwer CS, Wolterbeek R, Halkes CJ, et al. Failure of pre-emptive treatment of cytomegalovirus infections and antiviral resistance in stem cell transplant recipients. *Antivir Ther.* 2012;17(1):45-51. Epub 2012/01/24.
383. Kute VB, Vanikar AV, Shah PR, Gumber MR, Patel HV, Godara SM, et al. Post-renal transplant cytomegalovirus infection: study of risk factors. *Transplant Proc.* 2012;44(3):706-9. Epub 2012/04/10.
384. Charfeddine K, Zaghden S, Kharat M, Kamoun K, Jarraya F, Hachicha J. Infectious complications in kidney transplant recipients: a single-center experience. *Transplant Proc.* 2005;37(6):2823-5.
385. Al-Attas SG, Shehata MI, Esmaeel HM, Radhwan NA. Prognostic value of quantitative-PCR versus serology for detection of CMV in pre- and post- transplantation patients. *Egypt J Immunol.* 2010;17(1):41-8. Epub 2010/01/01.
386. Emery VC, Asher K, Sanjuan CD. Importance of the cytomegalovirus seropositive recipient as a contributor to disease burden after solid organ transplantation. *J Clin Virol.* 2012;54(2):125-9. Epub 2012/03/27.
387. Ugarte-Torres A, Hoegh-Petersen M, Liu Y, Zhou F, Williamson TS, Quinlan D, et al. Donor serostatus has an impact on cytomegalovirus-specific immunity, cytomegalovirus disease incidence, and survival in seropositive hematopoietic cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(4):574-85. Epub 2010/08/07.
388. Rane S, Nada R, Minz M, Sakhuja V, Joshi K. Spectrum of cytomegalovirus-induced renal pathology in renal allograft recipients. *Transplant Proc.* 2012;44(3):713-6. Epub 2012/04/10.
389. Ruiz R, Tomiyama K, Campsen J, Goldstein RM, Levy MF, McKenna GJ, et al. Implications of a positive crossmatch in liver transplantation: A 20-year review. *Liver Transpl.* 2012;18(4):455-60. Epub 2011/12/06.

390. Zeevi A, Marrari M, Feingold B, Webber S, Duquesnoy RJ. Human leukocyte antigen epitope analysis to assess complement- and non-complement-binding donor-specific antibody repertoire in a pediatric heart transplant recipient. *Hum Immunol.* 2012;73(1):48-51. Epub 2011/11/22.
391. Shepherd RW, Turmelle Y, Nadler M, Lowell JA, Narkewicz MR, McDiarmid SV, et al. Risk factors for rejection and infection in pediatric liver transplantation. *Am J Transplant.* 2008;8(2):396-403. Epub 2007/12/29.
392. Viklicky O, Slatinska J, Burgelova M, Vitko S, Urbanova M, Lazanska R, et al. Kidney transplantation at the Institute for Clinical and Experimental Medicine. *Cas Lek Cesk.* 2011;150(1):56-9. Epub 2011/03/17.
393. Erdbruegger U, Scheffner I, Mengel M, Schwarz A, Verhagen W, Haller H, et al. Impact of CMV infection on acute rejection and long-term renal allograft function: a systematic analysis in patients with protocol biopsies and indicated biopsies. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(1):435-43. Epub 2011/06/30.
394. Schag CC, Heinrich RL, Ganz PA. Karnofsky performance status revisited: reliability, validity, and guidelines. *J Clin Oncol.* 1984;2(3):187-93.
395. Smith AR, Majhail NS, MacMillan ML, DeFor TE, Jodele S, Lehmann LE, et al. Hematopoietic cell transplantation comorbidity index predicts transplantation outcomes in pediatric patients. *Blood.* 2011;117(9):2728-34. Epub 2011/01/14.
396. Rao S, D'Cruz AL, Aggarwal R, Chandrashekar S, Chetan G, Gopalakrishnan G, et al. Pediatric liver transplantation: A report from a pediatric surgical unit. *Journal of Indian Association of Pediatric Surgeons.* 2011;16(1):2-7. Epub 2011/03/25.
397. Herthelius M, Celsi G, Edstrom Halling S, Kmar RT, Sandberg J, Tyden G, et al. Renal transplantation in infants and small children. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(1):145-50. Epub 2011/07/26.
398. Echariz A, Pita S, Otero A, Suarez F, Gomez M, Guerrero A. Incidence, risk factors and influence on survival of infectious complications in liver transplantation. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003;21(5):224-31.
399. Digel M, Sinzger C. Determinants of endothelial cell tropism of human cytomegalovirus. In: Reddehase MJ, editor. *Cytomegaloviruses: Pathogenesis, Molecular Biology, and Infection Control.* Norfolk: Caister Scientific Press; 2006. p. 445-64.
400. Delucchi A, Ferrario M, Varela M, Cano F, Rodriguez E, Guerrero JL, et al. Pediatric renal transplantation: a single center experience over 14 years. *Pediatr Transplant.* 2006;10(2):193-7.
401. Wang ZL, Wang XH, Zheng S. Management of pediatric patients who underwent liver transplantation. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2007;45(6):428-31. Epub 2007/09/21.
402. Ivanovski N, Popov Z, Cakalovski K, Masin J, Spasovski G, Zafirovska K. Living-unrelated (paid) renal transplantation—ten years later. *Transplant Proc.* 2005;37(2):563-4.
403. Bassas AF, Chehab MS, Al-Shahed MS, Djurberg HG, Al-Shurafa HA, Jawdat MT, et al. Pediatric living-related liver transplantation in Saudi Arabia. *Saudi Med J.* 2002;23(6):640-4. Epub 2002/06/19.
404. Uchida K. Pediatric renal transplant in Japan. *Nihon Geka Gakkai Zasshi.* 2010;111(5):299-304. Epub 2010/09/25.
405. Paris C, Kopp K, King A, Santolaya ME, Zepeda AJ, Palma J. Cytomegalovirus infection in children undergoing hematopoietic stem cell transplantation in Chile. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;53(3):453-8. Epub 2009/05/07.
406. Liu DH, Zhao XS, Chang YJ, Liu YK, Xu LP, Chen H, et al. The impact of graft composition on clinical outcomes in pediatric patients undergoing unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* 2011;57(1):135-41. Epub 2011/03/19.
407. Al-Dhekri H, Al-Mousa H, Ayas M, Al-Muhsen S, Al-Ghoniim A, Al-Ghanam G, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in leukocyte adhesion deficiency type 1: a single center experience. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17(8):1245-9. Epub 2011/01/12.
408. Lobermann M, Borso D, Hilgendorf I, Fritzsche C, Zettl UK, Reisinger EC. Immunization in the adult immunocompromised host. *Autoimmun Rev.* 2012;11(3):212-8. Epub 2011/05/31.
409. Salavert M, Granada R, Diaz A, Zaragoza R. Role of viral infections in immunosuppressed patients. *Med Intensiva.* 2011;35(2):117-25. Epub 2011/02/18.
410. de Villemeur AB, Gratacap-Cavallier B, Casey R, Baccard-Longere M, Goirand L, Seigneurin JM, et al. Occupational risk for cytomegalovirus, but not for parvovirus B19 in child-care personnel in France. *J Infect.* 2011;63(6):457-67. Epub 2011/08/27.
411. Hyde TB, Schmid DS, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroconversion rates and risk factors: implications for congenital CMV. *Rev Med Virol.* 2010;20(5):311-26. Epub 2010/07/21.

