



Programa de Doctorado en Biomedicina

**La producción de interferón gamma por los linfocitos T CD8+
CMV - específicos confiere protección frente a la reactivación
de citomegalovirus en el paciente crítico**

**The production of interferon gamma by CMV-specific CD8+ T cells
confers protection against the reactivation of cytomegalovirus in the
critical patient**

TESIS DOCTORAL

Francisco Javier González Gasca

Directores de Tesis

Dr. Juan José Castón Osorio

Dra. Sara Cantisán Bohórquez

Director de Línea de Investigación y Tutor

Dr. Julián de la Torre Cisneros

Córdoba, 31 de mayo de 2018

TITULO: *La producción de interferón gamma por los linfocitos T CD8+
CMV-específicos confiere protección frente a la reactivación de
citomegalovirus en el paciente crítico*

AUTOR: *Francisco Javier González Gasca*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)

Informe razonado de Presentación de la Tesis Doctoral



TÍTULO DE LA TESIS:

La producción de interferón gamma por los linfocitos T CD8+ CMV-específicos confiere protección frente a la reactivación de citomegalovirus en el paciente crítico

DOCTORANDO/A: Francisco Javier González Gasca

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Durante el desarrollo de la tesis el doctorando ha adquirido las habilidades necesarias para desarrollar investigación clínica, partiendo desde la formulación de una hipótesis de trabajo y objetivos clínicos, junto con el diseño del estudio, el análisis de datos y la obtención de resultados para dar respuesta a la pregunta de investigación planteada. El trabajo de investigación del doctorando ha seguido el modelo de investigación traslacional, empleando investigación básica para dar respuesta a interrogantes clínicos que se plantean en la práctica asistencial.

Los resultados de este trabajo han sido presentados en Congresos nacionales y finalmente se han publicado en la revista *Intensive Care Medicine*, la cual es una revista del primer Decil, con un factor de impacto de 12.015

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 7 ___ de ___ Marzo ___ de ___ 2018 ___

Firma del/de los director/es

Fdo.: _Juan José Castón Osorio



TÍTULO DE LA TESIS:

La producción de interferón gamma por los linfocitos T CD8+ CMV-específicos confiere protección frente a la reactivación de citomegalovirus en el paciente crítico

DOCTORANDO/A: Francisco Javier González Gasca

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El doctorando ha mostrado a lo largo de todo el desarrollo de la tesis un gran interés y dedicación, lo que se evidencia en la calidad de la tesis y en el valor de los resultados obtenidos, que han sido presentados en varios congresos autonómicos y nacionales. Sin embargo lo más destacable es que son resultados con un gran potencial de traslacionalidad y de transferencia a la práctica clínica, lo que se demuestra en la gran calidad de la revista donde se han publicado dichos resultados (*Intensive Care Medicine*), una revista del primer Decil, con un factor de impacto de 12.015 y situada en tercera posición dentro de la categoría Critical Care Medicine (3/33).

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 6 ___ de ___ Marzo ___ de ___ 2018 ___

Firma del/de los director/es

Fdo.: Sara Cantisán Bohórquez



TÍTULO DE LA TESIS:

La producción de interferón gamma por los linfocitos T CD8+ CMV-específicos confiere protección frente a la reactivación de citomegalovirus en el paciente crítico

DOCTORANDO/A: Francisco Javier González Gasca

ESCRITO RAZONADO DEL RESPONSABLE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

(Ratificando el informe favorable del director. Sólo cuando el director no pertenezca a la Universidad de Córdoba).

Durante el desarrollo de la tesis el doctorando ha adquirido las habilidades necesarias para desarrollar investigación clínica, partiendo desde la formulación de una hipótesis de trabajo y objetivos clínicos, junto con el diseño del estudio, el análisis de datos y la obtención de resultados para dar respuesta a la pregunta de investigación planteada. El trabajo de investigación del doctorando ha seguido el modelo de investigación traslacional, empleando investigación básica para dar respuesta a interrogantes clínicos que se plantean en la práctica asistencial.

Los resultados de este trabajo han sido presentados en Congresos nacionales y finalmente se han publicado en la revista *Intensive Care Medicine*, la cual es una revista del primer Decil, con un factor de impacto de 12.015

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 26 de abril de 2018

Firma del responsable de línea de investigación

Fdo.: Dr. Julián de la Torre Cisneros

A mi mujer, Rosa Ana
y a mis hijas, Elisa y Encina

Agradecimientos

Al finalizar el largo recorrido que conlleva elaborar una tesis doctoral, uno se hace consciente de cuánto tiene que agradecer a tanta gente. En las próximas líneas, intentaré resumir brevemente mi gratitud a las personas que han estado presentes en su desarrollo.

Al Dr. Juan José Castón Osorio, compañero, amigo y director de esta Tesis, por su ayuda, consejo y apoyo, no sólo en el presente trabajo sino en el día a día. Desde que nos conocimos al comenzar la residencia de Medicina Interna en 2009, me ha abierto las puertas al desarrollo personal en el campo de las Enfermedades Infecciosas, me ha guiado a no centrarme en exclusiva a la labor asistencial y me ha dado una visión más amplia del mundo que me rodea.

A la Dra. Sara Cantisán Bohórquez, directora también de esta Tesis, por su gran implicación, no solo en su elaboración sino en abrirme las puertas del laboratorio y en la realización de los test específicos necesarios para su desarrollo.

Al Dr. Julián De la Torre Cisneros, Jefe de la Unidad de Gestión de Enfermedades Infecciosas del Hospital Reina Sofía, a quien conocí en la rotación de Infectología y que me sorprendió, no sólo por su saber hacer tanto científico como organizativo, sino por su bondad, y cercanía. Igualmente, hago extensivo mi agradecimiento al resto de compañeros de la Unidad, quienes me acogieron como uno más del equipo.

A Aurora Páez Vega, investigadora del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica, quien colaboró en gran medida en las técnicas de laboratorio.

Al Servicio de Medicina Intensiva del Hospital General Universitario de Ciudad Real. En primer lugar, a la Dra. Hasania Abedl-Hadi Álvarez, por su activa implicación en la

inclusión de pacientes. En segundo lugar, al Dr. Alfonso Ambrós, Jefe de Servicio, no sólo por favorecer la reclutación de pacientes, sino por sus consejos y enseñanzas.

Al Servicio de Medicina Intensiva del Hospital Reina Sofía de Córdoba y, en especial a la Dra. Gema Alonso Muñoz, y, a las entoces residentes, Rosa Díaz Pernalette y Melisa Echeverría León, quienes me abrieron las puertas de su Unidad para poder incluir pacientes en este trabajo.

Al Servicio de Microbiología Clínica del Hospital General de Ciudad Real, por su colaboración, destacando a la Dra. María Dolores Romero, a la Dra. Soledad Illescas, y a, la entonces residente de Análisis Clínicos, Carmen Cabrera Morales. Asimismo, lo hago extensivo a todo el personal de laboratorio que ha participado en la realización de determinaciones bioquímicas.

A mis padres, Paco y Luisa, quienes no sólo me criaron con cariño sino que, además, se sacrificaron para que yo pudiera realizar una carrera universitaria lejos de mi ciudad. A mi esposa, Rosa Ana por su amor y apoyo en momentos de debilidad.

A las entidades que han financiado el proyecto: Plan Nacional de I+D+I 2008-2011 y el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI11/01236), Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Red Española de Investigación en Enfermedades Infecciosas (REIPI RD 12/0015).

A los familiares de los pacientes que, en las circunstancias de un ser querido hospitalizado en Cuidados Intensivos, aceptaron el participar en este trabajo.

Y, por último, al Dr. Julio Gijón Rodríguez, por sus docencia e insistencia en que culminase la Tesis Doctoral.

Índice

Resumen	10
Abstract.....	11
Introducción.....	12
• Fisiopatología del CMV	13
○ Fisiología viral.....	13
○ Epidemiología.....	14
○ Vías de transmisión	15
○ Latencia y reactivación	17
○ Cuadros clínicos de la infección por CMV.....	18
○ Diagnóstico de laboratorio de la infección por CMV.....	31
○ Respuesta inmune frente a CMV	36
▪ Inmunidad innata.....	36
▪ Inmunidad adaptativa	37
▪ Monitorización de la respuesta mediada por células T	47
• Tratamiento de la enfermedad por CMV.....	47
• Estrategias de prevención de la enfermedad por CMV.....	52
• Replicación de CMV en el paciente crítico inmunocompetente	55
○ Alteraciones inmunológicas del paciente crítico.....	55
○ Incidencia de reactivación en el paciente crítico	56
○ Inicio de reactivación del CMV.....	57
○ Factores de riesgo para la reactivación de CMV.....	57
○ Reactivación de CMV y neumonía asociada a ventilación mecánica.....	58
○ Reactivación de CMV y pronóstico	58

Hipótesis de trabajo	61
Material y método	62
Resultados	69
• Selección de pacientes	69
• Características de los pacientes.....	71
• Resultados del test QF-CMV	71
• Características de la reactivación de CMV	71
• Factores asociados con la reactivación de CMV	74
• Mortalidad y CMV.....	75
Discusión	77
Conclusiones	82
Bibliografía	83
Figuras y Tablas	103
Abreviaturas	119
Anexos:	
• Anexo I: Artículo científico	121
• Anexo II: Consentimiento informado:.....	130
• Anexo III: Hoja de recogida de datos.....	132

Resumen

Objetivos: Evaluar la utilidad de la determinación de la producción de interferón gamma (IFN γ) por los linfocitos T CD8+ específicos de citomegalovirus (CMV) para determinar el riesgo de reactivación de CMV en el paciente crítico previamente no inmunocomprometido.

Métodos: Cohorte prospectiva reclutada en dos centros hospitalarios constituida por pacientes críticos no inmunocomprometidos seropositivos para CMV que ingresaron en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) entre diciembre de 2012 y marzo de 2013. La incidencia de reactivación de CMV se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en plasma. Se determinó el nivel de secreción de IFN γ al ingreso en UCI mediante QuantiFERON-CMV (QF-CMV). Se analizaron mediante regresión de Cox los factores asociados a reactivación viral.

Resultados: Se incluyeron 53 pacientes, de los cuales 13 (24,5 %) presentaron reactivación de CMV. Veintiséis pacientes (49,1 %) fueron QF-CMV-Reactivo. De esos 26 pacientes, 11,5 % (3/26) presentaron reactivación de CMV frente al 37% (10/27) de los QF-CMV-No reactivo ($p=0,03$). Mediante regresión de Cox, la presencia de QF-CMV-Reactivo al ingreso en UCI se asoció a un menor riesgo de reactivación de CMV (OR 0,09; IC 95% 0,02-0,44; $p=0,003$). La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del QF-CMV fueron, respectivamente, del 77, 57, 37 y 88%. Once de los pacientes (20,7%) fallecieron durante el período de seguimiento. La mortalidad fue mayor en aquellos pacientes con reactivación de CMV (6/13, 46,1% frente a 5/40, 12,5%; $p=0,015$).

Conclusiones: La presencia de una respuesta funcional mediada por linfocitos T CD8+ CMV-específicos (QF-CMV-Reactivo) en el paciente crítico no inmunosuprimido al ingreso en UCI le confiere protección frente a la reactivación de CMV.

Abstract

Purpose: To evaluate the usefulness of the secretion of IFN γ by cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells to determine the risk of CMV reactivation in critically ill non-immunosuppressed patients.

Methods: Two-center prospective cohort study including critically ill non-immunosuppressed CMV-seropositive patients admitted between December 2012 and March 2013. The incidence of CMV reactivation by polymerase chain reaction (PCR) in plasma was investigated. IFN γ secretion by CMV-specific CD8+ T lymphocytes was determined at the time of admission to the intensive care unit (ICU) by means of the QF-CMV test. Cox regression analyses were performed to investigate CMV reactivation risk factors.

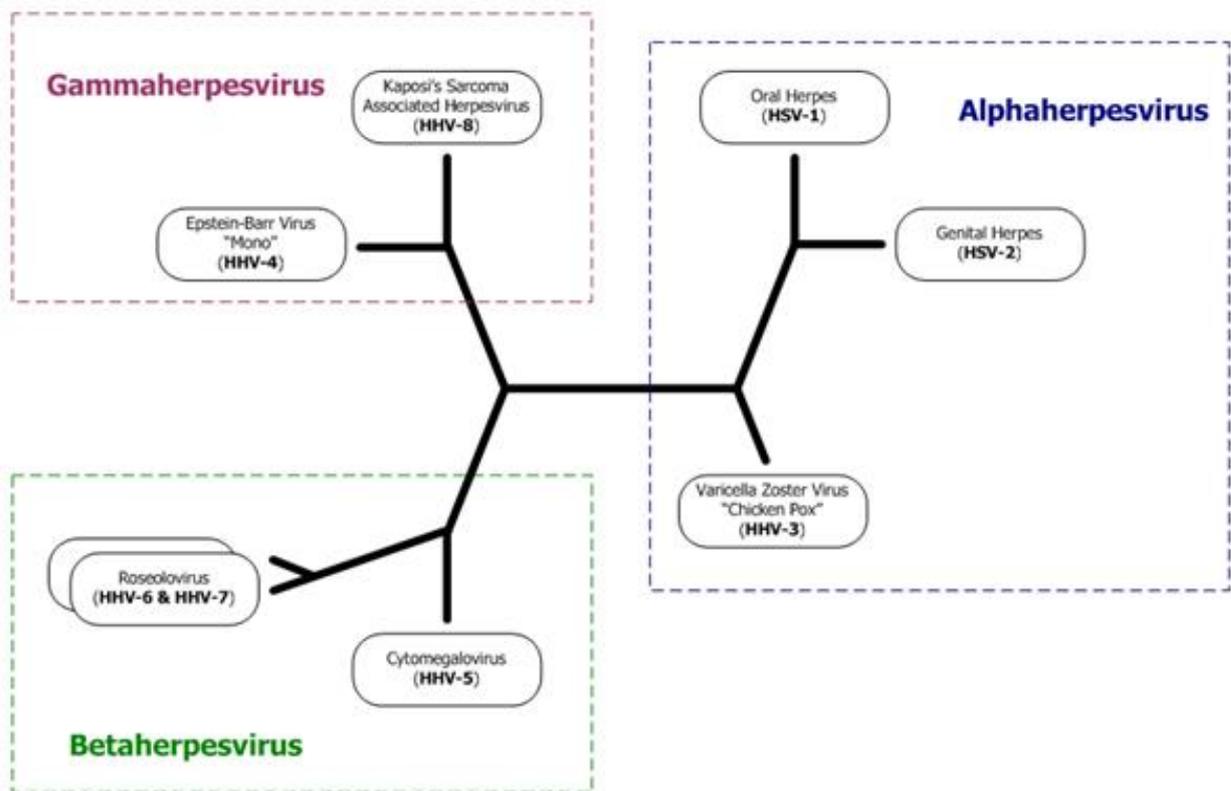
Results: Fifty-three patients were included, of whom 13 (24.5 %) presented CMV reactivation. Twenty-six patients (49.1 %) were QF-CMV-Reactive. Of the 26 QF-CMV-Reactive patients, 11.5 % (3/26) had CMV reactivation, whereas 37 % (10/27) of QF-CMV-Non reactive patients presented reactivation ($p=0.03$). By Cox regression, the presence of QF-CMV-Reactive at ICU admission (HR 0.09, 95 % CI 0.02–0.44; $p=0.003$) was associated with a decreased risk of CMV reactivation. The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of QF-CMV were 77, 57, 37, and 88 %, respectively. Eleven of the 53 patients (20.7 %) died during the follow-up period. Mortality was more frequent in patients with CMV reactivation (6/13, 46.1 vs. 5/40, 12.5 %; $p=0.015$).

Conclusions: In critically ill non-immunosuppressed patients, the presence of functional CMV-specific CD8+ T lymphocyte response (QF-CMV-Reactive) at ICU admission provides protection against CMV reactivation.

Introducción

El citomegalovirus (CMV) es un virus herpes beta tipo 5 con una seroprevalencia que varía en la población general del 65% en la quinta década de la vida hasta el 91% a partir de los 80 años.

Figura 1. Familia *Herpesviridae* (Adaptado de Moore et al. J Virol 1996) (1)



La mayoría de las primoinfecciones ocurren en la infancia y son asintomáticas, pasando, a continuación, a una fase latente, definida como persistencia del genoma viral en ausencia de producción de viriones infectantes en individuos inmunocompetentes. La fase latente puede dar paso a una reactivación en presencia de estímulos como pueden ser la inmunosupresión o una respuesta inflamatoria intensa. Mediante el empleo de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha podido implicar al CMV como patógeno inesperado incluso en el paciente inmunocompetente crítico (2).

En el paciente inmunodeprimido, especialmente en el trasplantado, se ha intentado predecir su reactivación, siendo prometedor el papel de la inmunidad del huésped mediada por linfocitos T CD8+, tanto directamente por su fenotipo como indirectamente midiendo el interferón específico frente a CMV (3).

FISIOPATOLOGÍA DEL CMV:

Fisiología viral

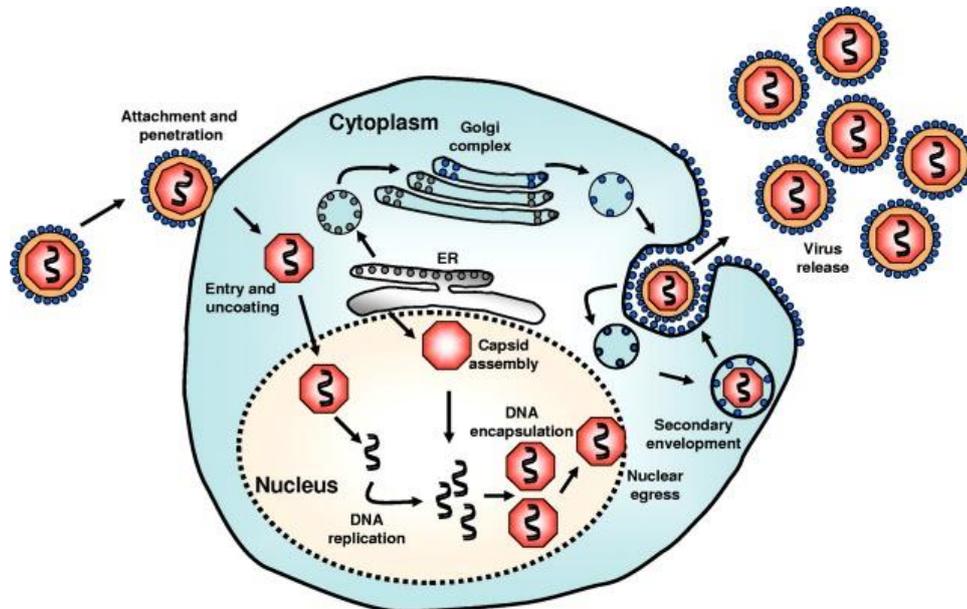
El CMV es un virus herpes beta tipo 5. Es el más grande de su familia, contando con un genoma de unas 235 kb que codifican unos 165 genes. Es un virus sensible a los solventes orgánicos, pH ácido y luz ultravioleta. Se debe conservar a temperaturas inferiores a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y preferentemente en nitrógeno líquido para preservar su viabilidad. Cuando se congela durante períodos prolongados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, el virus pierde completamente su infectividad (4).

El virión consiste en un núcleo de ADN bicatenario dentro de una nucleocápside que adopta la forma de un icosaedro, rodeada por una matriz proteica (tegumento). Todo ello se encuentra envuelto en una bicapa lipídica procedente del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático del huésped que incluye a unas 20 glicoproteínas del virus. El papel de las proteínas del tegumento puede dividirse en dos: estructural (interviene en el ensamblaje y desensamblaje del virión) y modulador de la respuesta inmune del huésped.

El CMV entra en las células humanas, bien a través de la fusión directa o bien mediante endocitosis de la envoltura (Figura 2). El virus se une a la célula a través de interacciones entre glicoproteínas virales (gB y gH) y un receptor específico de superficie (como puede ser el factor de crecimiento derivado de plaquetas). A continuación, se produce la fusión de la envoltura con la membrana celular, liberándose la nucleocápside en el citoplasma y translocándose al núcleo. Allí se libera el ADN viral y se inicia la expresión de genes IE-1 e IE-2. A continuación, se puede producir la replicación y maduración del CMV.

Este proceso implica la encapsulación del ADN viral replicado en cápsides, que luego son transportadas desde el núcleo hasta el citoplasma. En el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi son envueltas y, finalmente, el virión es liberado mediante exocitosis.

Figura 2. Ciclo del CMV (Tomado de Crough et al. Clin. Microbiol. Rev. 2009) (4)



Epidemiología

La infección por CMV tiene una altísima prevalencia mundial, especialmente en países subdesarrollados, en los que el 90% de la población está infectada, frente al 60% estimado en los países desarrollados (5). En zonas con malas condiciones socioeconómicas, la mayoría de los niños se ha infectado antes de la pubertad. El hacinamiento y la falta de higiene favorecen la transmisión de CMV. En los países desarrollados, el 40% de los adolescentes son seropositivos, aumentando la prevalencia aproximadamente un 1% por año de vida (6). Estos resultados son prácticamente superponibles en nuestro medio, ya que en un trabajo realizado en 2001 en la Comunidad de Madrid, la seroprevalencia global fue del 62,8%, a la vez que se observó una asociación significativa entre el aumento de la edad y el incremento de la seroprevalencia (7).

Vías de transmisión

El CMV se puede transmitir a través de la saliva, el contacto sexual, la transferencia placentaria, la lactancia materna, hemotransfusión, trasplante de órganos sólidos (TOS), o trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) (8).

1. Infección congénita:

La infección congénita es sinónimo de transmisión intrauterina o transplacentaria. La transmisión intrauterina ocurre únicamente en un tercio de las embarazadas con primoinfección. Además, las gestantes seropositivas pueden sufrir reinfecciones y reactivaciones, pudiendo transmitir en ambos casos la infección al feto. En zonas con nivel socioeconómico bajo, debido a la alta seroprevalencia en las madres, es más probable que un feto se infecte de una madre con infección recurrente que con infección primaria. Sin embargo, esta última presenta un riesgo para el feto mucho mayor. Esto explica el porqué la infección congénita por CMV es más frecuente en países ricos con un porcentaje mayor de madres seronegativas (6,9,10).

2. Infección perinatal:

La transmisión ocurre por contacto bien con secreciones genitales de la madre durante el parto, bien a través de la lactancia materna. La presencia de CMV en la leche materna constituye una ruta de transmisión por sí sola, ya que no se ha demostrado transmisión en niños de madres infectadas alimentados con leche de fórmula (6,10).

