



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**“Identificación y Caracterización de la Infección Activa por
Citomegalovirus en Recién Nacidos Prematuros”**

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

M. en C. Javier González Ramírez

Directora

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

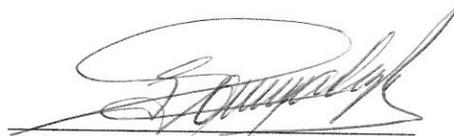
Asesores

Dra. Norma Velázquez Guadarrama

Dr. Humberto González Márquez

México D.F. a 6 de junio de 2013.

Los integrantes del jurado, designados por el posgrado en Biología Experimental aprobaron la tesis "Identificación y Caracterización de la Infección Activa por Citomegalovirus en Recién Nacidos Prematuros" realizada por el alumno Javier González Ramírez y se realizó la disertación pública el 6 de junio de 2013 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.



Presidente

Dr. Humberto González Márquez



Secretaria

Dr. Norma Velázquez Guadarrama

Vocales



Dr. Fausto Sánchez Muñoz



Dr. Marco Allán Pérez Solís

Los integrantes del jurado, designados por el posgrado en Biología Experimental aprobaron la tesis “Identificación y Caracterización de la Infección Activa por Citomegalovirus en Recién Nacidos Prematuros” realizada por el alumno Javier González Ramírez y se realizó la disertación pública el 6 de junio de 2013 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.

Presidente

Dr. Humberto González Márquez

Secretaria

Dr. Norma Velázquez Guadarrama

Vocales

Dr. Fausto Sánchez Muñoz

Dr. Marco Allán Pérez Solís

Comité Tutorial

Directora

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Profesor Investigador Titular C

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Asesores

Dra. Norma Velázquez Guadarrama

Investigador en Ciencias Médicas D

Departamento de Infectología

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. Humberto González Márquez

Profesor Investigador Titular C

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Reyna C. Fierro Pastrana.

Directora de este trabajo, por su apoyo incondicional y por su paciencia.

Al Dr. José Arellano Galindo.

Por haberme permitido trabajar en su laboratorio y por haber participado en la dirección de este trabajo.

A mi comité tutorial.

Por su asesoría, orientación y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Al jurado evaluador

Por su objetividad y apoyo, sus comentarios, siempre puntuales, le otorgaron mayor calidad a este trabajo

A los alumnos de Licenciatura

Carlos y Ely por su apoyo y comprensión

A los técnicos del Hospital Infantil

Heriberto y Tere, gracias por su ayuda, son buenas personas.

El presente trabajo fue realizado en el Hospital Infantil de México Federico Gómez y en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

El alumno Javier González Ramírez recibió apoyo de CONACYT, con el número de CVU 46513

Este proyecto fue realizado con el apoyo de:

- CONACYT SALUD 2008/COI/87920.
- Hospital Infantil de México Federico Gómez, Proyectos HIM/2009/01 y HIM/2009/040.
- Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XIII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.	3
CITOMEGALOVIRUS	3
<i>Historia</i>	3
<i>Características generales</i>	3
<i>Ciclo biológico</i>	4
RESPUESTA INMUNE CONTRA LA INFECCIÓN POR CMV	4
<i>Inmunidad Humoral</i>	4
<i>Inmunidad Celular</i>	5
PATOGÉNESIS VIRAL DE LA INFECCIÓN POR CMV	5
EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR CMV	6
DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR CMV	8
<i>Diagnóstico serológico</i>	8
<i>Métodos de cultivo</i>	8
<i>Antigenemia</i>	8
<i>Técnicas moleculares</i>	9
TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR CMV	9
CAPITULO II.	11
INFECCIONES PERINATALES Y CMV	11
TIPOS DE INFECCIONES	11
<i>Infecciones congénitas</i>	11
<i>Infecciones Verticales</i>	11

VIRUS QUE AFECTAN AL RECIÉN NACIDO	12
FUNCIÓN INMUNOLÓGICA EN EL RECIÉN NACIDO CONTRA LOS AGENTES VIRALES.....	14
<i>Inmunidad inespecífica</i>	14
<i>Inmunidad específica</i>	14
<i>Adquisición pasiva de anticuerpos</i>	15
INFECCIÓN VIRAL CONGÉNITA POR CMV	15
EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR CMV.....	16
RECIÉN NACIDOS PREMATUROS	16
FUNCIÓN INMUNOLÓGICA EN EL RECIÉN NACIDO PREMATURO	17
DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN CONGÉNITA POR CMV EN RECIÉN NACIDOS PREMATUROS.	18
USO DE SANGRE SECA EN TARJETAS DE PAPEL FILTRO PARA LA DETECCIÓN DE CMV	18
CAPÍTULO III.	21
HEMATOPOYESIS Y TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA.....	21
CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS PROGENITORAS Y MULTIPOTENCIALES.	22
CITOCINAS Y HEMATOPOYESIS.	25
ENFERMEDADES HEMATOLÓGICAS POR UNA HEMATOPOYESIS INEFICAZ	26
TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.....	26
<i>Tipos de trasplante según el donante:</i>	26
<i>Tipos de trasplante según la fuente de progenitores:</i>	27
TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA.....	28
<i>Rechazo del injerto</i>	31
<i>Enfermedad de injerto contra el huésped</i>	31
<i>Infecciones en trasplante de médula ósea</i>	32
INFECCIONES VIRALES DESPUÉS DE TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA.	33
EL PAPEL DE CMV EN EL TMO.	35
EL PAPEL DE LA PROTEÍNA DE ENVOLTURA gB EN LA PATOGÉNESIS VIRAL DESPUÉS DEL TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA.	36
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	37
JUSTIFICACIÓN.....	39
HIPOTESIS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
OBJETIVOS.	41
OBJETIVO GENERAL: IDENTIFICAR Y CARACTERIZAR LA INFECCIÓN ACTIVA POR CITOMEGALOVIRUS.	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	41
MÉTODOS	42

DISEÑO DEL ESTUDIO:.....	42
POBLACIÓN EN ESTUDIO.....	42
SEROLOGÍA MATERNA.....	42
CULTIVO DE MUESTRAS CLÍNICAS	43
TOMA DE MUESTRA DE SANGRE DEL TALÓN PARA LA TARJETA GUTHRIE.	43
TOMA DE MUESTRA DE SALIVA.	45
EXTRACCIÓN DE ADN DIRECTAMENTE DE SALIVA	47
EXTRACCIÓN DE ADN DE TARJETAS GUTHRIE	47
EXTRACCIÓN DE ADN DE SANGRE	47
PCR	48
N-PCR DE DIAGNÓSTICO PARA LA INFECCIÓN POR CMV	48
PCR EN TIEMPO REAL (PCR-TR)	49
ANÁLISIS GENOTÍPICO DE LA PROTEÍNA GB.....	54
ANÁLISIS DE DATOS.	56
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56
RESULTADOS.....	57
1. CARACTERÍSTICAS DE LAS MADRES DE LOS RECIÉN NACIDOS PREMATUROS.	57
2. CARACTERÍSTICAS DE LOS RECIÉN NACIDOS PREMATUROS.....	57
3. DETECCIÓN DE INFECCIÓN ACTIVA POR CMV EN CULTIVO CON SALIVA, PCR ANIDADA EN SALIVA, PCR ANIDADA EN TARJETA GUTHRIE Y PCR EN TIEMPO REAL EN TARJETA GUTHRIE.	59
4. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS, DE VALORACIÓN Y CLÍNICAS DE LOS RNP CON INFECCIÓN CONGÉNITA(C).	61
5. GENOTIPIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CMV DE LOS PACIENTES CON TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA (TMO).	63
DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIONES.....	70
REFERENCIAS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.PREVALENCIA DE ANTICUERPOS QUE FIJAN EL COMPLEMENTO CONTRA CMV EN DIFERENTES PARTES DEL MUNDO. TOMADO DE KRECH U, 1973.	7
FIGURA 2.MODELO DE LA HEMATOPOYESIS MOSTRANDO LAS CITOCINAS REQUERIDAS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS CELULARES HEMATOPOYÉTICOS. (MODIFICADO DE MORRINSON <i>ET AL</i> , 1995).	24
FIGURA 3.TOMA DE MUESTRA DE SANGRE DEL TALÓN PARA LA TARJETA GUTHRIE.	44
FIGURA 4.ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO PARA LAS OBTENCIÓN DE SALIVA EN LOS RECIÉN NACIDOS PREMATUROS.	46
FIGURA 5.AMPLIFICACIÓN DEL CUARTO EXÓN DE CMV. PM, MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 50 PB; 1 POSITIVO AD169; 2 CONTROL SIN ADN MOLDE; 3 CONTROL PACIENTE NEGATIVO; 4 PACIENTE POSITIVO ADN DE TARJETA GUTHRIE; 5 PACIENTE POSITIVO ADN DE SALIVA.	49
FIGURA 6. GRÁFICA DE LA MUESTRA NO..... POSITIVA PARA CMV.OBSERVAMOS QUE SOLAMENTE LA FLUORESCENCIA DE FAM QUE ES CON LA QUE SE MARCÓ LA Sonda SE INCREMENTA. SE UTILIZÓ EL PROGRAMA 7000 SDS SOFTWARE DE LA PLATAFORMA ABI PRISM DE APPLIED BIOSYSTEMS.	53
FIGURA 7.GRÁFICA DE UNA MUESTRA NEGATIVA PARA CMV. LA FLUORESCENCIA DE FAM NO SE INCREMENTA. SE UTILIZÓ EL PROGRAMA 7000 SDS SOFTWARE DE LA PLATAFORMA ABI PRISM DE APPLIED BIOSYSTEMS.	53

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. CAPACIDAD POTENCIAL DE VARIOS MODOS DE TRANSMISIÓN VERTICAL DE LOS VIRUS HERPES.	13
CUADRO 2. ESTUDIOS REALIZADOS PARA DETERMINAR LA UTILIDAD DE LA TARJETA GUTHRIE EN EL DIAGNÓSTICO DE CMV.	20
CUADRO 3. CONDICIONES TRATADAS CON TRASPLANTES DE CÉLULAS TALLO.	30
CUADRO 4. VIRUS CONOCIDOS Y EMERGENTES EN PACIENTES CON TRASPLANTE DE MEDULA ÓSEA.	34
CUADRO 5. CARACTERÍSTICAS Y PREPARACIÓN DE LA MEZCLA PARA PCR TR EN UN TUBO DE REACCIÓN.	51
CUADRO 6. CEBADORES UTILIZADOS PARA LA PCR ANIDADA DE DIAGNÓSTICO DE CMV, PARA LA PCR EN TIEMPO REAL Y PARA LA PCR SEMI-ANIDADA.	55
CUADRO 7. PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA CMV EN MADRES DE RECIÉN NACIDOS PREMATUROS DISTRIBUIDAS POR EDADES.	57
CUADRO 8. CARACTERÍSTICAS DE RNP CON Y SIN INFECCIÓN POR CMV. HOSPITAL DE LA MUJER 2009-2011.	58
CUADRO 9. COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN (PCR), CONTRA INFECCIÓN EN CULTIVO DE TEJIDOS (ESTÁNDAR DE ORO).	59
CUADRO 10. COMPARACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS DE N-PCR TIEMPO FINAL Y PCR-TR CON MUESTRA EN TARJETA GUTHRIE Y N-PCR EN SALIVA PARA LA DETECCIÓN DE CMV.	60
CUADRO 11. CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS Y DE VALORACIÓN DE LOS RNP INCLUIDAS EN INFECCIÓN CONGÉNITA.	62
CUADRO 12. DISTRIBUCIÓN OF LOS GENOTIPOS DE LA PROTEÍNA GB DE CMV EN LOS PACIENTES CON TMO.	63

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CDV	Cidofovir
CFU-G:	Unidad formadora de colonias de granulocitos
CFU-M:	Unidad formadora de colonias de macrófagos
CMV	Citomegalovirus
E	Especificidad
EPO	Eritropoyetina
G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
GCV	Ganciclovir
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos.
HCMV	Citomegalovirus humano
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
IFN	Interferón.
IL	Interleucina
MIP-1-α:	Proteína inflamatoria de macrófagos-1-alfa
NK	Natural Killer, células asesinas naturales
NO	Óxido nítrico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-TR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNP	Recién nacido prematuro
S	Sensibilidad
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TMO	Trasplante de médula ósea
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-alfa
TPO	Trombopoyetina
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

RESUMEN

La infección por Citomegalovirus (CMV) es una de las patologías de mayor riesgo en los pacientes con inmadurez inmunológica (recién nacidos prematuros) e inmunosuprimidos (pacientes con trasplante de médula ósea). La glicoproteína B de superficie (gB), y la presencia de uno o más genotipos, puede influir en el desarrollo de la enfermedad. La antigenemia o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de sangre, se ha usado rutinariamente para la detección de CMV en pacientes inmunosuprimidos. El uso de estas técnicas para diagnosticar CMV en recién nacidos prematuros ha sido limitado debido al difícil acceso vascular. El empleo de sangre absorbida en tarjetas de papel filtro (tarjeta de Guthrie) es una buena alternativa por la cantidad de muestra que se utiliza. Objetivo: Identificar y caracterizar la infección activa por CMV en pacientes recién nacidos prematuros y pacientes pediátricos con trasplante de medula ósea.

Material y Métodos: Se tomaron 271 muestras de saliva y 271 de sangre conservadas en tarjetas Guthrie, de 271 recién nacidos prematuros del Hospital de la Mujer, en la Ciudad de México D.F. Se realizó n-PCR y PCR en tiempo real (PCRTR) en ADN extraído de tarjetas Guthrie, además de n-PCR de saliva, y como estándar de oro, infección en cultivos celulares para detección de CMV. Se utilizó un PCR multiplex anidado para determinar los genotipos de la glicoproteína de CMV gB en 30 pacientes pediátricos mexicanos con trasplante de médula ósea del Hospital Infantil de México Federico Gómez, del Centro Médico Nacional La Raza, y del IMSS, en la Ciudad de México.

Resultados: Se evaluaron 271 muestras de sangre en tarjetas Guthrie y 271 muestras de saliva para la presencia de CMV. El 3.69% de éstas, resultó positivo al cultivo de saliva, el 4.05% positivas en n-PCR en tarjetas Guthrie, 4.05% positivas para PCR-TR en tarjetas de Guthrie y 1.10% positivas para n-PCR en saliva. La sensibilidad (S) de n-PCR y PCR-TR en tarjetas Guthrie fue de 100%, la especificidad (E) 99%, el valor predictivo positivo (VPP) de 90% y valor predictivo negativo (VPN) 100%. En la n-PCR en saliva, S del 30%, E del 99%, VPP del

75% y VPN del 97%. Ninguno presentó infección sintomática. Los genotipos en los pacientes trasplantados con medula ósea fueron: gB1, 9/30 (30%); gB2, 8/30 (27%); gB3, 4/30 (13%), y gB4, 1/30 (3%); se encontraron genotipos mezclados en 8/30 pacientes (27%).

Conclusiones: La sensibilidad en PCR o PCR-TR de las tarjetas Guthrie fue de 100%. No se determinó relación entre la carga viral y sintomatología ya que ningún paciente presentó infección sintomática. Los genotipos predominantes en nuestra población fueron gB2 y gB1. Se encontró una alta proporción de genotipos mezclados.

Palabras clave: citomegalovirus, diagnóstico, tarjeta Guthrie, genotipificación, glicoproteína gB, infección sintomática, trasplante de médula ósea alogénico.

ABSTRACT

Background: The cytomegalovirus infection is among the most feared complications in patients with immunological immaturity (preterm) and immunosuppressed (patients with bone marrow transplantation). The antigenemia or the polymerase chain reaction (PCR) tests have been routinely used for the detection of CMV in immunosuppressed patients. However, using these techniques for the diagnosis of active CMV infection in preterm infants has been limited because the vascular access is difficult. For this reason, it has turned to alternative samples such as blood collection in filter paper cards (Guthrie card). Furthermore, it has been proposed that the characterization of the surface proteins, such as gB is necessary because, apparently the presence of a particular genotype and the presence of genotype mixtures, in the same patient can affect the development of the syndrome caused by CMV. **Objective:** The aim of this work was to identify and characterize active CMV infection in preterm patients and pediatric patients with bone marrow transplantation.

Methods: It was evaluated 271 samples of saliva and 2171 preserved blood in Guthrie cards of preterm infants (RNP) obtained from the Hospital de la Mujer of Mexico City. Real time PCR (PCR-TR) and n-PCR was performed in DNA extracted from Guthrie cards, besides of n-PCR of saliva, and as a gold standard infection with CMV in cell culture. It was used also a nested multiplex PCR to determine the distribution of CMV genotypes in 30 mexican patients who underwent bone marrow transplantation from the Hospital Infantil de México Federico Gómez and Centro Médico Nacional La Raza, IMSS from Mexico City.

Results: We evaluated 271 blood samples from Guthrie cards and 271 saliva samples for the presence of CMV. Only 3.69% were positive in culture of saliva, 4.05% were positive by n-PCR in Guthrie cards, 4.05% were positive by RT-PCR in Guthrie cards and 1.10% were positive by n-PCR in saliva. The sensitivity (S) of n-PCR and RT-PCR on Guthrie Cards were 100%, specificity (E) 99%, positive predictive value (PPV) of 90% and negative predictive value (NPV) 100%. The

results in n-PCR in saliva were: S of 30%, E 99%, PPV 75% and NPV 97%. Congenital infection with CMV in RNP does not represent a risk to the RNP as none of the RNP detected with congenital CMV infection presented symptoms; the presence of infection in these RNP did not influence their anthropometric characteristics and initial evaluation. The genotypes found in the patients with bone marrow transplantation were: gB1, 9/30 (30%); gB2, 8/30 (27%); gB3, 4/30 (13%), y gB4, 1/30 (3%); mixed genotypes were found in 8/30 patients (27%).

Conclusions: The sensitivity in PCR or RT-PCR Guthrie cards was 100%. No relationship was found between viral load and symptoms since no subject had symptomatic infection. The predominant genotypes in our population were gB2 and GB1. It was found a high proportion of mixed genotypes.

Keywords: cytomegalovirus, diagnosis, Guthrie card, genotyping, gB glycoprotein, symptomatic infection, allogeneic bone marrow transplantation.

INTRODUCCIÓN

El citomegalovirus humano (HCMV) es un virus perteneciente a los virus herpes (Stone *et al.*, 2006), fue aislado por primera vez en 1957, los humanos son el único reservorio para el HCMV; cuando se presenta una infección por primera vez en un individuo (infección primaria) resulta una infección que es controlada inmunológicamente lo que lleva al virus a entrar a un estado de latencia (Hassan *et al.*, 2007). Al ser controlada la infección por CMV en individuos inmunocompetentes, ésta se presenta frecuentemente asintomática o puede causar una enfermedad similar a la mononucleosis, la cual está caracterizada por la presencia de fiebre y linfadenopatía (Watkins *et al.*, 2012).

El control de la infección en individuos inmunocompetentes es resultado de la formación de un complejo de respuesta inmune que actúa para limitar la replicación del virus, este complejo se inicia cuando el sistema inmune innato detecta al CMV a través del reconocimiento de las proteínas de envoltura que presenta por medio de los receptores tipo Toll. Sin embargo, el control sostenido del CMV se lleva a cabo mediante linfocitos CD4+ y CD8+ (Watkins *et al.*, 2012).

Los individuos seropositivos para CMV que se encuentran sanos, poseen niveles adecuados de estas células, lo que les provee una protección inmune apropiada (Sylwester *et al.*, 2005). Así, se dice que el surgimiento de una enfermedad causada por CMV se encuentra restringida a los individuos inmunocomprometidos, como los receptores de trasplantes, individuos infectados por VIH o en el hospedero inmunológicamente inmaduro (neonatos) (Hassan *et al.*, 2007).