412. Nigro G, Adler SP. Cytomegalovirus infections during pregnancy. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2011;23(2):123-8. Epub 2010/12/16.
413. Boin ID, Boteon YL, Stucchi RS, Pereira MI, Portugal TC, Udo EY. Serological profile of pretransplantation liver patients. *Transplant Proc*. 2010;42(2):491-3. Epub 2010/03/23.
414. Scott GM, Naing Z, Pavlovic J, Iwasenko JM, Angus P, Jones R, et al. Viral factors influencing the outcome of human cytomegalovirus infection in liver transplant recipients. *J Clin Virol*. 2011;51(4):229-33. Epub 2011/06/07.
415. Yinon Y, Farine D, Yudin MH, Gagnon R, Hudon L, Basso M, et al. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can*. 2010;32(4):348-54. Epub 2010/05/27.
416. Hiwarkar P, Gaspar HB, Gilmour K, Jagani M, Chiesa R, Bennett-Rees N, et al. Impact of viral reactivations in the era of pre-emptive antiviral drug therapy following allogeneic haematopoietic SCT in paediatric recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(6):803-8. Epub 2012/11/28.
417. Chen ZP, Cai HB, He Y, Li S, Wang LL, Lao XX, et al. The dissemination of CMV in urine of different group from Guangxi and the relationship between CMV infection and renal disease. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2010;24(3):196-8. Epub 2010/12/29.
418. Walker SP, Palma-Dias R, Wood EM, Shekleton P, Giles ML. Cytomegalovirus in pregnancy: to screen or not to screen. *BMC pregnancy and childbirth*. 2013;13:96. Epub 2013/04/19.
419. Johnson JM, Anderson BL. Cytomegalovirus: should we screen pregnant women for primary infection? *Am J Perinatol*. 2013;30(2):121-4. Epub 2013/01/08.
420. Buxmann H, Stackelberg OM, Schlosser RL, Enders G, Gonser M, Meyer-Wittkopf M, et al. Use of cytomegalovirus hyperimmunoglobulin for prevention of congenital cytomegalovirus disease: a retrospective analysis. *J Perinat Med*. 2012;40(4):439-46. Epub 2012/07/04.
421. Cahill AG, Odibo AO, Stamilio DM, Macones GA. Screening and treating for primary cytomegalovirus infection in pregnancy: where do we stand? A decision-analytic and economic analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;201(5):466 e1-7. Epub 2009/09/29.
422. Milewska-Bobula B, Lipka B, Radziszewska-Konopka M, Sielska-Badurek E, Niepokoj K, Wertheim-Tyssarowska K, et al. Analysis of causes and treatment of hearing loss in children from Department of Infant Diseases the Children's Memorial Health Institute, Warsaw. *Przegl Lek*. 2011;68(1):54-8. Epub 2011/05/14.
423. Bosnjak VM, Dakovic I, Duranovic V, Lujic L, Krakar G, Mam B. Malformations of cortical development in children with congenital cytomegalovirus infection - A study of nine children with proven congenital cytomegalovirus infection. *Coll Antropol*. 2011;35 Suppl 1:229-34. Epub 2011/06/09.
424. Sharland M, Luck S, Griffiths P, Cotton M. Antiviral therapy of CMV disease in children. *Adv Exp Med Biol*. 2011;697:243-60. Epub 2010/12/02.
425. Mercorelli B, Lembo D, Palu G, Loregian A. Early inhibitors of human cytomegalovirus: state-of-art and therapeutic perspectives. *Pharmacology & therapeutics*. 2011;131(3):309-29. Epub 2011/05/17.
426. Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol*. 2007;17(5):355-63.
427. Russell MY, Palmer A, Michaels MG. Cytomegalovirus infection in pediatric immunocompromised hosts. *Infect Disord Drug Targets*. 2011;11(5):437-48. Epub 2011/08/11.
428. George B, Kerridge IH, Gilroy N, Huang G, Hertzberg MS, Bradstock KF, et al. A risk score for early cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation identifies low-, intermediate-, and high-risk groups: reactivation risk is increased by graft-versus-host disease only in the intermediate-risk group. *Transpl Infect Dis*. 2012;14(2):141-8.
429. Caillard S, Moulin B. Transplant patient monitoring. *Rev Prat*. 2007;57(3):299-308.
430. Townsend CL, Peckham CS, Tookey PA. Surveillance of congenital cytomegalovirus in the UK and Ireland. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2011;96(6):F398-403. Epub 2011/02/04.
431. Blyth D, Lee I, Sims KD, Gasink LB, Barton TD, Van Deerlin VM, et al. Risk factors and clinical outcomes of cytomegalovirus disease occurring more than one year post solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2012;14(2):149-55.
432. Baquero-Artigao F. Congenital cytomegalovirus infection: is serological screening during pregnancy necessary?. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(6):363-9. Epub 2009/05/05.
433. Garido RS, Aguado JM, Diaz-Pedroche C, Len O, Montejo M, Moreno A, et al. A review of critical periods for opportunistic infection in the new transplantation era. *Transplantation*. 2006;82(11):1457-62. Epub 2006/12/14.

**X ANEXOS**



## X ANEXOS

### Anexo 1. Planilla de consentimiento informado de las gestantes.

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

El que suscribe: \_\_\_\_\_

Conozco que:

El Citomegalovirus es una Enfermedad Infecciosa viral, diseminada en la población adulta, pero en caso de que se produzca la infección durante el embarazo hay posibilidades de que la misma afecte al feto ocasionando malformaciones congénitas o retraso mental (prevalencia de infección congénita de un 0,2 a un 2 %). El estudio y diagnóstico temprano de una infección congénita por Citomegalovirus puede contribuir a disminuir la morbilidad y mortalidad infantil. El Departamento de Virología del IPK ha estado desarrollando estudios de importancia científica y social sobre la enfermedad por Citomegalovirus.

Conociendo todo lo anteriormente expuesto hago constar por este medio mi disposición y consentimiento informado para participar en el estudio: "Infección Congénita por Citomegalovirus, su diagnóstico prenatal"

Declaro que he sido informada del objetivo del estudio, y que participo en el mismo de forma totalmente voluntaria, y que puedo abandonar el estudio en el momento en que desee. He sido informada que la muestra de sangre obtenida para el estudio no será empleada para realizar ningún otro estudio ni prueba que no sea la del presente proyecto. Por todo lo anterior doy mi consentimiento para que se me realice la extracción de 10 mL de sangre.

Para constancia de lo expuesto anteriormente firmo este documento en \_\_\_\_\_ provincia \_\_\_\_\_, el día \_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del 200\_\_\_\_.

---

**Anexo 2.** Planilla de recogida de datos de las gestantes.

Encuesta del estudio de diagnóstico prenatal de Infección congénita por CMV.

Nombre y Apellidos de la Paciente: \_\_\_\_\_

No. entrada al estudio: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_\_

Dirección Particular: \_\_\_\_\_

Consultorio Médico: \_\_\_\_\_

Antecedentes patológicos personales: \_\_\_\_\_

Historia gestacional: No. embarazos: \_\_\_\_\_ Abortos: \_\_\_\_\_

No de hijos vivos: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Si algún fallecido: No. \_\_\_\_\_ Causa de la muerte: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Historia anterior de hijos nacidos con:

Microcefalia\_\_\_\_, Malformaciones\_\_\_\_, Hepatoesplenomegalia\_\_\_\_, Ictero\_\_\_\_,

Sordera \_\_\_\_\_, Ceguera \_\_\_\_\_, Retraso en el desarrollo psicomotor\_\_\_\_, Trastornos de aprendizaje\_\_\_\_, Calcificaciones cerebrales\_\_\_\_\_

Otras:

Embarazo actual:

Edad gestacional al momento de la encuesta: \_\_\_\_\_

Presencia o ausencia de los siguientes síntomas:

\_\_Fiebre \_\_Fatiga \_\_Dolor de cabeza \_\_Artralgia/Mialgia \_\_Faringitis

\_\_Gripe \_\_Elevación de las enzimas hepáticas \_\_Otros

**Anexo 3.** Operacionalización de las variables de gestantes de tres municipios de La Habana, desde enero del 2007 a enero del 2008.

Variables	Operacionalización de la variable	
	Categorías de la escala	Definición de categorías de la escala
Municipio	Habana Vieja, Centro Habana o Regla	Según el lugar de residencia de la gestante
Edad de la madre	< 20 años (Joven) ≥ 20 años (Adulto)	Se tuvo en cuenta la edad en años cumplida al momento de la captación del embarazo.
Antecedentes patológicos personales	Sí o No cuál	Según lo referido por la paciente y su historia clínica de gestante
Embarazos anteriores	Sí o No Cantidad de hijos, de éstos cuantos vivos, fallecidos y con alteraciones Cantidad de abortos anteriores	Se tuvieron en cuenta la presencia de embarazos, hijos y abortos anteriores referidos por la gestante y su historia clínica. Las alteraciones estuvieron dadas por la presencia de microcefalia, malformaciones, hepatoesplenomegalia, íctero, sordera, ceguera, retraso en el desarrollo psicomotor, trastornos de aprendizaje, calcificaciones cerebrales
IgG anti CMV	Positiva o Negativa	Según el valor de corte del estuche comercial
IgM anti CMV	Positiva o Negativa	Según el valor de corte del estuche comercial
Avidez	Alta (> 60 %) Intermedia (50-60 %) Baja (<50 %)	Según lo establecido por De Souza y colaboradores (117)
Seroconversión	Sí o No	Según la aparición de IgG o IgM anti CMV, en una paciente no infectada anteriormente
Re-activación o re-infección por CMV	Sí o No	Presencia de Acs IgM y de IgG anti CMV, así como alta e intermedia avidéz
Infección primaria	Sí o No	Presencia de Acs IgM y de IgG anti CMV, así como baja avidéz o seroconversión de Acs anti CMV
PCR cualitativo en orina y/o saliva	Positiva o Negativa	Detección del ADN del CMV, VHS, VHH6, VZ o VEB
PCR-TR (uso como variable cualitativa)	≥10 copias/μL: Positiva <10 copias/μL: Negativa	Detección y cuantificación del ADN del CMV

y Carga viral (variable cuantitativa) en saliva y/o orina	Numérico	
Síntomas y signos durante la gestación	Sí o No	Definido por la presencia de al menos uno de los siguientes síntomas: fatiga, fiebre, gripe, artralgias, mialgias, cefalea, faringitis, elevación de las enzimas hepáticas. O la presencia en las historias clínicas de las gestantes de: polihidramnios, alteraciones fetales como CIUR, sufrimiento fetal agudo, hiperecogenicidad intestinal, microcefalia, ventriculomegalia y malformaciones fetales (45).

Abreviaturas: ADN: ácido desoxiribonucleico, CMV: Citomegalovirus, VHS: Virus Herpes Simple, VVZ: Virus Varicela Zóster, VEB: Virus Epstein Barr, VHH6: Virus Herpes Humano 6, PCR: reacción en cadena polimerasa, PCR-TR: reacción en cadena polimerasa en tiempo real, Acs: anticuerpos, IgG: inmunoglobulina G, IgM: inmunoglobulina M, µL: microlitro, CIUR: crecimiento intrauterino retardado.

**Anexo 4.** Planilla de consentimiento informado de padres o tutores.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

El que suscribe: \_\_\_\_\_

Conozco que:

El Citomegalovirus es una Enfermedad Infecciosa viral, diseminada en la población adulta, pero en caso de que se produzca la infección durante el embarazo hay posibilidades de que la misma afecte al feto ocasionando malformaciones congénitas o retraso mental (prevalencia de infección congénita de un 0,2 a un 2%). El estudio y diagnóstico de la infección congénita por Citomegalovirus y otros herpesvirus en mi hijo puede contribuir a la prevención de complicaciones secundarias a la infección, como es la sordera, el retraso mental, para que pueda tener un mejor aprendizaje y tratamiento. El Departamento de Virología del IPK ha estado desarrollando estudios de importancia científica y social sobre la enfermedad por Citomegalovirus.