3. Infección posnatal:

Se ha recuperado CMV de saliva en juguetes de guarderías, por lo que se postula que la saliva puede ser una vía de transmisión en niños. No se sabe con certeza si CMV se transmite por vía sexual, ya que se ha encontrado CMV en semen y

secreciones vaginales, pero, generalmente, antes del contacto sexual hay contacto oral, pudiendo producirse la transmisión a través de la saliva. Los varones homosexuales tienen una prevalencia más alta de infección por CMV, quizás debido a que la mucosa rectal proporciona una barrera menos eficiente que la mucosa vaginal (6,10).

4. Transfusiones sanguíneas:

El CMV puede estar presente en estado latente en los monocitos en la sangre de donantes sanos y reactivarse al transfundirse a otro paciente, transmitiendo así la infección. Por desgracia, aún no se ha podido identificar hasta la fecha los donantes de alto riesgo de transmisión. En los individuos inmunodeprimidos se puede detectar CMV en polimorfonucleares y macrófagos. Actualmente, esta vía de transmisión está prácticamente eliminada gracias al uso rutinario de filtros para separar los leucocitos durante las transfusiones (6,10).

5. Trasplante de órganos:

En trasplante de órgano sólido (TOS) se pueden presentar primoinfección (en receptor seronegativo) e infecciones recurrentes, bien por reinfección con otra cepa del donante o de otra persona infectada o por reactivación del virus latente en el receptor, siendo esta última la situación más frecuente y la primoinfección la de mayor riesgo de enfermedad por CMV (ECMV) (11). En el trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH) hay menor riesgo de infección en el receptor si el donante es seropositivo, ya que transfiere cierta inmunidad al receptor de médula ósea con depleción de células T (6).

Latencia y reactivación

La infección primaria por CMV en un huésped inmunocompetente es normalmente asintomática, tras lo cual el virus se establece en el huésped en estado latente de por vida y puede presentar reactivaciones periódicas. El mecanismo mediante el CMV es capaz de mantenerse latente y reactivarse sigue siendo poco conocido. Durante la infección latente, se estima que el genoma viral de CMV se encuentra entre el 0,004% y 0,01% de células del sistema monocito - macrófago, con, aproximadamente, de 2 a 13 copias de genoma por célula infectada (12). Aunque aún no se ha aclarado con certeza el mecanismo, el virus parece quedar latente en células de estirpe mieloide (13). El ADN viral puede ser detectado en diversos tipos de células, incluyendo monocitos / macrófagos (14,15), linfocitos (16), células de médula ósea CD34+ (17), células dendríticas inmaduras (DC) (18) y células endoteliales (19,20).

El conocer los factores relacionados con la latencia es fundamental de cara a poder reducir la enfermedad por CMV. Se han propuesto tres vías posibles que conducen al establecimiento de la latencia (21). En primer lugar, a raíz de la adhesión y entrada, el CMV puede entrar directamente en un estado latente, sin precisar de la expresión *de novo* de genes virales. Una segunda posibilidad es que el virus inicie una infección productiva tras la entrada que se interrumpa prematuramente y, que posteriormente, conduzca a la latencia. En tercer lugar, a raíz de la entrada, el virus podría expresar un subconjunto de los genes virales que no están asociados con la infección, pero que son necesarios para el éxito del establecimiento de la latencia.

La reactivación del CMV de la latencia es un paso clave en la patogénesis de la infección por CMV y un atractivo campo de investigación ya que, de poder predecirla, nos permitiría iniciar tratamiento anticipado en huéspedes vulnerables. La reactivación del CMV puede ser detectada en situaciones de inmunosupresión, inflamación, infección o estrés (22–24). Aunque los mecanismos exactos que conducen a la reactivación aún no

se han aclarado, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es un mediador clave (25). El TNF α se acopla con el receptor de TNF de las células infectadas de forma latente, lo que resulta en la activación de la proteína quinasa C y NF-*kappa* B y, posteriormente, la transcripción de los genes de CMV IE, que en última instancia, desencadenan el inicio de la replicación del virus (26,27). La reactivación del CMV también se puede lograr aumentando el AMP cíclico a través de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) y prostaglandinas proinflamatorias, lo que conduce a la activación de los genes de genes de CMV IE (24,28).

Cuadros clínicos de la infección por CMV

El CMV rara vez causa infecciones graves en los sujetos sanos. Sin embargo, en los fetos, neonatos y pacientes inmunocomprometidos, la infección por CMV puede causar una serie de efectos clínicos muy perjudiciales, resumidos en la Tabla 1. Además, la infección por CMV puede tener un papel en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Tabla 1: Características clínicas de la infección por CMV

Tipo de paciente	Manifestaciones clínicas
Sanos	Generalmente asintomática; raramente síndrome mononucleósido (fiebre, malestar general, adenopatías, esplenomegalia).
Fetal / congénita	Ictericia, hepatoesplenomegalia, petequias, microcefalia, hipotonía, convulsiones, letargo
Trasplante de órgano sólido	Síndrome febril con leucopenia y quebrantamiento del estado general; neumonitis; enterocolitis, esofagitis, o gastritis; hepatitis; retinitis; y otras afectaciones de tejidos (nefritis, cistitis, miocarditis, pancreatitis)
Trasplante de progenitores hematopoyéticos	Neumonía; enterocolitis, esofagitis o gastritis; raramente retinitis, encefalitis, hepatitis
VIH	Retinitis; enterocolitis, esofagitis o gastritis; retinitis; neumonía; hepatitis

i) Infección en adultos inmunocompetentes

La infección primaria CMV en el huésped inmunocompetente suele ser asintomática y rara vez causa enfermedad. En algunos casos, puede dar lugar a un síndrome mononucleósido (SMN). El SMN se define como un conjunto de síntomas y signos, que responden a variadas etiologías y caracterizado por cuatro manifestaciones clínicas (fiebre, faringitis, poliadenoesplenomegalia y erupción cutánea) y un elemento paraclínico: leucocitosis mononuclear con linfocitosis atípica. Se estima que el 79% de los casos de mononucleosis infecciosa están causados por el virus de Epstein-Barr (VEB); la mayoría del 21% restante se debe a la infección aguda por CMV. Las manifestaciones clínicas anteriormente mencionadas no siempre están presentes, siendo el criterio diagnóstico fundamental la presencia de más de 50% de células mononucleares (linfocitos y monocitos) en sangre periférica, con un porcentaje de linfocitos atípicos mayor de 10%.

El SMN debido a CMV puede ser clínicamente indistinguible de la infección primaria por el VEB, el cual cursa clásicamente con fiebre, mialgias, adenopatías, y hepatomegalia (29,30). En este caso, la faringoamigdalitis, la afectación ganglionar y la esplenomegalia son hallazgos menos frecuentes en la primoinfección por CMV en comparación con la infección por VEB y los anticuerpos heterófilos son negativos (29). Otras complicaciones poco frecuentes de primoinfección por CMV incluyen artralgias y artritis, úlceras de colon, neumonitis, hepatitis granulomatosa, síndrome de Guillain – Barré, meningitis aséptica y miocarditis (29).

ii) La infección congénita y neonatal

La infección congénita de CMV es una causa grave de morbilidad y mortalidad en recién nacidos. Es la principal causa infecciosa de sordera y de anomalías del desarrollo neurológico en niños (31,32). La frecuencia de la infección congénita por CMV (tanto por primoinfección como por reactivación materna durante el embarazo) es de ~ 0,64% de los nacimientos vivos. Sin embargo, la incidencia puede variar considerablemente entre diferentes poblaciones de estudio (33). El riesgo de infección primaria en una madre seronegativa es de 1 a 4%, lo cual conlleva un riesgo de 30 a 40% de infección congénita (33,34). El riesgo y la gravedad de la enfermedad por CMV son mayores si la infección primaria en una madre seronegativa se produce durante el primer trimestre (35). La reactivación de una infección por CMV durante el embarazo, aunque puede causar infección congénita sintomática, presenta menor riesgo, ya que los anticuerpos maternos CMV preexistentes tienen un papel protector contra la transmisión intrauterina (36,37).

Aproximadamente, del 10 a 15% de los recién nacidos infectados congénitamente son sintomáticos al nacer, presentando: retraso del crecimiento intrauterino; hepatitis con ictericia y hepatoesplenomegalia; trombocitopenia con petequias; neumonitis; y afectación grave del sistema nervioso central (microcefalia, calcificaciones intracerebrales, coriorretinitis y pérdida de audición neurosensorial) (33,38). Aunque la mayoría de los neonatos con infección congénita son asintomáticos al nacer, del 10 al 17% pueden desarrollar defectos de audición o secuelas del neurodesarrollo (29). En los recién nacidos sintomáticos, se ha descrito una tasa de mortalidad de un 30% o morbilidad grave como secuelas neurológicas, visuales y auditivas (38).

iii) Infección en el paciente inmunodeprimido

(a) Virus de la inmunodeficiencia humana

El CMV es una infección oportunista seria en personas inmunodeprimidas, como las infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), debido al deterioro del sistema inmune adaptativo. Antes de la introducción de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) en los países desarrollados, aproximadamente el 40% de los pacientes infectados por el VIH sufría la enfermedad por CMV (39). La incidencia de CMV en pacientes con SIDA ha disminuido significativamente con la disponibilidad de la terapia TARGA, al haber un menor número de pacientes con un recuento de células T CD4+ inferior a 100 células/l, umbral de riesgo importante para la enfermedad por CMV en pacientes infectados por el VIH (40,41). Además, la infección por CMV en los pacientes con VIH puede acelerar directa y / o indirectamente la progresión a SIDA y muerte (42–44).

La manifestación más común de la enfermedad CMV en pacientes con VIH es la retinitis, que representa alrededor del 85% de todos los casos y se caracteriza por necrosis retiniana hemorrágica (39,45,46). Paradójicamente, tras la llegada del TARGA y la recuperación del sistema inmune en pacientes con CD4 bajos y antecedente de retinitis por CMV trajo como nuevo síndrome la vitritis por reconstitución inmune. Otras manifestaciones de la enfermedad asociada a CMV incluyen: enterocolitis, gastritis, esofagitis, hepatitis y encefalitis. La neumonitis es una causa poco frecuente de enfermedad pulmonar en los pacientes infectados por el VIH (39).

(b) Trasplante de órgano sólido (TOS).

A pesar de la mejora del tratamiento y del seguimiento, el CMV sigue siendo considerado como el patógeno infeccioso más significativo en el receptor de TOS. A día de hoy, sigue causando morbilidad y mortalidad después del trasplante y se asocia con la disminución de la supervivencia del injerto. Más del 50% de los receptores de TOS muestran infección por CMV, desarrollando enfermedad sintomática del 10 al 50% de pacientes, dependiendo del estado serológico del receptor (R) y del donante (D) (47). El escenario de mayor riesgo de infección (y de gravedad) es aquel donde un paciente serológicamente negativo (R-/D+) recibe un órgano procedente de un donante seropositivo debido a la ausencia de una respuesta inmune del huésped específica frente a CMV (48). Mientras que la adecuación de receptores seronegativos para donantes seronegativos sería lo ideal, la disponibilidad de órganos provoca que no sea siempre posible. Otros factores de riesgo para la enfermedad de CMV incluyen el tipo de trasplante (8), la coinfección con virus del herpes humano tipo 6 (49), el tipo y la intensidad del régimen inmunosupresor, incluyendo el uso de anticuerpos frente a receptores de células T (TCR) (50,51). La administración de anticuerpos anti-linfocitarios provocan la liberación de grandes cantidades de TNF α y otras citoquinas proinflamatorias, y puede estar involucrado en la reactivación de CMV latente (25). También se ha postulado, sin haberse confirmado, que el grado de carga viral en el órgano del donante trasplantado también podría ser proporcional al riesgo de la enfermedad por CMV debido su riqueza en células que albergan CMV latente o replicativo. (52).

Clínicamente, la infección, aguda por CMV en el paciente con TOS inmunodeprimido puede manifestarse bien como un síndrome mononucleósido (caracterizado por fiebre, leucopenia, malestar general, artralgias, y / o erupción macular) o bien como enfermedad invasiva de órgano (hepatitis, neumonitis, enterocolitis, encefalitis, coriorretinitis, nefritis, cistitis, miocarditis, o pancreatitis) (53). El diagnóstico de la enfermedad por CMV se realiza de acuerdo a los signos y síntomas clínicos en conjunción con la detección de CMV en la sangre y en los tejidos afectados (53). Además de causar directamente enfermedad en los órganos diana, el CMV también se ha asociado con un número de efectos indirectos perjudiciales en pacientes receptores de TOS. CMV se ha implicado en el aumento de rechazo del injerto (54–57) y está asociado con estenosis de la arteria renal en trasplante renal (58,59), estenosis acelerada de la arteria coronaria en trasplante de corazón (60,61), bronquiolitis obliterante en trasplante de pulmón (62,63), y el síndrome de fuga del conducto biliar en trasplante hepático (64–67). Además, la infección por CMV también puede predisponer a los pacientes de trasplante a la superinfección oportunista con una gama de diferentes microorganismos incluyendo *Pneumocystis jirovecii*, una amplia variedad de hongos y *Listeria monocytogenes* (8,68).

(c) Trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH).

Debido a un período prolongado de inmunodeficiencia tras el TPH alogénico (alo-TPH), los receptores de dicho trasplante tienen un riesgo significativo de enfermedad por CMV. En contraste con el receptor de TOS, las infecciones por CMV en el TPH son más frecuentes debido a la reactivación del virus latente presente en el receptor seropositivo que a

una infección primaria (69,70). La infección primaria por CMV se desarrolla en aproximadamente el 30% de los receptores seronegativos, mientras que la reactivación del CMV se produce en alrededor del 80% de los pacientes que son seropositivos antes del trasplante (71). La influencia del estado serológico de CMV del donante en el pronóstico de un paciente CMV-seropositivo sigue siendo controvertida. En pacientes CMV-seropositivos tratados con injertos de donantes no emparentados CMV-seropositivos en comparación con los que recibieron injertos de donantes CMV-seronegativos se ha observado una mejoría de la supervivencia y una reducción de la mortalidad relacionada con el trasplante, posiblemente debido a la transferencia de la inmunidad del donante (72). Otros estudios, sin embargo, no han mostrado ningún efecto positivo del uso de un donante CMV-seropositivo (73,74). El riesgo de infecciones por CMV también está influenciada por la edad del paciente, la fuente de células madre del donante, el HLA, el empleo de anticuerpos anti-células T, el régimen de acondicionamiento, la inmunosupresión después del trasplante, y la profilaxis de la enfermedad de injerto contra huésped aguda (75,76).

Durante el período inicial tras el TPH (<100 días), las manifestaciones clínicas más comunes de la enfermedad por CMV son neumonitis y enterocolitis (76). La introducción de la terapia antiviral dirigida específicamente frente a CMV ha reducido drásticamente la incidencia de la enfermedad temprana por CMV después del alo-TPH y la mejora de la supervivencia en determinados receptores de alto riesgo (77,78). Sin embargo, el tratamiento frente a CMV se asocia con mielotoxicidad significativa y alteración de la reconstitución hematológica, lo cual

provoca mayores tasas de infecciones fúngicas invasivas (69,79,80). El inicio de la enfermedad tardía por CMV (> 100 días después del TPH) amenaza la supervivencia a largo plazo (81,82). En un estudio de Boeckh et al. (76), la enfermedad tardía por CMV se desarrolló en el 17,8% de los pacientes con una mediana de 169 días después del trasplante y una tasa de mortalidad del 46%. La carga viral de CMV, la linfopenia y la inmunodeficiencia de células T-CMV específica fueron predictores de enfermedad por CMV (76).

iv) Complicaciones asociadas

En la infección por CMV pueden aparecer diferentes hallazgos asociados, que pueden ser la manifestación inicial de la enfermedad incluso en huéspedes sanos (9).

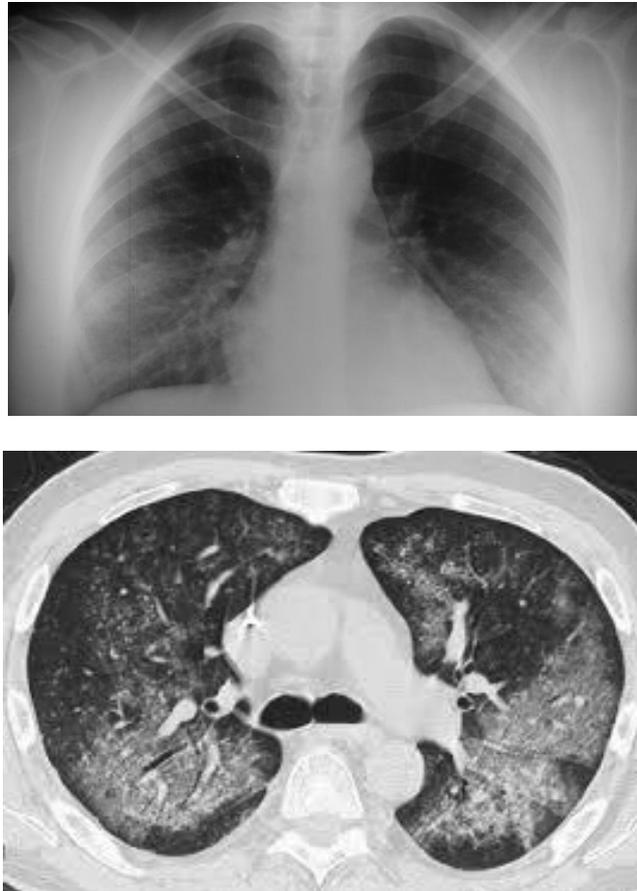
(a) HEPATITIS

La hepatitis se asocia a menudo a la mononucleosis por CMV, pero suele ser leve y en muy pocos casos es sintomática en pacientes inmunocompetentes. La hepatitis granulomatosa puede ser también una manifestación inicial de la infección por CMV que acompaña a la mononucleosis. En estos pacientes, se observa la presencia de fiebre, vómitos y una linfocitosis muy atípica de alrededor del 50%. El CMV se aísla en la faringe y se observa un aumento de la cifra de anticuerpos fijadores del complemento, lo que tiene valor diagnóstico. En estos pacientes, la biopsia hepática revela la presencia de hepatitis en fase de resolución con infiltrados de células mononucleares en el área portal junto con granulomas microscópicos con células gigantes. En el contexto de la infección aguda por CMV, la hepatitis se suele resolver por completo. (9)

(b) NEUMONÍA INTERSTICIAL

La neumonía intersticial es la complicación más grave de la enfermedad por CMV en pacientes con trasplante de progenitores hematopoyéticos, y también puede aparecer, aunque con menor frecuencia, en la mononucleosis inducida por el CMV en el huésped sano (9). Consiste en la aparición de un infiltrado intersticial difuso en la radiografía de tórax (Figura 3). La evolución es distinta entre el paciente inmunocompetente, donde suele ser leve y se resuelve espontáneamente sin precisar tratamiento frente a los pacientes receptores de TPH, en quienes la neumonitis por CMV tiene una mortalidad elevada incluso con tratamiento antiviral agresivo.

Figura 3. Neumonía por CMV. Arriba: Infiltrado intersticial en radiografía simple de tórax. Abajo: infiltrado bilateral en tomografía computarizada



(c) SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ

La asociación del síndrome de Guillain-Barré con la mononucleosis infecciosa se describió por primera vez en 1971, cuando nueve pacientes con mononucleosis aguda por CMV presentaron una polineuritis caracterizada por alteraciones sensitivas y debilidad motora en las extremidades. La recuperación de la sensibilidad precedió a la mejoría motora, y en la mayoría de los pacientes la recuperación completa ocurrió al cabo de unos 3 meses.

En los pacientes con SIDA el CMV puede ser una causa directa de polirradiculopatía y miopatía. Se ha podido observar la presencia de inclusiones de CMV en los núcleos de las células de Schwann, asociada a un síndrome de debilidad motora que conduce a incontinencia urinaria y rectal (9).

(d) MENINGOENCEFALITIS

La aparición de meningoencefalitis asociada a mononucleosis infecciosa inducida por el CMV se ha notificado en muy pocos casos en pacientes inmunocompetentes. Estos pacientes pueden tener también alteraciones sensitivas y motoras similares a las de la radiculopatía. Los síntomas más indicativos de meningoencefalitis son: cefalea intensa, fotofobia, letargo y síntomas de alteración del tracto piramidal. El LCR suele mostrar un número moderado de linfocitos. Tanto en la meningoencefalitis como en la polirradiculopatía por CMV, la presencia de ADN viral detectado con PCR es de ayuda en el diagnóstico (9).

(e) MIOCARDITIS

Una de las complicaciones, aunque infrecuentes, de la mononucleosis inducida por el CMV puede ser la afectación del miocardio o miocarditis. En tres de ocho casos, se observó la inversión de las ondas T. Asimismo, se ha descrito en muy pocos casos de niños con infección congénita por CMV la afectación del miocardio (9).

(f) TROMBOCITOPENIA Y ANEMIA HEMOLÍTICA

La trombocitopenia y la anemia hemolítica se producen con frecuencia en niños con enfermedad congénita por CMV, y a veces como complicación de la mononucleosis por CMV en adultos sanos (9).

(g) ERUPCIÓN CUTÁNEA

Los exantemas maculopapulares y rubeoliformes pueden aparecer también en el contexto de la mononucleosis por CMV. Estos exantemas pueden desarrollarse tras la administración de ampicilina, y se atribuyen a la reacción inmunológica ante los antígenos celulares que se exponen o que se expresan asociados a la infección aguda por el CMV (9).

(h) SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICO

El síndrome hemofagocítico (SHF) es una entidad multicausal con hallazgos clínicos comunes, caracterizado por afección al estado general, fiebre, hepatoesplenomegalia, fallo hepática, pancitopenia, adenopatías y coagulopatía, todo esto acompañado de proliferación de tejido linfohistiocitario y hemofagocitosis.

Se ha descrito una forma primaria familiar y varias secundarias, relacionadas con procesos infecciosos, incluyendo CMV, neoplásicos y autoinmunitarios.