Los individuos que reciben un trasplante de medula ósea (TMO) se encuentran profundamente inmunodeprimidos lo que causa un aumento en la incidencia de la reactivación del CMV (Peggs y Mackinnon, 2004). Las infecciones por CMV se encuentran entre las complicaciones más temidas en los pacientes con TMO. La profilaxis para las infecciones por CMV es necesaria, ya que esta infección

ocasiona altas tasas de morbilidad y mortalidad en estos pacientes (Jancel y Penzak, 2009).

Se considera a los neonatos como inmunológicamente inmaduros debido a la falta de memoria inmunológica preexistente (Adkins *et al.*, 2004). Las deficiencias principales que presentan los neonatos en la inmunidad innata son: inmadurez de las barreras naturales, disminución en número y función de neutrófilos y células NK, baja producción de citocinas, complemento y otras proteínas de fase aguda, en cuanto a la inmunidad específica, también presenta deficiencias: los linfocitos B, células plasmáticas y células T también se encuentran inmaduras, por último hay una producción limitada de inmunoglobulinas y citocinas (Penagos *et al.*, 2003). Todos estos factores hacen que la infección por CMV en los neonatos sea una de las infecciones más importantes, de hecho es la principal causa de infección viral congénita con una incidencia del 0.5 al 3% de los recién nacidos alrededor del mundo. Los neonatos infectados con CMV pueden presentar pérdida del oído y la vista, retraso mental y en ocasiones, la muerte (Hassan *et al.*, 2007).

En esta tesis se realizó un estudio en dos de los grupos que son vulnerables para una infección por CMV: los Recién Nacidos Prematuros (RNP) y pacientes con trasplante de médula ósea. En los RNP se realizó el análisis de la presencia del CMV, aplicando técnicas de biología molecular y en pacientes pediátricos con trasplante de médula ósea se realizó un análisis genotípico de la proteína gB de CMV.

De esta manera, el marco teórico se divide en tres capítulos: en el primero, se describe CMV en sus aspectos más importantes; en el segundo, se analizan los tipos de infecciones presentes en los recién nacidos y las causas de su presencia, y se presenta un panorama general de lo que es un recién nacido prematuro además del estado actual del diagnóstico de CMV en estos pacientes; finalmente, en el tercero, se hace una revisión de lo que es la hematopoyesis, los problemas que se presentan si ésta no se encuentra regulada en un organismo, el TMO como medida terapéutica, los problemas que se presentan al aplicar el trasplante de

medula ósea, los virus oportunistas después de un TMO, la importancia de CMV y la de evaluar los diversos genotipos de CMV presentes en los pacientes que se ven afectados por una infección con CMV.

Capítulo I.

Citomegalovirus

La infección humana por CMV ha adquirido importancia en la medicina moderna. Un gran número de enfermedades son producidas por el CMV, dependiendo del estado inmunológico del individuo. Este virus produce infecciones latentes con recurrencias periódicas que, en pacientes inmunodeprimidos, pueden adquirir un carácter aún más grave, como ocurre en los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Díaz *et al.*, 1998).

Historia

Durante los primeros años del siglo pasado, CMV fue reconocido por los cambios citopáticos que producía a nivel intracelular en las glándulas salivares, en 1956 fue aislado por primera vez en tres laboratorios distintos y fue Weller, quien le dio el nombre con el cual se le conoce actualmente. En 1966 se demostró que era el agente causal del síndrome mononucleósico postransfuncional y en 1970-80 surgió como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunosuprimidos por trasplante de órganos, de medula ósea o con SIDA (Ho, 2008).

Características generales

El citomegalovirus humano (CMVH), es un herpes virus de ADN de doble cadena constituido por dos regiones: la única corta (US) y la única larga (UL), que se unen mediante una región intergénica. La cápside es icosaédrica y está envuelta en una membrana lipídica de origen celular en la que se insertan varios complejos de glicoproteínas como gB y gN. Estas glicoproteínas tienen varias funciones en el ataque y reconocimiento durante la infección a la célula huésped pero también son el blanco de anticuerpos neutralizantes (Shenk, 2006).

Ciclo biológico

Después de la interacción del virus (cubierta fosfolipídica) con la célula (membrana de la célula huésped), el ADN se libera de la cápside y puede establecer un estado de latencia en forma episomal con su célula huésped y con la que se mantiene de por vida, o bien, iniciar un ciclo lítico en células permisivas a la infección. Durante su desarrollo, la expresión del genoma viral ocurre ordenadamente en tres fases: inmediata temprana (IE), temprana (E) y tardía (L). Los genes expresados en la fase IE codifican para proteínas no estructurales que participan en la transactivación de los genes E y L. En condiciones de replicación, la expresión de los genes tempranos conduce a la obtención de los elementos necesarios para la activación de los genes tardíos y de las enzimas requeridas para la replicación viral. Finalmente, la expresión de los genes tardíos conlleva a la obtención de las proteínas estructurales como gB, gN y gO que son importantes en el proceso de reconocimiento y ataque a la célula huésped (Bohmek, 2006).

Respuesta inmune contra la infección por CMV

Inmunidad Humoral.

La respuesta inicial contra la invasión viral comienza con la respuesta inmune innata o no específica que incluye diferentes citocinas con propiedades para regular la respuesta inmune (celular y humoral) antiviral, también las citocinas pueden tener efectos antivirales directos, tal es el caso del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el interferón gamma (IFN- γ), que actúan sobre las células infectadas impidiendo la replicación viral (Villalba-Magdaleno y Valdes-Espinoza, 2000). En infecciones con citomegalovirus murino (CMVM) se inducen altos niveles de interleucina 12 (IL-12), IFN- γ , TNF- α e IL-6, citocinas que están asociadas con efectos proinflamatorios (Yerkovich *et al.*, 1997).

Por otro lado, hay evidencias de que la respuesta mediada por anticuerpos no es efectiva en la generación de un estado de protección, ya que son escasas las proteínas virales que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, en la infección congénita la inmunidad humoral juega un papel relevante, ya que, aunque la presencia de anticuerpos en las madres con infección

recurrente no evita la infección intrauterina del producto, sí evita daños severos a menudo observados en productos de madres que sufren de primoinfección (Sánchez y Pelayo, 1996).

Inmunidad Celular

Entre los antígenos virales, la fosfoproteína pp65 y la proteína que codifica la proteína inmediata temprana-1 del exón 4 (IE1 Exón 4) son dos de las dianas inmunodominantes en la respuesta de los linfocitos T citotóxicos. Estos antígenos inducen la respuesta de los linfocitos CD8+ de memoria durante la infección primaria en cerca del 90% de los individuos; otros antígenos que inducen una respuesta citotóxica celular de los linfocitos T son la proteína gB y la fosfoproteína pp150, aunque esto fue solo observado en un tercio de los pacientes seropositivos estudiados (Gyulai *et al.*, 2000).

La respuesta celular a los antígenos inmunodominantes pp65 y del IE1 Exón 4 es mediada, primariamente, por el complejo mayor de histocompatibilidad clase I y, posteriormente, por la inducción de linfocitos CD8+ (Engstrand *et al.*, 2000). Por otro lado, la formación de linfocitos CD4+ puede ser mediada por antígenos clase II del complejo mayor de histocompatibilidad causado por la proteína pp65, aunque su función sigue sin definirse (Gyulai *et al.*, 2000).

Patogénesis viral de la infección por CMV

En individuos inmunocompetentes, la infección activa (ia) suele cursar asintomática o con síntomas leves, en esta fase el virus es detectable en sangre mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por antigenemia, sin embargo, no se asocia con sintomatología clínica y la respuesta inmune logra controlar la infección. En todos los casos deja respuesta de anticuerpos de clase IgG de por vida que protege contra reinfecciones del mismo serotipo pero no contra los demás (Vancikova y Dvorak, 2001).

En las mujeres embarazadas con infección por CMV, la infección primaria puede ser asintomática o causar hepatitis leve, linfocitosis atípica y síntomas no específicos que desaparecen espontáneamente. El virus, después de la infección

primaria, se mantiene latente y puede reactivarse periódicamente sin signos o síntomas clínicos durante los episodios de inmunodepresión causada por infecciones intercurrentes, embarazo o estrés. A menudo es difícil establecer el momento de una infección durante el embarazo, generalmente es subclínica. Se sabe también que mujeres seropositivas pueden sufrir una infección con cepas de CMV distintas a la que presentaba inicialmente (Salud/CLAP/SMR, 2008).

Los pacientes inmunosuprimidos son los que presentan mayor riesgo para la evolución de la infección latente a infección sintomática (is), en esta fase el virus es detectable en sangre mediante PCR o antigenemia (Ljungman *et al.*, 2002). Sus síntomas no son específicos, dependen del órgano afectado; los más comunes son: gastroenteritis y problemas respiratorios acompañados con fiebre, que evoluciona a neumonitis intersticial, el paciente fallece por insuficiencia respiratoria si el tratamiento con antivirales no es oportuno (Adler y Marshall, 2007).

Epidemiología de la infección por CMV.

El CMV humano es un herpes virus ampliamente distribuido en el mundo, infecta a las personas en todas las edades, estados socioeconómicos y culturales. La seropositividad de la infección aumenta con la edad. Se sabe que la localización geográfica, la clase socioeconómica y la exposición en el trabajo son factores que influyen como riesgos de infección. La infección con CMV requiere contacto íntimo con saliva, orina u otros fluidos corporales, otras posibles rutas de transmisión incluyen el contacto sexual, el trasplante de órganos, la transmisión transplacentaria, la transmisión vía leche materna y rara vez por transfusión sanguínea (Dollard *et al.*, 2007).

El conocimiento de la epidemiología de CMV ha resultado de esfuerzos conjuntos entre investigadores de varios países y esto se debe a la importancia de la infección, de tal manera que en 1973, se realizó un estudio en donde se usaron los mismos agentes diagnósticos y procedimientos técnicos para detectar anticuerpos que fijan el complemento contra CMV en diferentes países. Se utilizó como referencia la presencia de anticuerpos que fijan el complemento contra CMV

ya que estos persisten por muchos años, así que se han tomado en cuenta como buenos indicadores de infección antigua por CMV (figura 1) (Krech, 1973).

Los resultados de Krech (1973), demostraron que existe una amplia prevalencia de anticuerpos contra el CMV y pudo establecerse que varía de acuerdo con las condiciones socioeconómicas, culturales y de conducta sexual. En estratos medios y superiores de población blanca, la seroprevalencia es de aproximadamente 60%, en cambio, en los sectores socioeconómicos bajos, con hacinamiento y promiscuidad, la prevalencia puede ser mayor del 85%. En Iberoamérica hay regiones que incluso alcanzan el 100% (Echániz-Avilés *et al.*, 1993). En México sólo hay dos estudios sobre la epidemiología del CMV: el de Echániz- Aviles *et al.* (1993), quienes observaron en mujeres en edad reproductiva que el 91.6% eran seropositivas a CMV, y el estudio de Gutiérrez-Salinas y Cruz-Tovar (2008), quienes analizaron en el Distrito Federal a 968 individuos de ambos sexos, de los cuales 825 (85.23%) fueron positivos para IgG anti-CMV.

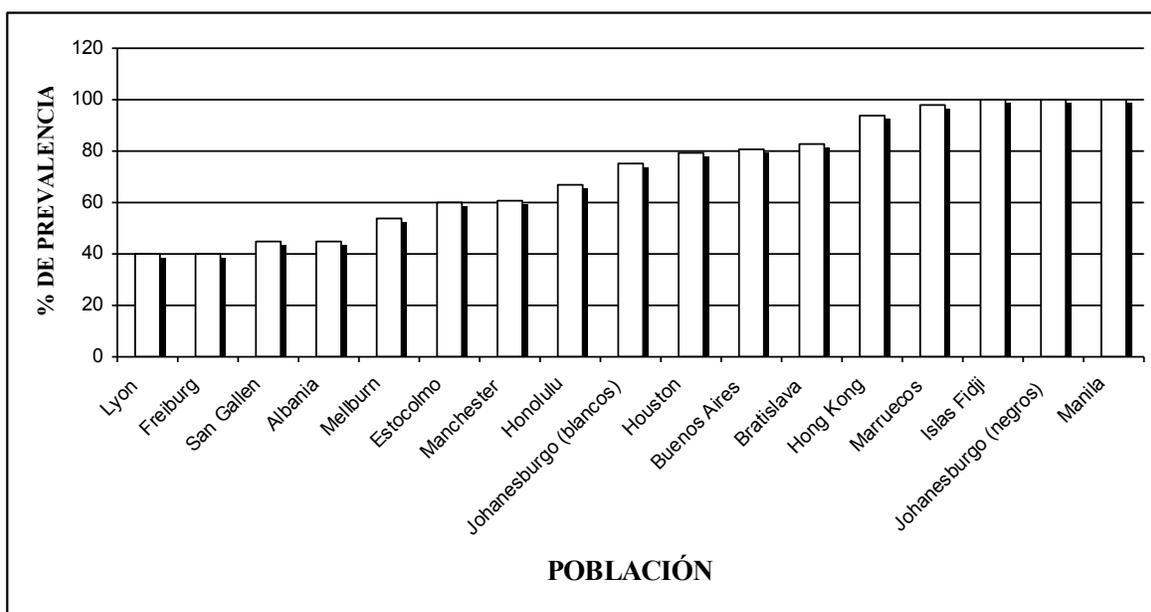


Figura 1. Prevalencia de Anticuerpos que fijan el complemento contra CMV en diferentes partes del mundo. Tomado de Krech, 1973.

Diagnóstico de la infección por CMV

Dado que actualmente existen antivirales muy eficaces para controlar la infección activa y curar la enfermedad por CMV, es muy importante poder diagnosticarla de forma fiable y precoz. Para ello se dispone de varias pruebas, de laboratorio e histológicas, con diferente sensibilidad y especificidad. El diagnóstico viral de rutina incluye técnicas directas e indirectas. La detección indirecta de los virus se realiza por medio de estudios serológicos. Técnicas para la detección directa de los virus incluyen la detección de antígenos virales, detección de los virus o componentes virales por aislamiento de los virus en cultivos celulares (o a través de experimentos animales) y la detección de ácidos nucleicos virales (Rabenau *et al.*, 2007).

Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico se basa en la identificación de anticuerpos contra el virus, que permite conocer la situación inmunológica frente al mismo antes de que se desarrolle la infección y diagnosticarla en buen momento; es de los métodos más utilizados (García *et al.*, 2004).

Métodos de cultivo

Esta técnica se basa en la reproducción de CMV de muestras clínicas, mediante la inoculación en fibroblastos humanos cultivados. El aislamiento del CMV se realiza a partir de muestras de orina, sangre, líquido cefalorraquídeo o tejidos afectados en forma específica por el proceso de la enfermedad (biopsias). Este proceso es muy largo y laborioso, requiere hasta 30 días además de que debe realizarse en un laboratorio de virología preparado. Son técnicas altamente sensibles para detectar CMV con un valor predictivo positivo de 100% (Barva, 2006).

Antigenemia

Es una técnica que se basa en la detección del antígeno pp65, una proteína estructural de la matriz viral expresada clínicamente solo durante la replicación *in vivo*, cuando se expresa en los granulocitos del huésped, permite diagnosticar una infección activa. Una desventaja potencial de esta prueba es la relativa subjetividad en la interpretación de los resultados, lo cual se explica por las

diferencias en el punto de corte en diferentes instituciones y por el deterioro potencial de la muestra cuando ocurre retraso en el procesamiento. Su mayor aplicación es en sangre y fluido cerebroespinal (Barva, 2006).

Técnicas moleculares

Estas técnicas se basan en la detección del genoma del CMV en las muestras, por lo que son absolutamente específicas y muy sensibles, si bien no significan una infección activa dado el carácter latente del virus. El método más utilizado es el de amplificación (PCR), que permite detectar cantidades muy pequeñas de virus, lo cual tiene el inconveniente de su excesiva sensibilidad que le resta valor pronóstico de enfermedad, aunque un resultado negativo permite excluir una infección activa (Barva, 2006).

Tratamiento de la Infección por CMV

Antes de 1989 no se disponía de ningún tratamiento adecuado contra el CMV. Se utilizaba aciclovir para el tratamiento de infecciones causadas por virus del herpes simple, pero se observó que poseía escasa actividad frente al CMV. El primer tratamiento utilizado fue ganciclovir por vía intravenosa. Posteriormente, aparecieron otros tratamientos sistémicos intravenosos y se desarrollaron tratamientos locales (Carretero, 2003).

Actualmente, cinco compuestos están licenciados para tratar infecciones establecidas por CMV, éstos son: ganciclovir (GCV), valganciclovir, foscarnet (FOS), cidofovir (CDV) y fomivirsen. Con excepción de fomivirsen, el cual es un oligonucleótido antisentido que tiene como blanco una proteína inmediata temprana y ha sido licenciado solamente para uso intra-ocular, todos los otros compuestos tienen como blanco, ya sea directa o indirectamente a la ADN polimerasa viral (Yeh y Coen, 2004).

Las drogas disponibles actualmente contra el CMV presentan severos inconvenientes que limitan su utilidad clínica, algunos de estos compuestos tienen una biodisponibilidad oral limitada, por lo que deben de ser administrados por vía intravenosa. Además, la mayoría de las drogas contra CMV exhiben una toxicidad

significativa, por ejemplo nefrotoxicidad, que es un factor limitante en la dosis de CDV y FOS, mientras que la supresión de la médula ósea que resulta en granulocitopenia y trombocitopenia, es el efecto tóxico más común observado con GCV (Villarreal, 2003).

La emergencia de cepas resistentes a los antivirales son un gran problema a la hora del manejo clínico. La mayoría de los compuestos anti-CMV comparten mecanismos de acción similares, ya que tienen como blanco a la ADN polimerasa viral, además los virus sensibles a una droga, son comúnmente resistentes a otras. De esta manera, actualmente hay todavía una fuerte necesidad de identificar nuevos blancos para la quimioterapia anti-CMV y de desarrollar nuevos compuestos antivirales y estrategias de tratamiento (Mercorelli *et al.*, 2008).

CAPITULO II.

Infecciones perinatales y CMV

La vida neonatal está caracterizada por una alta sensibilidad a los agentes infecciosos. La sensibilidad de los neonatos a las enfermedades infecciosas puede ser debida parcialmente, a la falta de una memoria inmunológica preexistente en los recién nacidos. Históricamente, la función de la respuesta inmune celular adaptativa en los recién nacidos ha sido considerada como inmadura (Adkins *et al.*, 2004).

Tipos de infecciones

Los procesos infecciosos que afectan al feto y al recién nacido se pueden clasificar en infecciones congénitas, víricas de transmisión vertical, bacterianas o por hongos de transmisión vertical y de transmisión horizontal.

Infecciones congénitas

En las infecciones congénitas, la agresión infecciosa tiene lugar en el período embrionario o fetal y puede ser causa de malformaciones de órganos y/o sistemas (período embrionario) o de lesiones (período fetal). Las infecciones congénitas pueden ser causadas por virus (CMV, virus rubeola, parvovirus B19, etc.), por protozoos (*Toxoplasma gondii*) o por bacterias (tuberculosis y sífilis congénitas). En general, cuando la infección tiene lugar en el 1er trimestre es más grave y origina múltiples malformaciones (Sastre *et al.*, 2002).

Infecciones Verticales

Las infecciones verticales se definen como aquéllas adquiridas por el neonato debido a que su madre la padece durante la gestación. Pueden ser transmitidas por la vía transplacentaria, por ruta ascendente a través de la vagina, al paso del neonato por el canal del parto o después del nacimiento (Jasso, 2005).

Virus que afectan al recién nacido

Los virus capaces de producir infección transplacentaria, estudiados hasta el momento, son de 25 a 30, de bacterias de 10 a 16, y de parásitos y otros tipos de agentes patógenos, de 3 a 5. Para el caso de la infección adquirida al paso del neonato por el canal del parto, los tipos de virus oscilan entre 8 y 10, de bacterias, de 30 a 40, y de parásitos y otros, de 10 a 14 (Jasso-Gutiérrez, 2006).