Conociendo todo lo anteriormente expuesto hago constar por este medio mi disposición y consentimiento informado para que mi hijo participe en el estudio: "Infección Congénita por Citomegalovirus, su diagnóstico prenatal"

Declaro que hemos sido informados del objetivo del estudio y que participo en el mismo de forma totalmente voluntaria, y que puedo abandonar el estudio en el momento en que desee. He sido informada que las muestras de orina y saliva obtenidas para el estudio no será empleada para realizar ningún otro estudio ni prueba que no sea la del presente proyecto. Por todo lo anterior doy mi consentimiento para que se le realice a mi hijo la colección de 2 mL de orina y de saliva mediante un hisopo estéril.

Para constancia de lo expuesto anteriormente firmo este documento en \_\_\_\_\_ provincia \_\_\_\_\_, el día \_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del 200\_\_.

\_\_\_\_\_  
Firma de ambos padres

**Anexo 5.** Planilla de recogida de datos de los recién nacidos.

Infección congénita por CMV en Cuba. Encuesta de datos de los recién nacidos.

Nombre y Apellidos del Paciente: \_\_\_\_\_

No. entrada al estudio de la madre: \_\_\_\_\_

Edad en días: \_\_\_\_\_ Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_\_

Dirección Particular: \_\_\_\_\_

Consultorio Médico: \_\_\_\_\_

Tipo de parto: \_\_\_\_\_, Apgar \_\_\_\_\_

Datos positivos al examen físico al nacimiento y en las primeras 72 horas de vida:

Microcefalia \_\_\_\_\_

Malformaciones \_\_\_\_\_, dismorfias \_\_\_\_\_

Hepatoesplenomegalia \_\_\_\_\_, hepatitis \_\_\_\_\_

Ictero \_\_\_\_\_

Trombocitopenia \_\_\_\_\_, petequias \_\_\_\_\_

Ausencia o alteración de los reflejos: \_\_\_\_\_

Otras: \_\_\_\_\_

Examen físico general: \_\_\_\_\_

Conclusión: Normal \_\_\_\_\_ o Alterado \_\_\_\_\_

Examen físico regional: \_\_\_\_\_

Conclusión: Normal \_\_\_\_\_ o Alterado \_\_\_\_\_

Talla: \_\_\_\_\_ cm

Peso: \_\_\_\_\_ Kg

Edad/ peso: \_\_\_\_\_ (percentil)

Edad/talla: \_\_\_\_\_ (percentil)

**Anexo 6.** Datos del niño congénitamente infectado.

Nombre y apellidos del niño: \_\_\_\_\_

Edad \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Talla: \_\_\_\_\_ cm

Peso: \_\_\_\_\_ Kg

Edad/ peso: \_\_\_\_\_ (percentil)

Edad/talla: \_\_\_\_\_ (percentil)

Circunferencia cefálica/edad: \_\_\_\_\_ (percentil)

**Secuelas:**

Examen físico general: \_\_\_\_\_

Conclusión: Normal \_\_\_\_\_ o Alterado \_\_\_\_\_

Examen físico regional: \_\_\_\_\_

Conclusión: Normal \_\_\_\_\_ o Alterado \_\_\_\_\_

Desarrollo psicomotor:

Función motora gruesa: \_\_\_\_\_

Conclusión: Normal \_\_\_\_\_ o Alterado \_\_\_\_\_

Función motora fina: \_\_\_\_\_

Conclusión: Normal \_\_\_\_\_ o Alterado \_\_\_\_\_

Leguaje: \_\_\_\_\_

Conclusión: Normal \_\_\_\_\_ o Alterado \_\_\_\_\_

Afectividad: \_\_\_\_\_

Conclusión: Normal \_\_\_\_\_ o Alterado \_\_\_\_\_

Socialización: \_\_\_\_\_

Conclusión: Normal \_\_\_\_\_ o Alterado \_\_\_\_\_

Conclusión del desarrollo psicomotor: Normal \_\_\_\_\_ o Alterado \_\_\_\_\_

Otros elementos de interés:

Resultados de complementarios:

Audiometría:

Potenciales evocados:

Exploración visual:

Ultrasonido transfontanelar:

**Anexo 7.** Operacionalización de las variables de los hijos de madres con infección viral activada tres municipios de La Habana, desde junio del 2007 a diciembre del 2011.

Variable	Operacionalización de la variable	
	Categorías de la escala	Definición de categorías de la escala
Tipo de parto	Eutócico Distócico (Cesárea o con instrumentaciones obstétricas)	Según historia clínica del recién nacido
Apgar	Puntuación de 0-10	Según historia clínica del recién nacido, al nacer y a los 5 minutos de vida
Valoración ponderal al nacer y peso del niño	<3er percentil bajo peso, 3-97 percentil normopeso, >97 percentil sobrepeso	Definida como peso en Kg en la primera hora de vida y clasificada según la valoración nutricional peso / edad en las tablas cubanas confeccionadas al efecto.
Valoración estatural al nacer y del niño	<3er percentil baja talla, 3-97 percentil talla normal, >97 percentil alto	Definida como la talla en cm en la primera hora de vida y clasificada según la valoración talla / edad en las tablas cubanas confeccionadas al efecto.
Valoración de la circunferencia cefálica al nacer y del niño	Microcefálico: <3er percentil, Circunferencia cefálica normal: 3-97 percentil, Macrocefálico: >97 percentil	Definida en cm y clasificada según la valoración circunferencia cefálica / edad en las tablas cubanas confeccionadas al efecto.
Examen físico al nacer	Sí o sintomático No o asintomático	Según la presencia en la historia clínica del recién nacido de: microcefalia, malformaciones, dismorfias, hepatoesplenomegalia, hepatitis, íctero, trombocitopenia, petequias, ausencia de reflejos, CIUR, anemia, neumonía, alteraciones en el examen neurológico (disminución o abolición de los reflejos) (45).
PCR cualitativo en saliva y/o orina	Positivo Negativo	Detección del ADN del CMV, VHS, VHH6, VVZ o VEB.
PCR-TR (uso como variable cualitativa) y Carga viral en saliva y/o orina (uso como variable cuantitativa)	≥10 copias/μL: Positiva <10 copias/μL: Negativa Numérico	Detección y cuantificación del ADN del CMV
Excreción viral o infección congénita por CMV	Sí No	Dado por la positividad de cualquiera de las variables PCR cualitativa y PCR-TR en cualquiera de las muestras del recién nacido



Transmisión placentaria	Sí No	Dada por la presencia de infección congénita por CMV en los hijos de aquellas gestantes detectadas con infección activa.
Secuelas	Sí No	Según la aparición de alteraciones en el examen físico general y regional y complementarios de los infectados congénitamente en las consultas de neurodesarrollo y pediatría. Las alteraciones pueden ser: sordera o hipoacusia (alteración de los potenciales evocados y audiometría), ceguera, lesión en encéfalo detectada por ultrasonido transfontanelar (calcificaciones periventriculares, atrofia cortical, lisencefalia, ventriculomegalia), retraso en el desarrollo psicomotor (afectación de la función motora gruesa o fina, el lenguaje, la afectividad o la socialización) (45).

Abreviaturas: Kg: kilogramos, cm: centímetros, ADN: ácido desoxiribonucleico, CMV: Citomegalovirus, VHS: Virus Herpes Simple, VZ: Virus Varicela Zóster, VEB: Virus Epstein Barr, VHH6: Virus Herpes Humano 6, PCR: reacción en cadena polimerasa, PCR-TR: reacción en cadena polimerasa en tiempo real, IgG: inmunoglobulina G, IgM: inmunoglobulina M, µL: microlitro, SNC: sistema Nervioso Central, CIUR: crecimiento intrauterino retardado.

**Anexo 8.** Documento de consentimiento informado para los padres o tutores de los receptores de trasplante y sus donantes.

Seguimiento de herpesvirus en pacientes receptores de trasplante en edad pediátrica

Por medio de la presente solicitamos su colaboración, absolutamente voluntaria, para ser incluido en este proyecto.

Actualmente, los trasplantes se han convertido en procedimientos de elección, frente a fallos irreversibles en diversos órganos de la biología humana. Sin embargo, este logro del trasplante puede verse interrumpido por la aparición de infecciones con diversos agentes virales. Actualmente en Cuba no se realiza un seguimiento del paciente trasplantado con relación a la aparición de infección activa por los agentes virales más comunes. Con este estudio pretendemos realizar un seguimiento de los pacientes trasplantados en edad pediátrica, con el objetivo de diagnosticar tempranamente la presencia de agentes virales para así poder evitar, en la medida de lo posible, la aparición de complicaciones producidas por estos virus.

El resultado de este trabajo contribuirá a elevar la calidad de vida de los pacientes trasplantados en edad pediátrica y permitirá establecer las pautas cubanas relacionadas con el seguimiento virológico del paciente trasplantado con el objetivo de predecir y en la medida de lo posible actuar a tiempo, en aquellos pacientes que presenten infecciones por alguno de los agentes virales que se estudiarán en este proyecto.

Para este estudio se necesitarán diversas muestras que permitan diagnosticar y realizar el seguimiento de los diferentes agentes virales que se estudiarán. Se obtendrán muestras de sangre de los niños y de sus donantes previo al trasplante, posteriormente se tomarán muestras de sangre, orina, saliva y heces fecales a todos aquellos niños trasplantados (ya sea de órgano sólido o de células precursoras hematopoyéticas) con una frecuencia semanal durante un mes, quincenal hasta completar tres meses, y luego mensual hasta los seis meses después del trasplante. A los mismos se le realizará el seguimiento de la carga viral mediante PCR en Tiempo Real, para detectar la presencia de VHS, CMV, VEB, VHH6 y VVZ.