La fisiopatología del SHF, que aún no está completamente comprendida, tiene como factor común a la activación del tejido linfohistiocitario secundaria a la hipercitoquinemia que deriva de la activación de linfocitos T. (83)

(i) COLITIS

La afectación del colon por el CMV se manifiesta generalmente como diarrea acuosa. Inicialmente aparecen úlceras superficiales que pueden profundizar y erosionar los vasos sanguíneos provocando rectorragia. En ocasiones pueden formar estructuras polipoideas, llegando en casos extremos, a causar obstrucción mecánica. En caso de que la inflamación sea muy intensa, la afectación vascular puede producir necrosis transmural y perforación (9,84).

v) Infección por CMV y enfermedad cardiovascular

El papel del CMV como factor potencial en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (CV) ha sido objeto de estudios epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. Los estudios han detectado ADN genómico de CMV en plasma, en aterectomía coronaria, en la autopsia de miocardio y en las válvulas cardíacas de los donantes de pacientes con enfermedades cardiovasculares; se emplearon las pruebas de PCR y de hibridación *in situ*. En el estudio HOPE, la presencia del CMV se asoció al fallecimiento posterior por infarto de miocardio, ictus o fallecimiento de causa cardiovascular (85).

Se ha demostrado que el CMV puede infectar las células endoteliales (CE) cardiovasculares y las células del músculo liso (CML) vascular de forma crónica o persistente. Además, la infección por CMV aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias y de factores de adhesión vascular, como el TNF- α , IL-1, IL-6, MCP-1, leucotrienos (LT), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la molécula de adhesión a las células vasculares 1 (VCAM-1) (9).

Diagnóstico de laboratorio de la infección por CMV

Las muestras clínicas habituales que se han empleado para el estudio de CMV son: suero (detección de anticuerpos), sangre completa (estudio de la inmunidad celular y técnicas de detección directa), orina, saliva, plasma, lavado broncoalveolar (LBA), líquido cefalorraquídeo y tejido (6,9,10), resumiéndose en la Tabla 2.

Diagnóstico serológico

Las técnicas serológicas de detección de anticuerpos específicos IgG e IgM frente a CMV nos permiten diagnosticar la infección primaria sintomática y determinar el estatus serológico de donantes y receptores de órganos. La presencia de anticuerpos tipo IgM específicos o la seroconversión de anticuerpos IgG es el método tradicional para detectar infección primaria. La determinación de IgM en muchas ocasiones da lugar a falsos resultados positivos, no permite demostrar infección recurrente y sus valores permanecen detectables durante meses. Por ello puede ser útil para diagnóstico de infección primaria sintomática en niños, pero se desaconseja en la mujer embarazada, en la cual la mejor opción es determinar la seroconversión de anticuerpos IgG o pruebas de avidéz. Durante las primeras semanas de la infección primaria, los anticuerpos IgG muestran muy baja avidéz por el antígeno, pero conforme van madurando, la avidéz aumenta progresivamente. Un porcentaje de avidéz bajo (< 35%) indica infección reciente y porcentajes > 65% son indicativos de infección pasada o de meses (6,9,10).

Existen varias técnicas serológicas de diagnóstico de CMV: reacción de fijación de complemento, aglutinación con partículas de látex (AL), ELISA, inmunofluorescencia indirecta, inmunocromatografía (IC), fluorescencia anticomplemento, quimioluminiscencia (CLIA) e inmunoblot (6,9,10).

Cultivo

CMV replica eficientemente en fibroblastos humanos. El tiempo que tarda en aparecer el efecto citopático en fibroblastos se correlaciona con la carga viral en la muestra pero, de cualquier modo, es lento y se requieren, al menos, 21 días para dar un resultado negativo. La mejor alternativa para la propagación del virus en cultivo celular es el empleo de la técnica de shell-vial (SV), que permite un diagnóstico en 18-48 h y puede aplicarse a todo tipo de muestras. Por otra parte, un resultado positivo de SV en sangre de pacientes trasplantados tiene un elevado valor predictivo positivo de ECMV y se considera el mejor procedimiento para el diagnóstico de ECMV con afectación orgánica en pacientes inmunodeprimidos utilizando la muestra adecuada (lavado broncoalveolar en neumonitis, biopsia de colon en colitis, etc.)(6).

Prueba de antigenemia

La prueba de antigenemia se basa en el empleo de anticuerpos monoclonales para detectar la proteína viral del tegumento pp65, producto del gen UL83, que es el antígeno viral mayoritario presente en leucocitos de sangre periférica durante la infección por CMV (4). En esta técnica se separa la capa leucocitaria de sangre completa anticoagulada. Un número determinado de leucocitos (habitualmente 100.000) se deposita sobre un portaobjetos con ayuda de citocentrífuga y se tiñen con anticuerpos monoclonales murinos frente a la proteína pp65. A pesar de ser una técnica relativamente sencilla y muy estandarizada para el seguimiento y manejo de la infección por CMV en trasplantados, la labilidad de la muestra de sangre, que debe ser procesada en pocas horas, la deficiente interpretación de esta en pacientes neutropénicos, y la mayor sencillez y grado de automatización de las técnicas moleculares cuantitativas recientes, que además no están sujetas a los inconvenientes de la

antigenemia, han obligado a muchos laboratorios a sustituir las clásicas pruebas de antigenemia por la determinación de la carga viral para el control de la infección por CMV en el paciente trasplantado (6).

Diagnóstico molecular

El ADN de CMV tiene algunas regiones homólogas al ADN humano que hay que tener en cuenta a la hora de diseñar técnicas diagnósticas de laboratorio como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o sondas de hibridación (10). Hoy día, la PCR es la técnica molecular más empleada para la cuantificación de ADN de CMV en muestras clínicas y es el método de elección. Actualmente hay métodos moleculares completamente automatizados para determinación de carga viral de CMV. El empleo de plasma en lugar de sangre completa ha sido recomendado por su mayor correlación con replicación activa de CMV, ya que la detección de ADN de CMV en sangre completa puede reflejar solamente la presencia del virus en los linfocitos donde CMV permanece en estado de latencia tras la infección primaria. Igualmente, como reflejo de replicación activa y diseminación del virus, algunos trabajos han planteado la controversia entre detección de ADN o detección de ARNm, que supone un paso más en la expresión genómica del virus y, por tanto, implica replicación viral. Para el diagnóstico prenatal de infección congénita, el método de elección es la PCR cuantitativa en líquido amniótico, estando indicada si se ha producido primoinfección durante el embarazo (seroconversión, IgM, IgG, baja avidéz) o si se observan anomalías ecográficas, independientemente de si la madre ha tenido o no una infección primaria durante el embarazo. La presencia de ADN de CMV en líquido amniótico confirma la infección intraútero, mientras que una carga viral elevada, $> 10^5$ copias/mL en líquido amniótico, indica alto riesgo de desarrollar infección sintomática. En el recién nacido, la presencia de ADN de

CMV en muestras de orina, tomadas en las 2 primeras semanas de vida, confirma el diagnóstico de infección congénita. La detección de ADN de CMV en sangre, saliva o líquido cefalorraquídeo también es diagnóstica de infección congénita, pero la sensibilidad es menor que en la orina. A pesar de que son muchos los trabajos que han intentado establecer un punto de corte de la carga viral que sea pronóstico del riesgo de ECMV en el período postrasplante para instaurar terapia anticipada, hay gran variabilidad de resultados entre técnicas y/o laboratorios. En muchos casos se recomienda, más que un valor absoluto, determinar la variación durante la monitorización. Por la posibilidad de contaminación con la saliva, vía de excreción principal de CMV, la carga viral en LBA debe ser mayor que la determinada en lavados faríngeos para demostrar replicación local del CMV en el tracto respiratorio inferior que permita adscribirle un papel etiológico en la neumonía. En pacientes VIH que inician tratamiento con TARGA y linfocitos CD4 < 50/l, la detección, tanto cualitativa como cuantitativa, de ADN CMV ha demostrado ser uno de los mejores predictores de riesgo de retinitis, recomendándose su determinación cada 2 meses con esta finalidad (6,9,10). En la Tabla 2 se describen los distintos métodos diagnósticos disponibles para CMV.

Tabla 2. Utilidad de los métodos diagnósticos para citomegalovirus (CMV) en función de la situación clínica (Tomado de Gámez et al. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014) (6)

Técnica	Infección congénita		Infección primaria sintomática	Trasplante de órganos		Enfermedad por CMV en inmunodeprimido
	Madre	RN		Donante	Receptor	
Indirecta						
IgM	+	++ ^a	+	nr/na	nr/na	nr/na
IgG (seroconversión)	+++	nr/na	++	nr/na	nr/na	nr/na
IgG (estatus serológico)	± ^b	nr/na	nr/na	+++ ^f	+++ ^f	nr/na
IgG (avidez)	+++	nr/na	+	nr/na	nr/na	nr/na
Directa						
Antigenemia pp65	nr/na	nr/na	nr/na	nr/na	+++ ^g	+
Cultivo celular SV (antígeno precoz p72)	+++ ^c	+++ ^d	nr/na	nr/na	+++ ^{g,h}	+++ ^h
ADN (o ARNm) cuantificado	+++ ^c	+++ ^e	nr/na	nr/na	+++ ^g	+++ ^g

RN: recién nacido; SV: Shell vial; nr/na: no recomendado/no aplicable; ±, +, ++, +++: controvertida, opcional, aceptable y alta recomendación, respectivamente.

^aLa determinación es diagnóstica en sangre de cordón o en las 2 primeras semanas de vida (baja sensibilidad).

^bNo recomendada actualmente en España.

^cEn líquido amniótico.

^dEn orina (2 primeras semanas).

^eEn orina (2 primeras semanas) y sangre de talón.

^fEn pretrasplante.

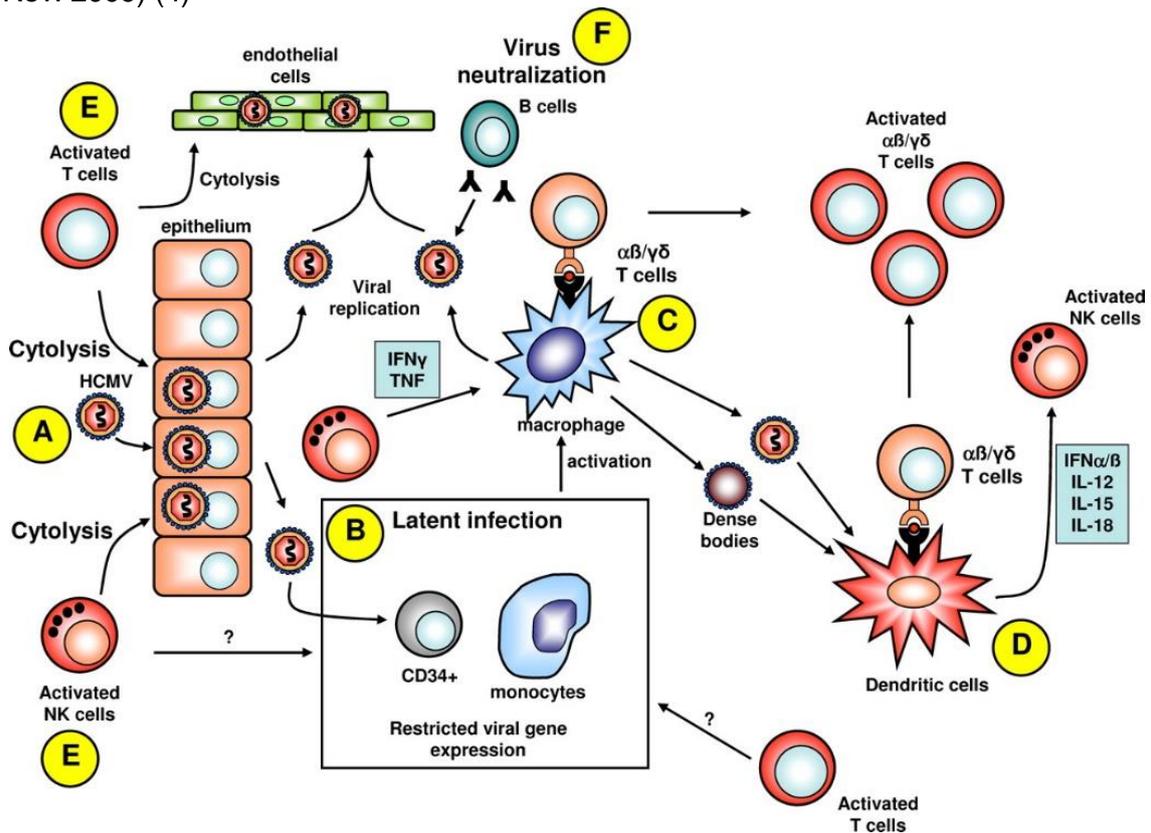
^gEn sangre y/o plasma para seguimiento postrasplante o en inmunodeprimidos.

^hEspecialmente útil en enfermedad por CMV con afectación orgánica del órgano afectado.

Respuesta inmune frente a CMV

La respuesta inmune frente a CMV es compleja e incluye a la inmunidad innata y adquirida (Figura 4).

Figura 4: Respuesta inmune frente a CMV (Tomado de Crough et al. Clin. Microbiol. Rev. 2009) (4)



Inmunidad Innata

El sistema inmune innato desempeña un papel importante tanto en la defensa contra el CMV como en la activación de la respuesta inmune adaptativa. Cada vez es más evidente que el CMV está sujeto a la detección innata por receptores tipo Toll (TLR). La estimulación de TLRs por patógenos tales como CMV que inducen la secreción de citoquinas inflamatorias que reclutan las células del sistema inmune innato, y la producción de moléculas coestimuladoras tales como CD80 y CD86, que son

importantes para la activación de la inmunidad adaptativa (86,87). TLR9 y TLR3 han demostrado ser componentes críticos de la respuesta inmune frente a CMV murino (MCMV) (88–90). (Fig. 7). El CMV también desencadena la producción de citoquinas inflamatorias mediante la activación de TLR2 tras la interacción con las proteínas virales gB / gH (86,87,91).

Las células NK son una parte integral de la inmunidad innata frente a CMV. En modelos experimentales, han demostrado estar involucradas en el aclaramiento de la infección por MCMV (92,93), y, además, la transferencia de células NK pueden proporcionar protección contra MCMV (94). Además, existen cepas de ratones resistentes a MCMV in vivo, pero que se vuelven susceptibles tras la depleción de las células NK (95,96).

En los seres humanos, se sabe relativamente poco sobre el papel de las células NK en la respuesta inmune frente a CMV. En los pacientes con trasplante renal, la actividad NK ha demostrado aumentar durante la infección primaria y recurrente por CMV, lo que indica que las células NK contribuyen a la recuperación de la infección por CMV (97). En un estudio de 43 pacientes con reactivación de CMV después de alo-TPH, en el que 12 casos fueron mortales, los niveles de citotoxicidad de las células NK se correlacionaron con la capacidad del paciente para recuperarse de la infección (98).

Inmunidad Adaptativa

La respuesta humoral.

El establecimiento de la inmunidad de larga duración en respuesta a una infección primaria CMV que sirva para controlar la posterior reactivación del CMV en el huésped es de vital importancia para la prevención de la replicación no controlada y de la enfermedad grave. El CMV desencadena potentes respuestas inmunes de todos los brazos del sistema inmune. Si bien la contribución de los anticuerpos para la protección y el control de CMV ha sido objeto de debate, la

evidencia apoya un papel para la inmunidad humoral en la respuesta inmune eficaz frente a CMV. Los anticuerpos frente a CMV disminuyen la difusión viral y limitan la gravedad de la enfermedad (99,100). La principal diana de los anticuerpos neutralizantes frente a CMV es la gB, que está implicada en la unión celular y en la penetración (101), siendo la diana de, al menos, el 50% de los anticuerpos neutralizantes en individuos infectados con CMV (101,102). Otra diana de los anticuerpos neutralizantes es la gH, la cual está implicada en la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula huésped (103).

La importancia de los anticuerpos se apoya en varios estudios con animales y humanos. En los seres humanos, la transferencia de anticuerpos de una madre CMV-seropositiva a un recién nacido ha demostrado tener un efecto protector contra la infección por CMV de transfusiones de sangre seropositivos (104). Por otro lado, también se conoce que las gestantes con inmunidad pre-concepcional para CMV transmiten menos la infección al feto que las gestantes con infección primaria (36,37). Además, si la respuesta de anticuerpos a CMV es de baja avidéz y pobre actividad neutralizante, la probabilidad de que la transmisión de la infección viral de la madre al feto es significativamente mayor (99).

La inmunidad humoral tiene un importante papel en el desarrollo de rechazo agudo, en la disfunción tardía y en la pérdida de los injertos, motivo por el cual es una diana de los tratamientos inmunodepresores en el paciente trasplantado (105).

Respuesta inmune mediada por linfocitos T

La respuesta inmune mediada por células T es el mecanismo predominante por el que se controla la replicación del CMV. Así, la enfermedad grave por CMV se produce casi exclusivamente en pacientes con inmunodeficiencia celular

profunda, con la excepción de la infección congénita. Aunque la respuesta inmune inducida por la infección primaria no erradica el virus, sí que los linfocitos T CD8+, CD4+ y $\gamma\delta$ CMV-específicos son importantes para el control y la limitación de la replicación viral en el huésped.

(I) Las células T CD8+.

El papel esencial de la inmunidad mediada por células T fue reconocida por primera vez en los estudios que utilizaban modelos de CMV murino (MCMV). En ellos, la eliminación de los linfocitos fue coincidente con el aumento de los niveles de reactivación y difusión de la infección viral, y la transferencia de linfocitos T citotóxicos CD8+ CMV- específicos (CTL) confirió protección frente a una infección que de otro modo sería letal (106,107). La depleción selectiva de subpoblaciones de linfocitos en ratones también reveló que los linfocitos T citotóxicos CD8+ MCMV- específicos eran el componente más importante en el control inmunológico de MCMV (93). Además, la disminución de células T CD8+ empleando un anticuerpo monoclonal específico frente a CD8 en monos infectados con el virus de la inmunodeficiencia del simio fue coincidente con la reactivación de CMV (108). En los pacientes con SIDA, la producción de IFN γ por células T CD8+ CMV específicas parece ser protectora contra la retinitis asociada a CMV (109). Los datos clínicos de pacientes TPH también confirman un papel crucial para las células T CD8+ en el control del CMV. El desarrollo de respuestas de linfocitos T CD8+ específicas para CMV tras el TPH han demostrado que se correlacionan con la protección (79,110) y la recuperación de la enfermedad por CMV (98). En un estudio de Reusser et al. (110), más de la mitad de los pacientes que carecen de una respuesta detectable de células T CMV-específicas desarrollaron la enfermedad por

CMV. En consecuencia, los estudios pivotaes de Riddell et al. (111) y Walter et al. (112) mostraron que la infusión de células T CD8+ CMV específicas, restauraba la inmunidad celular específica en los receptores de TPH alogénicos. Una importancia similar para la inmunidad mediada por células T CD8+ de se ha mostrado en el TOS. Los análisis de las respuestas de las células T específicas del virus en los receptores de trasplante renal demostraron que la presencia de respuestas dominantes de células T CD8+ pueden limitar la viremia y proteger contra las enfermedades del CMV (113–116). En los receptores de trasplante de pulmón, la adquisición de células T CD8+ CMV específicos, además de células T CD4+, se asocia tanto con la ausencia de enfermedad CMV y la preservación de la función del injerto en comparación con aquellos que no desarrollaron la inmunidad a CMV (117). En otro estudio, la valoración de la inmunidad frente a CMV mediada por linfocitos T CD8 específicos mediante la medición del IFN γ con el QF también predijo la reactivación de CMV (3).

La proporción de células T CD8+ implicadas con la respuesta anti-CMV es extraordinariamente grande. Alrededor de un 10% de células T CD8+ en la sangre periférica de los portadores del virus sanos y hasta 40% de células T de CD8+ en la sangre periférica de individuos de edad avanzada son específicas para los antígenos de CMV (118–121). Incluso aún hoy no es del todo comprendido cómo el CMV es capaz de orquestar una respuesta inmune tan potente y el impacto que esto puede tener en la respuesta frente a otros patógenos. La respuesta de células T es considerablemente diversa, con el reconocimiento de una variedad de antígenos estructurales y de inmunomoduladores codificados por CMV, incluyendo pp28, pp50, pp150 gH, gB, US2 , US3, US6, US11, UL16, y UL18 (121–123). Estos estudios,

en combinación con los datos reportados por otros grupos revelaron que estas respuestas se dirigen a las proteínas codificadas por CMV que se expresan en diferentes etapas de la replicación viral y a proteínas asociadas con diversas funciones (cápsida, matriz/tegumento, glicoproteína, ADN/regulador, y evasión inmune)

CMV también tiene un impacto importante en el estado de diferenciación de los linfocitos T CD8+, asociándose la infección por CMV con un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8+ altamente diferenciados, con alta capacidad efectora. Durante la infección aguda por CMV, la principal población efectora de células T CD8+ muestra un fenotipo CD45RA⁻ CD45RO⁺ CD27⁺ CD28^{+/-} CCR7⁻, mientras que en la infección crónica por CMV, hay dos patrones: CD45RA⁻ CD45RO⁺ CD27⁻ CD28⁻ CCR7⁻ ó CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD27⁻ CD28⁻ CCR7⁻ (124,125).

Otra característica interesante de la respuesta de células T CD8+ CMV específica es la acumulación de células T oligoclonales y una reducción en el *pool* de células T naïve (126,127). Asimismo, la selección de TCR es un complejo proceso en el que intervienen distintos factores. Uno de ellos es la avidéz de unión al antígeno de las células T CD8+ y otros el HLA y la eficiencia de presentación de antígeno en la superficie de las células infectadas por el virus. Todo ello no sólo ocupa un papel en el control de CMV sino también en la protección frente a otro virus persistentes (4).

La relación comentada anteriormente entre la infección por CMV y la expansión oligoclonal de linfocitos T CD8+ CMV con fenotipo de memoria altamente diferenciado (CD45RA⁺CCR7⁻CD28⁻ CD57⁺) ha llevado a relacionar también al CMV con el proceso de senescencia inmunitaria o inmunosenescencia (128). Ésta se caracteriza por una reducción de los

niveles de células naïve, la acumulación clonal de células T de memoria CD28⁻, y una disminución en la capacidad proliferativa (128,129). De hecho, hay estudios longitudinales que indican que CMV está asociado con un grupo de parámetros inmunes denominado *fenotipo de riesgo inmunológico*, que predicen un aumento de la mortalidad en individuos mayores de 80 años de edad (129,130). Además de seropositividad a CMV, los parámetros que comprenden dicho fenotipo de riesgo inmune incluyen la inversión del cociente CD4/CD8 debido al aumento de células T CD8⁺, el aumento de linfocitos T CD8⁺ CD28⁻ altamente diferenciados, la presencia de expansiones clonales de células T CD8⁺, y la reducción de la proliferación estimulada por mitógenos (129,130). Además, este aparente dominio de la respuesta inmune por CMV puede obstaculizar las respuestas a otros patógenos, como se sugiere por los resultados que la seropositividad CMV se asocia con menores tasas de éxito para la vacunación del virus de la gripe y es un cofactor que aumenta la progresión a SIDA (9).