Como ejemplos de la capacidad potencial que tienen los virus para transmitir la infección de la madre hacia el feto, en el **cuadro 1** se observa el caso de los virus herpes CMV, que tienen una elevada potencialidad de transmisión de la madre hacia el feto tanto por vía transplacentaria como intraparto o postnatal. El herpes simple 1 y el 2 son capaces de transmitirse de la madre al neonato con menor potencialidad por la vía transplacentaria, comparada con la intraparto y un poco menor por la postnatal. Situación parecida sucede con el virus varicela zoster, mientras que esto es mucho menor para el virus humano herpes 6. Otros virus, señalados en el mismo cuadro, se piensa que tienen la potencialidad de hacerlo, sin embargo, no hay evidencias de que así suceda (Galán, 2005).

Cuadro 1. Capacidad potencial de varios modos de transmisión vertical de los virus herpes.

Etiología	Transplacentaria	Intraparto	Postnatal
Citomegalovirus	+++	+++	+++
Virus varicela zoster	+	++	++
Virus humano herpes 6	+	+	+
Virus Epstein-Barr	*	*	
Virus herpes del sarcoma de kaposi	*	*	+
Virus humano herpes 7	¿	¿	¿

¿:se desconoce; *potencial razonable pero no sustentado; + descrita pero rara, ++:ocurre con frecuencia; +++: se presenta en forma común. Fuente: Galán HJF. Tratamiento antiviral durante la etapa perinatal. En: Mancilla RJ, Larios MFJ, editores.

Farmacología de antimicrobianos. PAC Neonatología 2. México: Editorial Intersistemas; 2005.

Función inmunológica en el recién nacido contra los agentes virales.

Así como en otras edades, existen dos actividades específicas del sistema inmunológico del recién nacido; la primera es la resistencia a las infecciones, la cual se encuentra disminuida, y la segunda es la respuesta inflamatoria, que puede ser inadecuada y a veces dañina (Jasso, 2005). Las principales deficiencias que se presentan son: inmadurez de sus barreras naturales, disminución en número y función de neutrófilos, células NK disminuidas en número y función, baja producción de citocinas y niveles de complemento y de otras proteínas de fase aguda, además de esto la inmunidad específica también presenta deficiencias: los linfocitos B y células plasmáticas se encuentran inmaduras, la actividad de las células T también es inmadura por último hay una producción limitada de inmunoglobulinas y citocinas (Penagos *et al.*, 2003).

Los aspectos más importantes relacionados con la capacidad de defensa del recién nacido contra los virus se enuncian a continuación.

Inmunidad inespecífica

La citotoxicidad mediada por linfocitos especiales, llamados células NK, es deficiente por una producción selectiva disminuida de IFN- γ en el neonato, comparada con el adulto, mientras que la producción de interferón α y β es muy similar a la del adulto (Kretschmer, 1996).

Inmunidad específica

En los recién nacidos se presenta una inmadurez e incapacidad de las células T para generar una respuesta específica, eficaz y oportuna ante determinados estímulos antigénicos virales, esto posiblemente es causado por la ausencia relativa de memoria inmunológica debida a la falta de exposición previa a un virus en particular (Kretschmer, 1996).

Tomando en cuenta la conjunción de varias deficiencias en la respuesta inmune del neonato, además de las dificultades halladas en la respuesta contra antígenos específicos, es posible explicar de manera satisfactoria el porqué de la

diseminación de algunos virus, como sucede con la familia de los herpes (Jasso, 2005).

Adquisición pasiva de anticuerpos

Este tipo de inmunidad se refiere de manera fundamental a la transmisión transplacentaria de anticuerpos de la madre al producto. Al respecto, hoy día se asume que los anticuerpos que el neonato adquiere por este mecanismo sólo le confieren protección parcial de tipo preventivo, pero es posible que ayude a que se límite considerablemente la gravedad y diseminación de una enfermedad viral, como es el caso del herpes (Jasso, 2005).

Infección viral congénita por CMV

La infección por CMV en el neonato suele cursar sin ningún tipo de sintomatología, sin embargo entre el 10 y el 15% de los casos puede dar lugar a enfermedad clínica (Revello *et al.*, 2002). Los síntomas clínicos en el recién nacido pueden ser inespecíficos e incluir: ictericia, hepatoesplenomegalia, petequias o púrpura, coriorretinitis, calcificaciones, encefalitis, microcefalia y déficit de audición en el 30-65% de los casos sintomáticos y constituye, así, la causa más frecuente de sordera neurosensorial de origen no hereditario (Kimberlin *et al.*, 2003; Demmler, 1996), incluso en aquellos sin enfermedad evidente al nacer puede ser responsable de algún tipo de secuelas a largo plazo (Michaels *et al.*, 2003). La infección ocurre verticalmente, es decir de la madre al recién nacido ya sea a través de la placenta o a través de la leche materna (Hamprecht *et al.*, 2008).

En estudios realizados en otras partes del mundo, se ha observado que la transmisión a través de la leche materna puede ser el mecanismo más frecuente de transferencia y que los bebés con menos de 1000 g de peso y nacidos con un período de gestación de menos de 30 semanas, son de alto riesgo para la adquisición de la infección por CMV y el desarrollo de infección sintomática (Hamprecht *et al.*, 2008; Jim *et al.*, 2004).

Epidemiología de la Infección Congénita por CMV

La infección por CMV es la causa más frecuente de infección viral congénita en la población general, afectando aproximadamente entre el 0.2 y el 2.2% de los recién nacidos vivos (Gaytant *et al.*, 2002; Ryant *et al.*, 2002).

La incidencia de la infección congénita en México es conocida solo por un estudio realizado en San Luis Potosí; en este estudio se evaluó la presencia de la infección por CMV en 560 recién nacidos y la incidencia reportada fue de (0.89%), los infantes con infección congénita por CMV fueron más probables en mujeres primíparas ($P = 0.01$) y fueron más frecuentes en mujeres de zonas rurales ($P = 0.058$), hasta la fecha este es el único dato publicado en donde se reporta la incidencia de la infección por CMV en recién nacidos en México (Noyola, 2003).

Recién Nacidos Prematuros

En 1969, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó que se definiera como prematuro al neonato nacido antes de las 37 semanas de gestación. Esto causó controversias por varios años, pero hasta la mitad de la década de los setenta fue que se adoptó la definición de prematuro al producto de edad gestacional mayor de 20 semanas y menor de 37, con peso al nacer mayor de 500 gramos y menor de 2,500 gramos (Miranda-Del Olmo *et al.*, 2003).

A pesar de los esfuerzos realizados en el control del embarazo y el parto, la frecuencia de los partos prematuros se mantiene estable e incluso se aprecia desde hace unos años cierto incremento en la frecuencia de nacimientos extremadamente prematuros. Actualmente nacen antes de la semana 37 de gestación del 7 al 8% de los recién nacidos vivos, y por debajo de los 1.500 gramos de peso del 1 a 2% aproximadamente (Pallás-Alonso, 2012). Cerca de 13 millones de niños recién nacidos prematuros nacen en todo el mundo y el número de partos prematuros está aumentando en los últimos años (Cardoso-Demartini *et al.*, 2011).

Al parecer el aumento en recién nacidos prematuros se debe, en parte al menos, a la aparición de nuevas situaciones de riesgo, como el aumento de edad de las madres y la utilización masiva de las técnicas de reproducción asistida, que se asocian a mayor probabilidad de gestación múltiple. Estas gestaciones están abocadas a un parto prematuro y en el caso de las de más de dos fetos, probablemente a un parto antes de 33 semanas (Pallás-Alonso, 2012).

El riesgo de nacimientos prematuros para la población general se estima, aproximadamente, entre el 6 y 10%; en un estudio realizado en México se registró un total de 57,431 recién nacidos de 1995 a 2001, de los cuales 2,400 (4.1%) fueron prematuros, 1,052 (43.8%) mujeres y 1,348 (56.2%) hombres (Miranda-Del Olmo *et al.*, 2003).

Aunque la mortalidad en los recién nacidos prematuros ha disminuido significativamente, no es así para el caso de la morbilidad de la prematuridad que continúa siendo muy importante (Álvarez-Gómez y Martínez-Irisarri, 2002). La prematuridad es la segunda causa de mortalidad infantil después de las anomalías congénitas (La Hood y Bryant, 2007).

Función inmunológica en el recién nacido prematuro

El sistema inmune en los recién nacidos a término se encuentra incompletamente desarrollado al nacer, además de este hecho se presenta una inexperiencia antigénica. Muchos de los aspectos de inmadurez que se presentan en los recién nacidos a término se ven más pronunciados en los recién nacidos prematuros (Bonhoeffer *et al.*, 2006).

Debido a la inmadurez del sistema inmune del recién nacido prematuro, se dice que la inmunodeficiencia en éstos es más severa y prolongada, además los recién nacidos prematuros presentan una incidencia más alta de infecciones, sepsis y al mismo tiempo un riesgo incrementado de morbilidad, mortalidad y secuelas neurológicas (Gaetano, 2005).

Diagnóstico de la infección Congénita por CMV en Recién Nacidos Prematuros.

En los recién nacidos prematuros el diagnóstico temprano suele ser en la mayor parte de los casos una herramienta importante que permite la toma inmediata de decisiones médicas; la antigenemia o el PCR en sangre han sido usados para la detección con considerable fidelidad en grupos de pacientes inmunosuprimidos, principalmente trasplantados de riñón o médula ósea (Yakushiji *et al.*, 2002).

Sin embargo, principalmente para la antigenemia, su uso en RNP no ha sido posible debido a que la toma de muestras de sangre no es sencilla por la dificultad para el acceso vascular causado por su bajo peso e inmadurez, así como por las condiciones clínicas en las que el paciente se encuentra. También se ha utilizado el cultivo de orina, aunque tiene la desventaja de que el diagnóstico por este método requiere de un período de incubación largo y su sensibilidad es baja (Lawrence, 2007).

En los últimos años se ha recurrido a técnicas de biología molecular con las que ha sido posible trabajar con volúmenes pequeños de sangre y de fácil transporte; mediante estos métodos, el uso de sangre seca en tarjetas de papel filtro ha tenido resultados altamente sensibles además de que la toma de muestra involucra volúmenes pequeños de sangre con un procedimiento no invasivo, punto de gran importancia para el RNP (Soetens *et al.*, 2008), también se han aplicado otros procedimientos como la detección mediante PCR de virus en orina y en saliva (Yamamoto *et al.*, 2006). Los métodos de la biología molecular, aunque han resultado altamente confiables, y no implican tomar una muestra con un procedimiento invasivo, se han utilizado poco y se requiere continuar su evaluación. A pesar de ello, resultan alentadores como posibilidades diagnósticas.

Uso de sangre seca en tarjetas de papel filtro para la detección de CMV

La utilización de tarjetas de papel filtro se utilizó inicialmente para detectar en recién nacidos la presencia de desórdenes metabólicos (Garrick *et al.*, 1973;

Guthrie y Susy, 1963). El uso de tarjetas de papel filtro para obtener muestras de sangre presenta varias ventajas con relación a la toma de sangre líquida, entre ellas: 1) requiere de poca cantidad de sangre, 2) el ADN que se deposita en las tarjetas es estable, 3) el costo de transporte de la tarjeta hacia un laboratorio de referencia es mínimo (Wei *et al.*, 2005), y 4) la obtención de sangre seca en las tarjetas a partir de la punción del talón es fácil de realizar y es un procedimiento con el cual la mayoría del personal de salud (enfermeras) se encuentra familiarizado (Driver *et al.*, 2007).

De igual manera que el papel cuando el procedimiento de PCR se encontró disponible, éste se utilizó inmediatamente para la detección de patógenos, de hecho la detección de CMV por PCR a partir de orina fue realizada por primera vez a finales de los años 80 (Demmler *et al.*, 1988).

No pasó mucho tiempo para aplicar el procedimiento de detección con PCR a partir de sangre absorbida en tarjetas de papel filtro, fue en 1994 cuando se aplicó en infantes infectados congénitamente con CMV (Shibata *et al.*, 1994), aunque hay que mencionar que el uso de las tarjetas de papel filtro fue inicialmente propuesto por Cassol *et al.* (1991) para detectar VIH.

A partir de la propuesta de Shibata, otros grupos se encaminaron a evaluar la utilidad de las tarjetas de papel filtro para la detección de CMV, debido a las ventajas que presenta esta muestra con respecto a la toma de sangre líquida. Conforme se fue evaluando la técnica comenzó a surgir controversia acerca de la sensibilidad y especificidad en las técnicas de PCR cuando se utilizan las tarjetas de papel filtro, además de esto se ha reportado un amplio número de protocolos para detectar el CMV en las tarjetas de papel filtro como se puede ver en el cuadro 2, estas metodologías han mostrado alta variabilidad en su sensibilidad, la cual al parecer depende del método de extracción de ADN.

Como una consecuencia de la importancia de estar infectado por CMV en los recién nacidos prematuros y a las amplias ventajas que presenta la utilización de

las tarjetas de papel filtro para la detección de CMV, ha surgido la necesidad de establecer protocolos que presenten alta sensibilidad y especificidad.

Cuadro 2. Estudios realizados para determinar la utilidad de la tarjeta Guthrie en el diagnóstico de CMV.

Estudio	N	Seroprevalencia (%) de mujeres embarazadas	Neonatos con infección por CMV	Tipo de extracción	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Barbi et al., (2000)	509	79	72	Choque Térmico	81.9-100	92.2-99.7
Soetens et al., (2009)	Des	50	55	Fenol-Cloroformo	83	NA
Atkinson et al., (2009)	NA	Des	70	Qiamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)	72-74	NA
Boppana et al., (2010)	20,448	>70	92	Qiagen M48 (Qiagen)	28-34	99.9
Leruez-Ville (2011)	271	50	64	Modified Qiamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)	96.9-100	98.1-99

Abreviaciones: N, número de casos; Des, Desconocido, NA, no aplicable, CMV, Citomegalovirus.

CAPÍTULO III.

Hematopoyesis y trasplante de médula ósea.

La producción de células sanguíneas, fenómeno conocido como hematopoyesis, es un proceso complejo a través del cual las células troncales hematopoyéticas proliferan y se diferencian, dando lugar a los distintos tipos de células maduras presentes en la circulación sanguínea, de ahí que se diga que las llamadas células troncales sean pluripotentes, ya que se caracterizan por el potencial de generar progenie que está representada por al menos los ocho linajes hematopoyéticos: los linfocitos T, linfocitos B, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, basófilos/células cebadas, eosinófilos, neutrófilos/granulocitos y monocitos/macrófagos (Szilvassy, 2003).

La hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea, en donde una intrincada red de células estromales y sus productos, regulan cada una de las etapas que conducen a la generación de células primitivas, intermedias y maduras (Mayani *et al.*, 2007).

Las células presentes en la circulación sanguínea desempeñan una gran variedad de funciones fundamentales para el organismo; los eritrocitos transportan el oxígeno, mientras que los linfocitos, monocitos y granulocitos, intervienen en la defensa inmunitaria contra cuerpos extraños como bacterias y virus, por último, las plaquetas participan en el control de la coagulación sanguínea (Zambrano-Ramírez *et al.*, 1999).

Las células de la sangre tienen períodos de vida relativamente cortos, que varían de unas cuantas horas (granulocitos) a 12 ó 16 semanas (eritrocitos). De esta manera, diariamente son removidas de la circulación cantidades impresionantes de eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Sin embargo, en una persona sana los niveles de células sanguíneas permanecen prácticamente constantes durante la etapa adulta, lo que quiere decir que, para compensar la pérdida diaria de estas células, cada día el organismo produce cantidades iguales de ellas. En efecto, en

un adulto de 70 Kg., diariamente se producen 2×10^{11} eritrocitos, 2×10^{11} plaquetas y 7×10^{10} granulocitos (Mayani *et al.*, 1999).

En el ser humano, la hematopoyesis comienza durante las primeras semanas del desarrollo prenatal, siendo el saco vitelino el primer órgano hematopoyético. A partir del tercer mes de desarrollo, la mayor parte de la actividad hematopoyética ocurre en el hígado fetal, el cual lleva a cabo esta función hasta el séptimo mes de la etapa prenatal. Durante este período, el bazo también actúa como órgano hematopoyético. Desde el sexto mes de desarrollo y durante toda la etapa postnatal hasta la muerte del individuo, la médula ósea es el principal órgano hematopoyético (Metcalf y Moore, 1971).

En cada uno de los órganos hematopoyéticos las células sanguíneas se desarrollan dentro de un ambiente específico constituido por distintos tipos de células y proteínas extracelulares denominado microambiente hematopoyético. En la médula ósea, el microambiente hematopoyético está constituido por fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, osteoblastos y adipocitos (todos ellos denominados células del estroma medular). Dichas células producen y secretan diversos tipos de proteínas, las cuales desempeñan un papel fundamental en la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Por una parte, las células del estroma medular secretan proteínas que constituyen la matriz extracelular, como la colágena, la fibronectina, la laminina y los proteoglicanos. Por otra parte estas células producen proteínas denominadas citocinas, las cuales regulan la fisiología de las células y sus precursores (Mayani *et al.*, 1999).

Células hematopoyéticas progenitoras y multipotenciales.

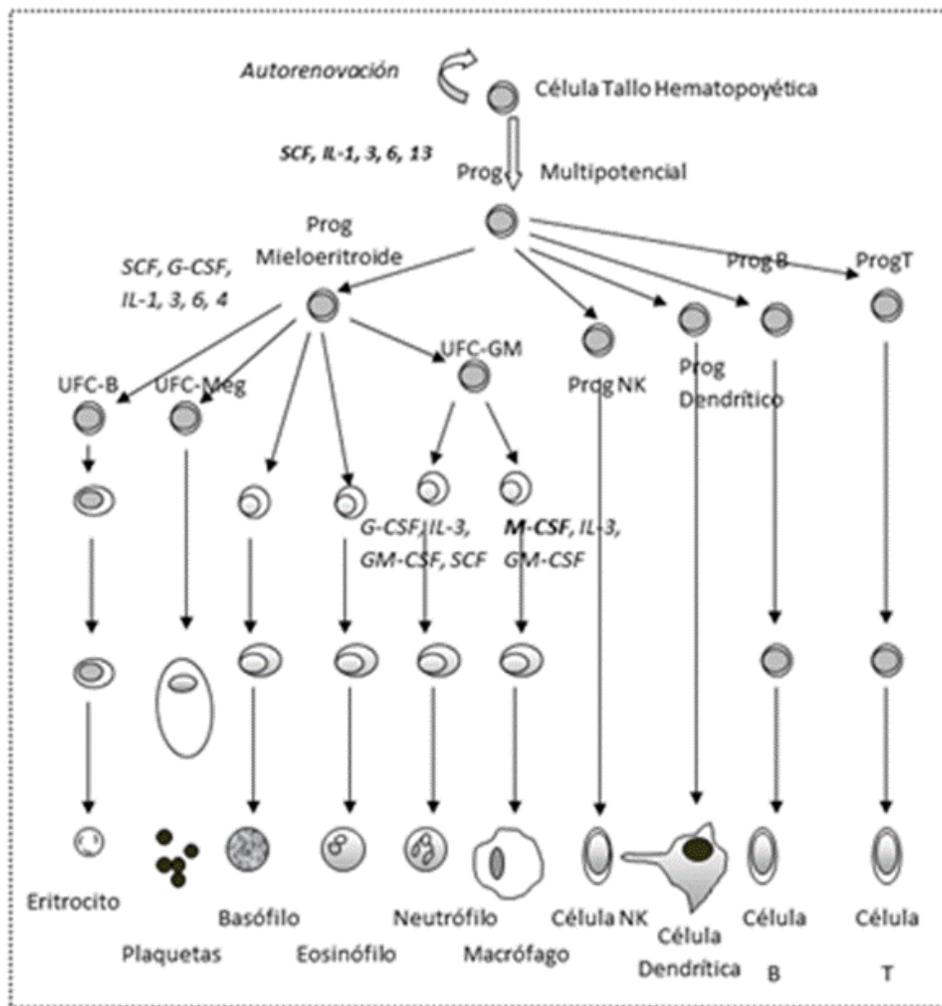
El sistema hematopoyético tiene como función renovar las células sanguíneas, para hacer esto el sistema se encuentra constituido por un conjunto de células que dan origen a todos los tipos de células sanguíneas estas células se conocen como células madre hematopoyéticas (Mera *et al.*, 2007).