Las muestras serán tomadas en el laboratorio clínico de cada hospital donde se realice el trasplante y el seguimiento médico de cada paciente, por personal autorizado y con experiencia en ese menester, y cumpliendo todas las normas ética y de bioseguridad. Las muestras obtenidas para el estudio no serán empleadas para realizar ningún otro estudio ni prueba que no sea lo estrictamente estipulado en el presente proyecto.

Los resultados obtenidos serán estrictamente confidenciales, por lo que serán de dominio sólo de los autores del estudio y de los sujetos participantes.

Respetando los principios de voluntariedad, los participantes están en todo su derecho de decidir si desean o no colaborar con el estudio y una vez en el, puede solicitar su exclusión en cualquier etapa del mismo, si así lo deseara. Esa decisión será respetada y no conlleva a ninguna penalidad o pérdida de los beneficios, a los cuales tienen derecho. A cada uno de los participantes se le informará el resultado de sus estudios en las diferentes fases del proyecto hasta la conclusión final, y se les explicará el resultado si así lo desean. Los resultados de dichos estudios serán utilizados y publicados de forma anónima.

De acuerdo con lo planteado en este documento, yo

\_\_\_\_\_

en pleno uso de mis facultades, accedo a colaborar con este proyecto.

Del mismo modo certifico que participaré en dicho estudio de una forma absolutamente voluntaria, teniendo derecho a conocer los resultados del examen a mi realizado. Certifico por la presente que autorizo a las entidades sanitarias nacionales y/o extranjeras, al comité ético a que consulten los informes hospitalarios que posean mi nombre, sin que por ello pierdan su carácter confidencial.

Nombre y Apellidos del paciente y los padres o tutores participantes en el estudio:

Firma del paciente y padres o tutores participantes en el estudio:

Nombre y Apellidos del testigo:

Firma del testigo:

Fecha:

Nombre y Apellidos del donante:

Firma del donante:

Yo: \_\_\_\_\_ responsable del Protocolo de Investigación certifico por medio de la presente haberle explicado al paciente todo lo relacionado con este estudio e igualmente certifico que el mismo ha participado de forma absolutamente voluntaria en el ensayo.

Fecha: \_\_\_\_\_ Firma \_\_\_\_\_

**Anexo 9.** Encuesta de Datos de los pacientes trasplantados.

Seguimiento de herpesvirus en pacientes receptores de trasplante en edad pediátrica

Nombre y Apellidos del paciente: \_\_\_\_\_

HCl: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

APP: \_\_\_\_\_ Grupo y factor sanguíneo: \_\_\_\_\_

Enfermedad causante del trasplante: \_\_\_\_\_

Fecha del trasplante: \_\_\_\_\_

Tipo de trasplante: \_\_\_\_\_

Tipo de donante: vivo: \_\_\_\_\_ fallecido: \_\_\_\_\_

Complicaciones infecciosas (agente infeccioso, localización de la infección, principales síntomas y signos, fecha y duración):

Bacterianas: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Virales: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Otras: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Rechazo al trasplante: sí \_\_\_\_\_ no \_\_\_\_\_ fecha: \_\_\_\_\_

Pérdida del órgano trasplantado: sí \_\_\_\_\_ no \_\_\_\_\_ fecha: \_\_\_\_\_

Muerte: sí \_\_\_\_\_ no \_\_\_\_\_ fecha: \_\_\_\_\_

Medicamentos utilizados: (*nombre, dosis, duración del tto*)

Inmunosupresores: \_\_\_\_\_

Antibióticos: \_\_\_\_\_

Antivirales: \_\_\_\_\_

Serología pre-trasplante:

Donante: CMV IgM \_\_\_ IgG \_\_\_ EBV IgM \_\_\_ IgG \_\_\_ VHS IgM \_\_\_ IgG \_\_\_

Receptor: CMV IgM \_\_\_ IgG \_\_\_ EBV IgM \_\_\_ IgG \_\_\_ VHS IgM \_\_\_ IgG \_\_\_

Otros aspectos de interés:

## Anexo 10. Operacionalización de las variables analizadas de los pacientes trasplantados.

Variables	Operacionalización de la variable	
	Categorías de la escala	Definición de categorías de la escala
Sexo	F M	Dado por lo referido en la historia clínica
Edad	Numérico ≥10 años o <10 años	Se tuvo en cuenta la edad en años cumplida al momento del trasplante.
Antecedentes patológicos personales	Sí o No Cuál	Dado por lo referido en la historia clínica
Enfermedad causante del trasplante	Cuál	Dado por lo referido en la historia clínica
Tipo de trasplante	Hígado Riñón TCPH	Dado por lo referido en la historia clínica
Tipo de donante	Vivo Fallecido	Dado por lo referido en la historia clínica
Semanas de evolución	Numérico	Se tuvo en cuenta el momento de cada toma de muestra según el tiempo transcurrido desde el trasplante.
Serología tipo IgG e IgM frente a CMV, VEB y VHS	Positiva Negativa	Según el valor de corte del estuche comercial
Medicamentos inmunosupresores	Sí o No cuál	Según lo referido en la historia clínica y en la planilla de recolección de los datos de los pacientes
PCR-TR (variable cualitativa) o detección herpesviral y Carga viral en suero, saliva, orina y/o en heces (variable cuantitativa)	≥10 copias/mL: Positiva <10 copias/mL: Negativa Numérico	Detección del ADN de CMV, VEB, VHS, VHH6 y VVZ
Infección primaria	Sí No	Dado por la presencia de detección a un herpesvirus para el que fuera previamente negativo antes del injerto.
Infección activa no primaria	Sí No	Dado por la presencia de detección a un herpesvirus para el que fuera previamente positivo antes del injerto.
Detección viral	Sí o No	Dado por la positividad de PCR-TR en cualquiera de las muestras del trasplantado.
Co-infección y co-infección viral	Sí No	Dado por la presencia de varios agentes microbiológicos, bacterianos y virales o solo virales.

Complicaciones por virus	Sí No	Definido por la presencia de al menos uno de los signos y síntomas asociados a enfermedad por CMV, VEB, VHS y VVZ: síndrome febril (>38°C por más de 2 días), leucopenia, trombocitopenia, síntomas de enfermedad pulmonar (en ausencia de otra causa evidente documentada), síntomas de enfermedad gastrointestinal alta o baja con lesiones en mucosas macroscópicas por endoscopia, sangramiento digestivo alto, elevación de enzimas hepáticas dos veces por encima de los valores normales, hepatoesplenomegalia, aumento de creatinina, necrosis tubular aguda, nefritis intersticial asociada a rechazo agudo del injerto, nefropatía crónica, lesiones orolabiales o genitales vesiculares, disfunción del órgano sin otra causa asociada confirmado por anatomía patológica, síndrome mononucleósico, desordenes linfoproliferativos, síntomas de enfermedad en SNC en ausencia de otra causa documentada, cistitis hemorrágica (52, 111).
Complicaciones bacterianas o micológicas	Sí No	Definido por la presencia de alguna de las siguientes complicaciones: infección localizada en algún órgano específico o sistémica confirmada por cultivo positivo a alguna bacteria u hongo (433).
Complicaciones por otra causa y rechazo.	Sí No Cuál Causa	Dado por lo referido en la historia clínica y diagnosticado clínica, por complementarios e histológicamente como: rechazo*, enfermedad de injerto contra huésped**, disfunción precoz del injerto***, signos de complicaciones quirúrgicas en el post-operatorio inmediato (dehiscencia de la herida, enfermedad veno-occlusiva), síndrome febril de etiología no precisada, reactivación de enfermedad de base, encefalopatía hepática.
Pérdida del órgano trasplantado	Sí o No Causa	Dado por lo referido en la historia clínica
Muerte	Sí o No Causa	Dado por lo referido en la historia clínica

\*En el caso de TH el diagnóstico se realiza clínicamente y por complementarios, solo en algunos casos por histología. En el TR el diagnóstico se realiza clínicamente, por complementarios e histológicamente. \*\*El diagnóstico se realiza clínica e histológicamente. \*\*\* El diagnóstico se realiza clínicamente y por complementarios. Abreviaturas: ADN: ácido desoxiribonucleico, CMV: Citomegalovirus, VHS: Virus Herpes Simple, VVZ: Virus Varicela Zóster, VEB: Virus Epstein Barr, VHH6: Virus Herpes Humano 6, mL: mililitro, D: Donante, R: Receptor, PCR: reacción en cadena polimerasa, PCR-TR: reacción en cadena polimerasa en tiempo real, IgG: inmunoglobulina G, IgM: inmunoglobulina M, SNC: sistema Nervioso Central, °C: grados celcius, TCPH: Trasplante células progenitoras hematopoyéticas, F: Femenino, M: Masculino.