Aunque en principio se pensó que el establecimiento de una población de células T de memoria en respuesta a una infección viral comprendía un período de expansión durante la fase aguda inicial de la infección, seguido por una fase de contracción una vez que la infección desaparece, varios estudios han revelado que la respuesta de células T humanas contra la infección latente por CMV muestra expansiones y contracciones continuas similares a las observadas durante la fase aguda de la infección, aunque en niveles inferiores (131). Estas fluctuaciones fueron sincrónicas no sólo entre los epítomos de CMV, sino también entre los antígenos de CMV y con las respuestas a los antígenos latentes y líticas del virus de Epstein-Barr (VEB) (131). La ausencia de CMV detectable indicó que la reactivación periódica

de estos virus persistentes era poco probable que provocara las fluctuaciones observadas de células T. Por tanto, dichas fluctuaciones fueron atribuidas a un efecto generalizado de la infección por CMV sobre la dinámica de poblaciones de células T específicas a CMV- y VEB (inmunidad heteróloga) (131,132).

(II) Las células T CD4+.

Cada vez hay más evidencia de que las células T CD4+ también son una parte integral de la lucha contra las infecciones por CMV (133,134). En ratones infectados con MCMV, el agotamiento selectivo de células T CD4+ dio lugar a un aumento de la incidencia de la infección por MCMV recurrente (93).

La importancia de las células T CD4+ también se extiende al mundo del trasplante. Los bajos niveles de células T CD4+ CMV específicos se correlacionan significativamente con la susceptibilidad a complicaciones infecciosas con CMV en los receptores de trasplante de pulmón (135). Después del trasplante renal, se ha demostrado que los síntomas clínicos de CMV estén precedidos por una disminución en los niveles de células T CD4+ CMV específicas y un aumento en la carga viral, lo que sugiere que los niveles de células T CD4+ CMV específicas pueden ser predictivos de enfermedad asociada a CMV (136). En los receptores de TPH, la presencia de una señal detectable de células T helper (Th) CD4+ de respuesta se ha asociado con protección contra la enfermedad por CMV (48) y la evidencia sugiere que la recuperación de células Th CD4+ CMV-específicas es necesaria para la reconstitución endógena de las células CD8+ (137).

Al igual que ocurre con los linfocitos T CD8+ CMV específicos, un alto porcentaje de células T de CD4+ se encuentran comprometidos en la inmunidad frente a CMV en individuos seropositivos sanos. Los individuos expuestos a CMV dedican una mediana del 9,1% de su de población de células T CD4+ memoria circulantes a este virus (121).

El análisis de la especificidad de la respuesta de células T CD4+ específica a CMV ha revelado un amplio reconocimiento de antígeno viral. Tradicionalmente, el papel de las células T CD4+ en la infección latente se consideró indirecta, mediante el suministro de linfocitos T helper en el mantenimiento de la respuesta de anticuerpos específicos frente al virus y en la expansión de las poblaciones de células T CD8+ (112). Sin embargo, los estudios apoyan un papel directo de las células T CD4+ CMV específicas en el control de la infección al matar las células infectadas por el virus. Los linfocitos T CD4+ gB-específicos con actividad citotóxica tanto de individuos seropositivos sanos como de mujeres embarazadas se han ampliado con éxito in vitro (122). Además, la adquisición de actividad citolítica directa por células T CD4+ pp65-específicos ha demostrado que se producen como una función del estado de diferenciación. La evidencia del papel citolítico directo para CTL CD4+ gB específica in vivo procede de un estudio en el cual células T CD4+ directamente purificadas de sangre periférica secretaban granzima B en respuesta a células gliales que expresaban gB endógena (138).

Monitorización de la respuesta mediada por células T específicas de CMV:

Predecir la aparición de enfermedad clínica por CMV (ECMV) en pacientes es difícil y necesita pruebas de diagnóstico rápidas y precisas para el adecuado diagnóstico y manejo de la ECMV post-trasplante (4). El diagnóstico de la ECMV se realiza de acuerdo a signos clínicos y síntomas junto con la detección de laboratorio de CMV (antígeno o carga viral) en sangre y/o su aislamiento en el órgano afectado (6,9,10). En la actualidad, las técnicas de replicación en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativas se utilizan habitualmente para determinar las cargas de CMV y tiene un papel importante en el manejo clínico de los pacientes trasplantados. Sin embargo, la enfermedad por CMV activa no siempre se correlaciona con la detección de la carga viral, haciendo que una no desdeñable parte de pacientes con carga viral detectable no lleguen a desarrollar enfermedad sintomática y por tanto sean tratados innecesariamente con fármacos antivirales y expuestos a posibles efectos secundarios (9). Como se ha descrito previamente, las células T CD8+ específicas de antígeno son cruciales en la respuesta inmune contra el CMV. Esto ha hecho que una parte de la investigación se haya centrado en la evaluación en la práctica clínica de técnicas capaces de evaluar la inmunidad celular tras el reciente desarrollo de estudios que enumeran y evalúan el fenotipo y función de las células T específicas a CMV de modo fiable para complementar a la determinación de ADN por PCR.

La medida de la respuesta inmune celular frente a CMV permite determinar la capacidad de las células T de responder a la reactivación de CMV. Hay diferentes métodos de medida y cuantificación de linfocitos T CD8+ y CD4+: uso de multímeros HLA-péptidos de CMV, ELISPOT, QuantiFERON-CMV (QF-CMV) y marcaje intracelular.

- A. Multímeros HLA-péptido: Esta técnica cuantifica el número de células T CMV-específicas. La combinación con anticuerpos monoclonales dirigido a marcadores de superficie (CD4, CD8, CD45RA, CCR7) o a citoquinas intracelulares (IFN γ , TNF α , IL-2) da una información muy completa sobre la respuesta T CMV-específica.
- B. ELISPOT: Esta técnica detecta el IFN γ liberado tras la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica con péptidos de CMV. La técnica ELISPOT no distingue entre T CD4+ y T CD8+ y sólo puede evaluar un único marcador funcional (IFN γ o TNF α , habitualmente).
- C. Marcaje intracelular (ICS): Basada en la citometría de flujo, detecta la producción y acumulación de citoquinas en el retículo endoplasmático tras la estimulación celular con péptidos de CMV o lisado viral. ICS puede ser empleado en combinación con técnicas de inmunofenotipado mediante marcadores de superficie así como con multímeros HLA-péptido para detectar respuesta antígeno específica.
- D. QuantiFERON-CMV: Determina la producción de IFN γ por los linfocitos T CD8+ CMV-específicos frente a epítomos inmunogénicos de CMV (contenidos en IE-1, IE-2, pp65, pp50, pp150, gB, US2, US6, UL16 y UL18). El IFN γ se detecta en el plasma tras centrifugar y se cuantifica mediante técnica de ELISA.

De todos ellos, el QF-CMV presenta una serie de ventajas: está aprobado por la Agencia Europea del Medicamento, está estandarizado (tiene un cut-off definido), es sencillo, requiere mínima manipulación, rapidez en los resultados y, desde un punto de vista de aplicación clínica, es fácilmente automatizable (3,139,140). Sin embargo, también presenta algunas desventajas, como que sólo determina la inmunidad mediada por linfocitos T CD8+ y no CD4+, además de que sólo cuantifica la producción de IFN γ y no de otras citoquinas importantes como TNF α o interleuquina-2.

Las diferencias entre los distintos métodos de estudio de la respuesta mediada por células T se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Métodos inmunológicos para el estudio de la respuesta mediada por los linfocitos T frente CMV (Tomado de Cantisán et al. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011) (139)

Características	Multímeros HLA-péptido	ICS	ELISPOT	QuantiferON-CMV
Muestra/ volumen	CMNSP/0,5-1 ml	SC o CMNSP/1-2 ml	CMNSP/10 ml	SC/3-5 ml
Duración	1 - 2 h	8 - 10 h	24-48 h	24-48 h
Antígeno	Péptido individual (pp65, IE-1, pp50)	Péptido individual/librería de péptidos / lisado / proteínas recombinantes / células dendríticas infectadas con CMV-VR-1814	Péptido individual/librería de péptidos / lisado / proteínas recombinantes / células dendríticas infectadas con CMV-VR-1814	Combinación de péptidos pp65/ gB/IE-1/pp50
Conocimiento previo del epitopo	Sí	No	No	No
Distingue T CD4+ de T CD8+	Sí	Sí	No	Péptidos diseñados para estimular a CD8+
Análisis funcional	No (sólo si se combina con ICS)	Sí	Sí	Sí
Análisis fenotípico	Sí	No	No	No
Conocimiento previo de HLA necesario	Sí	No	No	No
Ventajas	Resultados en 1-2 h	Caracterización cuali y cuantitativa	Permite congelación de muestras y su envío a laboratorio de referencia	Aprobado en Europa Fácil de hacer y mínima manipulación
Limitaciones	Requiere citómetro de flujo No estandarizado	Requiere citómetro de flujo No estandarizado	Requiere purificar CMNSP No estandarizado	Sensible a linfopenia No cubre pacientes con alelos raros HLA clase I

CMNSP: células mononucleares de sangre periférica; ICS: marcaje intracelular; SC: sangre completa.

Tratamiento de la enfermedad por CMV

Tres fármacos que actúan inhibiendo la ADN-polimerasa del virus han demostrado ser eficaces en el tratamiento de la enfermedad orgánica por CMV: ganciclovir, foscarnet y cidofovir. Otro fármaco, el valaciclovir, parece retrasar el tiempo hasta la progresión de la retinitis en pacientes con retinitis por CMV. El fomivirsén, un inhibidor complementario del CMV, se puede usar para el tratamiento de la retinitis por CMV por inyección intraocular directa en el humor vítreo. En la actualidad, los fármacos de elección en el tratamiento de la enfermedad por CMV son el ganciclovir intravenoso y el valganciclovir oral. Se han usado para tratar muchas formas de enfermedad por CMV en pacientes con SIDA y otros cuadros de inmunodepresión, por ejemplo, receptores de trasplante (9).

GANCICLOVIR

El ganciclovir es un análogo nucleosídico de la guanosina y homólogo del aciclovir, y fue el primer fármaco antiviral que se mostró eficaz en el tratamiento de la enfermedad por CMV en seres humanos. Inhibe todos los virus herpes y bloquea la transformación de los linfocitos normales de la sangre del cordón umbilical por el VEB. Para adquirir actividad antiviral, el ganciclovir necesita ser fosforilado. El ganciclovir trifosfato es un potente inhibidor de la enzima ADN polimerasa del CMV, e inhibe de forma competitiva la incorporación del desoxiguanosintrifosfato a la cadena del ADN viral en formación. Tras la escisión del pirofosfato, el ganciclovir monofosfato se incorpora al extremo de la cadena del ADN viral en formación, lo que enlentece la replicación.

La semivida del ganciclovir trifosfato en las células infectadas por el CMV es de 16,5 horas, frente a las 2,5 horas del aciclovir trifosfato. Aunque el ganciclovir trifosfato no es un inhibidor tan eficaz de la ADN-polimerasa del CMV como el

aciclovir trifosfato, esta concentración de ganciclovir trifosfato en las células infectadas por el CMV es 10 veces superior a la concentración de aciclovir trifosfato. La elevada concentración de ganciclovir trifosfato y su prolongada semivida intracelular hacen que el ganciclovir sea un inhibidor más eficaz de la replicación del CMV in vivo que el aciclovir.

El valganciclovir es el éster valina del ganciclovir; tiene una biodisponibilidad oral mucho mayor que el ganciclovir (se absorbe alrededor del 68%, frente al 6-8% del ganciclovir oral). Una valina esterasa presente en la mucosa intestinal humana escinde la valina, y el ganciclovir entra en el torrente circulatorio.

Los efectos adversos más frecuentes son neutropenia y trombocitopenia, elevación de creatinina, fiebre, vómitos y diarrea. El valganciclovir ha sustituido en gran medida al ganciclovir, debido a su mejor biodisponibilidad y comodidad (9,141).

FOSCARNET

El foscarnet es un análogo de pirofosfato que se une directamente a la ADN polimerasa del CMV y de otros virus herpes. Actúa como inhibidor competitivo y reversible que no se incorpora a la cadena de ADN viral en formación. Este fármaco debe encontrarse en concentraciones elevadas en el interior de las células para permanecer en contacto con la ADN-polimerasa e inhibir su actividad. Cuando la concentración intracelular de foscarnet disminuye, ya no se fija a la ADN-polimerasa y se reinicia la síntesis de ADN viral. Las cepas de CMV resistentes al ganciclovir siguen siendo sensibles al foscarnet.

El foscarnet se asocia a nefrotoxicidad y toxicidad metabólica significativas. La insuficiencia renal, la hipomagnesemia y la hipofosfatemia son consecuencias graves del tratamiento con foscarnet que se pueden prevenir de forma eficaz

mediante el control estrecho de las concentraciones séricas de creatinina y con la administración por vía oral de suplementos de magnesio, calcio y fosfato. Otros efectos secundarios frecuentes son: fiebre, vómitos, diarrea, anemia, granulocitopenia, cardiotoxicidad, daño neurológico y hepatotoxicidad (9,141).

CIDOFOVIR

El cidofovir es un análogo nucleotídico de la citosina que tiene una elevada actividad antiviral frente al CMV in vitro. Las enzimas celulares transforman el cidofovir en cidofovir trifosfato, que es el inhibidor activo de la ADN-polimerasa viral. El cidofovir trifosfato tiene una semivida intracelular larga, por lo que se administra sólo una vez por semana. La dosis máxima tolerada es de 5 mg/kg semanales por vía intravenosa. Esta dosis se administra semanalmente durante 2 semanas como tratamiento de inducción, y luego una vez cada 2 semanas. El cidofovir ha de administrarse junto con probenecid oral antes de cada dosis intravenosa para evitar la toxicidad renal (impide la captación del cidofovir y preserva las células del túbulo renal de la lesión degenerativa) (9).

El principal efecto tóxico del cidofovir se debe a su absorción por las células del túbulo contorneado proximal (9). Otros efectos secundarios frecuentes son: fiebre, alopecia, erupción cutánea, tos, disnea y daño ocular y digestivo (141).

NUEVOS AGENTES: Se relegan a casos de resistencia a ganciclovir.

Brincidofovir: inhibe la ADN polimerasa del CMV y es activo frente a virus ADN bicatenarios. Se administra vía oral y su principal efecto adverso es diarrea. No presenta interacciones relevantes y ya se han descrito mecanismos de resistencia mediante mutaciones en UL54. No se ha comparado con ganciclovir en profilaxis y ha sido eficaz en

tratamiento de enfermedad por CMV resistente a ganciclovir en cuatro de cinco pacientes con trasplante renal (142).

Letermovir: Inhibe el complejo terminasa de CMV. Su administración es oral, no tiene interacciones y el mecanismo de resistencia se debe a mutaciones en UL56. No se ha comparado frente a ganciclovir. Hay un informe de éxito en tratamiento en un paciente con enfermedad diseminada por CMV resistente a ganciclovir. (142).

Maribarir: Inhibe la encapsulación viral. También es de administración oral y puede alterar el gusto. A diferencia de los anteriores, aumenta los niveles de tacrolimus y everolimus. El mecanismo de resistencia se debe a mutaciones en UL97 y UL27. No ha demostrado inferioridad frente a ganciclovir en profilaxis en trasplante hepático y en tratamiento ha sido eficaz en cuatro de siete pacientes con trasplante de órgano sólido y que presentaban enfermedad por CMV resistente a ganciclovir. Por otro lado, se ha comunicado la aparición de resistencia al tratar un paciente con viremia alta (142).

La duración óptima del tratamiento debe ser individualizada y guiarse mediante monitorización semanal de la viremia y seguimiento clínico de respuesta a tratamiento. Así, el tratamiento debe mantenerse hasta la resolución de los síntomas clínicos y de la erradicación viral, ya sea a través de la carga viral o de la antigenemia, en una o dos muestras tras, al menos, dos semanas de tratamiento (142). Una vez terminado el tratamiento, se debe valorar la realización de profilaxis secundaria mediante valganciclovir 900 mg una vez al día de uno a 3 meses (142).

Estrategias de prevención de la enfermedad por CMV

Las dos principales estrategias para la prevención de la enfermedad por CMV en el paciente trasplantado son la profilaxis universal y el tratamiento anticipado. La **profilaxis universal** consiste en administrar un antiviral eficaz a todos los pacientes de riesgo, aunque no exista sospecha clínica ni datos microbiológicos de infección. El **tratamiento anticipado** consiste en el inicio de tratamiento antiviral en aquellos pacientes que presenten replicación asintomática de CMV, detectada por la monitorización regular en sangre mediante PCR o antigenemia. Una vez que la replicación viral alcanza un determinado umbral se inicia tratamiento antiviral para prevenir la progresión a una enfermedad sintomática. Ambas estrategias, comparadas con placebo, son eficaces en la prevención de la enfermedad por CMV en los receptores de TOS según varios metaanálisis (143).

La profilaxis universal presenta el beneficio de prevenir potencialmente la reactivación de otros herpesvirus, así como evitar la aparición de efectos indirectos y la necesidad de obtención de muestras repetidas para cuantificar la carga viral o antigenemia. Sin embargo, la exposición prolongada a fármacos antivirales puede suponer un mayor riesgo de aparición de resistencias y de toxicidad relacionada con el tratamiento antiviral. Además, la profilaxis universal se ha relacionado con la aparición de enfermedad tardía por CMV debido, probablemente, a un déficit en el desarrollo de inmunidad celular específica frente al virus (143). Por otro lado, la terapia anticipada permite disminuir el coste y la toxicidad de los fármacos antivirales, y permite el desarrollo de inmunidad celular específica evitando el desarrollo de enfermedad tardía por CMV (144). Sin embargo, esta estrategia sólo puede realizarse si se asegura una monitorización estrecha de la replicación viral. Sus ventajas e inconvenientes se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Ventajas e inconvenientes entre profilaxis universal y tratamiento anticipado (144)

Estrategia	Ventajas	Inconvenientes
Profilaxis	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de incidencia de enfermedades oportunistas • Aumenta supervivencia del injerto • Disminuye episodios de rechazo 	<ul style="list-style-type: none"> • Aparición de enfermedad tardía • Mayor incidencia de resistencia antiviral • Mayor riesgo de leucopenia
Tratamiento anticipado	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad tardía excepcional. • Menores efectos secundarios • Menor coste 	<ul style="list-style-type: none"> • Logística complicada

Los avances en el conocimiento del control inmunológico de la infección por CMV se van aplicando progresivamente a la clínica. En la actualidad se está evaluando de forma experimental la potencial utilidad de la determinación de la respuesta celular CMV-específica para personalizar la profilaxis según parámetros individuales (*profilaxis inmunoguiada*) en el trasplante. Así, se están investigando varios marcadores inmunológicos para poder utilizarlos en esta indicación: la cuantificación y fenotipo de los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos frente al CMV y su funcionalidad midiendo IFN γ (QF-CMV, ELISPOT, interferón intracelular) (145).

En un trabajo publicado recientemente por Cantisán (3), se ha demostrado cómo el analizar la inmunidad específica frente a CMV mediada por los linfocitos CD8+ mediante el interferón gamma (IFN γ) a través del kit comercial QuantiFERON-CMV[®] (QF) en el candidato a trasplante permite predecir el riesgo de replicación de CMV post-trasplante. Además, según los resultados publicados recientemente de un estudio de cohortes prospectivo en pacientes TOS de alto riesgo para el desarrollo de enfermedad por CMV (ECMV) tardía (D+/R-), el ensayo QF-CMV (realizado al finalizar la profilaxis, a las 4 y ocho semanas) permitiría identificar y estratificar a los pacientes en: riesgo bajo (QF-CMV reactivo), medio (QF-CMV no-reactivo) y alto (QF-CMV indeterminado). Estos

resultados esperanzadores, permitirían abrir la puerta a discriminar un grupo de pacientes que se beneficiarían bien de profilaxis bien de terapia anticipada frente a CMV en el candidato a trasplante o de monitorización estrecha de la reactivación de CMV, pudiendo disminuir así la incidencia de complicaciones tanto por la infección como por el tratamiento (140).

Replicación de CMV en el paciente crítico inmunocompetente

Los virus juegan un importante papel dentro de las infecciones graves en los pacientes adultos, siendo, en ocasiones, responsables directos de hospitalización y de ingreso en unidades de cuidados intensivos, especialmente en casos de síndrome de distrés respiratorio del adulto y/o encefalitis. Las infecciones por virus influenza y parainfluenza, virus sincitial respiratorio, herpes virus y adenovirus son las que más frecuentemente motivan estos ingresos.

En los últimos tiempos se está estudiando al paciente crítico, clásicamente considerado inmunocompetente, como sujeto en riesgo de reactivación del CMV. Por ejemplo, en situaciones de sepsis, se produce una cascada de citoquinas que son capaces de reactivar el CMV. La reactivación (y no la infección primaria) es la causa de infección en el paciente crítico (0% en el seronegativo y del 13-65% en el seropositivo) (2,146–148). Además, el CMV se ha implicado en la neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV), y aunque la etiología más frecuente sea la bacteriana, debe tenerse en cuenta en especial en los casos de mala y prolongada evolución sin aislamiento microbiológico (149).

Alteraciones inmunológicas en el paciente crítico

La sepsis grave y el shock séptico son la causa no cardiológica más frecuente de ingreso en UCI. La sepsis en sí misma provoca una inmunosupresión profunda, y así puede empeorar la inmunidad, no sólo en los pacientes ya inmunocomprometidos sino también en pacientes previamente sanos (150). La sepsis induce múltiples efectos en la inmunidad innata y adaptativa incluyendo la depleción de las células efectoras inmunes (linfocitos y células dendríticas) mediante apoptosis, la desactivación del monocito, el agotamiento de las células T, el aumento de las células supresoras derivadas de la serie mieloide y de células T reguladoras (151). Cabe destacar que alteraciones inmunes

similares también se han encontrado en pacientes politraumatizados, quirúrgicos, o asociados a tratamientos habituales en la UCI (ventilación mecánica, transfusión de hemoderivados, corticoesteroides, fármacos vasoactivos como las catecolaminas...) (152). Como resultado, el paciente de UCI se vuelve más vulnerable a la infección nosocomial. Esta inmunosupresión puede explicar cómo, en pacientes de trasplante de hígado que desarrollaron infecciones potencialmente mortales, la suspensión de la medicación inmunosupresora no produjo rechazo de trasplante como cabría esperar. Así, sólo una pequeña minoría precisó la reintroducción de inmunosupresores al presentar indicios leves de rechazo de órgano y llegando a reducirse la dosis del fármaco inmunosupresor hasta en un 50% (153).