En 1909 Alexander Maximov fue el primero en sugerir la existencia de las células tallo hematopoyéticas, las cuales presentaban una apariencia morfológica de un linfocito, capaces de proliferar y diferenciarse en linajes específicos (Mayani *et al.*, 2003).

Sin embargo, la existencia de las células progenitoras hematopoyéticas fue evidenciada posteriormente, al descubrir que ratones irradiados letalmente sobrevivían después de la inyección de células de médula ósea de ratones singénicos sanos. Las células formaban focos de proliferación en el bazo de los ratones recuperados después de 8 días, cada foco fue resultado de la multiplicación de una sola célula progenitora, la cual dio origen tanto al linaje mieloide como al linfoide. La proliferación de varias de ellas permitió la reconstitución del tejido hematopoyético de los ratones trasplantados (Gordon y Barret, 1985).

Las células tallo hematopoyéticas dan origen a células precursoras comprometidas de linaje multi o monopotente y se les conoce como unidad formadora de colonias (CFU), la proliferación y diferenciación de estas células constituyen el compartimiento de las células maduras hematopoyéticas localizadas en la circulación sanguínea y otros tejidos (Figura 2).

De esta manera, podemos decir que las células tallo hematopoyéticas son células primitivas indiferenciadas capaces de auto-renovación y diferenciación en todos los tipos celulares sanguíneos, la gran mayoría de las células tallo hematopoyéticas residen en la médula ósea y representan el 0.005% de las células totales (Mayani *et al.*, 2003).



Prog, Progenitora	IL, Interleucina
UFC, Unidad formadora de colonias	CSF, Factor estimulador de colonias
SCF, Stem Cell Factor	G, Granulocitos
M, Macrófagos	GM, Granulocito-Macrófago

Figura 2. Modelo de la hematopoyesis mostrando las citocinas requeridas para la diferenciación de los diferentes tipos celulares hematopoyéticos. Modificado de Morrison *et al.*, 1995.

Citocinas y hematopoyesis.

En general, en una célula eucarionte normal, el control estricto del ciclo celular se encuentra regulado por un amplio espectro de factores de crecimiento (Meager, 1991), tales factores son secretados por múltiples tipos celulares tanto normales como transformados (Lange *et al.*, 1992; Margni, 1996; Molema *et al.*, 1999).

Entre la mayoría de los moduladores de la proliferación celular destacan las citocinas. Estos moduladores ejercen su actividad de manera autocrina, paracrina o endocrina, intervienen en una fase determinada del ciclo celular, son capaces de regular la proliferación, la diferenciación y la activación de varios tipos celulares, comúnmente presentan actividad pleiotrópica (afectan a diferentes procesos, son multifuncionales) y sinérgica, circulan por los fluidos corporales, actúan a concentraciones muy bajas, tienen un tiempo de vida media muy corta y ejercen su efecto en determinadas células blanco al interactuar con receptores específicos de alta afinidad (Henrick y Bengt, 1989; Meager, 1991; Bendzten, 1994; Santos, 1994; Janeway-Travers, 1997).

Las células que se encuentran en el estroma medular producen estas glicoproteínas llamadas citocinas, que regulan la fisiología de las células sanguíneas y sus precursores. Particularmente, la proliferación de las células precursoras hematopoyéticas se encuentra regulada por varias citocinas conocidas como factores de crecimiento hematopoyético e interleucinas (Metcalf, 1998).

Las células en su estado más primitivo requieren de la acción concertada del factor de células tallo, Interleucina-6 (IL-6), IL-3, IL-1, IL-11, eritropoyetina (EPO), ligando flt 3/flk2 (FL) y trombopoyetina (TPO) para su sobrevivencia y proliferación. Para las células progenitoras, la presencia de otros factores como la IL-3 o TPO, es suficiente para su proliferación y diferenciación hacia células maduras (Ogawa y Matsunaga, 1999). Por otro lado, la regulación negativa de la hematopoyesis está bajo el control de factores como el de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), interferón gama (IFN- γ), factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) y

proteína inflamatoria de macrófagos-1-alfa (MIP-1 α) (Jacobsen *et al.*, 1994). También se ha incluido al óxido nítrico (NO) dentro de este grupo (Maciejewsky *et al.*, 1995).

Enfermedades Hematológicas por una Hematopoyesis ineficaz

La hematopoyesis es un proceso complejo en el que participan diversos tipos celulares y sus productos; todos éstos interactúan estrechamente para permitir que la producción de células sanguíneas ocurra de manera controlada. Sin embargo, al ocurrir alguna alteración en los compartimientos celulares del sistema hematopoyético, la producción de células sanguíneas puede modificarse, de manera que los niveles de células circulantes disminuyan drásticamente o se incrementen muy por encima de lo normal; cualquiera de estas condiciones puede conducir a estados fisiológicos muy delicados e incluso a la muerte del individuo. Enfermedades como la anemia aplásica, las leucemias mieloides (tanto crónica como aguda), las leucemias linfoides y los síndromes mielodisplásicos se originan a partir de alteraciones en células troncales y progenitoras hematopoyéticas (Mayani *et al.*, 2007).

Trasplante de progenitores hematopoyéticos

El tratamiento que involucra el trasplante de células tallo hematopoyéticas ha sido reconocido como un método que cura ciertas enfermedades del sistema hematopoyético (Holowiecki, 2008). Para realizar un trasplante hematopoyético se necesita obtener células progenitoras que puedan regenerar la función medular tras ser trasplantadas a un paciente al que se ha suprimido su médula ósea. Los trasplantes se clasifican en varios tipos según el donante y según la fuente de células progenitoras.

Tipos de trasplante según el donante:

El trasplante singénico es aquel en el que se aplica al enfermo médula ósea procedente de un hermano gemelo idéntico. Es un tipo de trasplante excepcional ya que es muy poco frecuente que un paciente tenga un hermano gemelo univitelino. El trasplante autólogo es aquel en el que se hace uso de células

progenitoras hematopoyéticas propias. En estos dos tipos de trasplante no existe disparidad genética ni antigénica entre la médula injertada y el receptor (Cárdenas, 2000; Garza-Madrid *et al.*, 2004).

El trasplante alogénico es aquel en el que un donante genéticamente no idéntico al receptor proporciona el injerto. Son individuos con diferencias genéticas, pero con la mayor identidad posible en los antígenos del sistema HLA. Existen varias posibilidades dentro del trasplante alogénico: hermanos HLA idénticos, con total identidad en los HLA de clase I y clase II. Es la mejor situación, pero sólo un 25-30% de los pacientes tienen un hermano totalmente idéntico, hermanos u otros familiares no idénticos con disparidad en 1 ó 2 locus. Existe un aumento de complicaciones por mayor incidencia de Enfermedad de Injerto Contra el Huésped (EICH), donantes haploidénticos, comparten un haplotipo del HLA con el paciente, generalmente son el padre o la madre, estos pacientes presentan un riesgo mucho mayor de EICH por lo que se realizan con depleción de linfocitos T como profilaxis. Donantes no emparentados: obtenidos a partir de los diversos registros internacionales de donantes de médula ósea, tienen que ser idénticos en todos los locus del HLA; sin embargo, aunque este tipo de trasplante constituye una opción terapéutica buena, la proporción de pacientes que tengan un HLA idéntico al de un donador, es muy bajo, y el éxito de este tipo de trasplantes es muy limitado (Bueren *et al.*, 2003; Rifon, 2006).

Tipos de trasplante según la fuente de progenitores:

La primera fuente de progenitores en utilizarse fue la médula ósea y la única utilizada durante mucho tiempo, sin embargo su uso está disminuyendo progresivamente al ser sustituida por la obtención de progenitores a partir de sangre periférica (Rifon, 2006). La sangre periférica, en condiciones normales, contiene una mínima cantidad de células madre hematopoyéticas circulantes, que aumentan durante la fase de recuperación de una aplasia inducida por quimioterapia o tras la administración de diversos factores de crecimiento hematopoyético, el más utilizado es el G-CSF (factor de crecimiento de colonias de granulocitos) (Bensinger *et al.*, 2001).

Los trasplantes de células tallo hematopoyéticas a partir de sangre periférica están reemplazando los de médula ósea debido a que la recuperación de neutrófilos y plaquetas así como la reconstitución son mucho más rápidas (Arai, 2003). Se ha utilizado una última fuente de células progenitoras, el cordón umbilical; las células progenitoras hemopoyéticas obtenidas a partir de la sangre del cordón umbilical se utilizan desde el año 1988 para trasplantes alogénicos de donantes no emparentados y se ha establecido como una alternativa (Wall y Chan, 2008; Gluckman *et al.*, 1989; Madero, 1999).

La sangre de cordón umbilical es rica en progenitores hematopoyéticos, pero su volumen es limitado, lo que hace que el número total de células madre sea pequeño y la recuperación inmunohematológica sea lenta. Inicialmente se usó sólo en niños, por la menor dosis celular necesaria, pero actualmente se está utilizando con éxito en pacientes adultos (Ballen, 2005). El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH), también llamado trasplante de células hematopoyéticas totipotenciales, en alguna época se conoció como trasplante de médula ósea, ya que de este sitio era de donde se obtenían preferentemente las células progenitoras hematopoyéticas, los autores también les denominan trasplantes de células tallo (Ballen, 2005), en esta tesis se mencionan indistintamente los nombres.

Trasplante de Médula Ósea

El TMO se originó como una medida para repoblar el compartimiento hematopoyético de células progenitoras, después de una exposición mieloablativa de radiación, era un medio de “rescate” (Blazar y Murphy, 2005; Baron *et al.*, 2003). El primer caso reportado de trasplante de médula ósea fue el caso de una mujer de 19 años con una aplasia inducida quien recibió el trasplante de médula de su hermano vía intravenosa. En 1949, el grupo de Jacobson, demostró que ratones irradiados cuyos bazoos eran protegidos, podrían ser protegidos de los efectos letales de la radiación, en 1951 el grupo de Lorenz demostró que los efectos letales de la radiación en ratones y conejillos de indias podrían ser prevenidos al trasplantarles médula ósea de conejillos de indias singénicos, otros

reportes demostraron de igual manera el efecto protector de la médula ósea contra radiación letal (Hardy y Ikpeazu, 1989; Baron *et al.*, 2003).

Los primeros trasplantes hematopoyéticos con éxito durable en humanos se reportaron en 1968 en tres pacientes con inmunodeficiencias primarias (Filipovich, 2008). Desde entonces se han realizado más de 240,000 trasplantes de médula ósea a nivel mundial en 450 centros en 47 países para el tratamiento de más de 50 enfermedades fatales (ver cuadro 3). La mayoría de estos trasplantes han sido trasplantes autólogos, se sabe que en la actualidad, se realizan anualmente de 25,000 a 35,000 trasplantes autólogos, mientras que solamente alrededor de 15,000 trasplantes alogénicos (Chinen y Buckley, 2010).

A pesar de los progresos que se han hecho en torno al trasplante de médula ósea como son el uso de factores de crecimiento hematopoyéticos para acelerar el injerto y reducir la duración de la neutropenia, así como la implementación de nuevas terapias inmunosupresoras y mejores procedimientos para evaluar la histocompatibilidad, el TMO se asocia con problemas que impiden que los pacientes presenten una remisión completa, entre éstos, encontramos problemas inmunológicos como el rechazo del injerto, la EICH, así como las infecciones (Ninin *et al.*, 2001; Di Persio *et al.*, 2000).

Cuadro 3. Enfermedades tratadas con trasplantes de células tallo.

Enfermedad	Tipo
Leucemias	Leucemia aguda linfoblástica Leucemia aguda mielógena Leucemia crónica linfocítica Leucemia mielógena crónica
Linfoma	Linfoma no-Hodgkin Enfermedad Hodgkin
Desordenes celulares plasmáticos	Mielomas múltiples y desordenes relacionados
Neoplasias de órganos sólidos	Cáncer de senos, cáncer de ovarios, cáncer de pulmón, sarcoma
Síndrome mielodisplásico Anemia aplástica severa	
Enfermedades autoinmunes	Esclerosis múltiple, esclerosis sistémica, Lupus eritematoso sistémico
Inmunodeficiencias primarias	Inmunodeficiencia severa combinada Síndrome de Wiskott-Aldrich Enfermedad granulomatosa crónica Deficiencia en la adhesión de los leucocitos Deficiencia del ligando CD40 Enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma-X Linfo-histiocitosis hemofagocítica

Tomado de: Chinen y Buckley, 2010.

Rechazo del injerto

Desde los inicios del trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas se reconoció al rechazo del injerto como un fenómeno frecuente y con un impacto negativo sobre el éxito del trasplante. El rechazo ocurre como consecuencia de la disparidad genética entre donador y receptor, o bien como consecuencia de una sensibilización a antígenos menores de histocompatibilidad por transfusiones. Se han reconocido dos formas de presentación del rechazo: el primario, cuando no existe ninguna evidencia de actividad hematopoyética del injerto, y el tardío, que se define como una pérdida de la función del injerto después de haber existido evidencia de actividad del mismo. Los pacientes que presentan esta complicación pueden ser rescatados con un segundo trasplante (Hernández-Rivera, 2005).

Enfermedad de injerto contra el huésped (EICH).

La EICH se mantiene como una de las principales complicaciones del TMO. Es una entidad inmunológica observada frecuentemente luego del trasplante de médula ósea, que se produce como resultado del reconocimiento como extraños a los antígenos de histocompatibilidad (HLA) de los tejidos del receptor por el sistema inmunitario procedente del donante, esto da como resultado la agresión de distintos órganos diana del paciente por parte de una serie de células efectoras estimuladas del injerto (linfocitos T citotóxicos, células NK...), con el concurso de varias citocinas (IL-2, TNF...). La EICH se caracteriza por manifestaciones cutáneo-mucosas compromiso sistémico (principalmente hígado, ojo y aparato gastrointestinal) además de manifestaciones en la piel las cuales son múltiples, secuenciales e indicadores del pronóstico de la enfermedad (Centeno, 2006; Brufau *et al.*, 2004).

La incidencia de esta enfermedad varía de un 35 a 50% y esto depende de los factores de riesgo presentes, el riesgo de presentar la enfermedad se incrementa con el uso de donadores no relacionados, donador incompatible, mayor edad del donador, mujer donadora múltipara, edad mayor del recipiente, tipo de trasplante (la sangre de cordón umbilical presenta una menor incidencia que la médula o la sangre periférica) entre otras (Jacobsohn y Vogelsang, 2007).

Existen dos tipos de EICH, el agudo y el crónico; el tipo agudo se caracteriza por dermatitis, elevación de pruebas hepáticas con un patrón colestásico y enteritis en un plazo menor a 100 días después del trasplante de médula ósea, se inicia aproximadamente a los 20 días. La crónica ocurre después de 100 días del TMO, y se considera a veces una extensión del cuadro agudo, aunque puede ocurrir «de novo» o luego de resolución de un episodio agudo previo (Ortega *et al.*, 2005).

Infecciones en trasplante de médula ósea.

Las infecciones representan una de las más significativas complicaciones que se presentan después de un trasplante, las cuales tienen un efecto negativo en la calidad de vida y sobre todo en la sobrevivencia del paciente (Nucci *et al.*, 2003), representan arriba del 63% de las causas de muerte en trasplantes alogénicos (Frere *et al.*, 2006).

Durante los últimos años, se han hecho modificaciones en el manejo de los pacientes que reciben trasplantes de células tallo hematopoyéticas para la prevención de infecciones en estos pacientes, estos cambios comprenden entre otros, nuevos agentes antimicrobianos, incremento en el conocimiento que se tiene sobre la reconstitución inmune después del trasplante, sin embargo, a pesar de estos avances, las infecciones son la causa de muerte primaria en 8% de los pacientes que reciben un trasplante autólogo y la causa de muerte primaria de 17 a 20% de los que reciben un trasplante alogénico (Tomblyn *et al.*, 2009).

Se dice que, en todos los pacientes, las infecciones bacterianas son comunes debido a la neutropenia y mucositis que presentan debido a la terapia de inmunosupresión y también debido a la presencia de catéteres centrales intravenosos (Steward y Jarisch, 2005). De esta manera, la infección bacteriana se ha mantenido como una de las principales causas de infecciones dentro de los recipientes de trasplantes de células tallo hematopoyéticas, ocurriendo en más de 30% de los episodios febriles neutropénicos que dan durante el período temprano post-trasplante (Oliveira, 2007).

Las infecciones con hongos (especialmente con especies de *Candida* y *Aspergillus*) son potencialmente letales (Steward y Jarisch, 2005), de ahí que se reconozca a las infecciones invasivas por hongos como una causa de morbilidad y mortalidad en pacientes que han recibido un trasplante de médula alogénico (Martino *et al.*, 2002).

Los problemas virales abarcan desde patógenos respiratorios de origen nosocomial (RSV, influenza, parainfluenza) o la reactivación de virus que residen ya sea en el paciente o en el donador, los principales virus incluyen a CMV, adenovirus y Epstein-Barr (EBV).

Infecciones virales después de trasplante de médula ósea.

La mayor parte de los virus que afectan al hombre pueden causar enfermedad grave en pacientes inmunocomprometidos. Las infecciones virales son una complicación común y potencialmente fatal en estos pacientes, incluyendo aquellos que han recibido un trasplante de células tallo hematopoyéticas (Villasís-Keever y Mosqueda, 2005; Jancel y Penzak, 2009); su epidemiología se encuentra relacionada con el tipo de trasplante (autólogo vs alogénico), el estado inmune del donador y/o del recipiente y el tiempo del trasplante (Castagnola *et al.*, 2008). Las infecciones virales son un evento raro después de un trasplante autólogo, a pesar de que muchos virus han demostrado causar enfermedad en trasplantes alogénicos (Castagnola *et al.*, 2008).

Las infecciones virales más frecuentes después de un trasplante autólogo de células son el virus de herpes simple y el CMV que ha sido reportado en no más del 3% de los pacientes (Castagnola *et al.*, 2008). Las infecciones causadas por CMV, HSV, VZV y EBV así como virus respiratorios como RSV, virus de parainfluenza y virus de influenza, son bien conocidas, sin embargo hay algunos virus de reciente descubrimiento que atacan al paciente después de un TMO como HHV-6, hMPV, y el virus BK, mientras que otros presentan una reemergencia como el adenovirus; en el cuadro 4 se puede ver un panorama general de los virus

reconocidos que atacan al paciente después de un trasplante de médula ósea (Boeckh *et al.*, 2005).

Cuadro 4. Virus conocidos y emergentes en pacientes con trasplante de médula ósea.

Virus conocidos
CMV HSV VZV EBV Influenza virus Parainfluenza virus RSV
Virus nuevos o emergentes
Adenovirus Polyoma virus BK virus JC virus hMPV HHV-6 HHV-7
CMV, citomegalovirus; EBV, Virus Epstein Barr; HCT, HHV, virus herpes humano; hMPV, metaneumovirus humano; HSV, virus herpes simple; RSV, virus sincitial respiratorio; VZV, virus de varicela zoster. Tomado de: Boeckh <i>et al.</i> , 2005.

El papel de CMV en el TMO.

La infección y enfermedad por CMV son complicaciones muy importantes en el TMO y su incidencia es de 42 a 69% y de un 16 a 25% (Stocchi, 1999), aunque en estudios más recientes se ha reportado una incidencia de hasta del 35% en trasplantes alogénicos (Leruez-Ville *et al.*, 2003). Algunos autores consideran a la infección por CMV como la más importante de las complicaciones infecciosas después de un trasplante de médula ósea (Foot *et al.*, 1993; Yi y Kim, 2012).