**Anexo 11.** Información demográfica y terapéutica pre-trasplante de los receptores de trasplante.

Características de los Pacientes		Total de pacientes	Hígado		Riñón		Trasplante de células precursoras hematopoyéticas	
Sexo	Femenino	15	11		4		0	
	Masculino	14	8		4		2	
Media de la edad (rango)		12 (1-17)	9,6 (1-17)		13,3 (7-16)		14 (10-17)	
Enfermedad causante del trasplante n (%)			Atresia biliar	6 (31,6)	Glomerulo-esclerosis segmentaria focal	2 (25)	Leucemia promielocítica aguda	1 (50)
			Cirrosis Criptogénica	7 (31,6)	Enfermedad renal de origen desconocido	4 (50)	Leucemia mieloide aguda	1 (50)
			Retrasplante por no tomar tratamiento inmunosupresor	2 (10,5)	Uropatía obstructiva	1 (12,5)		
			Fallo hepático fulminante	1 (5,3)	Glomerulopatía	1 (12,5)		
			Hepatitis autoinmune	2 (10,6)				
			Síndrome Budd Chiari	1 (5,3)				
Donante	Vivo (%)	6 (20.7)	4 (21.1)		0		2* (100)	
	Fallecido (%)	23 (79.3)	15 (79.9)		8 (100)		0	
Régimen inmunosupresor † (%) y Régimen acondicionamiento ‡ (%) para TCPH			Metil-Prednisona †	19 (100)	Prednisona †	8 (100)	Ciclofosfamida †‡	2 (100)
			Ciclosporina †	8 (42,1)	Ciclosporina †.&	6 (75)	Metotrexate † en los días 1, 3, 6 y 11	2 (100)
			o Tacrolimus †	11 (57,9)	o Tacrolimus †	2 (25)		
			Micofenolato mofetil (MMF) †	16 (84,2)	Si se usó Ciclosporina † entonces se indicó MMF †	6 (75)	Etopósido en el alogénico †	1 (50)
			Basiliximab †	3 (15,8)	Basiliximab †	5 (62,8)	Irradiación corporal total	2 (100)
					o Timoglobulina †	2 (25)		
Profilaxis antimicrobiana perioperatoria			Cefotaxima + ampicilina	18 (94,7)	Cefazolina	7 (87,5)	Cotrimoxazol	2 (100)

		Vancomicina + meropenem	1 (5,3)	Cotrimoxazol	8 (100)	Ciprofloxacina	2 (100)
		Sulfametoxazol/trimetoprin	19 (100)	Nistatina	8 (100)	Fluconazol	2 (100)
		Nistatina	19 (100)				
Profilaxis antiviral (tiempo)		Ganciclovir /valganciclovir (1 mes)		Ganciclovir/valganciclovir (3 meses)		Aciclovir (4 semanas)	
		Aciclovir (2 meses, luego del tratamiento con ganciclovir)					
Muestras analizadas	554	332		183		39	

Fuente: Historias clínicas.

\*Un trasplante de células precursoras hematopoyéticas fue autólogo. Régimen inmunosupresor † se empleó en todos los receptores de trasplante y el Régimen acondicionamiento, ‡ sólo se empleó para los receptores de trasplante de células precursoras hematopoyéticas. & En dos casos se suspendió la ciclosporina por nefrotoxicidad y los pacientes se mantuvieron con anti CD25, micofenolato mofetil y prednisona.

Abreviaturas: TCPH: trasplante de células precursoras hematopoyéticas, MMF: Micofenolato mofetil.



**Anexo 12.** Tratamiento inmunosupresor y antiviral de receptores de TR según el “Protocolo de Trasplante Renal, 1988, Hospital Pediátrico Universitario de Centro Habana”

### **Esquema inmunosupresor empleado en TR**

A Esquema de inducción (4 horas previas al trasplante):

1-Ciclosporina neoral (100mg/ 1mL): de elección, vía oral 8-10 mg/Kg o Tacrolimus: 0,1-0,2 mg/Kg/día (si hay disponibilidad y posibilidad de dosificación en sangre, se utiliza preferiblemente como tratamiento de rescate)

2-Micofenolato mofetil (500mg/ tab): 600-1 200 mg/metro cuadrado (m<sup>2</sup>)

3-Anti CD25: indicado en pacientes con retrasplante, hipersensibilizados o muy inmunogénicos. Monoclonales: Basiliximab (infusión endovenosa, en dos subdosis día 0 y 4): <30 Kg de peso 10 mg y en >30 Kg 20 mg o Daclizumab (5 mL, 5 mg/mL): 1 mg/Kg, 24 horas antes del trasplante y 4 dosis cada 14 días.

o Policlonales (es necesaria la premedicación con metilprednisolona, antihistamínicos y antipiréticos): Timogan (globulina antitímocítica equina, 250 mg/5 mL): 15 mg/Kg en 8-12 horas durante 14 días, seguida de administración cada 48 horas durante otros 14 días o Timoglobulina (25 mg/5 mL): 1,25-2,5 mg/Kg/día en 6 horas durante 1-3 semanas. Ambas se utilizan en infusión endovenosa a través de una vena central en solución salina.

B Tratamiento durante el transoperatorio:

Metilprednisolona: 15 mg/Kg, la mitad de la dosis al inicio de la sutura venosa o por perfusión continua transoperatoria.

C Día cero:

Micofenolato mofetil (500 mg): 600-1 200 mg/m<sup>2</sup>/dividido en dos dosis + Metilprednisolona: pasar la segunda mitad de la dosis del transoperatorio

D A partir del primer día:

Ciclosporina (4-8 mg/Kg/día, se comienza cuando se normaliza la función renal. Se debe monitorear la dosificación de ciclosporinemia dos veces por semana, introducción de la Ciclosporina (Neoral) cuando la creatinina sea < 2 mg/decilitro (dL) a razón de 8 mg/kg/día en 2 subdosis, con una ciclosporinemia al momento (C<sub>0</sub>) entre 150-250 nanogramos (ng)/mL o a las dos horas (C<sub>2</sub>) según el tiempo de trasplantado) o Tacrolimus (0,10-0,30 mg/kg/día en dos subdosis hasta niveles entre 10-15 ng/mL en el postrasplante inmediato y posteriormente 5-10 ng/mL)

+ Prednisona (primera semana 2 mg/Kg/día, segunda semana 1,5 mg/Kg/día, tercera semana 1,0 mg/Kg/día, cuarta semana 0,5 mg/Kg/día, tercer mes 0,25 mg/Kg/día)

+ Micofenolato mofetil (500 mg, 600-1 200 mg/m<sup>2</sup>, en dos subdosis sin pasar de 2 gramos diarios.  
Meta de los niveles: entre 2-5 ng/ml).

Niveles recomendados de ciclosporinemia: **C<sub>0</sub>** (primer mes: 250-350 ng/mL, segundo al tercer mes: 200-300 ng/mL, desde el cuarto mes hasta el año: 150-200 ng/mL y a partir del año: 100-200 ng/mL) y **C<sub>2</sub>** (primer mes: 1 150-1 550 ng/mL, segundo al tercer mes: 800-1200 ng/mL, desde el cuarto al sexto mes: 750-900 ng/mL y a partir del sexto mes: hasta 650 ng/mL).

### **Tratamiento antiviral:**

Se indica el valganciclovir (de elección) o el ganciclovir durante tres meses como profilaxis universal en los receptores.

Valganciclovir (450 mg) inicio tras el trasplante según la función renal:

Filtrado glomerular  $\geq 60$  mL/1,73 m<sup>2</sup> de superficie corporal, 900 mg al día

Filtrado glomerular 40 a 59 mL/1,73 m<sup>2</sup> de superficie corporal 450 mg al día

Filtrado glomerular 25 a 39 mL/1,73 m<sup>2</sup> de superficie corporal 450 mg cada 2 días

Filtrado glomerular 10 a 24 mL/1,73 m<sup>2</sup> de superficie corporal 450 mg 2 veces a la semana.

Filtrado glomerular < 10, no recomendada.

Dosis máxima de 900 mg diario y se recomienda una dosis diaria. Para los pacientes pediátricos se prefiere el polvo para la solución oral que viene en frasco de 60 ml y contiene 12 gramos. Cucharadita de 5 ml=100 mg

En el niño de 4 meses a 16 años de edad la dosis profiláctica se haya con la siguiente fórmula:

Dosis (mg)= 7 x Superficie corporal x filtrado glomerular teórico (Fórmula de Schwartz)

Si el filtrado glomerular es mayor de 150 mL/1,73 m<sup>2</sup> se debe usar como mayor valor en la ecuación esta cifra.

Ganciclovir: 10 mg/Kg/24 horas repartido en 2 dosis endovenosas. La dosis será ajustada en función del aclaramiento de creatinina:

> de 50 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>: dosis habitual

entre 25-50 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>: 2,5 mg/Kg/12 horas

entre 10-25 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>: 2,5 mg/Kg/24 horas

< de 10 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>: 1,25 mg/Kg/24 horas

En aquellos casos con enfermedad clínica con o sin confirmación del laboratorio causada por VHS o VVZ se indica el Aciclovir (10 mg/Kg/día), así como el ganciclovir/valganciclovir en los casos con manifestaciones clínicas con sospecha de etiología citomegálica con o sin confirmación del laboratorio.

Valganciclovir: tratamiento durante un mínimo de 21 días

Filtrado glomerular  $\geq 60$  mL/1,73 m<sup>2</sup> de superficie corporal 900 mg 2 veces al día

Filtrado glomerular 40 a 59 mL/1,73 m<sup>2</sup> de superficie corporal 450 mg 2 veces al día

Filtrado glomerular 25 a 39 mL/1,73 m<sup>2</sup> de superficie corporal 450 mg diario

Filtrado glomerular 10 a 24 mL/1,73 m<sup>2</sup> de superficie corporal 450 mg cada 2 días.

Filtrado glomerular < 10 no recomendado

El tiempo de tratamiento esta en dependencia de la respuesta clínica y virológica del paciente.

Anticipado: Se recomienda que el médico de asistencia valore la posibilidad del empleo de valganciclovir/ganciclovir (igual a la empleada en el tratamiento terapéutico) o el Aciclovir (igual a la empleada en la profilaxis) en aquellos casos con detección del CMV o del VHS o el VVZ, respectivamente, en muestras de un receptor asintomático, previo a la aparición de complicaciones de origen viral.