Incidencia de reactivación de CMV en el paciente crítico

La incidencia de la reactivación de CMV en el paciente inmunocompetente crítico ha sido estudiada en varios metaanálisis por Kalil en un 30%, variando entre 22 y 42% (146), por Heininger en un 40 % si hay sepsis (147) y por Osawa en un 32-33% (2). En un reciente estudio de Frantzeskaki, la reactivación por CMV se objetivó en el 14 % de 80 pacientes (154). Estas diferencias pueden explicarse tanto por el momento de la monitorización como por el tipo de muestra empleada. La incidencia de reactivación de CMV puede verse infraestimada si la toma de la muestra se realiza precozmente ya que ésta no ocurre inmediatamente sino normalmente entre la primera y tercera semana tras el ingreso en UCI (155–157). Además, diversos estudios sugieren que la reactivación de CMV parece ocurrir más precozmente, con mayor frecuencia e intensidad en el pulmón, observándose una incidencia de reactivación más alta si la muestra empleada es el lavado broncoalveolar en lugar de sangre periférica (155,158). Asimismo, parece haber diferencias en función de la patología que motivó el ingreso en UCI, ya que en unidades coronarias la reactivación de CMV alcanza solamente el 4% (159). Limaye observó cómo la etiología de ingreso parece influir en la reactivación de

CMV, siendo posiblemente mayor el riesgo en las unidades de quemados y politrauma que el que presentan los pacientes coronarios o médicos (157).

Inicio de reactivación del CMV

El tiempo medio de inicio tras el ingreso en UCI de la infección varía entre los 4 y 28 días si la replicación viral se establece mediante antigenemia o entre los 4 y 12 días, si se emplea PCR. En un estudio que comparó ambos métodos diagnósticos también corrobora la mayor superioridad en la detección precoz de la PCR sobre la antigenemia, con una mediana de 4 días vs 11 días, respectivamente (2). Este momento de aparición de la reactivación por CMV sugiere que se deba por la propia activación del sistema inmune (148).

Factores de riesgo para reactivación de CMV

Tanto Limaye et al (148) en su metaanálisis como en una revisión más reciente de Al-Omari et al (141) han establecido que la gravedad del paciente (evaluada mediante la escala APACHE, SOFA y SAPS), el sexo o la edad, no se asociaron con un aumento del riesgo de reactivación del CMV. Sí que parece relacionarse la necesidad de ventilación mecánica al ingreso (OR 8,5; con un intervalo de confianza al 95% de 1,1-66,5 en viremias superiores a 1000 copias/mL), distrés respiratorio, neumonía bacteriana o sepsis bacteriana (157). Por tanto, aunque los datos sean limitados no parece ser un simple marcador de gravedad en este contexto (2,154,160,161). Por otro lado, la transfusión de hemoderivados, especialmente en las primeras 24 horas de inicio del cuadro clínico, sí que parece ser un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad por CMV, relacionándose especialmente en el momento de transfusión y la cantidad de concentrados de hematíes transfundidos (141,157). También el tipo de ingreso puede asociarse a reactivación de CMV, siendo mayor en quemados y politraumatizados (157).

Reactivación del CMV y Neumonía asociada a la ventilación mecánica

Aunque la neumonía por CMV es una manifestación clínica frecuente y bien conocida en los pacientes inmunocomprometidos, en el paciente crítico inmunocompetente es un reto diagnóstico, especialmente si la intubación se debe a otro motivo (141).

Existen varios trabajos publicados que tratan de documentar la incidencia real de neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAV) causada por CMV (162,163). Papazian observó hallazgos anatomopatológicos compatibles con neumonía por CMV en el 29,4% de 85 pacientes diagnosticados de síndrome de distrés respiratorio del adulto con sospecha de NAV y con cultivos negativos (162). Posteriormente, demostró por biopsia *in vivo*, una alta incidencia de neumonía por CMV (30%) y una baja rentabilidad diagnóstica tanto de PCR como de cultivo de BAL (sensibilidad del 53% y especificidad del 92%) en una población de 100 pacientes (163). En un estudio conducido por Chiche, la incidencia de enfermedad activa por CMV de un 16,1% en una población de 242 pacientes inmunocompetentes ventilados más de 48 horas (164).

Por todo ello, en los últimos años ha aumentado la sospecha de que CMV sea responsable de episodios de NAV con infiltrados persistentes, sin mejoría clínica y cultivos bacterianos negativos.

Reactivación del CMV y pronóstico

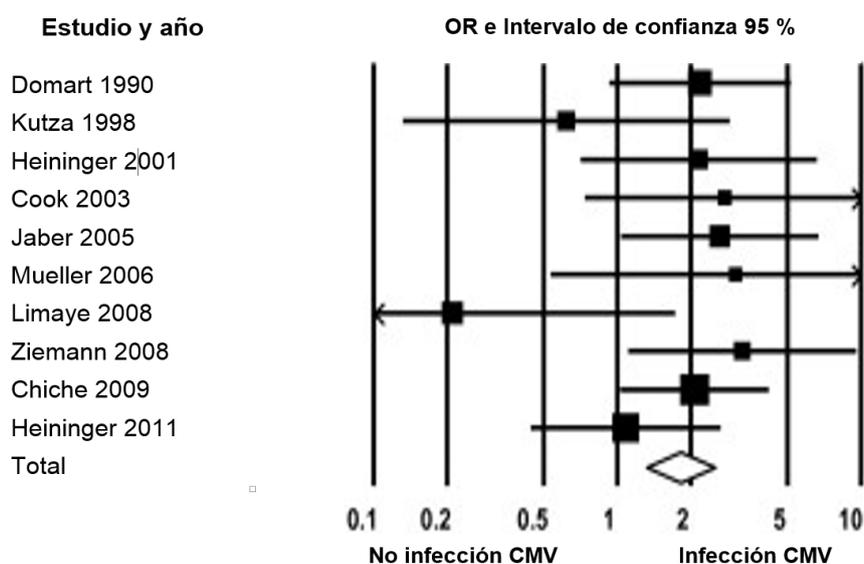
Existe discordancia en la literatura respecto a la influencia de la reactivación de CMV en el pronóstico de los pacientes críticos inmunocompetentes. Se ha encontrado disfunción orgánica hepática en un estudio y renal en otros dos, con diferentes porcentajes. Respecto a la estancia en UCI, en 6 estudios se ha encontrado mayor duración del ingreso en UCI en aquellos pacientes con replicación del CMV (22-48 días vs 33 – 69 días, $p < 0,05$ en cada estudio por separado) (149). También parecen precisar más días de ventilación mecánica aquellos pacientes con replicación viral (13-24 días vs 21-39

días) (2). Respecto a la mortalidad, Kalil en su metanálisis también encuentra relación con la mortalidad (OR 1,81; p=0,0003) (Tabla 5) (165). En cambio, Heininger no encontró diferencias significativas ni en mortalidad bruta ni ajustada a gravedad de la enfermedad de base, shock séptico o duración de la estancia en UCI (147). En tres trabajos posteriores se ha encontrado relación del CMV con la mortalidad (161,166,167).

Tabla 5. Metaanálisis de exitus y reactivación de CMV (Adaptado de Kalil et al. Crit Care. 2011) (165).

Estudio y año	Resultados individuales			Exitus/Total	
	OR	IC 95%	p	CMV +	CMV -
Domart 1990	2,18	0,93-5,13	0,0731	16 / 29	31 / 86
Kutza 1998	0,62	0,13-2,88	0,54	7 / 11	17 / 23
Heininger 2001	2,16	0,71-6,58	0,1744	11 / 20	13 / 36
Cook 2003	2,76	0,74-10,35	0,1321	5 / 10	25 / 94
Jaber 2005	2,64	1,04-6,669	0,0412	20 / 40	11 / 40
Mueller 2006	3,06	0,53-17,46	0,2091	5 / 8	6 / 17
Limaye 2008	0,21	0,03-1,72	0,1465	1 / 39	9 / 81
Ziemann 2008	3,26	1,11-,54	0,0312	10 / 35	7 / 64
Chiche 2009	2,08	1,04-4,17	0,0396	23 / 39	83 / 203
Heininger 2011	1,08	0,44-2,65	0,8608	13 / 35	18 / 51
Total	1,81	1,31-2,50	0,0003	111 / 266	220 / 695

CMV, Citomegalovirus; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza



Existen estudios experimentales que demuestran cómo la administración de ganciclovir en ratones inmunocompetentes con sepsis evito la reactivación de CMV y el desarrollo de fibrosis pulmonar. Dos pequeños estudios retrospectivos con subgrupos de pacientes que recibieron antivirales activos frente a CMV obtuvieron resultados no concluyentes (168,169) y no hay datos en la actualidad que avalen la utilidad y eficacia de tratar anticipadamente el CMV en el paciente inmunocompetente crítico (2). El uso de tratamiento antiviral profiláctico anti-CMV en todo paciente crítico en la actualidad no está indicado (no es práctico, plantea problemas tanto logísticos como de coste y la relación riesgo-beneficio no es clara) y aún se encuentra n en desarroolo varios ensayos clínicos (141). Un enfoque más prudente consistiría primero en identificar a los pacientes de alto riesgo de desarrollar infección por CMV y administrar profilaxis. Para poder clasificarlos en estos grupos de alto riesgo, se podrían emplear bien criterios clínicos como podría ser la sepsis, la fiebre persistente o la hemotransfusión, bien tratar sólo aquéllos donde haya viremia de CMV. Un tercer enfoque podría consistir en identificar a los pacientes que se encuentren mediante la evaluación de la respuesta celular frente a CMV en riesgo inmunológico de reactivación de CMV, por ejemplo, mediante la medición de la inmunidad celular específica, ya directamente mediante inmunofenotipo ya según los niveles IFN γ . En cualquier caso, son necesarios ensayos clínicos que nos permitan conocer tanto el impacto real de CMV en el pronóstico clínico como el hipotético beneficio de un tratamiento profiláctico.

Hipótesis de trabajo y objetivos del estudio

Hipótesis de trabajo

- La respuesta funcional de los linfocitos T CD8+ CMV-específicos se asocia con el desarrollo de replicación de CMV en pacientes críticos seropositivos frente a CMV.

Objetivo principal

- Estudiar si el nivel de producción de IFN γ , liberado por los linfocitos T CD8+ CMV-específicos, se asocia con el riesgo de replicación de CMV en el paciente crítico inmunocompetente.

Objetivos secundarios

- Determinar la incidencia de reactivación de CMV en el paciente crítico inmunocompetente.
- Estudiar los factores de riesgo clínicos relacionados con la reactivación de CMV en el paciente crítico inmunocompetente.
- Estudiar los factores pronósticos del paciente crítico inmunocompetente que presenta reactivación de CMV.

Material y método

Población de estudio y diseño

Para conocer los factores asociados a replicación y la relación con el IFN γ hemos realizado un estudio prospectivo de cohortes en el Hospital General Universitario de Ciudad Real (HGUCR) y el Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba (HURS) entre los meses de diciembre de 2012 y agosto de 2013.

El Hospital General Universitario de Ciudad Real es un hospital público de tercer nivel del Servicio de Salud de Castilla – La Mancha (SESCAM). Cuenta con hasta 600 camas y 24 camas de Cuidados Intensivos. El Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba es un centro público del Servicio Andaluz de Salud (SAS). Dispone de 1.300 camas en total, de las cuales 50 son de Cuidados Intensivos.

Criterios de inclusión:

- 1) Pacientes mayores de 18 años inmunocompetentes
- 2) Seropositividad IgG frente a CMV
- 3) Supervivencia estimada mayor de 3 días
- 4) Ausencia de inmunodeficiencia congénita o adquirida
- 5) No tratamiento corticosteroideo en el mes previo al ingreso.
- 6) Ausencia de hemotransfusión en la semana previa al ingreso.
- 7) Aceptación de participar en el proyecto, bien el mismo o sus familiares según la situación clínica del paciente.

Esquema de trabajo:

- 1) En las primeras 24 horas tras el ingreso en UCI:
 - a) Evaluación de criterios y consentimiento informado

- b) Extracción de muestras: serología para CMV, carga viral CMV y medición de la producción de IFN γ por linfocitos T CD8+ específico para CMV.
- 2) Dos veces a la semana: extracción de plasma para cuantificar la carga viral de CMV. Los pacientes que presentaron replicación viral de CMV al ingreso en UCI no se incluyeron en el estudio.
- 3) Recogida de datos en formularios anexos y codificación en base de datos.
- 4) El protocolo de investigación se aprobó por el Comité Ético de cada centro. El estudio se desarrolló siguiendo la Declaración de Helsinki y sus modificaciones posteriores. Todos los pacientes (o sus familiares) prestaron su consentimiento informado previo a la inclusión en el estudio.

Variables recogidas y definiciones:

- 1) Demográficas: edad, sexo, procedencia del ingreso.
- 2) Antecedentes personales: Hipertensión arterial, diabetes mellitus, insuficiencia cardiaca, cardiopatía isquémica, broncopatía crónica, enfermedad renal crónica.
- 3) Duración de ingreso en UCI y hospitalario.
- 4) Exitus.
- 5) Empleo de técnicas de soporte vital: Técnicas de reemplazo renal (hemodiafiltración continua, hemodiálisis), ventilación mecánica invasiva.
- 6) Complicaciones:
 - a) Fracaso renal agudo: definido como creatinina mayor de 1,5 mg/dl en pacientes con función renal normal o aumento de más del 50% en pacientes con enfermedad renal crónica o establecimiento de oliguria o anuria.
 - b) Hepatitis: aumento de transaminasas en más del 50% del valor normal o actividad de protrombina menor del 60%.
 - c) Bacteriemia: presencia cierta de microorganismos en la sangre del paciente, siguiendo los criterios de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y

Microbiología Clínica (SEIMC). Se consideró bacteriemia clínicamente significativa la presencia en un paciente de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y el aislamiento de un microorganismo en un hemocultivo (en 2 hemocultivos con el mismo biotipo para *Staphylococcus coagulasa negativos*). (170).

- d) Fungemia: demostración de crecimiento de hongos en hemocultivos.
 - e) Neumonía asociada a la ventilación mecánica: presencia de una condensación en la radiografía simple de tórax junto con evidencia de infección local (secreciones purulentas por el tubo endotraqueal), y sistémica (fiebre y/o leucocitosis) en paciente intubado y conectado a respirador.
 - f) Traqueobronquitis asociada a la ventilación mecánica: evidencia de infección local (secreciones purulentas por el tubo endotraqueal), y sistémica (fiebre y/o leucocitosis) sin alteración en la radiografía de tórax en paciente intubado y conectado a respirador.
- 7) Replicación de CMV: Detección mediante PCR de ADN de CMV en sangre, medido en UI/mL.
 - 8) Duración de replicación de CMV: días desde la detección de la primera carga viral hasta que esta se negativiza o es alta de UCI.
 - 9) Tiempo hasta replicación: Tiempo (en días) desde el ingreso en UCI hasta la primera detección de PCR positiva para CMV.
 - 10) QF-CMV-Reactivo: IFN γ CMV \geq 0,20 UI/mL.

Determinación de anticuerpos IgG anti-CMV y de carga viral:

- 1) La serología para CMV se realizó en todos los pacientes en el HGUCR. En los pacientes procedentes del HURS se realizó una primera serología en dicho centro, siendo repetida con posterioridad en el HGUCR para evitar discrepancias. Se determinó mediante un kit comercial de inmunensayo de quimioluminiscencia

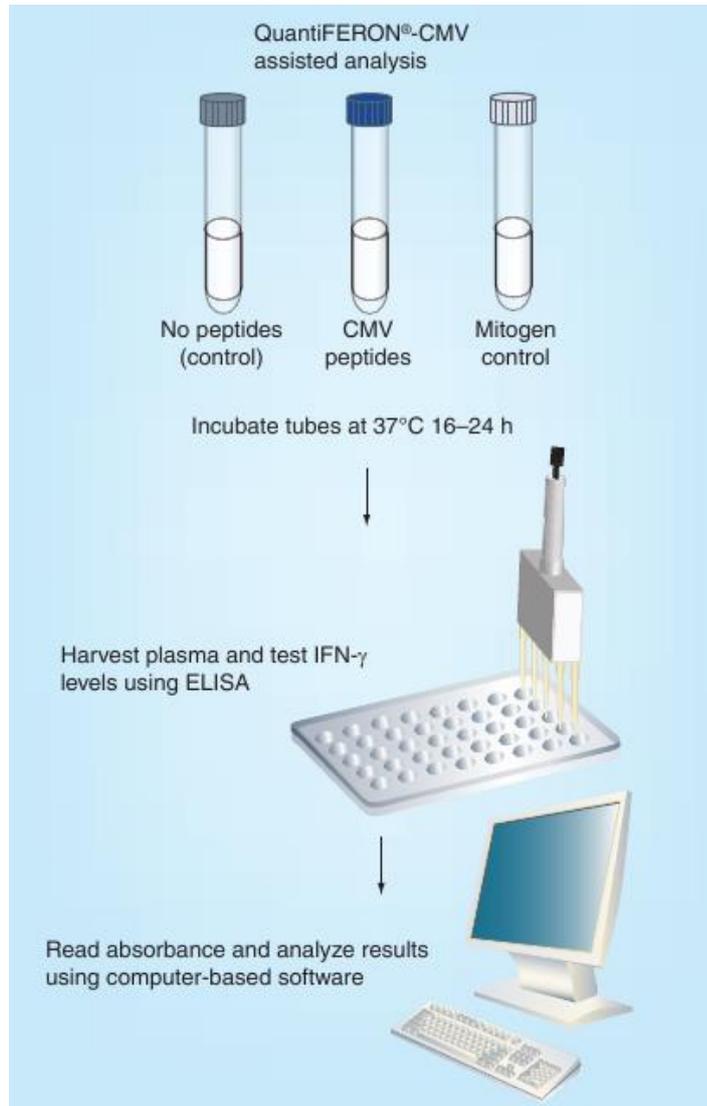
- (Architect CMV IgG6C15, Abbott, Sligo, Irlanda) según las recomendaciones del fabricante (171).
- 2) La carga viral en plasma se realizó en el HUGCR mediante PCR en tiempo real empleando el kit Abbott RealTime CMV® (Abbott Molecular, Illinois, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante (172). La extracción del ADN se realizó con 0,5 mL de plasma empleando el kit de preparación de ADN Abbott mSample en un equipo m2000sp (Abbott Molecular, Illinois, USA) y ha continuación eluido en un volumen de 70 µL. La amplificación y detección en tiempo real del ADN de CMV se realizó en un equipo m2000rt. El resultado se estandarizó a unidades internacionales por mililitro (UI/mL) siguiendo el Standard Internacional para Técnicas de Amplificación de Ácidos Nucleicos de HCMV de la Organización Mundial de la Salud (NIBSC 09/162). Su umbral de detección es de 31,2 UI/mL (equivalente a 20 copias/mL) (172,173).
- 3) Los médicos responsables del paciente desconocían los valores virológicos e inmunológicos, los cuales se guardaron en una base de datos interna diseñada para el estudio. Ningún paciente recibió tratamiento activo frente a CMV durante el estudio.

Test QuantiFERON-CMV

El test de QuantiFERON-CMV® (Qiagen, Melbourne, Australia) mide la producción de IFN γ por los linfocitos T CD8+ CMV-específicos al ser estimulados, in vitro, por 22 péptidos de CMV (Figura 5) (174). Las personas infectadas por el CMV suelen tener en la sangre linfocitos CD8+ que reconocen estos antígenos. El ensayo QF-CMV se realiza en 2 etapas. En la primera se recoge sangre completa en cada uno de los tres tubos del kit de QF-CMV: tubo de control negativo, tubo de antígenos de CMV y tubo de mitógeno (control positivo). Los tubos se incuban a 37 °C dentro de las primeras 16 horas

siguientes a la recogida. Tras un período de incubación de 16 a 24 horas, se centrifugan los tubos y se mide la cantidad de IFN γ (UI/mL) en el sobrenadante.

Figura 5. Test QuantiFERON-CMV (Tomado de Giulieri et al. Expert Rev Mol Diagn 2011) (175)



Un resultado se considera Reactivo cuando el nivel de IFN γ , una vez sustraído el producido en el tubo del control negativo, es mayor o igual a 0,2 UI/mL, con independencia de cual sea la producción de IFN γ en el tubo del mitógeno. Un resultado se considera No-reactivo cuando el nivel de IFN γ , una vez sustraído el producido en el tubo del control negativo, es menor a 0,2 UI/mL y el del tubo de mitógeno es menor de

0,5 UI/mL. Una respuesta baja al mitógeno (IFN γ <0,5 UI/mL) junto con una respuesta baja a los péptidos de CMV indica un resultado Indeterminado. Este resultado puede darse en situaciones de linfocitos insuficientes, manipulación incorrecta de las muestras o incapacidad de los linfocitos del paciente para producir IFN γ , como en el caso de los pacientes que se han sometido recientemente a un trasplante. (175). A efectos del análisis, los resultados indeterminados se consideraron como no reactivos. La recogida de muestras, incubación y congelación se realizó en cada centro, mientras que la lectura e interpretación de los resultados mediante inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) se efectuó en el HURS.

Análisis de datos

Las características basales de los pacientes en función de reactivación de CMV o de exitus se compararon mediante la prueba Chi cuadrado (o test exacto de Fisher) si eran cualitativas y las cuantitativas con el test de U-Mann-Whitney. El estudio de los factores asociados a replicación de CMV se han realizado mediante regresión de Cox. Para ello, se incluyeron variables clínicamente relevantes tras completar el QF-CMV a pesar de no haber sido significativo en el análisis univariante. El modelo multivariado se limitó a cuatro factores presentes al ingreso en UCI debido al limitad número de eventos o de pacientes en cada caso. Así se incluyeron: la edad (años), SAPS II al ingreso (puntuación), diabetes mellitus (sí/no) y QF-CMV (reactivo/no reactivo). El modelo incluyó pruebas de colinealidad, interacciones y modelo de riesgos proporcionales. Evaluamos el QF-CMV como prueba diagnóstica calculando su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (pacientes QF-CMV no reactivos que presentaron reactivación) y negativo (pacientes QF-CMV reactivos que no presentaron reactivación). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Para la realización el análisis estadístico se utilizó el paquete IBM SPSS en su versión 15 (IBM, Chicago, EEUU).

Financiación:

La financiación del proyecto ha sido financiada por el Plan Nacional de I+D+I 2008-2011 y el Instituto de Salud Carlos III (FIS PI11/01236), Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Red Española de Investigación en Enfermedades Infecciosas (REIPI RD 12/0015).