La importancia de la infección por CMV radica en los efectos que presenta el paciente al presentar la infección (Hantz, 2010; Boeckh *et al.*, 2005); la neumonía por CMV es muy frecuente en los 6 primeros meses postrasplante, la evolución es muy agresiva presentando una mortalidad del 85% (Alonso, 2004). Sin embargo, la neumonía por CMV se ha vuelto menos común al aplicarse las estrategias de prevención actuales (Hantz, 2010). Otras manifestaciones que se incluyen debidas a la infección con CMV, pero que son raras, son la retinitis y la encefalitis. El CMV también ha demostrado un efecto inmunosupresor, lo que conlleva a una susceptibilidad incrementada para presentar enfermedades por hongos y bacterias (Hantz, 2010). Muchos factores se han asociado con el riesgo de presentar infección y enfermedad por CMV, en trasplantes alogénicos el estado serológico del donador y del receptor es el factor más importante de riesgo (Yi y Kim, 2012; Zhou, 2009).

Los receptores seropositivos, no importando el serostatus de sus donadores, se encuentran en alto riesgo de una infección recurrente por CMV, mientras que los individuos seronegativos quienes reciben médula de donadores seropositivos se encuentran en un menor riesgo de una infección primaria. Los pacientes que se encuentran en el riesgo más bajo son aquellos seronegativos que presenta un donador seronegativo dado que el principal riesgo es que reciban transfusiones de donadores de sangre seropositivos (Stochi *et al.*, 1999). Otros factores secundarios que predisponen a la infección por CMV incluyen: una alta depleción de células T, enfermedad crónica de injerto contra el huésped y el uso de altas dosis de corticoesteroides (Hantz, 2010, Stocchi *et al.*, 1999).

El papel de la proteína de envoltura gB en la patogénesis viral después del trasplante de médula ósea.

Cuando se presenta la infección o reactivación de CMV en los pacientes con TMO algunos pacientes desarrollan enfermedad clínica, mientras que otros se mantienen asintomáticos y solo presentan infección activa (Britt, 2008).

Debido a estos hechos, se ha sugerido un posible involucramiento de factores ya sea del hospedero o del virus que llevan a la infección sintomática. Por este hecho se han estudiado variaciones genotípicas que se encuentran en la glicoproteína gB de CMV las cuales podrían estar involucradas en la evolución de la infección activa a una enfermedad severa (Torok-Storb *et al.*, 1997; Chou y Denninson, 1991).

La proteína gB es codificada por el gen UL55 de CMV, a la fecha se conocen cinco genotipos: gB1, gB2, gB3, gB4 y gB5. Aunque los resultados obtenidos en la relación del genotipo gB con la gravedad de la infección son todavía controvertidos, se ha observado que las infecciones asociadas a múltiples cepas muestran mayor probabilidad de mala evolución que aquellas donde infecta sólo una cepa (Coaquette *et al.*, 2004).

De esta manera el estudio de marcadores moleculares como gB podría ofrecer una alternativa pronóstica al paciente de TMO que sufre una reactivación si se establece asociación entre el genotipo gB en el desarrollo de la infección y algún o algunos genotipos determinados de gB.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los recién nacidos prematuros, el diagnóstico temprano de enfermedades infecciosas suele ser, en la mayor parte de los casos, una herramienta importante que permite la toma inmediata de decisiones médicas; la antigenemia o el PCR en sangre han sido usados para la detección de CMV con considerable fidelidad en grupos de pacientes inmunosuprimidos, principalmente trasplantados de riñón o médula ósea (Yakushiji *et al.*, 2002).

En los RNP, el uso de la antigenemia como método de diagnóstico del CMV no ha sido posible debido a que la toma de muestras de sangre no es sencilla; su bajo peso e inmadurez, así como sus condiciones clínicas, dificultan el acceso vascular. También se ha utilizado el cultivo de orina, aunque tiene la desventaja de que el diagnóstico requiere de un período de incubación largo y su sensibilidad es baja (Drew, 2007).

En los últimos años, se ha recurrido a técnicas de biología molecular, lo que permite trabajar con volúmenes pequeños de sangre. Estos métodos, más el uso de sangre seca en tarjetas de papel filtro, han tenido resultados altamente sensibles; la toma de muestra involucra volúmenes pequeños de sangre, procedimiento no invasivo, punto de gran importancia para el RNP (Soetens *et al.*, 2008). También se han aplicado otros procedimientos como la detección mediante PCR de virus en orina y en saliva (Yamamoto *et al.*, 2006; Schlesinger *et al.*, 2003), aunque han resultado altamente confiables y no implican tomar una muestra con un procedimiento invasivo, se han utilizado poco y se requiere continuar su evaluación, ya que resultan alentadores como posibilidades diagnósticas.

El trasplante de médula ósea ha tenido poco desarrollo en nuestro país, se calcula que en México se están realizando solo 10% de los trasplantes hematopoyéticos que debieran realizarse en condiciones óptimas, lo que significa que se está privando de este tratamiento a 90% de los pacientes que lo requieren (Ruíz-Arguelles *et al.*, 2011). El costo unitario estimado de un trasplante de médula ósea

en México es de 2.3 millones de pesos (Gómez-Fraga, 2001), lo que es sumamente elevado e implica que se deben buscar estrategias para optimizar recursos y disminuir los costos del tratamiento con resultados comparables con centros internacionales (Gómez-Morales, 2002).

El tratamiento y estudio de las enfermedades oncológicas es de suma importancia en nuestro país, se estudió la mortalidad por cáncer en niños mexicanos durante el período de 1955 a 1995 y se observó un aumento general (Fajardo-Gutiérrez, 2005).

El futuro de los niños con leucemia radica en ofrecerles un tratamiento integral (Fajardo-Gutiérrez, 2005), lo que implica conocer completamente los problemas que se presentan en un trasplante de médula ósea. Dentro de éstos se encuentra la presencia de infecciones que son muy importantes tanto por su frecuencia como su asociación a morbilidad y mortalidad (Nucci *et al.*, 2003; Frere *et al.*, 2006). De las infecciones que se presentan en un TMO, la infección por CMV es una de las complicaciones más temidas en los pacientes inmunosuprimidos. Algunos autores la consideran como la más importante de las complicaciones infecciosas después de un TMO (Jancel y Penzak, 2009; Foot *et al.*, 1993; Yi y Kim, 2012).

JUSTIFICACIÓN

Los recién nacidos presentan una protección disminuida para las infecciones, por su respuesta inmune deficiente (Orfali, 2004); debido a esto, son particularmente susceptibles a presentar infecciones virales. Además, se sabe que a mayor prematuridad en el recién nacido se presenta mayor frecuencia de infecciones, por lo que consideramos que la susceptibilidad a presentar una infección por CMV y presentar sintomatología que originarían secuelas durante la infancia en estos pacientes sería muy alta, de ahí que el identificar y caracterizar la infección activa por CMV en pacientes recién nacidos prematuros mexicanos es de gran importancia.

Se ha propuesto que las proteínas de envoltura como la proteína gB de CMV presentan un papel importante en el tropismo del virus hacia diferentes tejidos y como epítopes inmunodominantes en la respuesta de anticuerpos neutralizantes (Meyer-König *et al.*, 1998), por lo que en el presente trabajo nos proponemos establecer la prevalencia de cada genotipo debido a dos razones fundamentales:

1. Las proteínas gB tienen un papel importante en el ataque y reconocimiento a la célula huésped, por lo tanto, dependiendo de las variaciones que estas proteínas presenten, es posible que el tropismo del virus hacia los diferentes tejidos también cambie, lo que pudiera llevar a cambios en la patogenicidad y sintomatología clínica dependiendo del genotipo del cual se trate (Noyola *et al.*, 2003), de esta manera el conocer dichas variaciones permitiría dar un pronóstico respecto al riesgo del neonato para desarrollar sintomatología clínica posterior a una infección activa.
2. El diseño de una vacuna anticitomegalovirus está fundamentado en la respuesta inmune de anticuerpos que se desarrollan contra dichas proteínas (Coaquette *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2008), por lo que, conocer la prevalencia de genotipos tendrá impacto en el desarrollo de vacunas.

HIPÓTESIS

1. Si se establece un método molecular, a partir de muestras no invasivas, entonces se logrará un diagnóstico rápido, sensible y específico, pero evitando los riesgos que implica una toma de muestra invasiva.
2. Si la carga viral es un marcador de riesgo en el recién nacido prematuro infectado con CMV entonces, el identificar qué niveles son riesgosos para desarrollar infección sintomática permitirá tomar medidas para reducir el riesgo de infección y evitar secuelas postnatales.
3. Si la presencia de un determinado genotipo, o mezclas de genotipos, influyen en el desarrollo de la enfermedad por CMV entonces, establecer el genotipo de la proteína gB, ayudará a conocer el pronóstico de la infección viral.

OBJETIVOS.

Objetivo General: Identificar y caracterizar la infección activa por Citomegalovirus.

Objetivos Específicos:

1. Establecer qué tipo de muestra (saliva o sangre en tarjeta Guthrie) es el más adecuado para la detección de CMV.
2. Determinar la asociación entre la carga viral con el riesgo de desarrollo de infección sintomática y secuelas postnatales congénitas.
3. Establecer los genotipos de gB en pacientes de TMO infectados con CMV.
4. Establecer el papel de los genotipos de gB como marcadores pronósticos de la evolución clínica de la infección activa en pacientes con TMO.

MÉTODOS

Diseño del estudio:

Estudio descriptivo, observacional, prospectivo.

Población en estudio.

Se realizó un estudio en RNP admitidos entre diciembre de 2009 y agosto del 2011 en la unidad neonatal del Hospital de la Mujer. Se incluyeron aquellos recién nacidos que al nacer tenían menos de 37 semanas. Se obtuvo consentimiento informado de todas las madres. Se seleccionaron 271 RNP los cuales fueron evaluados para infección para CMV mediante cultivo de saliva y por PCR con dos especímenes tarjetas Guthrie y saliva. Se reclutaron 30 pacientes pediátricos con edades de 1 a 17 años, los cuales presentaban ADNemia por CMV después de que se les realizara trasplante de médula ósea alogénico en el Hospital Infantil de México Federico Gómez y en el Centro Médico Nacional La Raza, IMSS en la Ciudad de México.

Serología Materna.

Se evaluó la presencia de anticuerpos anti CMV IgG e IgM con el kit Platelia de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), estos se realizaron de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Brevemente, a la microplaca revestida del antígeno (para IgG) y de anticuerpos anti- μ (para IgM), se les adicionaron 200 μ l de las muestras a analizar y se incubó 60 minutos a 37°C. Se lavó cuatro veces y se agregó el conjugado. Se incubó 60 minutos a 37°C, se lavó cuatro veces y se colocó en la microplaca el sustrato/cromógeno. Se incubó 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y por último se agregó el inhibidor de la reacción. La lectura se realizó a 450 nm, el valor de corte se estableció de acuerdo con lo descrito por el fabricante.

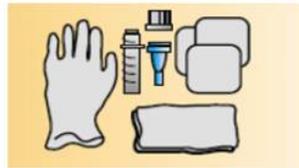
Cultivo de muestras clínicas

Se realizaron cultivos para diagnosticar la infección por CMV, de acuerdo con la siguiente metodología: las muestras de saliva se descongelaron en hielo, posteriormente se centrifugaron a 3220 g por 10 min, se hizo una dilución 1:2 en medio D-MEM (Gibco) 2% de SFB (Gibco) y se filtraron usando un filtro Millipore de 0.22 μm de nitrocelulosa, se centrifugaron a 50,000 g por 60 min a 4°C, por último se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 400 μl de D-MEM 2% de SFB (Gibco). La mezcla D-MEM y muestra se adicionó a una monocapa confluyente de células HFF jóvenes (pases 12-16), en una microplaca de 96 pozos. Las placas se analizaron durante un mes hasta que se observó efecto citopático característico de la infección por CMV el cual se caracteriza por un efecto focal de células gigantes (Hamprecht *et al.*, 2003).

Toma de muestra de sangre del talón para la tarjeta Guthrie.

La obtención de las muestras de sangre del talón para las tarjetas Guthrie se realizó siguiendo el mismo procedimiento empleado para la obtención de las muestras que se utilizan para el tamiz metabólico en neonatos. Posterior a la obtención del consentimiento informado de la madre, se procesó la muestra como se detalla a continuación (figura 3).

1. Se preparó el material para la obtención de la muestra: torunda de algodón, lanceta guantes, tarjeta Guthrie (papel Whatmann).
2. Se realizaron las medidas de asepsia y antisepsia en el talón del paciente.
3. Se puncionó el talón, se eliminó la primera gota de sangre y se dejó formar otra.
4. Se hizo contacto con ésta última levemente con el papel filtro, dejando absorber hasta llenar el círculo por completo en una sola aplicación (la sangre se aplica solamente en una de las caras del papel filtro). Se deben llenar los círculos restantes de la misma manera.
5. Al finalizar, se secó la zona con algodón y se desinfectó con alcohol.



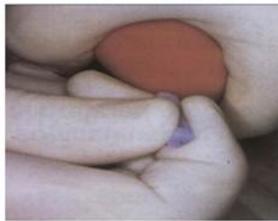
Paso 1 Reuna el material y prepare al paciente



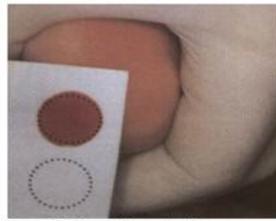
Paso 2. Seleccione la zona, y calientela



Paso 3. Desinfecte y deje secar al aire



Paso 4. Haga una punción en el talón. Limpie la primera gota de sangre, deje que se forme otra gota de sangre.



Paso 5. Toque la gota de sangre levemente con el papel filtro. Deje que se absorba y llene el círculo por completo con una sola aplicación (Para aumentar el flujo de sangre puede aplicar una muy LEVE presión de manera intermitente al área próxima al lugar de punción). Aplique la sangre solamente en una de las caras del papel filtro.



Paso 6. Llène los círculos restantes de la misma manera, con Gotas de sangre sucesivas, al finalizar seque con algodón y desinfecte con alcohol.

Figura 3. Toma de muestra de sangre del talón para la tarjeta Guthrie.

Toma de muestra de saliva.

Para la obtención de cada muestra de saliva se obtuvo el consentimiento informado por parte de la madre y posteriormente se realizaron los siguientes pasos:

- 1.** Se reunió el material para la obtención de la saliva: hisopo (estéril), tubo con medio de transporte (MEM).
- 2.** Se tomó el hisopo y se colocó la punta del algodón en el interior de una de las mejillas (en la zona conocida como carrillo) durante 1 minuto.
- 3.** Se colocó el hisopo con la muestra en el tubo con el medio de transporte y se tapó el tubo.

Un esquema del procedimiento se puede ver en la figura 4.



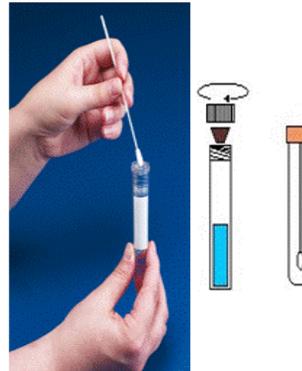
Paso 1. Reúna el material y prepare al paciente.



Paso 2. Tome el hisopo y sáquelo del empaque.



Paso 3. Tome un hisopo y coloque la punta del algodón en el interior de una de las mejillas durante 1 minuto.



Paso 4. Coloque el hisopo con la muestra en el tubo con el medio de transporte y cierre el tubo.

Figura 4. Esquema del procedimiento para las obtención de saliva en los recién nacidos prematuros.

Extracción de ADN directamente de saliva

Se tomaron 500 μ l de saliva y se les adicionaron 100 μ g/ml de proteinasa K. Las muestras se incubaron a 56°C toda la noche. En seguida se agregaron 500 μ l de fenol-cloroformo (1/1), se agitó vigorosamente por 30 seg y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. La fase acuosa (fase superior) fue recuperada y se le agregaron 500 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24/1), se agitó vigorosamente por 30 seg y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. La fase acuosa se recuperó y se le agregaron 700 μ l de etanol al 70% y 70 μ l de acetato de sodio 3M, el tubo se guardó a -20°C por 24 horas. Posteriormente se realizaron tres lavados con 500 μ l de etanol al 70% y el botón se secó por 2 horas. El ADN se resuspendió en 50 μ l de H₂O estéril y se usó directamente para la amplificación por PCR.

Extracción de ADN de Tarjetas Guthrie

El papel que contenía la muestra se sumergió en un amortiguador de extracción (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 50 mM, EDTA 0.5 mM y 0.5% SDS) como lo reportaron Soetens *et al.* (2008) y se digirió toda la noche con 100 μ g/ml de proteinasa K. A la muestra se le adicionaron 500 μ l de fenol cloroformo (1/1), se agitó vigorosamente por 30 seg y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. La fase acuosa (fase superior) se recuperó y se le agregaron 500 μ l de cloroformo alcohol isoamílico (24/1), se agitó vigorosamente por 30 seg y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. La fase acuosa se recuperó y se le agregaron 70 μ l de acetato de sodio 3M y 700 μ l de etanol al 70%, el tubo se guardó a -20°C por 24 horas. Se realizaron tres lavados con 500 μ l de etanol al 70% y el botón se dejó secar por 2 horas. El ADN se resuspendió en 50 μ l de H₂O estéril y este se usó directamente para la amplificación por PCR.

Extracción de ADN de sangre

Se obtuvieron 5 ml de sangre de los pacientes con TMO. De la sangre se obtuvo un plasma rico en leucocitos adicionando una solución de dextrans; el plasma rico en leucocitos se centrifugó a baja velocidad (1,500 rpm) para recuperar el paquete

leucocitario y el plasma. Se tomaron 500 μ l de plasma libre de células, cada uno de los cuales se digirió con proteinasa K, enseguida se agregaron 500 μ l de fenol-cloroformo (1/1), se agitó vigorosamente por 30 seg y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. La fase acuosa (fase superior) fue recuperada y se le agregaron 500 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24/1), se agitó vigorosamente por 30 seg y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. La fase acuosa se recuperó y se le agregaron 700 μ l de etanol al 70% y 70 μ l de acetato de sodio 3M, el tubo se guardó a -20 °C por 24 horas. Posteriormente se realizaron tres lavados con 500 μ l de etanol al 70% y el botón se secó por 2 horas. El ADN se resuspendió en 50 μ l de H₂O estéril y se usó directamente para la amplificación por PCR.

PCR

Se evaluaron dos técnicas de PCR, una anidada (n-PCR) ya reportada para detectar CMV (Hamprecht *et al.*, 1997; Hamprecht *et al.*, 1998) y otra en tiempo real desarrollada en el laboratorio. La genotipificación de las muestras se realizó utilizando una PCR semianidada como lo describieron Tarrago *et al* (2003).

n-PCR de diagnóstico para la infección por CMV

Las muestras de ADN obtenidas de las tarjetas Guthrie y saliva se amplificaron con una PCR anidada secuencial, utilizando cebadores del cuarto exón del gen IE1. Los cebadores IEP4C y IEP4D se utilizaron para la PCR externa y para la interna los cebadores IEP4A y IEP4B (Cuadro 6) (Hamprecht *et al.*, 1997; Hamprecht *et al.*, 1998).

Las condiciones de reacción fueron MgCl₂ 1mM, amortiguador de reacción 1X, DNTPs 0.208 mM c/u, iniciadores 2 pmol, Taq ADN polimerasa 1 U, ADN 5 μ l, agua a completar una reacción de 50 μ l; las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial por 5 min a 94°C, 20 ciclos de desnaturalización por 30 seg a 91°C, alineamiento por 45 seg a 57°C, síntesis por 30 seg a 72°C y una extensión final por 10 min a 72°C. Para la segunda reacción se empleó la misma mezcla de reacción; las condiciones de amplificación fueron las mismas salvo que

se realizaron 35 ciclos. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2%.