**Anexo 13.** Tratamiento inmunosupresor y antiviral de receptores de TH según el “Protocolo de Trasplante Hepático en Pediatría, 2005, Hospital Pediátrico Universitario William Soler”.

### **Esquema inmunosupresor:**

La inmunosupresión primaria se realiza con ciclosporina o tacrolimus, esteroides y micofenolato mofetil (si se usa ciclosporina). De ser trasplante de donante vivo agregar basiliximab.

Anticalcineurínicos:

Ciclosporina Neoral (vía oral): 10 mg/Kg/dosis en las primeras seis horas tras cierre de piel y posteriormente 10 mg/Kg/24 horas en dos dosis. Si no se alcanza nivel mínimo de ciclosporinemia (200–250 ng/mL en 48 horas o 250–350 ng/mL en 5 días) se suplementa con ciclosporina endovenosa (1-2 mg/Kg/24 horas en perfusión continua). Las dosis se modifican en base a la evidencia clínica de toxicidad, eficacia y para mantener los niveles en sangre (primeras dos semanas: 250 - 350 ng/mL, 3-12 semanas: 200 - 300 ng/mL, 4-12 mes: 150 - 200 ng/mL, posteriormente: 100 - 150 ng/mL).

Tacrolimus (solo se emplea en el trasplante de donante vivo): 0,15-0,3 mg/Kg/24 horas vía oral en 2 dosis. La dosis se modifica en base a la evidencia clínica de toxicidad, eficacia y para mantener los niveles en sangre (0- 2 semanas: 10–20 ng/mL, 3- 4 semanas: 10 – 15 ng/mL, 2- 3 mes: 5–15 ng/mL y posteriormente 5–10 ng/mL.

Esteroides (Metilprednisona): Intraoperatoria de 10 mg/Kg en bolo endovenoso en 20 min en el momento de la reperfusión del injerto, día 1- 6: 2 mg/Kg/24 horas endovenoso, día 7-13: 1 mg/Kg/24 horas vía oral en una sola dosis a partir de este momento, día 14- 20: 0,75 mg/Kg/24 horas, día 21-28: 0,5 mg/Kg/24 horas, en el mes 2 y 3: 0,25 mg/Kg/24 horas y hasta el año: 0,25 mg/Kg/48 horas.

Micofenolato Mofetil (Se utiliza si el anticalcineurínico usado es la ciclosporina, vía oral): 30 mg/Kg/24 horas en dos dosis (máximo 1 g/ 24 horas) durante 3 meses. Se reduce la dosis si los leucocitos <5 000/milímetro cúbico ( $\text{mm}^3$ ) plaquetas <50 000/ $\text{mm}^3$  y se suspende si leucocitos <3 000/ $\text{mm}^3$ .

Monoclonales (anti CD25, en trasplantes hepáticos de donante vivo):

Basiliximab: 2 únicas dosis endovenosas, la primera entre 2 horas antes y 8 horas después del trasplante y la segunda en el cuarto día post-trasplante. <= 20 Kg usar 10 mg, >20 Kg administrar 20 mg.

O Daclizumab: 1-2 mg/Kg/dosis endovenoso con 5 dosis, la primera dosis antes de la reperfusión y después se emplea cada 14 días hasta completar las 5 dosis.

### **Tratamiento antiviral:**

Profilaxis

- Valganciclovir: 520 mg/m<sup>2</sup>/12 horas vía oral (máximo: 450 mg/dosis)

Inicio tras el trasplante hepático en cuanto lo permitan las cifras de leucocitos (más de 3 000 /mm<sup>3</sup>) y plaquetas (más de 50 000 /mm<sup>3</sup>). Duración: un mes.

En ausencia de valganciclovir:

- Ganciclovir: 10 mg/Kg/24 horas repartido en 2 dosis endovenosas. Duración: un mes.

La dosis será ajustada en función del aclaramiento de creatinina:

> de 50 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>: dosis habitual

entre 25-50 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>: 2,5 mg/Kg/12 horas

entre 10-25 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>: 2,5 mg/Kg/24 horas

< de 10 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>: 1,25 mg/Kg/24 horas

También se indica el aciclovir (10mg/ Kg/ día) durante dos meses luego del empleo del ganciclovir/valganciclovir como profilaxis.

En aquellos casos con enfermedad clínica con o sin confirmación del laboratorio causada por VHS o VVZ se indica el Aciclovir (10 mg/Kg/ día), así como el ganciclovir/valganciclovir en los casos con manifestaciones clínicas con sospecha de etiología citomegálica con o sin confirmación mediante métodos de laboratorio.

Anticipado. Se recomienda que el médico de asistencia valore la posibilidad del empleo de ganciclovir/valganciclovir (10 mg/Kg/24 horas repartido en 2 dosis endovenosas y 520 mg/m<sup>2</sup>/12 horas vía oral, respectivamente) o el Aciclovir (10 mg/Kg/ día) en aquellos casos con detección del CMV y del VHS o el VVZ, respectivamente, en muestras de un receptor asintomático, previo a la aparición de complicaciones de origen viral.

**Anexo 14.** Tratamiento inmunosupresor y antiviral de receptores de TCPH según el “Protocolo de Trasplante de Médula Ósea, 2006, Hospital Universitario Hermanos Ameijeiras e Instituto de Hematología e Inmunología”.

### **Tratamiento preparatorio de TCPH**

1. Tratamientos preparatorios en trasplantes autólogos de Leucosis Mieloblástica aguda

- Ciclofosfamida + Irradiación corporal total
- o Ciclofosfamida + etoposido + Irradiación corporal total\*

2. Tratamientos preparatorios en trasplante alogénico de Leucosis Mieloblástica aguda

- Ciclofosfamida + Irradiación corporal total\*
- O Ciclofosfamida + etoposido + Irradiación corporal total
- O Busulfan + Ciclofosfamida

\*tratamiento empleado en los pacientes estudiados

Metodología de los tratamientos preparatorios en trasplante autólogo con células progenitoras no congeladas:

Ciclofosfamida ( $5 \text{ g/m}^2/\text{día}$ / 1 día) + Irradiación corporal total ( $500 \text{ centigray (cGy)/día}$  por 2 días)

Día -7 Iniciar antibioticoterapia profiláctica

Día -4 Antibioticoterapia profiláctica + cateterismo venoso central (puede ser el día -3)

Día -3 Antibioticoterapia profiláctica + leucoféresis de menor volumen (LMV) en TCPH de sangre periférica (4 de la tarde)

Día -2 Antibioticoterapia profiláctica + leucoféresis de mayor volumen (LGV) en TCPH de sangre periférica o extracción de médula ósea en los TCPH de médula ósea (8 de la mañana)

3 de la tarde: Ciclofosfamida ( $5 \text{ gramos/m}^2$  en 500 mL de solución salina/ 1 hora)

Día - 1: 3 pm irradiación corporal total (500 cGy)

Día 0 Antibioticoterapia profiláctica + 3 pm irradiación corporal total (500 cGy) + Infusión de las células progenitoras hematopoyéticas inmediatamente que llegué de la radioterapia

Metodología de los tratamientos preparatorios en trasplante alogénico:

Ciclofosfamida ( $60 \text{ mg/Kg/día}$  x 2 días) + Etoposido ( $400 \text{ mg x m}^2/\text{día}$  x 2 días) + Irradiación corporal total ( $333 \text{ cGy/día}$  x 3 días)

Día - 10 Antibioticoterapia profiláctica

Día - 7 Antibioticoterapia profiláctica

Día – 6 Antibioticoterapia profiláctica +Inicio del acondicionamiento: Etoposido (400 mg/m<sup>2</sup> en 1 000 mL de solución salina/ 1 hora), Ciclofosfamida (60 mg/Kg en 500 mL de solución salina/ 1 hora, luego de terminar el etoposido)

Día – 5 Antibioticoterapia profiláctica + Etoposido (400 mg/m<sup>2</sup> en 1 000 mL de solución salina/ 1 hora), Ciclofosfamida (60 mg/Kg en 500 mL de solución salina/ 1 hora luego de terminar el etoposido)

Día – 4 Antibioticoterapia profiláctica + irradiación corporal total (333 cGy)

Día – 3 Antibioticoterapia profiláctica + irradiación corporal total (333 cGy)

Día – 2 Antibioticoterapia profiláctica + irradiación corporal total (333 cGy)

Día – 1 Antibioticoterapia profiláctica + Iniciar Ciclosporina A (3 mg/Kg/12 horas en infusión endovenosa de 2 horas o Neoral 6–8 mg/kg/día).

Día 0 Antibioticoterapia profiláctica + Ciclosporina A + Infusión de las células progenitoras hematopoyéticas

Metotrexate: Se emplea como profilaxis de la enfermedad injerto contra huésped (15 mg/m<sup>2</sup>/endovenoso día +1 y 10 mg/m<sup>2</sup>/endovenoso los días +3, +6, +11).

#### **Tratamiento antiviral:**

Profilaxis de de la infección por CMV en trasplante alogénico:

Prevención de la exposición en receptores no infectados por el CMV: Utilización de hemoderivados negativos a Acs específicos anti CMV y filtración de estos hemoderivados para depletarlos de leucocitos (uso de filtros de leucorreducción de alta eficacia), selección (si posible) de un donante no infectado por CMV y prevención del contagio (no compartir platos, vasos, cubiertos y el uso de preservativos). Estas medidas deben aplicarse también en los receptores de TCPH autólogos.