Resultados

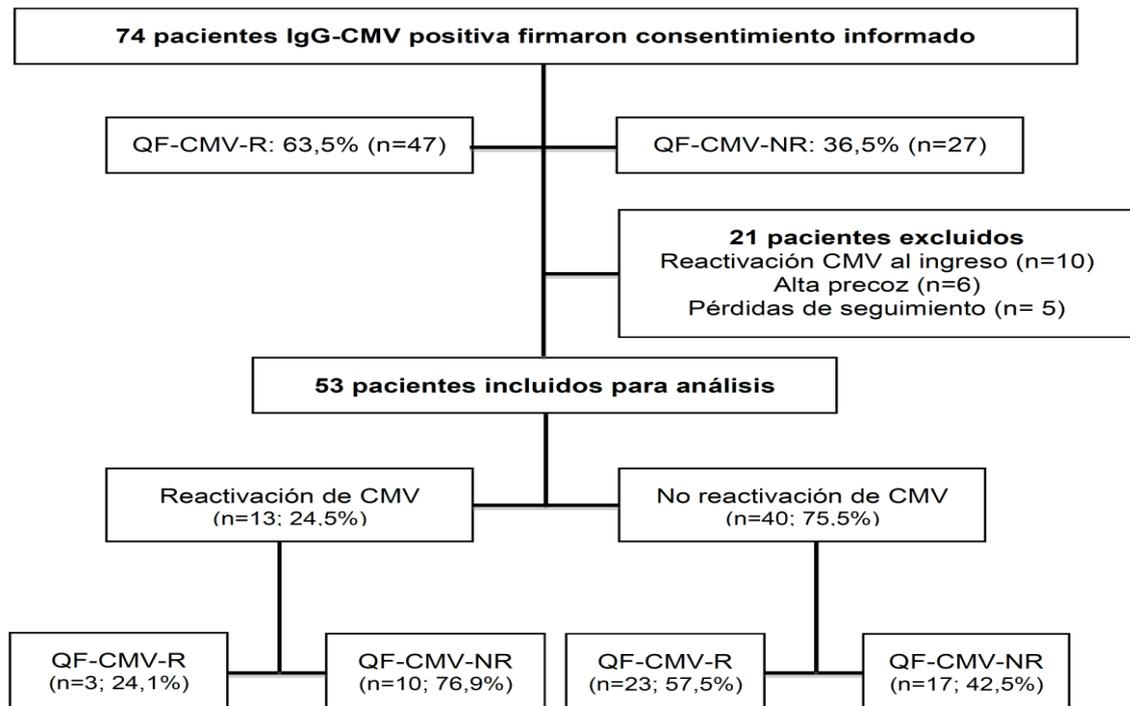
Selección de pacientes

Se evaluaron inicialmente 98 pacientes para ser incluidos en el estudio. Veinticuatro de ellos fueron descartados debido a las siguientes causas:

1. Alta probabilidad de exitus o alta en los primeros cuatro días (n=13)
2. Serología negativa a CMV (n=4)
3. Transfusión de hemoderivados (n=4)
4. Inmunosupresión (n=3)

Un total de 74 pacientes firmaron el consentimiento informado. De estos 74 pacientes, se excluyeron 21 debido a que ya existía replicación de CMV al ingreso en UCI (n=10), alta precoz inesperada (n=6) y pérdida de seguimiento (n=5). Finalmente, 53 pacientes se incluyeron en el estudio (Figura 6).

Figura 6. Selección de Pacientes.



Abreviaturas: CMV: Citomegalovirus; IgG: Inmunoglobulina G; QF-CMV-R: QF-CMV-Reactivo; QF-CMV-NR: QF-CMV-No-reactivo.

Características de los pacientes

Se estudiaron 53 pacientes cuyas características se resume en la Tabla 6. La mediana de edad fue de 59,3 años (rango intercuartílico 46-75). El motivo de ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos fue quirúrgico en el 66% (n=35), siendo más frecuentemente neuroquirúrgico (23 pacientes). El 88,7 % (n=47) de los pacientes precisaron ventilación mecánica (VM), con una mediana de duración de 15 días (rango intercuartílico 10-27,5 días). La mediana de APACHE-II fue de 16 (rango intercuartílico 6-26). Veintiocho pacientes (52,8%) sufrieron shock séptico, 25 (47,2%) fracaso renal agudo y 21 (39,6%) neumonía asociada a la ventilación mecánica. La mediana de estancia en UCI fue de 23,1 (rango intercuartílico 13-36) días y la mediana de tiempo de hospitalización global fue de 45,3 días (rango intercuartílico 29-61 días). Once pacientes (20,7%) fallecieron.

Tabla 6. Características de los pacientes

Características de los pacientes	
Sexo: Varón ^b	40 (75,5%)
Edad (años) ^a	64 (20 – 83)
Diabetes mellitus ^b	10 (18,9%)
APACHE II ^a	16 (3 – 26)
SAPS 2 ^a	34 (13 – 68)
Tipo de ingreso	
Médico ^b	18 (34%)
Quirúrgico ^b	35 (66%)
Cirugía urgente ^b	34 (97,1%)
Tipo de Cirugía	
Neurocirugía ^b	23 (65,7%)
General ^b	5 (14,3%)
ORL y Maxilofacial ^b	2 (5,7%)
Traumatológica ^b	3 (8,6%)
Urológica ^b	1 (2,9%)
Vascular ^b	1 (2,9%)
Ventilación mecánica (VM) ^b	47 (88,7%)
Duración de VM (días) ^a	15 (2 – 90)
Hepatitis ^b	7 (13,2%)
Fracaso renal agudo ^b	25 (47,2%)
Técnicas de reemplazo renal ^b	3 (5,7%)
Bacteriemia ^b	25 (47,2%)
Candidemia ^b	7 (13,2%)
Neumonía asociada a la ventilación mecánica ^b	21 (40,4%)
Traqueobronquitis ^b	18 (35,3%)
Traqueostomía ^b	28 (54,9%)
Duración de ingreso (Días) ^a	37 (8 – 132)
Duración de Estancia en UCI (días) ^a	23 (5 – 90)
Exitus ^b	11 (20,8%)

^a Media (Rango) ^b Recuento (Porcentaje)

Resultados del test QuantiFERON - CMV

La extracción del QF-CMV al ingreso del paciente en UCI, nos permitió disponer de los resultados de los 74 pacientes que inicialmente fueron incluidos. Así, 44 pacientes (63,5%) fueron QF-CMV-Reactivos.

De los 53 pacientes que completaron el estudio, el QF-CMV fue Reactivo en 26 (49,1%). De los 27 restantes, en 25 pacientes (47,2%) fue No reactivo y en 2 pacientes (3,7%) fue indeterminado, siendo incluidos dentro del grupo de No reactivo de cara al análisis estadístico.

El nivel medio de producción de IFN γ de los pacientes con QF-CMV-Reactivo fue de 2,02 UI/mL (rango intercuartílico 0,8-15,6 UI/mL).

De los 13 pacientes en los cuales se objetivó replicación de CMV, en 10 (76,9%) el QF-CMV fue no reactivo. El tiempo medio de aparición de replicación de CMV desde el ingreso en UCI fue de 38,5 días (rango 14-63 días) en el grupo QF-CMV-Reactivo frente a 14 días (rango 3-30 días) en aquellos con QF-CMV-No reactivo ($p=0,28$).

La sensibilidad y especificidad del QF-CMV fueron del 77% y del 57%, respectivamente. Su valor predictivo positivo fue del 37% (de los 27 que presentaron QF-CMV-No reactivo, 10 pacientes presentaron replicación de CMV en) y su valor predictivo negativo del 88% (de los 26 pacientes con QF-CMV-Reactivo, no se objetivó replicación viral en 23 de ellos).

Características de la reactivación de CMV

Se objetivó la reactivación de CMV en sangre periférica mediante PCR en 13 de los 53 pacientes, representando el 24,5 % (Tabla 6). En estos 13 pacientes, la mediana de aparición de la viremia fue de 14 días (rango intercuartílico 12-27 días). La incidencia acumulada de reactivación superior a 1.000 UI/mL fue del 23,1% (3/13 pacientes), ocurriendo el día 10 de mediana (rango intercuartílico 7-20 días). La mediana de carga viral fue de 384 UI/mL (rango 32 – 6376 UI/mL). La carga viral más alta fue de 42.058 UI/mL. La mediana de duración de la viremia fue de 18 días (rango intercuartílico 8-33 días).

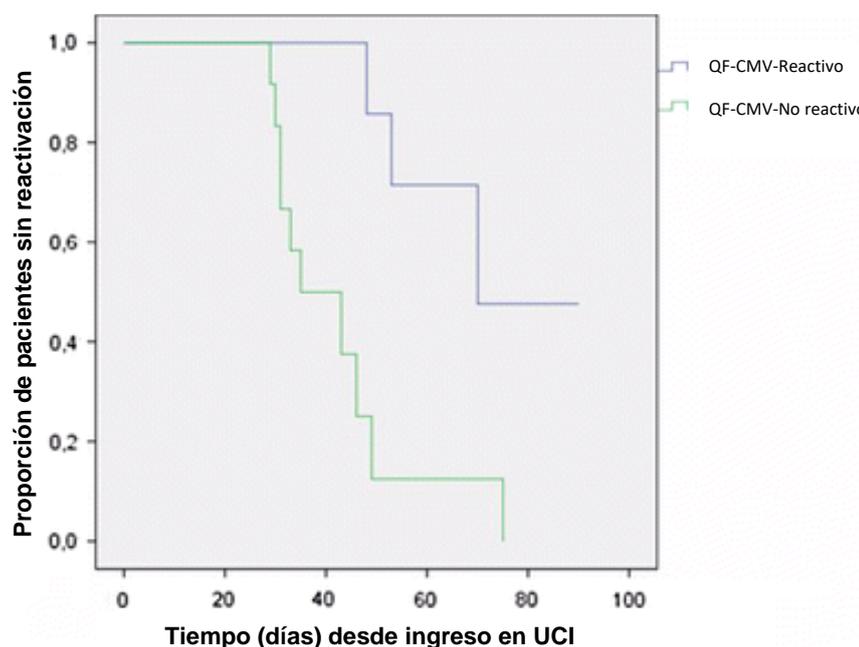
La frecuencia de reactivación fue tres veces mayor en los pacientes que presentaron el test de QF-CMV-No reactivo, alcanzando significación estadística (37% frente a 11,5%; $p=0,03$). La replicación apareció de mediana al día 20 (rango intercuartílico 14 – 63 días) en los pacientes con QF-CMV-Reactivo frente a 14 días (rango intercuartílico 14-63 días) en el grupo QF-CMV-No reactivo, sin alcanzar significación estadística ($p=0,28$).

La mediana de la carga viral máxima de CMV en el grupo de pacientes con QF-CMV-Reactivo fue de 3.521 UI/mL (rango intercuartílico 40-6.376 UI/mL) y en grupo de QF-CMV-No reactivo 377 UI/mL (rango intercuartílico 58-520 UI/mL), sin lograr significación estadística ($p=0,39$).

No se encontraron diferencias significativas en la duración de la viremia detectada en los paciente con QF-CMV-Reactivo (mediana 35 días, rango intercuartílico 12-57 días) comparado frente a los pacientes con QF-CMV-No reactivo (mediana 15 días, rango intercuartílico 10 - 24 días), ($p=0,63$).

Mediante curvas de Kaplan – Meier, representamos el porcentaje de pacientes a lo largo del tiempo sin reactivación de CMV en función de si el QF-CMV fue o no reactivo (Figura 7).

Figura 7. Proporción de pacientes sin reactivación de CMV en función del QuantIFERON-CMV



Análisis comparativo emplando curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia estimada libre de enfermedad por CMV en los pacientes con QF-CMV-Reactivo (morado) frente a los pacientes con QF-CMV-No reactivo (azul). Long rank test $p=0,04$

En nuestro estudio, se encontró una mayor reactivación de CMV en aquellos pacientes que presentaban diabetes mellitus (46,2% vs 10 %, $p = 0,009$), mayor duración de la VM (mediana de 33,42 vs 17,23 días; $p=0,007$), precisaron de traqueostomía ($p=0,002$), su ingreso fue más prolongado en UCI (92,3% vs 42,1%; $p=0,001$) o fueron exitus (20,8% vs 5%, $p=0,017$). En cambio, ha sido menor en aquellos pacientes que presentaron QF-CMV-Reactivo (replicación de 23,1% vs 57,5%, $p=0,031$). El resto de características de los pacientes en función de la reactivación se recogen en la Tabla 7.

Tabla 7. Características de los pacientes en función de la reactivación de CMV

Variable	Total n = 53 (100%)	Replicación de CMV		p
		Sí n=13 (24,5%)	No n=40 (75,5%)	
Sexo: Varón #	40 (75,5%)	8 (61,5%)	32 (80%)	0,2 ^a
Edad (años) *	59,28 (46-75)	58,54 (43-76)	59,53 (46-64)	0,8
Ingreso médico #	18 (34%)	6 (46,2%)	12 (30%)	0,3 ^a
APACHE II *	16 (6-26)	16,54 (8-26)	15,80 (6-24)	0,6
SAPS 2 *	34,89 (13-68)	37,23 (26,5-46)	34,13 (28-37,5)	0,4
Diabetes mellitus #	10 (18,9%)	6 (46,2%)	4 (10%)	0,009^b
Complicaciones				
Ventilación mecánica #	47 (88,7%)	13 (100%)	34 (85%)	0,3 ^a
Duración de Ventilación mecánica *	21,63 (10-27)	33,46 (21-45)	17,23 (6-22)	0,007
Fracaso renal agudo #	25 (47,2%)	8 (61,5%)	17 (42,5%)	0,2 ^a
Bacteriemia #	25 (47,2%)	7 (53,8%)	18 (45%)	0,5 ^a
Fungemia #	7 (13,2%)	2 (15,4%)	5 (12,5%)	1,0 ^b
Neumonía asociada a la ventilación mecánica #	21 (40,4%)	8 (61,5%)	13 (32,5%)	0,1 ^a
Traqueobronquitis #	18 (35,3%)	6 (50%)	12 (30,8%)	0,3 ^a
Traqueostomía #	28 (54,9%)	12 (92,3%)	16 (42,1%)	0,002^b
QF-CMV-Reactivo #	26 (49,1%)	3 (23,1%)	23 (57,5%)	0,03^b
Duración de ingreso *	45,33 (29-61)	56,17 (31-76)	42 (23-54)	0,9
Duración de estancia en UCI *	28,15 (13,5-36)	44,08 (31-51)	22,98 (12-26,5)	0,01
Exitus #	11 (20,7%)	6 (46,2%)	5 (12,5%)	0,01^b

#Expresado como n (porcentaje). Estadístico de contraste: ^aChi cuadrado (o ^bexacto de Fisher).

*Expresado como mediana (rango intercuartílico). Estadístico de contraste: U-Mann-Whitney

Factores asociados con la reactivación de CMV

A continuación, se analizaron los factores asociados a reactivación de CMV en el paciente crítico inmunocompetente mediante regresión de Cox. En dicho análisis se incluyeron las siguientes variables: edad, SAPS II, diabetes mellitus y QF-CMV-Reactivo. En la regresión de Cox, el test de QF-CMV fue la única variable con asociación estadísticamente significativa para reactivación de CMV (HR 0,09; IC 95% 0,02-0,44; p=0,003). En este caso, la presencia de respuesta celular T CD8+ a CMV (por ejemplo, siendo el QF-CMV reactivo) al ingreso en UCI se asoció a protección frente a

reactivación por CMV. El resto de factores incluidos en el análisis (diabetes mellitus, SAPS II y la edad) no se asociaron a reactivación de CMV (Tabla 8).

Tabla 8. Factores asociados a reactivación de CMV por regresión de Cox.

Variable	OR	p	IC 95%
Diabetes mellitus	4,73	0,150	0,57-39,21
SAPS II	1,02	0,470	0,96-1,07
Edad	0,97	0,400	0,92-1,03
QF-CMV-Reactivo	0,09	0,003	0,02-0,44

Mortalidad y CMV

Durante el período de estudio fallecieron 11 de los 53 pacientes, representando el 20,8%. Esta limitada mortalidad no nos permitió realizar un análisis multivariante. En el análisis bivariante los factores de riesgo asociados a mortalidad fueron: el tipo de ingreso, siendo mayor si el motivo de admisión en UCI era por patología médica en lugar de quirúrgica (63,6% vs 36,7%, $p=0,031$), la duración de la ventilación mecánica (35 vs 14 días; $p=0,022$), el tiempo de ingreso en UCI (35 vs 20,5 días; $p=0,026$), duración de hospitalización global (62 vs 32,5 días; $p=0,014$) y la reactivación de CMV (54,5% vs 16,7%; $p=0,015$). El resto de características de los pacientes referidas a mortalidad se encuentran recogidas en la Tabla 9.

Tabla 9. Características de los pacientes en función de la mortalidad

Variable	Total n = 53 (100%)	Exitus		p
		Sí n=11 (20,8%)	No n=42 (79,2%)	
Sexo: Varón #	40 (75,5%)	7 (63,6%)	33 (78,6%)	0,4
Edad (años) *	59,28 (46-75)	67 (51-76)	63 (44,5-70,5)	0,4
Ingreso médico #	18 (34 %)	7 (63,6%)	11 (26,2%)	0,03
Cirugía urgente #	34 (64,2%)	3 (27,3%)	31 (92,2%)	0,1
APACHE II *	16 (3-26)	18 (14-23)	16 (11-19)	0,1
SAPS 2 *	34,89 (13-68)	34 (27-38)	34 (28-38,3)	0,1
Diabetes mellitus #	10 (18,9%)	6 (54,5%)	4 (9,5%)	0,003
Complicaciones				
Ventilación mecánica #	47 (88,7%)	10 (90,9%)	37 (88,1%)	1,0
Días de ventilación mecánica *	21,6 (10-27,5)	35 (12-57)	14 (7-24)	0,02
Fracaso renal agudo #	25 (47,2%)	8 (72,7%)	17 (40,5%)	0,06
Bacteriemia #	25 (47,2%)	6 (54,5%)	19 (45,2%)	0,6
Candidemia #	7 (13,2%)	2 (18,2%)	5 (11,9%)	0,6
Neumonía asociada a ventilación mecánica #	21 (40,4%)	6 (54,5%)	15 (36%)	0,3
Traqueobronquitis #	18 (35,3%)	5 (50%)	13 (31,7%)	0,3
Traqueostomía #	28 (54,9%)	9 (81,8%)	19 (47,5)	0,08
Replicación cuantificable #	13 (24,5%)	6 (54,5%)	7 (16,7%)	0,015
Carga viral inicial (UI/mL) *	52 (40,5-112,5)	56 (38-370,3)	48 (41-110)	0,4
Carga viral máxima (UI/mL) *	384 (56,5-1333,5)	412,5 (47-3023,5)	370 (61-757)	0,5
QF-CMV-Reactivo #	26 (49,1%)	4 (36,4%)	22 (52,4%)	0,3
Duración de ingreso *	45,3 (29-61)	62 (35-82)	36,5 (24,5-52,8)	0,01
Duración de estancia en UCI *	28,1 (13,5-36)	35 (23-75)	20,5 (12,8-31)	0,026

#Expresado como n y porcentaje. Estadístico de contraste: Chi cuadrado (o exacto de Fisher).

*Expresado como mediana y rango intercuartílico. Estadístico de contraste: U-Mann-Whitney

Discusión

Los resultados de este estudio observacional prospectivo muestran cómo la determinación de la producción de IFN γ por los linfocitos T CD8+ CMV específicos en el momento del ingreso en UCI puede ser un buen marcador para la identificación del riesgo de reactivación del CMV en el paciente crítico no inmunosuprimido.

En los últimos años se ha evidenciado que hasta el 40% de los pacientes críticos seropositivos frente a CMV presentan reactivación viral (2,146,147). En algunos estudios esta replicación se ha asociado a un aumento del riesgo de complicaciones como mayor duración de necesidad de ventilación mecánica, infecciones nosocomiales, estancia hospitalaria prolongada e incluso mayor mortalidad (2,154,160,161).

Sin embargo, hasta la actualidad, el estudio de factores clínicos asociados a mayor riesgo de replicación viral no ha mostrado resultados concluyentes. Ello ha dificultado la identificación de grupos de pacientes de riesgo en los cuales podría estudiarse el beneficio de la administración de profilaxis antiviral.

Por todo ello y debido a la heterogenicidad en los factores de riesgo clínicos descritos para la reactivación del CMV en estos pacientes, hemos planteado una determinación analítica estandarizada que nos permita definir la situación inmunológica frente a CMV. De esta forma, hemos analizado la producción de IFN γ por los linfocitos T CD8+ CMV específicos para conocer el valor de esta determinación en la identificación de pacientes críticos no inmunosuprimidos con mayor riesgo de replicación viral.

Para evaluar dicha producción de IFN γ hemos empleado el test de QuantiFERON-CMV. Su utilidad para identificar el riesgo de replicación de CMV ya ha sido demostrada en el trasplante tanto de progenitores hematopoyéticos como de órgano sólido (3,176,177). Cantisán et al publicaron que los pacientes CMV-seropositivo trasplantados de órgano

sólido que tenían un QF-CMV-No reactivo antes del trasplante mostraban un mayor riesgo de replicación de CMV en el periodo postrasplante (3).

La principal utilidad del QF-CMV en estos pacientes es su alto valor predictivo negativo de reactivación de CMV. Por tanto, aquellos pacientes donde el resultado del test sea QF-CMV-Reactivo se encuentran menor riesgo de replicación viral y por tanto no estaría indicada la administración de profilaxis antiviral frente a la reactivación del CMV.

En nuestro estudio, únicamente 10 de los 27 (37%) pacientes con QF-CMV-No reactivo presentaron reactivación de CMV. Debido a este bajo valor predictivo positivo consideramos que la determinación de QF-CMV no resultaría una herramienta adecuada para identificar a los pacientes con mayor riesgo de reactivación de CMV, ya que en ese caso el 63% de los pacientes con QF-CMV-No reactivo estarían recibiendo profilaxis de manera innecesaria. En cambio, la no reactividad del QF-CMV nos permitiría diseñar una estrategia de detección precoz de la reactivación de CMV y de tratamiento dirigido mediante la monitorización de la viremia (mediante PCR o antigenemia). Esta estrategia nos permitiría disminuir la morbilidad y evitaría la posible aparición de efectos adversos de medicamentos antivirales en el resto de pacientes.