En todas las corridas de n-PCR, se incluyeron, como controles positivos, ADN extraído de cultivos de fibroblastos infectados con la cepa de referencia de CMV AD169 y como negativos, reacciones sin molde con ADN de pacientes no infectados con CMV (Fig 5).

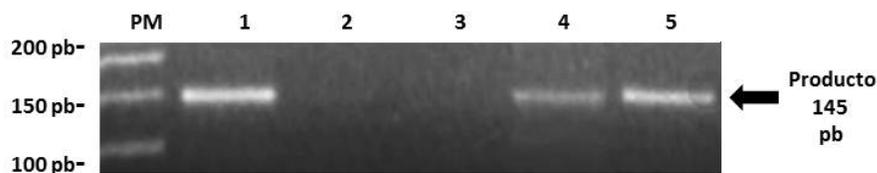


Figura 5. Amplificación del cuarto exón de CMV. PM, marcador de peso molecular de 50 pb; 1 positivo AD169; 2 control sin ADN molde; 3 control paciente negativo; 4 paciente positivo ADN de tarjeta Guthrie; 5 paciente positivo ADN de saliva.

PCR en Tiempo Real (PCR-TR)

Para diagnosticar el ADN de CMV en los recién nacidos prematuros por medio del tiempo real se diseñó una sonda TaqMan (AppliedBiosystems) cuyo fundamento es el siguiente: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real utiliza el mismo fundamento que el PCR tradicional, aunque son modificadas algunas condiciones para obtener un mejor rendimiento, una mejor especificidad y elimina la necesidad de realizar el proceso posterior de identificar en gel de agarosa o acrilamida, la utilización de enzimas de restricción y la secuenciación la muestra amplificada, con lo que se reducen costos y tiempos de operación.

Básicamente son utilizados cebadores 5' → 3' y 3' ← 5', de la misma forma en que son diseñados en la forma ya establecida, pero se diseña una sonda (sonda Taqman™), que debe aparearse con el sitio de interés para la identificación que en este caso reconocen una región altamente conservada de la proteína gB de CMV. La sonda TaqMan presenta en el extremo 5' un fluorocromo reportero y en el extremo 3' se añade un apagador (quencher), el cual tiene unido a su vez un Minor Groove Binder (MGB) que incrementa la estabilidad de la unión de los cebadores, además de incrementar la T_m. Experimentalmente se ha observado

que la temperatura entre el apareamiento y desapareamiento de la sonda puede tener un rango promedio de 9 °C, esto permite el diseño de la sonda para que el primer paso tenga una T_m superior a la del templado, y el segundo la tenga menor, dando como resultado una mayor precisión. Se diseñaron un par de cebadores y la sonda, utilizando el programa Primer-Express 2.0 (Cuadro 6).

Antes de realizar los diagnósticos se realizó un ensayo para determinar el límite de detección del ensayo de PCR y éste se realizó por análisis de titulación utilizando diluciones seriadas de ADN control para CMV de AD169 (de 10^1 a 10^7 copias/ml) y éste se determinó a 25 copias.

El protocolo para realizar las reacciones de tiempo real fue el siguiente: en la amplificación de la región conservada de gB para CMV se preparó una mezcla de reacción la cual se muestra en la siguiente tabla considerando que el volumen final en un tubo de reacción debe de ser de 50 μ l (ver Cuadro 5). Todos los reactivos y la mezcla de reacción se mantuvieron en hielo.

Cuadro 5. Características y preparación de la mezcla para PCR TR en un tubo de reacción.

Reactivo	[]/Rx	μl/Rx
PCR Master Mix (Applied Biosystems) [5X]	1X	10.0 μl
Cebador Sentido (Cuadro 6) [20 μM]	0.2 μM	2.5 μl
Cebador Anti-sentido (Cuadro 6) [20 μM]	0.2 μM	2.5 μl
Sonda TaqMan (Cuadro 6) [10μM]	0.1 μM	0.5 μl
Agua para PCR		29.5 μl
ADN	***	5 μl
Volumen final		50 μl
*** El ADN se obtuvo a partir del corte del papel que contenía la muestra con un sacabocados. Se sabe que un corte realizado con un sacabocados de 3mm equivale a 3-4 ml de sangre.		

Al tener preparada la mezcla se depositaron 5 μ l de ADN y por último se colocaron los tubos en el termociclador en tiempo real de Applied Biosystems con el siguiente programa:

Fase 1

1. 95°C por 10 min

Fase 2.

1. 95°C por 15 seg

2. 59°C por 60 seg

Se repitieron los pasos 1 y 2 de la fase 2 por 40 ciclos

Fase 3.

1. 4°C por 1 hora

Fin

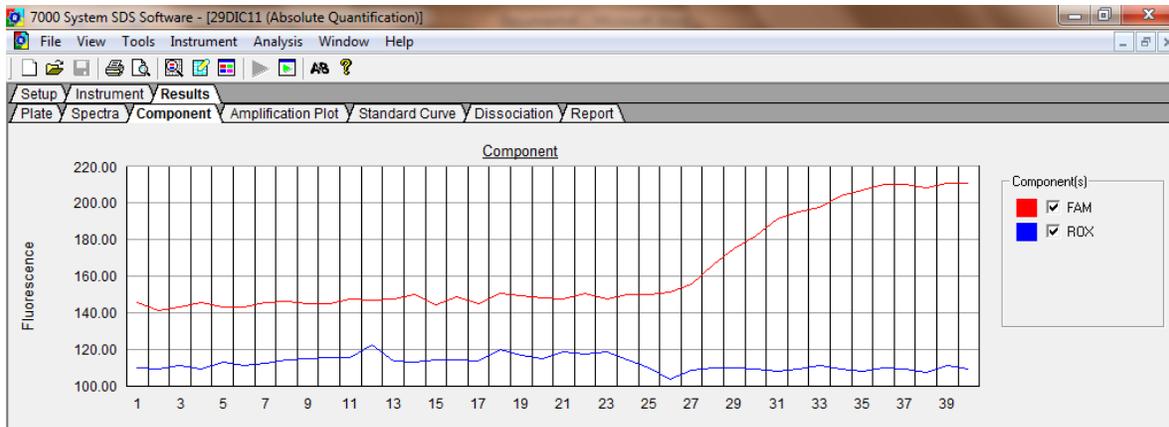


Figura 6. Gráfica de un control positivo para CMV. Observamos que solamente la fluorescencia de FAM que es con la que se marcó la sonda se incrementa. Se utilizó el programa 7000 SDS software de la plataforma ABI prism de Applied Biosystems.

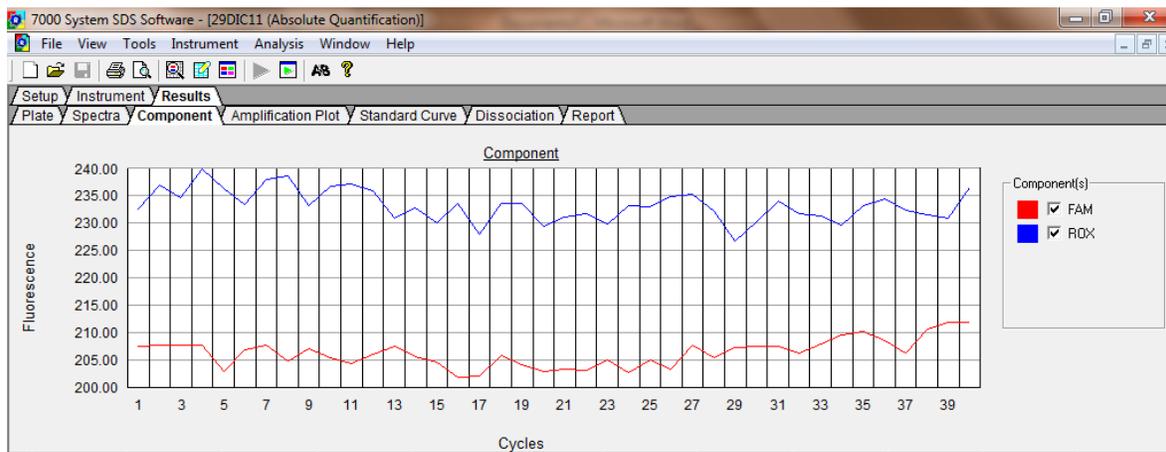


Figura 7. Gráfica de una muestra negativa para CMV. La fluorescencia de FAM no se incrementa. Se utilizó el programa 7000 SDS software de la plataforma ABI prism de Applied Biosystems.

Análisis genotípico de la proteína gB.

La reacción de amplificación fue realizada con una PCR semianidada utilizando un sistema de termociclador para PCR Gene Amp 2400 (Applied Biosystems). Para el primer ciclo de amplificación, se utilizó el siguiente programa: desnaturalización inicial a 91°C por 4 min seguida de 35 ciclos a 91°C por 1 min, 57°C por 45 seg, y 72°C por 45 seg, con una extensión final de 72°C por 10 min. La segunda ronda se realizó con 25 pmol de oligonucleótidos (Cuadro 1) específicos para cada genotipo (CMVGT1 + CMVGT2 + CMVGT3 + CMVGT4 + CMVGT5+) como se describió previamente (Tarrago, 2003) y 25 pmol del oligonucleótido (Cuadro 6) antisentido común (CMVQ2-), 1 µl del producto de la primera amplificación y la misma concentración de los otros reactivos. La amplificación fue realizada bajo las mismas condiciones que en la primera ronda excepto que la temperatura de alineación en cada ciclo fue de 59°C. La cepa de CMV AD169 (genotipo 2) fue utilizada como un control de amplificación.

Cuadro 6. Cebadores utilizados para la PCR anidada de diagnóstico de CMV, para la PCR en tiempo real y para la PCR semi-anidada.

CEBADOR	SECUENCIA	PRODUCTO (PB)
IEP4C	5'-TGAGGATAAGCGGGAGATGT-3'	242
IEP4D	5'-ACT GAG GCAAGTTCTGCAGT-3'	
IEP4A	5'-AGCTGCATGATGTGAGCA AG-3'	145
IEP4B	5'-GAAGGCTGAGTTCTTGGT AA-3'	
PCR TR SENTIDO	5'-CTGCGTTCCAGCAACGTTT-3	66
PCR TR REVERSA	'5'-CCGCTGCTTGTACGAGTTGA-3'	
Sonda Taqman	5'-TGACCTCGAAGAGATCATGCGCGA-3'	
CMVQ1 forward	5'-TTTGGAGAAAACGCCGAC-3'	749
CMVQ1-reverse	5'-CGCGCGGCAATCGTTTTGTTGTA--3'	
CMVGT1	5'-ATGACCGCCACTTTCTTATC-3'	420
CMVGT2	5'-TTCCGACTTTGGAAGACCCAACG-3'	613
CMVGT3	5'-TAGCTCCGGTGTGAACTCC-3'	190
CMVGT4	5'-ACCATTCGTTCCGAAGCCGAGGAGTCA-3'	465
CMVGT5	5'-TACCCTATCGCTGGAGAAC-3'	139
CMVQ2-	5'-GTTGATCCACRCACCAGGC-3'	

Análisis de Datos.

En una tabla de contingencia de doble entrada, la técnica de PCR de cada una de las muestras se evaluó utilizando como estándar de oro el cultivo, se determinó la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), con las siguientes ecuaciones: sensibilidad: $S=a/a+c$ donde: a= verdaderos positivos c=falsos negativos, la especificidad se calculó como: $E=d/b+d$, donde b= número de falsos positivos c=número de falsos negativos, valor predictivo positivo: $VPP=a/a+b$ donde a= verdaderos positivos, b=falsos positivos, valor predictivo negativo: $VPN=d/c+d$ donde d= verdaderos negativos y c=falsos negativo.

Análisis Estadístico.

Los datos son presentados como la media y la desviación estándar y se presenta la mediana de cada dato, las comparaciones entre los grupos se hicieron dependiendo si los grupos cumplían con la normalidad al evaluarla con la prueba de Levane, se utilizó la prueba "t" de Student, o bien, se utilizó una prueba de U de Mann-Whitney. Por último para cada genotipo se presenta la n obtenida y el porcentaje para cada genotipo.

RESULTADOS

1. Características de las madres de los recién nacidos prematuros.

La seropositividad de IgG (Cuadro 7) de las madres fue de 257/ 271 (96.48%). Al estratificar por edad, se observó que, entre 14 y 20 años, la seroprevalencia para IgG fue de 93%; de 20 a 25 años, de 97.18%; de 26 a 30 años, de 100%; de 31 a 35, de 96.87% y de 36 a 43, 100%.

Cuadro 7. Prevalencia de anticuerpos contra CMV en madres de recién nacidos prematuros distribuidas por edades.

Edad (años)	Positivas	%	Negativas	%	Total
14 -20	79	93	6	7	85
20-25	69	97.18	2	2.81	71
26-30	44	100	0	0	44
31-35	31	96.87	1	3.13	32
36-43	24	100	0	0	24
Total	247	--	9	--	256

2. Características de los Recién Nacidos Prematuros

Se analizaron 271 RNP para evaluar la prevalencia de infección por CMV usando cultivo inoculado con saliva, PCR anidada en saliva, PCR anidada y PCR-TR en muestras tomadas sobre tarjetas Guthrie. La distribución por sexos de los RNP fue 137 (50.55%) femenino, y 134 (49.44%) masculino. El peso promedio al nacer 1,639 g y la talla, de 41.8 cm (Cuadro 8).

Cuadro 8. Características de RNP con y sin infección por CMV. Hospital de la mujer 2009-2011.

Características del RNP	CMV infectados (n= 11; 4.05%)	CMV sin infección (n=260; 95.9%)
Sexo F/M (%)	45.45/54.54	50.76/49.23
Peso al nacer* (g)	1648.18±295.32	1630.36 ± 314.06
Talla* (cm)	42 ± 3.58	41.57 ± 3.32
Edad gestacional, semanas	33.32 ± 2.26	33.28 ± 2.34
Edad a la toma de la muestra (días)	11.10 ± 7.07	11.71 ± 11.38
Edad de la madre	22.20± 4.63	24.75± 6.84

*Los valores representan la media ± DS

3. Detección de infección activa por CMV en cultivo con saliva, PCR anidada en saliva, PCR anidada en tarjeta Guthrie y PCR en tiempo real en tarjeta Guthrie.

Se detectó la presencia de CMV en 11/271 (4.05%) tomando en cuenta todas las metodologías utilizadas. El cultivo en saliva permitió identificar 10 de 11 infantes (90.90%), con n-PCR en saliva solo se identificaron 4 de los 11 (36.36%), con la PCR anidada en tarjetas Guthrie se identificaron 11 de 11 (100%) y con la PCR-TR se identificaron también 11 de 11 (100%) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Comparación de las técnicas de amplificación (PCR), contra infección en cultivo de tejidos (estándar de oro).

PCR	Valor predictivo	Cultivo en células HFF*		
		Positivo	Negativo	Total
n-PCR en Tarjeta Guthrie	Positivo	10	1	11
	Negativo	0	260	260
PCR-TR en Tarjeta Guthrie	Positivo	10	1	11
	Negativo	0	260	260
n-PCR en Saliva	Positivo	3	1	4
	Negativo	7	260	267
	Total	10	261	271

*La muestra se preparó, se esterilizó por filtración y se inoculó.

En el cuadro 10 se muestra el análisis para determinar la sensibilidad (S), especificidad (E), y los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) de cada una de las técnicas; se encontró que la S de n-PCR y PCR-TR calculada frente a la prueba de referencia (cultivo) fue del 100%, E del 99%, VPP de 90% y VPN de 100%. En saliva: S de 30%, E del 99%, VPP del 75% y VPN del 97%.

Cuadro 10. Comparación entre las técnicas de n-PCR tiempo final y PCR-TR con muestra en tarjeta Guthrie y n-PCR en saliva para la detección de CMV.

PCR	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predictivo Positivo (%)	Valor Predictivo negativo
n-PCR en Tarjeta Guthrie	100	99	90	100
PCR-TR en Tarjeta Guthrie	100	99	90	100
n-PCR en saliva	30	99	75	97
PCR, Reacción en cadena de la polimerasa; TR, tiempo real.				

4. Características antropométricas, de valoración y clínicas de los RNP con infección congénita (C).

Se compararon las medidas antropométricas, la edad gestacional y una medida de valoración del estado al nacer (Apgar) de los 200 RNP que entraban en el grupo de infección congénita en cuadro 11. No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en las medidas antropométricas entre los RNP infectados y los no infectados como se muestra en el cuadro 9. Tampoco hubo asociación entre la infección con CMV y el peso al nacer, la talla, el perímetro cefálico, perímetro torácico, el Apgar al minuto y a los 5 minutos, además de que tampoco se presentaron diferencias en la edad gestacional (Cuadro 11). En ninguno de los RNP diagnosticados con infección congénita por CMV se encontraron indicios de infección sintomática por CMV (0 de 6).

Cuadro 11. Características antropométricas y de valoración de los RNP incluidas en infección congénita.

Características del RNP	Tipo de infección		
	Congénita		Valor de P
	CMV infectados (n= 6; 3%)	CMV sin infección (n=194; 97%)	
Peso al nacer* (g)	1696.66	1686.12 ± 305.16	0.933
Talla* (cm)	43.41 ± 3.23	42.04 ± 3.14	0.295
Perímetro cefálico* (cm)	29.58 ± 1.38	29.95 ± 0.91	0.613
Perímetro torácico*	26.08 ± 1.11	26.6435 ± 2.43	0.576
Apgar al minuto*	7.16 ± 1.60	7.10 ± 1.39	0.914
Apgar 5 minutos*	8.5 ± 0.83	8.32 ± 1.11	0.705
Capurro* (edad gestacional, semanas)	33.76 ± 2.09	33.64 ± 2.28	0.9
Edad a la toma de la muestra (días)	6.77 ± 2.09	6 ± 1.78	0.615
Edad de la madre	21.20± 4.32	23.96± 6.43	0.342

Los valores representan la media ± DS. *Los datos no tienen una distribución normal de acuerdo con la prueba de Levane, las comparaciones se realizaron mediante la prueba "U" de Mann-Whitney sin encontrarse diferencia significativa.

5. Genotipificación de las muestras de CMV de los pacientes con trasplante de médula ósea (TMO).

De 30 pacientes que sufrieron un TMO y que presentaban ADNemia para CMV, se obtuvieron 202 muestras de sangre periférica y se les realizó una genotipificación por PCR multiplex. Los genotipos de CMV presentes fueron gB1, 9/30 pacientes (30%); gB2, 8/30 (27%); gB3, 4/30 (13%); gB4, 1/30 (3%); gB5 no se detectó. Más de un genotipo se observó en 8/30 (27%) pacientes, y esto se denominó como infecciones en mezcla (IM). Las mezclas de los genotipos que se encontraron en los pacientes con IM fueron gB2/gB3, 5/8; gB1/gB3, 2/8; gB1/gB2, 1/8 (Cuadro 12); ningún paciente tuvo más de tres genotipos en este grupo de 30 pacientes. Los genotipos gB1 y gB2 fueron los más prevalentes. Se observó también una alta frecuencia de infección con IM.

Cuadro 12. Distribución of los genotipos de la proteína gB de CMV en los pacientes con TMO.

Genotipo Simple	Cantidad de pacientes con el genotipo
gB1	9 (30%)
gB2	8 (27%)
gB3	4 (13%)
gB4	1 (3%)
Total	22 (73%)
Mezclas (IM)	
gB2/gB3	5 (17%)
gB1/gB3	2 (7%)
gB1/gB2	1 (3%)
Total	8 (27%)

TMO. Trasplante de médula ósea.