Prevención de la reactivación en receptores infectados previo al trasplante por CMV: Se aplica solamente en TCPH alogénico, en pacientes de alto riesgo (donantes no emparentados, de cordón umbilical, haploidénticos, etc).

a. Ganciclovir: 2,5 mg/Kg/ 3 v/día del día - 8 al - 1 y después reiniciarlo cuando la cifra de neutrófilos sea mayor de 1 000/ mm<sup>3</sup> a la dosis de 6 mg/Kg/día, 5 veces por semana hasta el día + 120.

b. Gammaglobulina endovenosa: 500 mg/Kg una vez a la semana desde el día - 7 hasta el día + 90. No se emplea habitualmente.

Profilaxis de de la infección por VHS: En todos los receptores de trasplantes (alogénicos y autólogos) infectados previamente al trasplante (IgG +) o con antecedentes de infecciones herpéticas recidivantes.

El Aciclovir se utiliza junto con el tratamiento acondicionante o el día +1, y se continúa hasta el día + 30. El Aciclovir puede utilizarse por vía endovenosa (5 mg/Kg/12 horas o 250 mg/m<sup>2</sup>/12 horas) u oral (200 mg/6 horas/día o 800 mg/12 horas. La mucositis inducida por la quimio-radioterapia debe estar

resuelta antes suspender el Aciclovir. La profilaxis prolongada solo es recomendada en pacientes que presenten episodios de reactivación del VHS después del día +30. El Aciclovir debe suspenderse en los casos en que se utiliza Ganciclovir o foscarnet para el CMV. Como alternativa pueden utilizarse Valaciclovir (500 mg/12 horas, vía oral) o Famciclovir (125 mg/12 horas, vía oral).

Profilaxis de la infección por el VVZ: Todos los receptores de TCPH que no tienen IgG anti VVZ deben evitar todo contacto con personas con sospecha de infección activa por VVZ o reactivación de una infección previa. Los receptores no infectados por VVZ si tienen contacto con una persona potencialmente infectada deben recibir rápidamente IgG anti-VVZ y este tratamiento debe repetirse en caso de una nueva exposición. La profilaxis con Aciclovir durante 30 días posterior al TCPH es efectiva contra el VVZ. El tratamiento prolongado generalmente no es recomendado. Los receptores de TCPH con una infección de varicela o zóster evidente, deben ser aislados rigurosamente hasta que todas las lesiones estén en fase costrosa.

Tratamiento anticipado y terapéutico de infecciones herpesvirales en TCPH:

Infección por CMV: El tratamiento anticipado con Ganciclovir (periodo de inducción: 5 mg/Kg/12 horas endovenoso durante 14 días y posteriormente 6 mg/Kg/día endovenoso), se suspende cuando la detección viral sea negativa. El Ganciclovir debe suspenderse si hay neutropenia < 1 000 /mL dos días seguidos y se debe reiniciar cuando los neutrófilos estén > 1 000 /mL.

Tratamiento de la enfermedad citomegálica: El pronóstico es muy desfavorable. Se recomienda la asociación de Ganciclovir (5 mg/Kg/12 horas durante 21 días y seguir con 5 mg/Kg/día endovenoso mientras dure la inmunodepresión) + Inmunoglobulina endovenosa inespecífica (500 mg/Kg/días alternos endovenoso hasta completar 7 dosis y después continuar semanal durante 4 semanas).

Infección por VHS: Aciclovir endovenoso 250 mg/m<sup>2</sup>/8 horas o 5 – 10 mg/Kg/8 horas por 7–10 días o Aciclovir oral 200–400 mg/dosis, 5 dosis por día durante 7–10 días.

Receptores con lesiones cutáneas de VVZ: Aciclovir (endovenoso 500 mg/m<sup>2</sup>/8 horas o 10 mg/Kg/8 horas u oral 200–400 mg/dosis, 5 dosis por día hasta dos días después que todas las lesiones estén en fase de costra. Si hay resistencia al Aciclovir: Foscarnet 60 mg/Kg/12 horas.



**Anexo 15.** Asociación de variables seleccionadas con la presencia de Acs anti CMV de las gestantes de tres municipios de La Habana, desde enero del 2007 a enero del 2008.

Variables		Acs IgG + (n=1048)	Acs IgG - (n=83)	Asociación (IC)	p
Antecedentes de enfermedad materna o síntomas o signos durante el embarazo	Sí*	151	12	RP 0,77 (0,12-4,91)	0,619
	no	897	71		
Síntomas o signos durante el embarazo **	Sí*	1	162	RP 0,77 (0,12-4,91)	0,619
	no	8	960		

\*referencia, \*\* IgM+

Abreviaturas: Acs: anticuerpos, IgG+: Inmunoglobulina G positivo, IC: intervalo de confianza, RP: razón de prevalencia, IC: intervalo de confianza.

**Anexo 16.** Asociación de variables seleccionadas con la infección activa materna, infección primaria e infección congénita por CMV en pacientes de tres municipios de La Habana, desde junio del 2007 a diciembre del 2011.

Variables		Sí	No	Asociación (IC)	p
<b>Infección activa (n=27)</b>					
Municipio	Centro Habana*	12	333	OR 2,47(0,73-9,17)	0,179
	Regla	4	274		
Antecedente de enfermedad materna y los síntomas o signos durante el embarazo	Sí*	3	160	OR 0,76 (0,18-2,69)	0,461
	No	24	974		
Embarazos previos	Sí*	19	847	OR 0,72 (0,29-1,81)	0,589
	no	8	257		
Hijos fallecidos	Sí*	1	12	OR No hay intervalo de confianza	0,263
	no	9	415		
<b>Infección primaria (n=20)</b>					
Los síntomas o signos durante el embarazo	Sí*	2	1	OR 0,67 (0,03-22,46)	0,610
	no	18	6		
Excreción de CMV	Sí*	6	3	OR 0,57 (0,07-4,65)	0,429
	no	14	4		
<b>Infección congénita (n=12)</b>					
Infección primaria materna	Sí*	9	11	OR 1,09 (0,14-8,55)	0,636
	no	3	4		
Síntomas o signos durante el embarazo	Sí*	1	162	OR 0,54 (0,03-4,03)	0,466
	no	11	968		
Infección primaria materna **	Sí*	1	8	OR 0,25 (0,00-14,91)	0,455
	no	1	2		
Parto por cesárea o instrumentado	Sí*	3	7	OR 0,50 (0,16-1,52)	0,191
	no	9	7		

\*referencia, \*\*sintomatología en el recién nacido

Abreviaturas: OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza, CMV: Citomegalovirus.

**Anexo 17.** Asociación de variables seleccionadas con la presencia de Acs IgG anti CMV o VHS en receptores pediátricos en Cuba, desde noviembre del 2009 a diciembre del 2011.

Variables		Acs IgG+	Acs IgG-	Asociación (IC)	p
<b>CMV</b>					
Tipo de trasplante	TR*	7	1	RP 0,98 (0,72-1,33)	0,669
	TH y TCPH	17	2		
Sexo	Masculino*	13	1	RP 0,54 (0,05-5,28)	0,527
	Femenino	13	2		
<b>VHS</b>					
Edad	>=10 años *	16	3	RP 1,35 (0,76-2,38)	0,227
	<10 años	5	8		

\*referencia

Abreviaturas: Acs: anticuerpos, IgG: Inmunoglobulina G, +: positivo, -: negativo, IC: intervalo de confianza, RP: razón de prevalencia, IC: intervalo de confianza, CMV: Citomegalovirus, VHS: Virus Herpes Simple, TR: trasplante renal, TH: trasplante hepático, TCPH: trasplante de células precursoras hematopoyéticas, >=: mayor o igual que, <: menor que.

**Anexo 18.** Posibles factores de riesgo para en receptores de trasplante. Asociación de variables seleccionadas con la detección herpesviral, de CMV y complicaciones en receptores pediátricos en Cuba, desde noviembre del 2009 a diciembre del 2011.

Variables		Sí	No	Asociación (IC)	p
<b>Detección herpesviral</b>					
Enfermedad causante del TR	Glomerulopatía*	3	0	OR 0,25 (0,01-6,23)	0,348
	Otras	4	1		
sexo	Femenino*	14	1	OR 1,08 (0,0-44,93)	0,741
	Masculino	13	1		
Tipo de trasplante	TH*	19	0	OR indefinido	0,296
	TR	7	1		
IgG anti CMV	Positivo*	18	7	OR 0,00 (0,00-13,76)	1,000
	Negativo	2	2		
IgG anti VEB	Positivo*	17	7	OR 4,86 (0,27-163,35)	0,25
	Negativo	1	3		
IgG anti VHS	Positivo*	8	13	OR indefinido	0,136
	Negativo	0	6		
<b>CMV</b>					
Enfermedad causante del TH	Cirrosis*	6	1	OR 1,20 (0,06-42,21)	0,704
	Otras	10	2		
Las muestras de TR**	TR*	10	40	OR 2,56 (0,85-7,82)	0,106
	TH y TCPH	15	141		
TR	Orina +*	13	35	OR 2,15 (0,84-5,48)	0,119
	Orina -	14	81		
Tipo de donante	Fallecido*	18	3	OR 1,50 (0,0-27,30)	0,599
	Vivo	4	1		
Tratamiento con micofenolato mofetil	Sí*	18	6	OR 0,00 (0,0-9,48)	0,455
	No	3	0		
Tratamiento con micofenolato mofetil	Sí*,***	9	15	OR 1,20 (0,07-39,08)	0,697
	No	1	2		
Tratamiento con anti CD25	Sí*	6	3	OR 0,40 (0,04-3,54)	0,305
	No	15	3		
Tratamiento con anti CD25	Sí*,***	4	5	OR 1,60 (0,23-11,22)	0,439
	No	6	12		
<b>Complicaciones</b>					
Tipo de trasplante	TH*	15	4	OR 0,42 (0,02-5,33)	0,424
	TR y TCPH	9	1		
Tipo de trasplante	TR*	7	1	OR 1,65 (0,12-46,13)	0,575
	TH y TCPH	17	4		
Tipo de trasplante	TR*	7	1	OR 1,87 (0,14-52,67)	0,528