En la actualidad, los estudios realizados sobre la funcionalidad de los linfocitos T CMV específicos en el enfermo crítico son escasos y sus resultados contradictorios. Dos estudios previos no informaron de ninguna diferencia en cuanto a la funcionalidad de las células T específicas por CMV en pacientes con y sin reactivación CMV (155,178). Posteriormente, los resultados de un estudio de casos y controles, que incluyó a 31 pacientes sometidos a ventilación mecánica, demostró que la disminución de los niveles de IFN γ producido por linfocitos T CD4+ y CD8+ CMV específicos se asoció con la presencia de la infección por CMV activa o el aumento del riesgo de reactivación viral posterior, aunque la ausencia de análisis multivariante hace que no podamos descartar la posible existencia de factores de confusión (160).

Los trabajos realizados hasta ahora muestran que, aunque puede ser variable, la incidencia media de reactivación del CMV en el paciente crítico inmunocompetente es del 25% (2). Esta variabilidad en la incidencia de reactivación puede deberse a diferencias en el tipo de población, de la técnica empleada y de la frecuencia de monitorización de la replicación viral. En nuestra serie, se encontró una incidencia de reactivación CMV de 24,5%, que es similar a la incidencia observada en la literatura (157,161,179). Del mismo modo, la mediana de tiempo de la aparición de la viremia en nuestro estudio fue de 14 días, que es análoga a la encontrada en estudios previos que monitorizaron la replicación viral mediante PCR en plasma (157). En nuestros resultados no se encontraron diferencias en el momento de inicio, duración y magnitud de la viremia a pesar de que la reactivación era más frecuente en pacientes de QF-CMV-No reactivo. Un estudio con una muestra mayor probablemente revelaría las diferencias en estos aspectos.

De entre los factores clínicos observados, la ventilación mecánica prolongada se asoció con un mayor riesgo de reactivación del CMV, lo cual es consistente con los resultados descritos anteriormente (147,157). La razón para seleccionar un punto de corte de veinte días para definir el tiempo de ventilación mecánica como prolongada se basó en los resultados de estudios previos en la mediana de la duración de la ventilación mecánica en pacientes críticamente enfermos con la reactivación del CMV (147,179). Debido a las características de nuestro estudio, no fue posible establecer una relación causal entre la duración de la insuficiencia respiratoria y reactivación del CMV. Es posible que estos resultados sean debidos a que los pacientes que requieren ventilación invasiva prolongada sean más propensos a mostrar reactivación viral, como se ha observado en varios estudios que monitorizaban la replicación viral mediante la monitorización de la presencia de carga viral o de antígeno en el broncoaspirado (156,158). En nuestros pacientes no hemos vigilado la reactivación del CMV específicamente en las vías

respiratorias mediante muestras de broncoaspirado ni hemos evaluamos la incidencia de síndrome de distrés respiratorio agudo. Sin embargo, en modelos animales y de paciente crítico, una mayor duración de un intercambio gaseoso pulmonar disminuido ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$) se ha objetivado en pacientes con reactivación del CMV con respecto aquellos en que no se reactivó (147,156); por lo tanto, no se puede descartar que estos trastornos respiratorios estén causados por CMV y no sea un mero espectador como se ha pensado clásicamente.

En consonancia con los datos previamente publicados (141,165), no se encontró asociación en este estudio entre reactivación de CMV y sistemas de puntuación de gravedad al ingreso en UCI (SAPS II y APACHE II). Esto probablemente se deba a que estos sistemas de puntuación se realizan al momento del ingreso en UCI, mientras que la reactivación del CMV ocurre no en el momento de admisión sino mientras el paciente se encuentra bajo en terapia intensiva y, por tanto, no reflejan adecuadamente la gravedad del paciente en el momento de inicio de la replicación.

La reactivación del CMV ha sido encontrada frecuentemente en pacientes críticos no inmunosuprimidos y parece estar asociada a un mayor daño orgánico. Lamentablemente, aún no se ha podido aclarar si este hecho tiene repercusión en el pronóstico final en pacientes inmunocompetentes ya que, en la actualidad, existen datos contradictorios (147,154,157), aunque globalmente parece apuntar a una mayor morbimortalidad (141,161,166,167). En nuestro trabajo, la tasa de mortalidad bruta ha sido superior en aquellos pacientes que presentaron replicación de CMV. Otras variables que se han relacionado con mayor mortalidad han sido: que el motivo de ingreso fuese médico, la presencia de diabetes mellitus, la duración de la ventilación mecánica y el tiempo de ingreso. Sin embargo, dado nuestro pequeño tamaño muestral y escaso número de exitus, no hemos podido eliminar los posibles factores de confusión al no poder realizar un análisis multivariante.

A pesar de ello, estos resultados son similares a los descritos previamente en pacientes críticos con sepsis grave, donde se observaron diferencias en la mortalidad en pacientes con y sin reactivación CMV (141,154,157). Sin embargo, nuestros resultados contrastan con los reportados por Limaye et al. (157), quien sí encontró asociación entre la reactivación CMV y la combinación de mayor duración de ingreso y mortalidad. Esta diferencia podría ser debida al hecho de que los pacientes en nuestro estudio presentaron una menor incidencia de reactivación de CMV y una mediana de carga viral inferior con respecto a los estudiados por Limaye et al. Por otro lado, en nuestro trabajo, la mitad de los pacientes presentaron shock séptico en la admisión; por lo tanto, el manejo adecuado del shock séptico probablemente tenga prioridad sobre la influencia de la reactivación del CMV en el pronóstico de estos pacientes. A pesar de estos resultados, un ensayo clínico controlado con placebo de profilaxis antiviral tendría que llevarse a cabo con el fin de determinar la influencia real de la reactivación del CMV en la mortalidad en esta población.

Nuestro estudio, tiene algunas limitaciones. La más relevante es el pequeño tamaño de la muestra estudiada, y que, por lo tanto no permite extraer conclusiones definitivas con respecto a la existencia de diferencias en la cinética de reactivación viral basada en los resultados de la prueba de QF-CMV o el impacto de CMV en el pronóstico de estos pacientes.

A pesar de estas limitaciones, nuestro estudio tiene algunas fortalezas como su diseño prospectivo, el empleo de un método robusto basado en PCR para detectar la reactivación de CMV, la evaluación de la función inmune mediante un método estandarizado, y la inclusión de pacientes representativos de las patologías más prevalentes en las UCI.

Conclusiones

1. La reactivación de CMV tiene una frecuencia considerable en nuestros pacientes críticos inmunocompetentes.
2. La reactivación de CMV es más frecuente en los pacientes que presentan diabetes mellitus, mayor duración de la ventilación mecánica o tienen un ingreso en UCI más prolongado.
3. Sin embargo, en un análisis ajustado, el único factor independiente asociado al riesgo de reactivación de CMV en el paciente crítico ha sido el resultado del test del QF-CMV.
4. El QF-CMV presentó un alto valor predictivo negativo, indicando que puede ser de gran utilidad para identificar a los pacientes que están protegidos frente a la reactivación del virus.
5. De hecho, la frecuencia de reactivación de CMV fue tres veces menor en los pacientes con QF-CMV-Reactivo que en los QF-CMV-No reactivo, y, en caso de presentar replicación, ésta se presentaba más tardíamente.
6. No se encontró asociación entre el resultado del QF-CMV y la incidencia de mortalidad, aunque este resultado podría estar relacionado con el escaso número de eventos.

Bibliografía

1. Moore PS, Gao SJ, Dominguez G, Cesarman E, Lungu O, Knowles DM, et al. Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae. *J Virol.* 1996;70(1):549-58.
2. Osawa R, Singh N. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: a systematic review. *Crit Care Lond Engl.* 2009;13(3):R68.
3. Cantisán S, Lara R, Montejo M, Redel J, Rodríguez-Benot A, Gutiérrez-Aroca J, et al. Pretransplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8+ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2013;13(3):738-45.
4. Crough T, Khanna R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):76-98.
5. Gkrania-Klotsas E, Langenberg C, Sharp SJ, Luben R, Khaw K-T, Wareham NJ. Seropositivity and higher immunoglobulin g antibody levels against cytomegalovirus are associated with mortality in the population-based European prospective investigation of Cancer-Norfolk cohort. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2013;56(10):1421-7.
6. Gámez SS, Ruiz MP, Navarro Marí JM. Infección por citomegalovirus humano. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica.* 2014;32:15-22.
7. Fernando de Ory Manchón, Juan Carlos Sanz Moreno, Rosario Castañeda López, Rosa Ramírez Fernández, Pilar León Rega, Isabel Pachón del Am. Seroepidemiología frente a citomegalovirus en la Comunidad de Madrid. *Rev Esp Salud Pública.* 2001;75(1):55-62.
8. Sia IG, Patel R. New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(1):83-121, table of contents.
9. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 8th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier; 2015. 3904 p.

10. Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P, editores. Principles and Practice of Clinical Virology [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2009 [citado 28 de junio de 2015]. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470741405>
11. Bataille S, Moal V, Gaudart J, Indreies M, Purgus R, Dussol B, et al. Cytomegalovirus risk factors in renal transplantation with modern immunosuppression. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* 2010;12(6):480-8.
12. Slobedman B, Mocarski ES. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J Virol.* 1999;73(6):4806-12.
13. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 7):1763-79.
14. Söderberg C, Larsson S, Bergstedt-Lindqvist S, Möller E. Definition of a subset of human peripheral blood mononuclear cells that are permissive to human cytomegalovirus infection. *J Virol.* 1993;67(6):3166-75.
15. Taylor-Wiedeman J, Sissons JG, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol.* 1991;72 (Pt 9):2059-64.
16. Schrier RD, Nelson JA, Oldstone MB. Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science.* 1985;230(4729):1048-51.
17. Mendelson M, Monard S, Sissons P, Sinclair J. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J Gen Virol.* 1996;77 (Pt 12):3099-102.
18. Sénéchal B, Boruchov AM, Reagan JL, Hart DNJ, Young JW. Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood.* 2004;103(11):4207-15.
19. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human

- cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol.* 1995;76 (Pt 4):741-50.
20. Grefte A, van der Giessen M, van Son W, The TH. Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis.* 1993;167(2):270-7.
 21. Cheung AKL, Abendroth A, Cunningham AL, Slobedman B. Viral gene expression during the establishment of human cytomegalovirus latent infection in myeloid progenitor cells. *Blood.* 2006;108(12):3691-9.
 22. Kutza AS, Muhl E, Hackstein H, Kirchner H, Bein G. High incidence of active cytomegalovirus infection among septic patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1998;26(5):1076-82.
 23. Mutimer DJ, Shaw J, O'Donnell K, Elias E. Enhanced (cytomegalovirus) viral replication after transplantation for fulminant hepatic failure. *Liver Transplant Surg Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc.* 1997;3(5):506-12.
 24. Prösch S, Wendt CE, Reinke P, Priemer C, Oppert M, Krüger DH, et al. A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology.* 2000;272(2):357-65.
 25. Fietze E, Prösch S, Reinke P, Stein J, Döcke WD, Staffa G, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation.* 1994;58(6):675-80.
 26. Prösch S, Staak K, Stein J, Liebenthal C, Stamminger T, Volk HD, et al. Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNFalpha is mediated via induction of NF-kappaB. *Virology.* 1995;208(1):197-206.
 27. Stein J, Volk HD, Liebenthal C, Krüger DH, Prösch S. Tumour necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells. *J Gen Virol.* 1993;74 (Pt 11):2333-8.

28. Kline JN, Hunninghake GM, He B, Monick MM, Hunninghake GW. Synergistic activation of the human cytomegalovirus major immediate early promoter by prostaglandin E2 and cytokines. *Exp Lung Res.* 1998;24(1):3-14.
29. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(12):725-38.
30. Sissons JGP, Carmichael AJ. Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. *J Infect.* 2002;44(2):78-83.
31. Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2006;35(2):226-31.
32. Ross SA, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2005;16(1):44-9.
33. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol.* 2007;17(4):253-76.
34. Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, et al. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA.* 1986;256(14):1904-8.
35. Pass RF, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Stagno S. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2006;35(2):216-20.
36. Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Henderson RE, Moore EG, Walton PD, et al. Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N Engl J Med.* 1982;306(16):945-9.
37. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med.* 1992;326(10):663-7.
38. Malm G, Engman M-L. Congenital cytomegalovirus infections. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2007;12(3):154-9.

39. Steininger C, Puchhammer-Stöckl E, Popow-Kraupp T. Cytomegalovirus disease in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2006;37(1):1-9.
40. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med.* 1998;338(13):853-60.
41. Salmon-Céron D, Mazon MC, Chaput S, Boukli N, Senechal B, Houhou N, et al. Plasma cytomegalovirus DNA, pp65 antigenaemia and a low CD4 cell count remain risk factors for cytomegalovirus disease in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS Lond Engl.* 2000;14(8):1041-9.
42. Sabin CA, Devereux HL, Clewley G, Emery VC, Phillips AN, Loveday C, et al. Cytomegalovirus seropositivity and human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in individuals with hemophilia. *J Infect Dis.* 2000;181(5):1800-3.
43. Webster A, Lee CA, Cook DG, Grundy JE, Emery VC, Kernoff PB, et al. Cytomegalovirus infection and progression towards AIDS in haemophiliacs with human immunodeficiency virus infection. *Lancet.* 1989;2(8654):63-6.
44. Griffiths PD. CMV as a cofactor enhancing progression of AIDS. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2006;35(4):489-92.
45. Yust I, Fox Z, Burke M, Johnson A, Turner D, Mocroft A, et al. Retinal and extraocular cytomegalovirus end-organ disease in HIV-infected patients in Europe: a EuroSIDA study, 1994-2001. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2004;23(7):550-9.
46. Gallant JE, Moore RD, Richman DD, Keruly J, Chaisson RE. Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The Zidovudine Epidemiology Study Group. *J Infect Dis.* 1992;166(6):1223-7.
47. Rubin RH. The pathogenesis and clinical management of cytomegalovirus infection in the organ transplant recipient: the end of the «silo hypothesis». *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20(4):399-407.

48. Limaye AP, Raghu G, Koelle DM, Ferrenberg J, Huang M-L, Boeckh M. High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy. *J Infect Dis.* 2002;185(1):20-7.
49. Dockrell DH, Prada J, Jones MF, Patel R, Badley AD, Harmsen WS, et al. Seroconversion to human herpesvirus 6 following liver transplantation is a marker of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis.* 1997;176(5):1135-40.
50. Best NG, Trull AK, Tan KK, Spiegelhalter DJ, Wreghitt TG, Wallwork J. Blood cyclosporine concentrations and cytomegalovirus infection following heart transplantation. *Transplantation.* 1995;60(7):689-94.
51. Portela D, Patel R, Larson-Keller JJ, Ilstrup DM, Wiesner RH, Steers JL, et al. OKT3 treatment for allograft rejection is a risk factor for cytomegalovirus disease in liver transplantation. *J Infect Dis.* 1995;171(4):1014-8.
52. Balthesen M, Messerle M, Reddehase MJ. Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. *J Virol.* 1993;67(9):5360-6.
53. Humar A, Michaels M, AST ID Working Group on Infectious Disease Monitoring. American Society of Transplantation recommendations for screening, monitoring and reporting of infectious complications in immunosuppression trials in recipients of organ transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2006;6(2):262-74.
54. Shi X-L, de Mare-Bredemeijer ELD, Tapirdamaz ö., Hansen BE, van Gent R, van Campenhout MJH, et al. CMV Primary Infection Is Associated With Donor-Specific T Cell Hyporesponsiveness and Fewer Late Acute Rejections After Liver Transplantation: CMV May Promote Liver Transplant Tolerance. *Am J Transplant.* 2015;15(9):2431-42.
55. Streblow DN, Dumortier J, Moses AV, Orloff SL, Nelson JA. Mechanisms of cytomegalovirus-accelerated vascular disease: induction of paracrine factors that promote angiogenesis and wound healing. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;325:397-415.
56. Evans PC, Soin A, Wreghitt TG, Taylor CJ, Wight DG, Alexander GJ. An association between cytomegalovirus infection and chronic rejection after liver transplantation. *Transplantation.* 2000;69(1):30-5.

57. Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, Sund S, Scott H, Degré M, et al. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2002;2(9):850-6.
58. Pouria S, State OI, Wong W, Hendry BM. CMV infection is associated with transplant renal artery stenosis. *QJM Mon J Assoc Physicians.* 1998;91(3):185-9.
59. Audard V, Matignon M, Hemery F, Snanoudj R, Desgranges P, Anglade MC, et al. Risk factors and long-term outcome of transplant renal artery stenosis in adult recipients after treatment by percutaneous transluminal angioplasty. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2006;6(1):95-9.
60. Koskinen PK, Nieminen MS, Krogerus LA, Lemström KB, Mattila SP, Häyry PJ, et al. Cytomegalovirus infection accelerates cardiac allograft vasculopathy: correlation between angiographic and endomyocardial biopsy findings in heart transplant patients. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant.* 1993;6(6):341-7.
61. McDonald K, Rector TS, Braulin EA, Kubo SH, Olivari MT. Association of coronary artery disease in cardiac transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Am J Cardiol.* 1989;64(5):359-62.
62. Kroshus TJ, Kshetry VR, Savik K, John R, Hertz MI, Bolman RM. Risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997;114(2):195-202.
63. Bando K, Paradis IL, Similo S, Konishi H, Komatsu K, Zullo TG, et al. Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation. An analysis of risk factors and management. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;110(1):4-13; discussion 13-14.
64. Arnold JC, Portmann BC, O'Grady JG, Naoumov NV, Alexander GJ, Williams R. Cytomegalovirus infection persists in the liver graft in the vanishing bile duct syndrome. *Hepatology Baltim Md.* 1992;16(2):285-92.
65. Hindupur S, Yeung M, Shroff P, Fritz J, Kirmani N. Vanishing bile duct syndrome in a patient with advanced AIDS. *HIV Med.* 2007;8(1):70-2.

66. Lautenschlager I, Höckerstedt K, Jalanko H, Loginov R, Salmela K, Taskinen E, et al. Persistent cytomegalovirus in liver allografts with chronic rejection. *Hepatology* Baltim Md. 1997;25(1):190-4.
67. O'Grady JG, Alexander GJ, Sutherland S, Donaldson PT, Harvey F, Portmann B, et al. Cytomegalovirus infection and donor/recipient HLA antigens: interdependent co-factors in pathogenesis of vanishing bile-duct syndrome after liver transplantation. *Lancet*. 1988;2(8606):302-5.
68. George MJ, Snyderman DR, Werner BG, Griffith J, Falagas ME, Dougherty NN, et al. The independent role of cytomegalovirus as a risk factor for invasive fungal disease in orthotopic liver transplant recipients. Boston Center for Liver Transplantation CMVIG-Study Group. Cytogam, MedImmune, Inc. Gaithersburg, Maryland. *Am J Med*. 1997;103(2):106-13.
69. Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW, Gratama JW, Henzen-Logmans S, Kuenen-Boumeester V, et al. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood*. 2000;95(7):2240-5.
70. Castro-Malaspina H, Harris RE, Gajewski J, Ramsay N, Collins R, Dharan B, et al. Unrelated donor marrow transplantation for myelodysplastic syndromes: outcome analysis in 510 transplants facilitated by the National Marrow Donor Program. *Blood*. 2002;99(6):1943-51.
71. Ljungman P. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: viral status. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(2):209-17.
72. Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frassonni F, Niederwieser D, Cordonnier C. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood*. 2003;102(13):4255-60.
73. Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood*. 2001;98(7):2043-51.

74. Boeckh M, Nichols WG. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood*. 2004;103(6):2003-8.
75. Hebart H, Einsele H. Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum Immunol*. 2004;65(5):432-6.
76. Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2003;9(9):543-58.
77. Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA, Du Mond C, Cays M, Ebeling DF, et al. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1991;325(23):1601-7.
78. Schmidt GM, Horak DA, Niland JC, Duncan SR, Forman SJ, Zaia JA. A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplants; The City of Hope-Stanford-Syntex CMV Study Group. *N Engl J Med*. 1991;324(15):1005-11.
79. Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood*. 1994;83(7):1971-9.
80. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis*. 2002;185(3):273-82.
81. Einsele H, Hebart H, Kauffmann-Schneider C, Sinzger C, Jahn G, Bader P, et al. Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(7):757-63.
82. Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR, Bowden RA, Huang M-L, Myerson D, et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic

- hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood*. 2003;101(2):407-14.
83. Núñez Bacarreza JJ, Montiel López L, Núñez del Prado Alcoreza JR. Síndrome hemofagocítico asociado a infección viral por citomegalovirus. *Med Intensiva*. 2011;35(3):189-92.
84. Douglas M Heuman. Cytomegalovirus colitis [Internet]. Medscape. 2017. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/173151-overview#showall>
85. Smieja M, Gnarpe J, Lonn E, Gnarpe H, Olsson G, Yi Q, et al. Multiple infections and subsequent cardiovascular events in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. *Circulation*. 2003;107(2):251-7.
86. Boehme KW, Compton T. Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *J Virol*. 2004;78(15):7867-73.
87. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol*. 2003;77(8):4588-96.
88. Delale T, Paquin A, Asselin-Paturel C, Dalod M, Brizard G, Bates EEM, et al. MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN-alpha release and initiation of immune responses in vivo. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2005;175(10):6723-32.
89. Hokeness-Antonelli KL, Crane MJ, Dragoi AM, Chu W-M, Salazar-Mather TP. IFN-alpha-beta-mediated inflammatory responses and antiviral defense in liver is TLR9-independent but MyD88-dependent during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2007;179(9):6176-83.
90. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(10):3516-21.
91. Juckem LK, Boehme KW, Feire AL, Compton T. Differential initiation of innate immune responses induced by human cytomegalovirus entry into fibroblast cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2008;180(7):4965-77.

92. Bukowski JF, Woda BA, Habu S, Okumura K, Welsh RM. Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1983;131(3):1531-8.
93. Polić B, Hengel H, Krmpotić A, Trgovcich J, Pavić I, Luccaronin P, et al. Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J Exp Med*. 1998;188(6):1047-54.
94. Bukowski JF, Warner JF, Dennert G, Welsh RM. Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J Exp Med*. 1985;161(1):40-52.
95. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Simmons A, La Vista AB, Shellam GR. Cmv-1, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J Exp Med*. 1990;171(5):1469-83.
96. Scalzo AA, Fitzgerald NA, Wallace CR, Gibbons AE, Smart YC, Burton RC, et al. The effect of the Cmv-1 resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1992;149(2):581-9.
97. Venema H, van den Berg AP, van Zanten C, van Son WJ, van der Giessen M, The TH. Natural killer cell responses in renal transplant patients with cytomegalovirus infection. *J Med Virol*. 1994;42(2):188-92.
98. Quinnan GV, Kirmani N, Rook AH, Manischewitz JF, Jackson L, Moreschi G, et al. Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med*. 1982;307(1):7-13.
99. Boppana SB, Britt WJ. Antiviral antibody responses and intrauterine transmission after primary maternal cytomegalovirus infection. *J Infect Dis*. 1995;171(5):1115-21.
100. Jonjić S, Pavić I, Polić B, Crnković I, Lucin P, Koszinowski UH. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med*. 1994;179(5):1713-7.