DISCUSIÓN

Los estudios que se han realizado en México para determinar la seroprevalencia de CMV en nuestra población han demostrado que ésta varía de un 85.23%, en una ciudad como Cuernavaca (Echániz-Avilés *et al.*, 1993), hasta un 91.6%, en la ciudad de México (Gutiérrez-Salinas y Cruz-Tovar, 2008). En este estudio, se encontró una seroprevalencia de 96.48%, mayor de lo encontrado en los estudios referidos. Esta diferencia, aunque no es muy grande, puede estar relacionada con el hecho de que la muestra estudiada aquí, estuvo formada por personas que perciben ingresos económicos menores a 6,000 pesos mensuales (principalmente a los niveles socioeconómicos 2 y 3). De igual manera, puede ser que presentaran otros factores de riesgo como hacinamiento e incluso contacto sexual con otros individuos aparte de su pareja estable, ya que esto ha sido observado en otros estudios (Polanco-Marín *et al.*, 1996), sin embargo, en nuestro estudio se tuvo acceso a estos datos. Por otro lado, también hay que considerar que, en nuestro estudio, no se realizaron pruebas de avidéz de anticuerpos para CMV, de ahí que no conozcamos si las madres analizadas presentaban una infección o una reactivación reciente. Sin embargo, parece ser que, en las madres de los niños con infección activa, se presentó una reactivación hacia una cepa para la cual ya tenían una respuesta inmune establecida, que protegió a los niños con infección congénita ya que ninguno presentó sintomatología. Si se hubiera presentado una primo-infección en la madre, se hubiese observado alrededor de 10% de RN sintomáticos al nacer (Fowler y Boppana, 2006).

Por su parte, en las mujeres menores de 25 años se encuentra un grupo de alto riesgo para la infección por CMV, lo que implica que sus RNP tengan mayor probabilidad de presentar la infección y por lo tanto sintomatología ya que los neonatos nacidos de una madre que presenta una infección primaria, el 40% nace infectado; de este 40%, el 10% nace sintomático y de este 10% que nace con sintomatología, el 50% presenta secuelas permanentes (Dollard *et al.*, 2007; Stagno *et al.*, 1986), mientras que los neonatos nacidos de mujeres que presentan

una reactivación, solo del 1 al 2% nace infectado y más del 90% de estos infectados son asintomáticos al nacimiento (Stagno *et al.*, 1986).

Se ha encontrado que la detección de ADN viral en muestras de sangre seca (tarjetas Guthrie) produce resultados comparables con los obtenidos usando muestras de sangre líquida (Luo *et al.*, 2005; Patton *et al.*, 2007). La detección viral por PCR en tarjetas Guthrie tiene ventajas sobre la sangre líquida y el cultivo, tales como el pequeño volumen de sangre requerido para la prueba así como la facilidad de almacenamiento y transporte de las tarjetas (Comeau *et al.*, 1996). Nuestros resultados muestran que la utilización de tarjetas Guthrie para detectar la infección por CMV en RNP es adecuada, esta aportación debe de ser considerada en relación con el debate que existe sobre el uso de tarjetas Guthrie para detectar CMV, ya que existe controversia en su uso debido a que la sensibilidad en la detección del CMV con ellas, varía desde un 34% hasta un 100% (Soetens *et al.*, 2008; Barbi *et al.*, 2000; Leruez-Ville *et al.*, 2011). Se ha especulado que se puede explicar esta discrepancia en sensibilidades por el método elegido para extraer el ADN de las tarjetas Guthrie. Se han evaluado diversos métodos de extracción para el diagnóstico de la infección por CMV, por ejemplo, se han comparado: el mini kit para sangre de Qiamp, extracción por calor, extracción con fenol-cloroformo y un método automatizado para la extracción de ADN (NucliSenseEasy-Mag/Biomerieux). Estos métodos fueron combinados con una n-PCR o con una PCR-TR y se encontró que la combinación técnica más sensible para el diagnóstico de CMV a partir de las tarjetas Guthrie es el método de fenol-cloroformo y la PCR anidada (Göhring *et al.*, 2010). En nuestro estudio se muestra una alta sensibilidad en la extracción con fenol-cloroformo acoplada a amplificación por PCR-TR, de esta manera nuestro diseño de PCR-TR presenta alta relevancia ya que aportamos un diseño altamente sensible y con las ventajas que tiene la PCR-TR en comparación con la n-PCR. Sin embargo, aunque nuestros resultados mostraron una alta sensibilidad y especificidad, también encontramos un falso positivo, cuando lo comparamos con el estándar de oro que es el cultivo, debido a esto, su VPP disminuyó al 90%. Los métodos de detección viral que se han utilizado a partir de tarjetas Guthrie han sido evaluados desde su

inicio para descartar la posibilidad de que el análisis arroje falsos positivos. Esto es por dos razones principales, alrededor del mundo son pocas los laboratorios en los que se procesan altos volúmenes de tarjetas Guthrie como un servicio de rutina, por lo que no se han establecido las buenas prácticas de control de calidad para este estudio (Driver *et al.*, 2007); la segunda, es que, la muestra debe de ser cortada y eluída antes de ser procesada lo que debe hacerse manualmente e incrementa el tiempo de proceso (Patton *et al.*, 2006). El riesgo de contaminación entre muestras de pacientes positivos durante el corte de las tarjetas es una preocupación real que impide implementar este análisis en el laboratorio como rutina clínica y no hay, hasta el momento, reportes que informen sobre mejores prácticas para el corte de la muestra de la tarjeta Guthrie o sobre cuál es la mejor manera de limpiar el instrumento que se utiliza para hacer el corte (Driver *et al.*, 2007). Además, desde hace tiempo se ha expresado una necesidad urgente de establecer buenas prácticas de laboratorio para el procesamiento de las tarjetas Guthrie (World Health Organization, 2006).

La detección de CMV en saliva así como en tarjetas Guthrie, presenta ventajas sobre la PCR en sangre líquida, orina y el cultivo, ya que la recolección de saliva es mucho más fácil de obtener que las anteriores (Yamamoto *et al.*, 2006). Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que hay baja sensibilidad de la detección en saliva al utilizar la metodología de fenol:cloroformo-n-PCR, lo que contrasta con el trabajo de Boppana *et al.* (2011), en donde se encontró que la PCR tanto en saliva líquida como en saliva seca muestra altos grados de especificidad y sensibilidad. Consideramos que esta diferencia se debe al método de extracción utilizado, ya que en el trabajo mencionado, utilizaron el kit de extracción de ADN Qiagen M48 (Qiagen), por lo que utilizar la extracción del ADN viral de la saliva con fenol:cloroformo, probablemente sea lo mejor.

Debido a que se sabe que la pérdida del oído causada por la presencia de CMV congénito, se ve agravada por el hecho de que frecuentemente el daño es detectado tardíamente, se ha sugerido que sería de gran importancia aplicar campañas de escaneo neonatal para detectar la infección por CMV (Barbi *et al.*,

2006). La manera más directa de detectarla, es realizar pruebas genéticas moleculares al nacimiento a partir de sangre absorbida en papel de todos los recién nacidos y, de esta manera, promover que los infantes infectados, sean colocados en monitoreo audiológico continuo (Nance *et al.*, 2006). Los beneficios del escaneo neonatal son: aplicar el tratamiento para prevenir la progresión de pérdida del oído y la identificación de niños en riesgo de pérdida tardía del oído (Grosse *et al.*, 2009). Además, la detección temprana de pérdida del oído puede mejorar profundamente el desempeño académico de niños sordos (Yoshinaga-Itano, 2003). Sin embargo, en la ausencia de un protocolo consensual para el monitoreo de niños infectados por CMV, en ningún país se han aplicado políticas de escaneo ni prenatales ni neonatales (Leruez-Ville *et al.*, 2011). De ahí que propongamos el diseño de PCR-TR elaborado en nuestro laboratorio para ser tomado en cuenta y aplicarlo en laboratorios mexicanos e iniciar un escaneo general de la población de recién nacidos lo cual resultaría en los beneficios ya citados anteriormente.

En el estudio de genotipificación de los genotipos de gB presentes en los pacientes con TMO determinamos que los genotipos gB1 y gB2 fueron los más prevalentes. Además, observamos una alta frecuencia de infección que presentaban genotipos mezclados, estos resultados concuerdan parcialmente con un reporte previo en pacientes con TMO (Torok-Storb *et al.*, 1997), el cual describe al genotipo gB1 como el más frecuente, seguido por el genotipo gB3 y mostraron la presencia de solo algunos genotipos mezclados. En otro estudio se reportó que gB2 fue el genotipo más frecuente seguido por el genotipo gB1 y se reportaron algunos genotipos mezclados. Un último estudio demostró que 49% de los pacientes que recibieron trasplantes de órganos sólidos presentaban genotipos mezclados (Woo *et al.*, 1997; Manuel *et al.*, 2009).

En el presente estudio se observaron más genotipos mezclados que los observados en otros trabajos (Torok-Storb *et al.*, 1997; Woo *et al.*, 1997). Las discrepancias con estos estudios posiblemente se deben a que en este estudio se utilizó una PCR multiplex anidada, mientras que en los otros, se utilizó una

amplificación por PCR seguida de cortes con enzimas de restricción (RFLPs). Aunque ambos métodos utilizan la genotipificación basándose en el área que rodea la región del sitio de corte proteolítico de gB, los métodos podrían tener diferentes sensibilidades para detectar las mezclas. De hecho, se ha reportado que el análisis con RFLP falló en detectar gB3 debido a un mismatch de los oligonucleótidos en tres sitios de la secuencia (Sowmya *et al.*, 2006). En un estudio reciente se compararon los dos métodos y se encontró una buena correlación para la detección de los genotipos en los aislamientos pero no para las muestras clínicas, además, el RFLP mostró no ser una metodología confiable para la detección de genotipos mezclados en muestras clínicas (Sowmya *et al.*, 2007). Aunque no realizamos la metodología de RFLP para comparar los resultados por ambos métodos, los estudios previos soportan la diferencia que encontramos al detectar los genotipos mezclados observados en este estudio. Otra posibilidad es que en la población pediátrica mexicana la presencia de IM es más frecuente que en las poblaciones estudiadas en los otros reportes. En este trabajo se analizaron muestras de pacientes pediátricos, los cuales en su mayoría presentaban un seroestatus D+R+ (Arellano-Galindo *et al.*, 2011).

Nuestros resultados sugieren que estos pacientes se encontraban infectados con CMV antes de la realización del TMO y, al realizarse el trasplante de las células tallo, se re infectaron con nuevas cepas, lo que daría como resultado la presencia de la IM en los genotipos. Sin embargo, esto es posible en algunos de los casos, pero no en todos; esto debido a que la reactivación en los pacientes con CMV después de un TMO puede ser endógena (Winston *et al.*, 1985).

Varios estudios han mostrado una relación entre las variaciones genotípicas de gB y la infección sintomática. Hay evidencia de que los genotipos gB, gB3 y la presencia de mezclas están particularmente asociadas con la presencia de una infección sintomática en pacientes que reciben un TMO (Torok-Storb *et al.*, 1997; Woo *et al.*, 1997). Sin embargo, en nuestro estudio no pudimos establecer ninguna relación entre la presencia de un genotipo con la aparición de infección sintomática, esto tal vez se deba a que el tamaño de la muestra no fue suficiente,

lo que ha sido un obstáculo en otros estudios que tenían como objetivo determinar si había una relación entre los genotipos de gB presentes en la población estudiada y la presencia de sintomatología, debido a dicha falla, esto no se pudo determinar. Cabe resaltar que en un estudio previo, no se encontró asociación entre los genotipos y el progreso a una infección sintomática a pesar de haber contado con un gran número de pacientes (Manuel *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

1. La seroprevalencia del CMV encontrada en la población estudiada es mayor que lo reportado anteriormente, lo que puede indicar que la prevalencia de la infección se ha incrementado.
2. Se diseñó y validó una estrategia de detección de CMV con PCR acoplado en pacientes recién nacidos prematuros a partir de sangre sobre tarjetas Guthrie.
3. El PCR-TR diseñado en nuestro laboratorio, al presentar una sensibilidad y especificidad iguales que la n-PCR reportada, es otra buena alternativa para el diagnóstico de CMV que puede ser aplicada con confiabilidad en laboratorios de nuestro país, ya que se puede cuantificar la cantidad de copias del patógeno y elimina el uso de geles de agarosa.
4. No se pudo determinar si hay una relación entre la carga viral y la sintomatología debido a que la muestra fue insuficiente.
5. Nuestros resultados contribuyen a aumentar los reportes de prevalencia de los genotipos de CMV a nivel nacional e internacional; sin embargo, se requiere de una muestra mayor para evaluar si el genotipo juega un papel importante en el desarrollo de infección sintomática.

REFERENCIAS

1. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptative immunity comes of age. *Nature Reviews/Immunology*. 2004. 4: 553-64.
2. Adler SP, Marshall B. Cytomegalovirus infections. *Pediatr Rev*. 2007. 28(3): 92-100.
3. Álvarez-Gómez MJ, Martínez-Irisarri I. Programa de atención temprana a prematuros, recién nacidos de bajo peso y recién nacidos de muy bajo peso en pediatría de Atención Primaria. *Bol S Vasco-Nav Pediatr*. 2002. 36: 54-58.
4. Arai S. Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Bone Marrow vs. Mobilized Peripheral Blood. *Arch Med Res*. 2003. 34: 545–553.
5. Arellano-Galindo J, Vázquez-Meraz E, Jiménez- Hernández E, *et al*. The role of cytomegalovirus infection and disease in pediatric bone marrow transplant recipients in Mexico City in the context of drug resistance. *Pediatr Transplant*. 2011. 15: 103–111.
6. Ballen KB. New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood*. 2005. 105: 3786-3792.
7. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Primache V. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *J Clin Virol*. 2006. 35(2): 206-9.
8. Barbi M, Binda S, Primache V, *et al*. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. *J Clin Virol*. 2000. 17(3): 159-165.
9. Baron F, Storba R, Littlea MT. Hematopoietic Cell Transplantation: Five Decades of Progress. *Arch Med Res*. 2003. 34: 528–544.
10. Barva EJ. Citomegalovirus y trasplante renal: Una combinación peligrosa. *Rev Mex Patol Clin*. 2006. 53(1): 52-61.
11. Bendzten K. Cytokines and natural regulators of cytokines. *Immunol Lett*. 1994. 43: 111-23.
12. Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, *et al*. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med*. 2001. 344(3): 175-181.
13. Blazar BR, Murphy WJ. Bone marrow transplantation and approaches to avoid graft-versus-host disease (GVHD). *Phil Trans R Soc B*. 2005. 360: 1747–1767.

14. Boeckh M, Erard V, Zerr D, *et al.* Emerging viral infections after hematopoietic cell transplantation. *Pediatr Transplant.* 2005. 9 (Suppl. 7): 48–54.
15. Bohmek KW. Virus entry and activation of innate immunity. En *Cytomegaloviruses: Molecular Biology And Immunology.* Editor: Matthias J. Reddehase. 2006, U.K: Caister Academic Press. pp. 111.
16. Bonhoeffer J, Siegrist C-A, Heath P T. Immunization of premature infants. *Arch Dis Child.* 2006. 91: 929–935.
17. Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, *et al.* Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med.* 2011. 364(22): 2111-2118.
18. Britt W. Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008. 325: 417–470.
19. Brufau RC, Fernández BG, Vallejo LJC. Enfermedad injerto contra huésped en el trasplante hematopoyético. *Piel.* 2004. 19(8): 431-41.
20. Bueren JA, Guenechea G, Casado JA, *et al.* Genetic Modification of Hematopoietic Stem Cells: Recent Advances in the Gene Therapy of Inherited Diseases. *Arch Med Res.* 2003. 34: 589-599.
21. Cárdenas CR. Trasplante de médula ósea. *Médica Sur.* 2000. 7(2): 68-72.
22. Cardoso-Demartini AA, Bagatin AC, Guimarães VRP, *et al.* Growth of preterm-born children. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011. 55/8: 534-540.
23. Carretero MC. Tratamiento del citomegalovirus. *Offarm.* 2003. 22(10): 166-167.
24. Castagnola E, Bagnasco F, Faraci M, *et al.* Incidence of bacteremias and invasive mycoses in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single center experience. *Bone Marrow Transplant.* 2008. 41: 339–347.
25. Cassol SA, Salas T, Arella M, Meumann P, Schechter MT, and M. O'Shaughnessy. Use of dried blood spot specimens in the detection of human immunodeficiency virus type 1 by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991. 29: 667-671.
26. Centeno A. Variedad esclerodermiforme de enfermedad injerto contra huésped. *Med Cutan Iber Lat An.* 2006. 34(1): 21-24.
27. Chinen J, Buckley RH. Transplantation immunology: Solid Organ and bone marrow. *Allergy Clin Immunol.* 2010. 125(2 Suppl 2): S324–S335.

28. Chou S, Dennison K. Analysis of inters train variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *J Infect Dis.* 1991. 163: 1229–1234.
29. Coaquette A, Bourgeois A, Dirand C, *et al.* Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis.* 2004. 39(2): 155-161.
30. Comeau AM, Pitt J, Hillyer GV, *et al.* Early detection of human immunodeficiency virus on dried blood spot specimens: sensitivity across serial specimens. *J Pediatr.* 1996. 129(1): 111-118.
31. Demmler G. Congenital cytomegalovirus infection and disease. *Adv pediatr infect dis.* 1996. 11:135-162.
32. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis.* 1988. 158: 1177-1184.
33. Di Persio JF, Kbouy H, Haug J, *et al.* Innovations in Allogeneic Stem-Cell Transplantation. *Semin Hematol.* 2000. 37(1S2): 33-41.
34. Díaz MAG, Valdés AM, Resik AS: Infecciones por citomegalovirus. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 1998. 14(3): 270-278.
35. Dignan FL, Clark A, Amrolia P, *et al.* Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol.* 2012. 158: 30–45.
36. Dollard SC, Grosse S.D, 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): 355-363.
37. Drew WL. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2007. 20(4): 408-411.
38. Driver GA, Patton JC, Moloji J, *et al.* Low risk of contamination with automated and manual excision of dried blood spots for HIV DNA PCR testing in the routine laboratory. *J Virol Methods.* 2007. 146(1-2): 397-400.
39. Echániz-Avilés G, Tamayo-Legorreta E, Cruz-Valdez A, *et al.* Prevalence of antibodies against cytomegalovirus in women of reproductive age. *Salud Pública Mex.* 1993. 35(1): 20-6.
40. Engstrand M, Tournay C, Peyrat MA, *et al.* Characterization of CMV pp65 specific CD8+ T Lymphocytes using MHC tetramers in kidney Transplant patients and healthy participants. *Transplantation.* 2000. 69 (11): 2243-50.
41. Fajardo-Gutiérrez A. Mortalidad por cáncer en niños. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2005. 62: 1-3.

42. Filipovich AH. Hematopoietic cell transplantation for correction of primary immunodeficiencies. *Bone Marrow Transplant.* 2008. 42: S49–S52.
43. Foot AB, Caul EO, Roome AP, *et al.* Cytomegalovirus pneumonitis and bone marrow transplantation: Identification of a specific high risk group. *J Clin Pathol.* 1993. 46: 415-419.
44. Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J Clin Virol.* 2006. 35(2): 226-31.
45. Frere P, Baron F, Bonnet C, *et al.* Infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with a nonmyeloablative conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant.* 2006. 37: 411–418.
46. Gaetano C. Development of the Immune System in Neonates. *J. Arab Neonatal Forum.* 2005. 2: 5-11.
47. Galán HJF. Tratamiento antiviral durante la etapa perinatal. En: Mancilla RJ, Larios MFJ, editores. *Farmacología de antimicrobianos. PAC Neonatología 2.* México: Editorial Intersistemas; 2005.
48. García R N, García P L, Iglesias G E, Ortiz Q L. Citomegalovirus y embarazo. *Ginecología y obstetricia Clínica.* 2004. 5(3): 156-169.
49. Garrick M D, Dembure P, Guthrie R. Sickle-cell anemia and other hemoglobinopathies: procedures and strategy for screening and employing spots of blood on filter papers as specimens. *N Engl J Med.* 1973. 288: 1265-1268.
50. Garza-Madrid ME, Borbolla-Escoboza JR, López-Hernández MA. Trasplante autólogo de médula ósea como tratamiento de enfermedades autoinmunes: mecanismos y resultados. *Gac Med Méx.* 2004. 140(5): 531-539.
51. Gaytant M, Steegers EA, Semmekrot BA, *et al.* Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome. *Obstet Gynecol Surv.* 2002. 57(4): 245-256.
52. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical- cord blood from an HLA-identical sibling. *N Eng J Med.* 1989. 321: 1174-1178.
53. Göhring K, Dietz K, Hartleif S, *et al.* Influence of different extraction methods and PCR techniques on the sensitivity of HCMV-DNA detection in dried blood spot (DBS) filter cards. *J Clin Virol.* 2010. 48(4): 278-281.
54. Gómez-Fraga. II Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica, Habana. 2001. <http://www.hab2001.sld.cu/arrepdf/00306.pdf>.