	TH	15	5		
IgG anti CMV	Positivo*	18	5	OR 0,90 (0,03-13,31)	1,000
	Negativo	4	4		
PCR-TR	CMV +*	15	4	OR 0,42 (0,02-5,33)	0,424
	CMV-	9	1		
<b>Muerte o pérdida del trasplante</b>					
PCR-TR	CMV+*	7	15	OR 1,17 (0,14-11,46)	0,631
	CMV-	2	5		
Sexo	Masculino*	6	8	OR 3,00 (0,45-21,77)	0,241
	Femenino	3	12		
edad	<10 años*	4	5	OR 2,40 (0,35-17,48)	0,266
	>=10 años	5	15		

\*referencia, \*\* Virus Herpes Simple, \*\*\* viremia por CMV

Abreviaturas: Acs: anticuerpos, IgG: Inmunoglobulina G, +: positivo, -: negativo, RP: razón de prevalencia, IC: intervalo de confianza, CMV: Citomegalovirus, TR: trasplante renal, TH: trasplante hepático, TCPH: trasplante de células precursoras hematopoyéticas, PCR-TR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, >=: mayor o igual que, <=: menor que.

**Anexo 19.** Detección de co-infecciones en receptores pediátricos de trasplante, 2009-2011.

Muestras	2 virus				3 o más virus				Virus y Bacteria				Total *						
	Virus	No ptes	%	No de muestras	%	Virus	No ptes	%	No de muestras	%	Virus	No ptes	%	No de muestras	%	No ptes	%	No de muestras	%
<b>saliva</b>	Cualquier combinación	20	69	35	6,3	Cualquier combinación	8	27,6	17	3,1	Cualquier combinación	7	24,1	10	1,8	23	79,3	57	10,3
	VHS/VHH6	2	6,9	2	0,4	VHS/VHH6/CMV	2	6,9	5	0,9	CMV	2	6,9	2	0,4				
	VHS/VEB	1	3,4	1	0,2	VHS/VHH6/VEB	1	3,4	1	0,2	VHH6	1	3,4	1	0,2				
	VHS/CMV	2	6,9	2	0,4	VEB/VHH6/CMV	5	17,2	6	1,1	VEB	2	6,9	2	0,4				
	VHH6/VEB	10	34,5	13	2,3	VHS/VHH6/CMV/VEB	4	13,8	5	0,9	VHH6/VEB	1	3,4	1	0,2				
	VHH6/CMV	10	34,5	13	2,3						VHS/CMV	1	3,4	1	0,2				
	VEB/CMV	4	13,8	4	0,7						CMV/ VHH6/VEB	1	3,4	1	0,2				
										VHS/CMV/VHH6/VEB	2	6,9	2	0,4					
<b>Suero</b>	Cualquier combinación	2	6,9	2	0,4					Cualquier combinación	2	6,9	2	0,4	3	10,3	3	0,5	
	VHH6/CMV	1	3,4	1	0,2					CMV	1	3,4	1	0,2					
	VEB/CMV	1	3,4	1	0,2					VEB/CMV	1	3,4	1	0,2					
<b>Saliva +orina</b>	Cualquier combinación	4	13,8	4**	0,7	Cualquier combinación	2	6,9	2**	0,4	Cualquier combinación	2	6,9	2**	0,4	7	24,1	8**	1,4
	VHS+CMV	1	3,4	1	0,2	VHH6/VEB+CMV	1	3,4	1	0,2	CMV+CMV	2	6,9	2	0,4				
	VHH6/CMV+	2	6,9	2	0,4	VHH6/VEB/CMV+CMV	1	3,4	1	0,2									
	CMV																		
<b>Saliva +suero</b>	Cualquier combinación	3	10,3	3**	0,5	Cualquier combinación	2	6,9	2**	0,4	Cualquier combinación	0	0	0	0	5	17,2	5**	0,9
	VEB/CMV+	1	3,4	1	0,2	VHS/VHH6/VEB/CMV+	1	3,4	1	0,2									
	CMV					CMV													
	VHH6/CMV+	2	6,9	2	0,4	VHS/VHH6/VEB/CMV+	1	3,4	1	0,2	CMV/VEB								
<b>Saliva +orina +suero</b>	Cualquier combinación	4	13,8	4**	0,7	Cualquier combinación	3	10,3	5**	0,9	Cualquier combinación	1	3,4	1**	0,2	6	20,7	9**	1,6
	VHS/CMV+	1	3,4	1	0,2	VHS/VHH6/CMV+CMV+CMV	2	6,9	4	0,7	VHS/CMV+CMV	1	3,4	1	0,2				
	CMV+CMV					VHH6/VEB+CMV+CMV	1	3,4	1	0,2	+CMV								
	CMV+CMV+	1	3,4	1	0,2														
	VHH6/CMV																		
VHH6/CMV+	2	6,9	2	0,4															
CMV +CMV																			
<b>Total</b>	Cualquier combinación	21	72,4	37 **	6,7	Cualquier combinación	8	27,6	18**	3,2	Cualquier combinación	11	37,9	12**	2,2	25	86,2	62 **	11,2

\*Los totales no coinciden con su sumatoria, pues un paciente puede tener muestras con varias co-infecciones, \*\*Muestras en las que su positividad coincide en un momento y paciente.

Para el cálculo de los porcentajes se tuvo en cuenta: n (pacientes)=29 y n (muestras)=554.

Abreviaturas: CMV: Citomegalovirus, VHH6: Herpes Virus Humano 6, VEB: Virus Epstein Barr, VHS: Virus Herpes Simplex.

**Anexo 20.** Seguimiento de la carga viral en los pacientes trasplantados pediátricos con tratamiento antiviral curativo o anticipado.

No Pcte	Tipo de trasplante	Antiviral	Semana de inicio (duración en semanas)	Síntomas y signos	Carga viral (copias/mL) antes del tratamiento antiviral	Carga viral (copias/mL) después del tratamiento antiviral
15	Riñón	Valganciclovir	14 (4)	Síndrome por CMV	CMV Viremia: $10^2$ Saliva: VHH6 $10^2$ , VHS $10^6$ y CMV $10^4$ Orina: CMV $10^5$	Viremia: CMV $10^2$ Saliva: VHH6 $10^2$ y CMV $10^2$ Orina: No detección viral
			22 (12)	Síndrome por CMV y rechazo crónico	Viremia: CMV $10^2$ Saliva: VHH6 $10^3$ , VHS $10^4$ y CMV $10^6$ Orina: CMV $10^6$	No detección viral en suero o saliva Orina: CMV $10^5$
23	Hígado	Ganciclovir + Valganciclovir	5 (5 días + 4)	Aumento de las transaminasas (TGP y TGO)	CMV Viremia: $10^4$ Saliva: VHH6 $10^3$ y VEB $10^6$ Orina: CMV $10^3$	No viremia Saliva: VHH6 $10^3$ , VEB $10^6$ y CMV $10^3$
5	Hígado	Valganciclovir	14 (4)	Fiebre de origen desconocido	Saliva: CMV $10^5$ , VHH6 $10^5$ y VEB $10^5$	Saliva: CMV $10^3$
10	Hígado	Valganciclovir + Aciclovir	14 (4)	Fiebre de origen desconocido	Saliva: CMV $10^7$ , VHH6 $10^5$ , VHS $10^6$ y VEB $10^7$	Saliva: CMV $10$ , VHH6 $10^3$ y VEB $10^2$
18	Riñón	Valganciclovir	13 (12)	Infección urinaria	Viremia: CMV $10^2$ Saliva: VHH6 $10^2$ y CMV $10^5$ Orina: CMV $10^3$	No detección viral en suero y saliva Orina: CMV $10^2$
22	Hígado	Valganciclovir	10 (10)	Aumento de las transaminasas (TGP y TGO), absceso abdominal	Viremia: CMV $10^4$ y VEB $10$ Saliva: CMV $10^4$ , VHH6 $10^3$ , VHS $10^4$ y VEB $10^7$	No viremia Saliva: VHH6 $10^2$ y VEB $10^2$
1	Hígado	Valganciclovir	14 (4)	asintomático	viremia CMV: $10^3$ Saliva: CMV $10^3$ y VEB $10^5$	No detección viral
8	Hígado	Valganciclovir	11 (4)	asintomático	viremia CMV: $10^4$ Saliva: CMV $10^5$ y VHH6 $10^3$	No detección viral
12	Riñón	Valganciclovir	29 (4)	asintomático	CMV Viremia: $10$ Saliva CMV $10^3$ , VHH6 $10^4$ y VHS $10^4$ Orina: CMV $10^2$	No viremia Saliva: CMV $10^3$ Orina: CMV $10$
17	TCPH	Aciclovir	4 (4)	asintomático	Saliva: VHS $10^6$ y VHH6 $10^2$	Saliva: VHH6 $10^3$

Abreviaturas: Pcte: paciente, TGP: transaminasa pirúvica, TGO: transaminasa oxalacética, TCPH: Trasplante de células precursoras hematopoyéticas, CMV: Citomegalovirus, VHH6: Virus Herpes Humano 6, VEB: Virus Epstein Barr, VHS: Virus Herpes Simple.