55. Gómez-Morales E. Trasplante de médula ósea. Experiencia en México. *Gac Med Méx.* 2002. 138(S1): S135-S144.
56. Gordon M and Barret A. (1985). Bone marrow disorders; the biological basis of clinical problems: Chapter 2; Haematopoietic precursor cells. Blackwell Sci Publ. London. pp. 20-59.
57. Grosse SD, Dollard S, Ross DS, *et al.* Newborn screening for congenital cytomegalovirus: Options for hospital-based and public health programs. *J Clin Virol.* 2009. 46 Suppl 4: S32-6.
58. Gutiérrez-Salinas J, Cruz-Tovar L. Estudio de la seroprevalencia de la infección por citomegalovirus a través de la concentración sérica de IgG en un hospital de tercer nivel. *Rev Mex Patol Clin.* 2008. 55(4): 175-186.
59. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics.* 1963. 32: 338–343.
60. Gyulai Z, Endresz V, Burian K, *et al.* Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1 Exon 4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals. Reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. *J Infect Dis.* 2000. 181: 1537-1546.
61. Hamprecht K, Maschmannb J, Jahna G, *et al.* Cytomegalovirus transmission to preterm infants during lactation. *J Clin Virol.* 2008. 41(3): 198-205.
62. Hamprecht K, Mikeler E, Jahn G. Semi-quantitative detection of cytomegalovirus DNA from native serum and plasma by nested PCR: influence of DNA extraction procedures. *J Virol Methods.* 1997. 69(1-2): 125-135.
63. Hamprecht K, Steinmassi M, Einsele H, *et al.* Discordant detection of human cytomegalovirus DNA from peripheral blood mononuclear cells, granulocytes and plasma: correlation to viremia and HCMV infection. *J Clin Virol.* 1998. 11(2): 125-36.
64. Hamprecht K, Witzel S, Maschmann J, *et al.* Rapid detection and quantification of cell free cytomegalovirus by a high-speed centrifugation-based microculture assay: comparison to longitudinal analyzed viral DNA load and pp67 late transcript during lactation. *J Clin Virol.* 2003. 28(3): 303-316.
65. Hantz S, Resistance Survey Study Group. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J Antimicrob Chemother* 2010. 65: 2628–2640.
66. Hardy RE, Ikpeazu EV. Bone marrow transplantation: a review. *J Natl Med Assoc.* 1989. 81(5): 518-523.

67. Hassan J, Connell J. Translational Mini-Review Series on Infectious Disease: Congenital cytomegalovirus infection: 50 years on. *Clin Exp Immunol.* 2007. 149: 205–210.
68. Henrick H C, Bengt W Y. Growth factors as transforming proteins. *J Biochem.* 1989. 184: 487-496.
69. Hernández-Rivera EG. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en anemia aplásica. *Rev Invest Clin.* 2005. 57(2): 298-304.
70. Ho M. The citomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol,* 2008. 197(2): 65-73.
71. Hołowiecki J. Indications for hematopoietic stem cell transplantation. *Pol Arch Med Wewn.* 2008. 118 (11): 658-652.
72. Jacobsen S E, Ruscetti F W, Ortiz M, *et al.* The growth response of Lin-Thy-1+ hematopoietic progenitors to cytokines is determined by the balance between synergy of multiple stimulators and negative cooperation of multiple inhibitors. *Exp Hematol.* 1994. 22: 985-989.
73. Jacobsohn DA, Vogelsang GB. Acute graft versus host disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2007. 2: 35-44.
74. Jancel T, Penzak SR. Antiviral Therapy in Patients With Hematologic Malignancies, Transplantation, and Aplastic Anemia. *Semin Hematol.* 2009. 468(3): 230–247.
75. Janeway-Travers (1997). *Inmunobiology the immune system in health and disease.* 3ª ed. Garland Publishing. New York and London. pp. 980.
76. Jasso GL. *Neonatología práctica.* 6ª ed. ed. 2005, México: El Manual Moderno. pp. 370.
77. Jasso-Gutiérrez L. Infecciones congénitas poco habituales de transmisión vertical. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2006. 63: 55-63.
78. Jim WT, Shu CH, Chiu NC, *et al.* Transmission of cytomegalovirus from mothers to preterm infants by breast milk. *Pediatr infect dis j.* 2004. 23(9): 848-51.
79. Kimberlin D, Lin CY, Sánchez PJ, *et al.* Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J pediatr.* 2003. 143: 16-25.
80. Krech U. Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bull World Health Organ.* 1973. 49(1): 103-106.

81. Kretschmer SR. Inmadurez inmunitaria del recién nacido. En: Neonatología. McGraw-Hill Interamericana. 1996. pp. 75-85.
82. La Hood A, Bryant C. Outpatient Care of the Premature Infant. Am Fam Physician. 2007.76 (8): 1159-1164.
83. Lange WB, Rosenthal LFM, Lindermann KA. The role of cytokines in Oncology. Clin Exp Hematol. 1992. 1: 13-19.
84. Lawrence, D., Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. Curr Opin Infect Dis. 2007. 20(4): 408-411.
85. Leruez-Ville M, Couderc S, Parat S, *et al.* Prospective identification of congenital cytomegalovirus infection in newborns using real-time polymerase chain reaction assays in dried blood spots. Clin Infect Dis. 2011. 52(5): 575-581.
86. Leruez-Ville M, Ouachée M, Delarue R, *et al.* Monitoring Cytomegalovirus Infection in Adult and Pediatric Bone Marrow Transplant Recipients by a Real-Time PCR Assay Performed with Blood Plasma. J Clin Microbiol. 2003. 41(5): 2040–2046.
87. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. Clin Infect Dis. 2002. 34: 1094:1097.
88. Luo W, Yang H, Rathbun K, *et al.* Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in dried blood spots by a duplex real time PCR assay. J Clin Microbiol. 2005. 43: 1851–1857.
89. Maciejewsky JP, Selleri C, Sato T, *et al.* Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon- γ and tumor necrosis factor- α . J Clin Inv. 1995. 96: 1085-1092.
90. Madero L. Trasplante de progenitores hematopoyéticos de sangre de cordón umbilical. An Esp pediatr 1999. 50: 119-125.
91. Manuel O, Asberg A, Pang X, *et al.* Impact of genetic polymorphisms in cytomegalovirus glycoprotein B on outcomes in solid-organ transplant recipients with cytomegalovirus disease. Clin Infect Dis 2009. 49: 1160–1166.
92. Margni R. Inmunología e Inmunoquímica. Ed. Médica Panamericana. 1996. México. pp. 680.
93. Martino R, Subira AM, Rovira Mo, *et al.* Invasive fungal infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: incidence and risk factors in 395 patients. Br J Haematol. 2002. 116: 475-482.

94. Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzman P. Biology of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Present in Circulation. *Arch Med Res.* 2003. 34: 476–488.
95. Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, *et al.* Hematopoyesis. *Cancerología.* 2007. 2: 95-107.
96. Mayani V H. Las células seminales del sistema hematopoyético. En: *Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico: Mecanismos celulares y moleculares.* Soto CI, Cacéres R J, Mendoza FJ, Weiss SB (eds.). 1999 México, Plaza y Valdés Editores. pp. 15-33.
97. Meager A. (1991). *Cytokines.* Ed Prentic Hall, USA. pp. 1-8.
98. Mera RC, Roa LA, Ramírez CS. Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación. *Rev Ciencias Salud.* 2007. 5(1): 67-89.
99. Mercorelli B, Sinigalia E, Loregian A, *et al.* Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev Med Virol.* 2008. 18 (3): 177-210.
100. Metcalf D, Moore MAS. (1971). Hematopoietic cells. En: *Frontiers of biology,* editado por A Neuberger, E I Tatum Amsterdam: North Holland Publishing Company. vol 24, pp. 448-465.
101. Metcalf D. Cell-cell signaling in the regulation of blood cell formation and function. *Inmunol Cell Biol.* 1998. 76: 441-447.
102. Meyer-König U, Vogelberg C, Bongarts A, *et al.* Glycoprotein b genotype correlates with cell tropism in vivo of human cytomegalovirus infection. *J Med Virol.* 1998. 55: 75-81.
103. Michaels M, Greenberg DP, Sabo DL, *et al.* Treatment of children with congenital cytomegalovirus with ganciclovir. *Pediatr Infect Dis J.* 2003. 22: 504-508.
104. Miranda-Del Olmo MH, Cardiel-Marmolejo LE, Reynoso E, *et al.* Morbilidad y mortalidad en el recién nacido prematuro del Hospital General de México. *Rev Med Hosp Gen (Mex).* 2003. 66(1): 22 -28.
105. Molema H, Hermes R, Wanebo H, *et al.* The effect of surgical wounding on tumor development. *Eur J Surg Oncol.* 1999. 25: 231-43.
106. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995. 11:35-71.
107. Nance WE, Lim BG, Dodson KM. Importance of congenital cytomegalovirus infections as a cause for pre-lingual hearing loss. *J Clin Virol.* 2006. 35(2): 221-5.

108. Ninin E, Milpied N, Moreau P, *et al.* Longitudinal Study of Bacterial, Viral, and Fungal Infections in Adult Recipients of Bone Marrow Transplants. *Clin Infect Dis.* 2001. 33: 41–7.
109. Noyola D, Mejía-Elizondo A, Canseco-Lima J, *et al.* Congenital cytomegalovirus infection in San Luis Potosí, México. *Ped. Infect Dis J.* 2003. 22(1): 89-90.
110. Nucci M, Andrade F, Vigorito A, *et al.* Infectious complications in patients randomized to receive allogeneic bone marrow or peripheral blood transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2003. 5: 167-173.
111. Ogawa M, Matsunaga T. Humoral regulation of hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1999. 872: 17-23.
112. Oliveira AL. Epidemiology of bacteremia and factors associated with multi-drug resistant gram-negative bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2007. 39: 775–781.
113. Orfali JL. Sepsis Neonatal, nuevas estrategias terapéuticas. *Rev. Ped. Elec.* [en línea], 2004. 1: 1.
114. Ortega MC, O'Brien A, Berríos GC, *et al.* Enfermedad injerto versus huésped: manifestacion-enterocolica y diagnóstico diferencial. *Rev Chil Radiol.* 2005. 11(3): 134-137.
115. Pallás-Alonso CR. Actividades Preventivas y de Promoción de la Salud para niños prematuros con una edad gestacional menor de 32 semanas o un peso inferior a 1.500 g. Del alta hospitalaria a los siete años (1ª parte). *Rev Pediatr Aten Primaria.* 2012. 14: 153-66.
116. Patton JC, Akkers E, Coovadia AH, *et al.* Evaluation of dried whole blood spots obtained by heel or finger stick as an alternative to venous blood for diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection in vertically exposed infants in the routine diagnostic laboratory. *Clin Vaccine Immunol.* 2007. 14(2): 201-3.
117. Patton JC, Sherman GG, Coovadia AH, *et al.* Ultrasensitive human immunodeficiency virus type 1 p24 antigen assay modified for use on dried whole-blood spots as a reliable, affordable test for infant diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 2006. 13: 152–155.
118. Peggs KS, Mackinnon S. Cytomegalovirus: the role of CMV post-haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004. 36: 695–701.
119. Penagos PMJ, Berrón PRD, García CM, *et al.* El sistema inmune del recién nacido. *Alergia, Asma e inmunología pediátricas.* 2003. 12 (2): 63-68.

120. Polanco-Marín GG, Puerto-Solís M, González-Losa MR, *et al.* Prevalencia e incidencia de infección por Citomegalovirus en mujeres embarazadas del estado de Yucatán, México. *Rev Biomed.* 1996. 7: 127-31.
121. Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, *et al.* Verification and validation of diagnostic laboratory test in clinical virology. *J Clin Virol.* 2007. 40: 93-98.
122. Revello M, Zavattoni M, Furione M, *et al.* Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional primary human cytomegalovirus infections. *J Infect Dis.* 2002. 186 (4): 553-557.
123. Rifón J. J. Trasplante de progenitores hemopoyéticos. *An Sist Sani. Navar.* 2006. 29(S2): 137-151.
124. Ruíz-Arguelles G J, Cazares-Ordoñez Y, Ruís-Delgado GJ. Algunas Observaciones sobre el rezago en la práctica de los trasplantes hematopoyéticos en México. *Rev Hematol Mex.* 2011. 12 (1): 1-4.
125. Ryant P, Morley C, Garland S, *et al.* Cytomegalovirus transmission from breast milk in premature babies: does it matter? *Arch Dis Child.* 2002. 87: 75-77.
126. Salud/CLAP/SMR, O.P.d.I.S.O.M.d.I., Infecciones perinatales transmitidas por la madre a su hijo. Material didáctico para personal de salud. Centro Latinoamericano de Perinatología/Salud de la Mujer y Reproductiva. 2008.
127. Sánchez PC, Pelayo RC. Múltiples estrategias de evasión de la respuesta inmune por citomegalovirus humano: Mecanismos moleculares. *Lab acta.* 1996. 8: 65-73.
128. Santos A L. Principios básicos de la respuesta inmunológica. *Perinatol Reprod Human.* 1994. 8: 4-11.
129. Sastre JL, Moro BC, Coto CGD, *et al.* Infecciones perinatales. Infecciones congénitas, en *Protocolos Diagnósticos y Terapéuticos en Pediatría* 2002. http://hispasante.hispagenda.com/documentacion/guias/medicina/pediatrica/neonatologia/20-Infecciones_perinatales-congenitas.pdf
130. Schlesinger Y, Halle D, Eidelman AI, *et al.* Urine polymerase chain reaction as a screening tool for the detection of congenital cytomegalovirus infection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2003. 88: 371-374.
131. Shenk, T. Human cytomegalovirus genomics. En *Cytomegaloviruses: Molecular Biology And Immunology.* Editor: Matthias J. Reddehase. 2006. UK: Caister Academic Press. pp. 49.

132. Shibata M, Takano H, Hironaka T, Hirai K. Detection of human cytomegalovirus DNA in dried newborn blood filter paper. *J. Virol. Methods* 1994. 46: 279–285.
133. Soetens O, Vauloup-Fellous C, Foulon I, *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): 943-946.
134. Sowmya P, Dhanya V, Madhavan HN, *et al.* Comparative efficacy of PCRbased restriction fragment length polymorphism (RFLP) and multiplex PCR for glycoprotein B (gB) genotyping of human cytomegalovirus. *Indian J Med Res.* 2007. 126: 122–127.
135. Sowmya P, Madhavan HN, Therese KL: Failure to genotype human cytomegalovirus by PCR-RFLP method due to sequence variation within the primer binding site. *J Virol Methods.* 2006. 134: 250–251.
136. Stagno SPR, Cloud G, Britt WJ, *et al.* Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA.* 1986. 256(14): 1904-8.
137. Steward C G, Jarisch A. Haemopoietic stem cell transplantation for genetic disorders. *Arch Dis Child.* 2005. 90: 1259–1263.
138. Stochi R, Ward KN, Fanin° R, *et al.* Management of human cytomegalovirus infection and disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica.* 1999. 84: 71-79.
139. Stone SF, Price P, French MA. Cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells in individuals with HIV infection: correlation with protection from CMV disease. *J Antimicrob Chemother.* 2006. 57: 585–588.
140. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, *et al.* Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med.* 2005. 202(5): 673–685.
141. Szilvassy SJ. The Biology of Hematopoietic Stem Cells. *Archives of Medical Research.* 2003. 34: 446–460.
142. Tarragó D, Quereda C, Tenorio A. Different cytomegalovirus glycoprotein B genotype distribution in serum and cerebrospinal fluid specimens determined by a novel multiplex nested PCR. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 2872–2877.
143. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, *et al.* Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009. 15: 1143-1238.

144. Torok-Storb B, Boeckh M, Hoy C, *et al.* Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. *Blood*. 1997. 90: 2097–2102.
145. Vancikova Z, Dvorak P. Cytomegalovirus infection in immunocompetent and immunocompromised individual a review. *Current Drug Targets*. 2001. 1 (2): 179-187.
146. Villalba-Magdaleno J.D. Valdes-Espinoza R.A. Las citocinas en la patogénesis por citomegalovirus. *Rev Biomed*. 2000. 11: 293-300.
147. Villarreal EC. Current and potential therapies for the treatment of herpes-virus infections. *Prog Drug Res*. 2003. 60: 263-307.
148. Villasís-Keever A, Mosqueda JL. Infecciones en trasplante de médula ósea. *Rev Invest Clin*. 2005. 57(2): 381-386.
149. Wall DA, Chan KW. Selection of cord blood unit(s) for transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2008. 42: 1–7.
150. Watkins RR, Lemonovich TL, Razonable RR. Immune response to CMV in solid organ transplant recipients: current concepts and future directions. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012. 8(4): 383–393.
151. Wei L, Hua Y, Rathbun K, Chou-Pong P, Chin-Yih O. Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA in Dried Blood Spots by a Duplex Real-Time PCR Assay. *J Clin Microbiol*. 2005. 43(4): 1851–1857.
152. Winston DJ, Huang ES, Miller MJ, *et al.* Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections associated with bone marrow transplantation. *Ann Intern Med* 1985. 102: 16– 20.
153. Woo PC, Lo CY, Lo SK, *et al.* Distinct genotypic distributions of cytomegalovirus (CMV) envelope glycoprotein in bone marrow and renal transplant recipients with CMV disease. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997. 4: 515–518.
154. World Health Organization, 2006. Antiretroviral therapy of HIV infection in infants and children: Towards Universal Access. Recommendations for a public health approach. Available from: <http://who.int/hiv/pub/guidelines/paediatric020907.pdf>
155. Yakushiji K, Gondo H, Kamezaki K, *et al.* Monitoring of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation: comparison of an antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant*. 2002. 29: 599-606.
156. Yamamoto A Y, Mussi-Pinhata M, Marin L J, *et al.* Is saliva a reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? *J Clin Virol*. 2006. 36: 228-230.

157. Yan H, Koyano S, Inami Y, *et al.* Genetic variations in the gB, UL144 and UL149 genes of human cytomegalovirus strains collected from congenitally and postnatally infected Japanese children. *Arch virol.* 2008. 153: 667-674.
158. Yeh R, Coen D. (2004). Pharmacology of viral replication. En: *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*, ed. D. Golan, *et al.* Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins. pp. 545-564.
159. Yerkovich S T, Olver SD, Lenzo JC, *et al.* The roles of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and interleukin-12 in murine cytomegalovirus infection. *Immunology.* 1997. 91: 45-52.
160. Yi ES, Kim YJ. Cytomegalovirus Infection according to Cell Source after Hematopoietic Cell Transplantation in Pediatric Patients. *Yonsei Med J.* 2012. 53(2): 393-400.
161. Yoshinaga-Itano C. Early intervention after universal neonatal hearing screening: impact on outcomes. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2003. 9(4): 252-66.
162. Zambrano-Ramírez IR, Santiago O E, Weiss S B, *et al.* Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. *Rev Inv Clin.* 1999. 51: 53-66.
163. Zhou W. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood.* 2009. 113(25): 6455-6476.