101. Britt WJ, Vugler L, Butfiloski EJ, Stephens EB. Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol.* 1990;64(3):1079-85.
102. Marshall GS, Rabalais GP, Stout GG, Waldeyer SL. Antibodies to recombinant-derived glycoprotein B after natural human cytomegalovirus infection correlate with neutralizing activity. *J Infect Dis.* 1992;165(2):381-4.
103. Rasmussen L, Matkin C, Spaete R, Pachi C, Merigan TC. Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans. *J Infect Dis.* 1991;164(5):835-42.
104. Yeager AS, Grumet FC, Hafleigh EB, Arvin AM, Bradley JS, Prober CG. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *J Pediatr.* 1981;98(2):281-7.
105. Filippone EJ, Farber JL. Humoral Immune Response and Allograft Function in Kidney Transplantation. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* agosto de 2015;66(2):337-47.
106. Mutter W, Reddehase MJ, Busch FW, Bühring HJ, Koszinowski UH. Failure in generating hemopoietic stem cells is the primary cause of death from cytomegalovirus disease in the immunocompromised host. *J Exp Med.* 1988;167(5):1645-58.
107. Reddehase MJ, Weiland F, Münch K, Jonjic S, Lüske A, Koszinowski UH. Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J Virol.* 1985;55(2):264-73.
108. Barry AP, Silvestri G, Safrit JT, Sumpter B, Kozyr N, McClure HM, et al. Depletion of CD8+ cells in sooty mangabey monkeys naturally infected with simian immunodeficiency virus reveals limited role for immune control of virus replication in a natural host species. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007;178(12):8002-12.
109. Jacobson MA, Maecker HT, Orr PL, D'Amico R, Van Natta M, Li X-D, et al. Results of a cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+/interferon- gamma+ cytokine flow

- cytometry assay correlate with clinical evidence of protective immunity in patients with AIDS with CMV retinitis. *J Infect Dis.* 2004;189(8):1362-73.
110. Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood.* 1991;78(5):1373-80.
 111. Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science.* 1992;257(5067):238-41.
 112. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med.* 1995;333(16):1038-44.
 113. Walker S, Fazou C, Crough T, Holdsworth R, Kiely P, Veale M, et al. Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* 2007;9(2):165-70.
 114. Radha R, Jordan S, Puliyananda D, Bunnapradist S, Petrosyan A, Amet N, et al. Cellular immune responses to cytomegalovirus in renal transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2005;5(1):110-7.
 115. Reusser P, Cathomas G, Attenhofer R, Tamm M, Thiel G. Cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immunity after renal transplantation mediates protection from CMV disease by limiting the systemic virus load. *J Infect Dis.* 1999;180(2):247-53.
 116. Sester M, Sester U, Gärtner BC, Girndt M, Meyerhans A, Köhler H. Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2002;13(10):2577-84.
 117. Shlobin OA, West EE, Lechtzin N, Miller SM, Borja M, Orens JB, et al. Persistent cytomegalovirus-specific memory responses in the lung allograft and blood following primary infection in lung transplant recipients. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2006;176(4):2625-34.

118. Crough T, Burrows JM, Fazou C, Walker S, Davenport MP, Khanna R. Contemporaneous fluctuations in T cell responses to persistent herpes virus infections. *Eur J Immunol.* 2005;35(1):139-49.
119. Gillespie GM, Wills MR, Appay V, O'Callaghan C, Murphy M, Smith N, et al. Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol.* 2000;74(17):8140-50.
120. Khan N, Hislop A, Gudgeon N, Cobbold M, Khanna R, Nayak L, et al. Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004;173(12):7481-9.
121. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, 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):673-85.
122. Elkington R, Walker S, Crough T, Menzies M, Tellam J, Bharadwaj M, et al. Ex vivo profiling of CD8+-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol.* 2003;77(9):5226-40.
123. Manley TJ, Luy L, Jones T, Boeckh M, Mutimer H, Riddell SR. Immune evasion proteins of human cytomegalovirus do not prevent a diverse CD8+ cytotoxic T-cell response in natural infection. *Blood.* 2004;104(4):1075-82.
124. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GMA, Papagno L, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med.* 2002;8(4):379-85.
125. Gamadia LE, Remmerswaal EBM, Weel JF, Bemelman F, van Lier RAW, Ten Berge IJM. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood.* 2003;101(7):2686-92.
126. Day EK, Carmichael AJ, ten Berge IJM, Waller ECP, Sissons JGP, Wills MR. Rapid CD8+ T cell repertoire focusing and selection of high-affinity clones into memory following primary infection with a persistent human virus: human cytomegalovirus. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007;179(5):3203-13.

127. Price DA, Brenchley JM, Ruff LE, Betts MR, Hill BJ, Roederer M, et al. Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8+ T cell populations specific for persistent DNA viruses. *J Exp Med.* 2005;202(10):1349-61.
128. Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2002;169(4):1984-92.
129. Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Solana R, Grubeck-Loebenstien B, Wikby A. Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol Rev.* 2005;205:257-68.
130. Akbar AN, Fletcher JM. Memory T cell homeostasis and senescence during aging. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(5):480-5.
131. Crough T, Fazou C, Weiss J, Campbell S, Davenport MP, Bell SC, et al. Symptomatic and Asymptomatic Viral Recrudescence in Solid-Organ Transplant Recipients and Its Relationship with the Antigen-Specific CD8+ T-Cell Response. *J Virol.* 2007;81(20):11538-42.
132. Dunn HS, Haney DJ, Ghanekar SA, Stepick-Biek P, Lewis DB, Maecker HT. Dynamics of CD4 and CD8 T cell responses to cytomegalovirus in healthy human donors. *J Infect Dis.* 2002;186(1):15-22.
133. Einsele H, Roosnek E, Rufer N, Sinzger C, Riegler S, Löffler J, et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood.* 2002;99(11):3916-22.
134. Gupta MP, Coombs P, Prockop SE, Hasan AA, Doubrovina E, O'Reilly RJ, et al. Treatment of cytomegalovirus retinitis with cytomegalovirus-specific T-lymphocyte infusion. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina.* 2015;46(1):80-2.
135. Sester U, Gärtner BC, Wilkens H, Schwaab B, Wössner R, Kindermann I, et al. Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2005;5(6):1483-9.
136. Sester M, Sester U, Gärtner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, et al. Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and

- predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation*. 2001;71(9):1287-94.
137. Kemble G, Duke G, Winter R, Spaete R. Defined large-scale alterations of the human cytomegalovirus genome constructed by cotransfection of overlapping cosmids. *J Virol*. 1996;70(3):2044-8.
138. Hegde NR, Dunn C, Lewinsohn DM, Jarvis MA, Nelson JA, Johnson DC. Endogenous human cytomegalovirus gB is presented efficiently by MHC class II molecules to CD4+ CTL. *J Exp Med*. 2005;202(8):1109-19.
139. Cantisán Bohórquez S, Navarro Ortega D. Estrategias de monitorización inmunológica para la infección por citomegalovirus. *Tratamientos de base inmunológica. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2011;29:28-32.
140. Manuel O, Husain S, Kumar D, Zayas C, Mawhorter S, Levi ME, et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2013;56(6):817-24.
141. Al-Omari A, Aljamaan F, Alhazzani W, Salih S, Arabi Y. Cytomegalovirus infection in immunocompetent critically ill adults: literature review. *Ann Intensive Care*. 2016;6(1):110.
142. Torre-Cisneros J, Aguado JM, Caston JJ, Almenar L, Alonso A, Cantisán S, et al. Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: SET/GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations. *Transplant Rev*. julio de 2016;30(3):119-43.
143. Hodson EM, Ladhani M, Webster AC, Strippoli GFM, Craig JC. Antiviral medications for preventing cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;2:CD003774.
144. Cordero Matía E, Len Ó. Esquemas de prevención de la infección por citomegalovirus: terapia anticipada frente a profilaxis universal. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2011;29:33-7.

145. Torre-Cisneros J, Arias-Rodríguez M, Aguado JM, Campistol JM. Presente y futuro de la infección por citomegalovirus en el trasplante renal. *Nefrología*. 2012;(3).
146. Florescu DF, Kalil AC. Cytomegalovirus infections in non-immunocompromised and immunocompromised patients in the intensive care unit. *Infect Disord Drug Targets*. 2011;11(4):354-64.
147. Heininger A, Haeberle H, Fischer I, Beck R, Riessen R, Rohde F, et al. Cytomegalovirus reactivation and associated outcome of critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2011;15(2):R77.
148. Limaye AP, Boeckh M. CMV in critically ill patients: pathogen or bystander? *Rev Med Virol*. noviembre de 2010;20(6):372-9.
149. Díaz A, Zaragoza R, Granada R, Salavert M. Infecciones virales graves en pacientes inmunocompetentes. *Med Intensiva*. 2011;35(3):179-85.
150. Pène F, Pickkers P, Hotchkiss RS. Is this critically ill patient immunocompromised? *Intensive Care Med*. 2016;42(6):1051-4.
151. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(12):862-74.
152. Asehnoune K, Roquilly A, Abraham E. Innate immune dysfunction in trauma patients: from pathophysiology to treatment. *Anesthesiology*. 2012;117(2):411-6.
153. Mañez R, Kusne S, Linden P, Gonzalez-Pinto I, Bonet H, Kramer D, et al. Temporary withdrawal of immunosuppression for life-threatening infections after liver transplantation. *Transplantation*. 1994;57(1):149-51.
154. Frantzeskaki FG, Karampi E-S, Kottaridi C, Alepaki M, Routsis C, Tzanela M, et al. Cytomegalovirus reactivation in a general, nonimmunosuppressed intensive care unit population: incidence, risk factors, associations with organ dysfunction, and inflammatory biomarkers. *J Crit Care*. 2015;30(2):276-81.
155. Chilet M, Aguilar G, Benet I, Belda J, Tormo N, Carbonell JA, et al. Virological and immunological features of active cytomegalovirus infection in

- nonimmunosuppressed patients in a surgical and trauma intensive care unit. *J Med Virol.* agosto de 2010;82(8):1384-91.
156. Cook CH, Zhang Y, Sedmak DD, Martin LC, Jewell S, Ferguson RM. Pulmonary cytomegalovirus reactivation causes pathology in immunocompetent mice. *Crit Care Med.* 2006;34(3):842-9.
157. Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ, et al. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA.* 2008;300(4):413-22.
158. Hamprecht K, Baumeister A, Beck R, Haeberle H, Heininger A. The lung as a central compartment of active CMV infection. *Inflamm Res.* 2007;Supplement 2:S242.
159. Ishioka H, Sanui M, Tsutsumi Y, Yanase F, Shiotsuka J. Low prevalence of active cytomegalovirus infection in a cardiovascular intensive care unit. *J Intensive Care.* 2014;2(1):12.
160. Navarro D. Active cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in the ICU. *Chest.* 2011;140(1):269-70.
161. Ong DSY, Klein Klouwenberg PMC, Verduyn Lunel FM, Spitoni C, Frencken JF, Dekker HAT, et al. Cytomegalovirus seroprevalence as a risk factor for poor outcome in acute respiratory distress syndrome*. *Crit Care Med.* 2015;43(2):394-400.
162. Papazian L, Fraisse A, Garbe L, Zandotti C, Thomas P, Saux P, et al. Cytomegalovirus. An unexpected cause of ventilator-associated pneumonia. *Anesthesiology.* 1996;84(2):280-7.
163. Papazian L, Doddoli C, Chetaille B, Gernez Y, Thirion X, Roch A, et al. A contributive result of open-lung biopsy improves survival in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med.* 2007;35(3):755-62.
164. Chiche L, Forel J-M, Roch A, Guervilly C, Pauly V, Allardet-Servent J, et al. Active cytomegalovirus infection is common in mechanically ventilated medical intensive care unit patients. *Crit Care Med.* 2009;37(6):1850-7.

165. Kalil AC, Florescu DF. Is cytomegalovirus reactivation increasing the mortality of patients with severe sepsis? *Crit Care*. 2011;15(2):1–3.
166. Coisel Y, Bousbia S, Forel J-M, Hraiech S, Lascola B, Roch A, et al. Cytomegalovirus and herpes simplex virus effect on the prognosis of mechanically ventilated patients suspected to have ventilator-associated pneumonia. *PloS One*. 2012;7(12):e51340.
167. Walton AH, Muenzer JT, Rasche D, Boomer JS, Sato B, Brownstein BH, et al. Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PloS One*. 2014;9(2):e98819.
168. Cook CH, Yenchar JK, Kraner TO, Davies EA, Ferguson RM. Occult herpes family viruses may increase mortality in critically ill surgical patients. *Am J Surg*. 1998;176(4):357-60.
169. Jaber S, Chanques G, Borry J, Souche B, Verdier R, Perrigault P-F, et al. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: associated factors and consequences. *Chest*. 2005;127(1):233-41.
170. Cisneros-Herreros JM, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodríguez-Baño J, Salavert-Lletí M. [Guidelines for the diagnosis and treatment of patients with bacteriemia. Guidelines of the Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25(2):111-30.
171. CMV IgG Abbot Architect System. User manual [Internet]. 2008. Disponible en: <http://www.ilexmedical.com/files/PDF/CMVIgG.pdf>
172. Schnepf N, Scieux C, Resche-Riggon M, Feghoul L, Xhaard A, Gallien S, et al. Fully Automated Quantification of Cytomegalovirus (CMV) in Whole Blood with the New Sensitive Abbott RealTime CMV Assay in the Era of the CMV International Standard. *J Clin Microbiol*. 2013;51(7):2096-102.
173. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus (HCMV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. WHO/BS/10.2138 [Internet]. World Health Organization; 2010. Disponible en: http://www.who.int/biologicals/expert_committee/BS_2138_HCMV_ECBS_Report.pdf

174. Quiagen. QuantiFERON-CMV ELISA Package Insert [Internet]. 2015. Disponible en: <http://www.quantiferon.com/irm/content/PI/CMV/2PK/US.pdf>
175. Giulieri S, Manuel O. QuantiFERON®-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011;11(1):17-25.
176. Mattes FM, Vargas A, Kopycinski J, Hainsworth EG, Sweny P, Nebbia G, et al. Functional impairment of cytomegalovirus specific CD8 T cells predicts high-level replication after renal transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2008;8(5):990-9.
177. Tey S-K, Kennedy GA, Cromer D, Davenport MP, Walker S, Jones LI, et al. Clinical assessment of anti-viral CD8+ T cell immune monitoring using QuantiFERON-CMV® assay to identify high risk allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients with CMV infection complications. *PloS One.* 2013;8(10):e74744.
178. von Muller L, Klemm A, Durmus N, Weiss M, Suger-Wiedeck H, Schneider M, et al. Cellular immunity and active human cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *J Infect Dis.* 2007;196(9):1288-95.
179. Chiche L, Forel J-M, Thomas G, Farnarier C, Cognet C, Guervilly C, et al. Interferon- γ production by natural killer cells and cytomegalovirus in critically ill patients. *Crit Care Med.* 2012;40(12):3162-9.
180. Castón JJ, Cantisán S, González-Gasca F, Páez-Vega A, Abdel-Hadi H, Illescas S, et al. Interferon- γ production by CMV-specific CD8+ T lymphocytes provides protection against cytomegalovirus reactivation in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2016;42(1):46-53.

Figuras y Tablas

Figura 1. Familia *Herpesviridae* Adaptado de Moore et al. J Virol 1996 (1) Publicado con permiso del editor. Copyright © American Society for Microbiology.

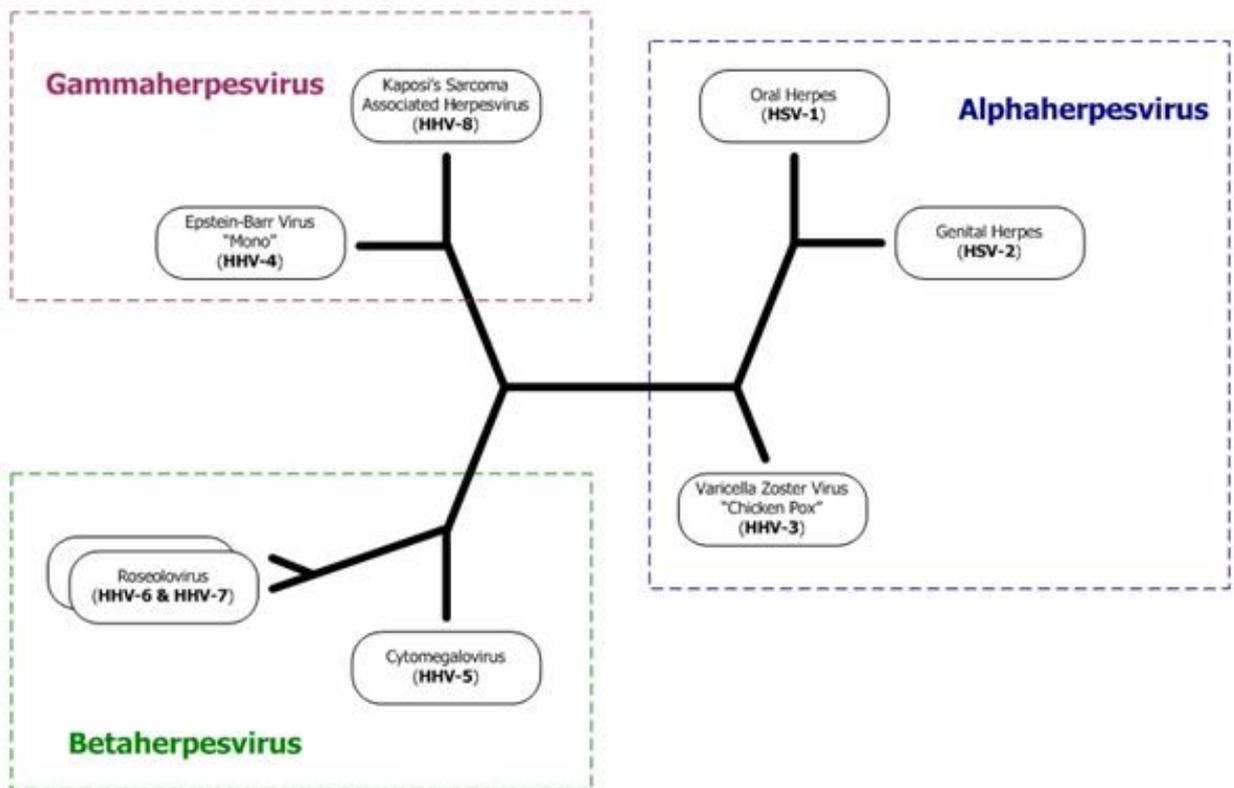


Figura 2. Ciclo del CMV (Tomado de Crough et al. Clin. Microbiol. Rev. 2009) (4)

Publicado con permiso del editor. Copyright © American Society for Microbiology.

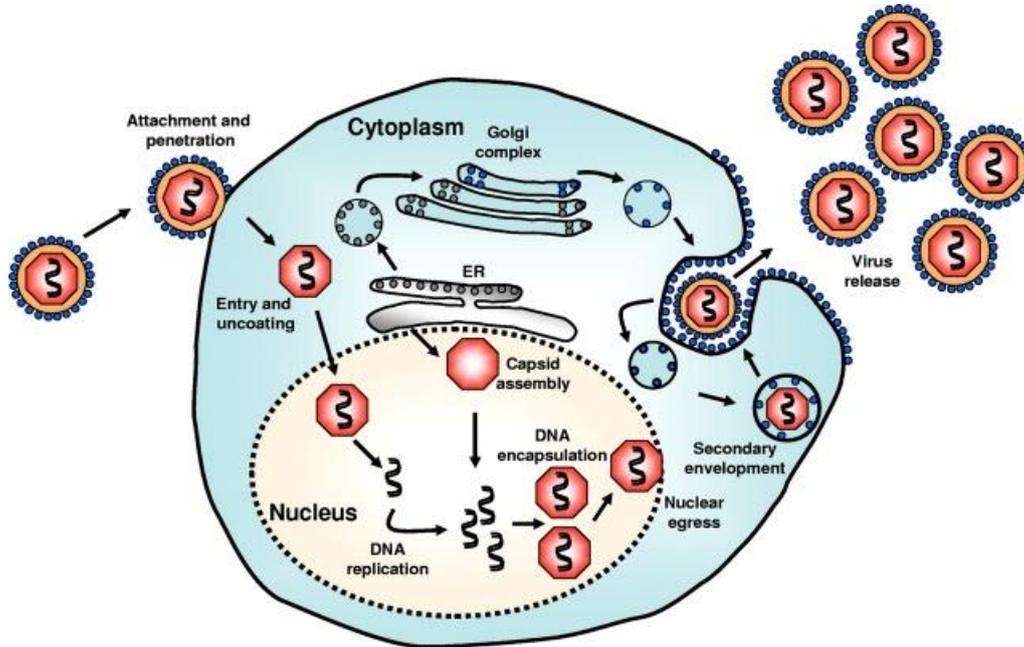


Figura 3. Neumonía por CMV. Arriba: Infiltrado intersticial en radiografía simple de tórax. Abajo: infiltrado bilateral en tomografía computarizada (9). Publicado con permiso del Editor.

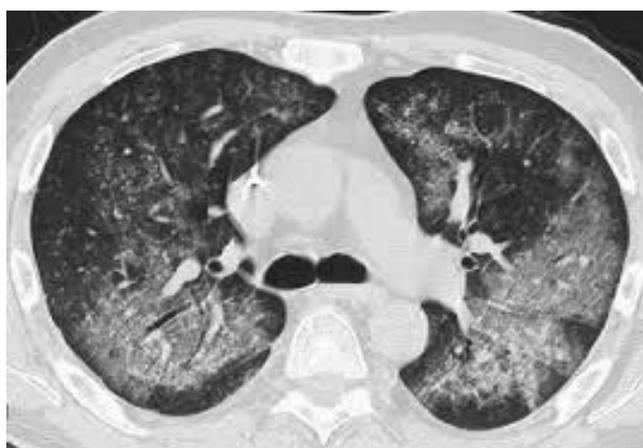


Figura 4: Respuesta inmune frente a CMV (Tomado de Crough et al. Clin. Microbiol. Rev. 2009) (4) Publicado con permiso del editor. Copyright © American Society for Microbiology.

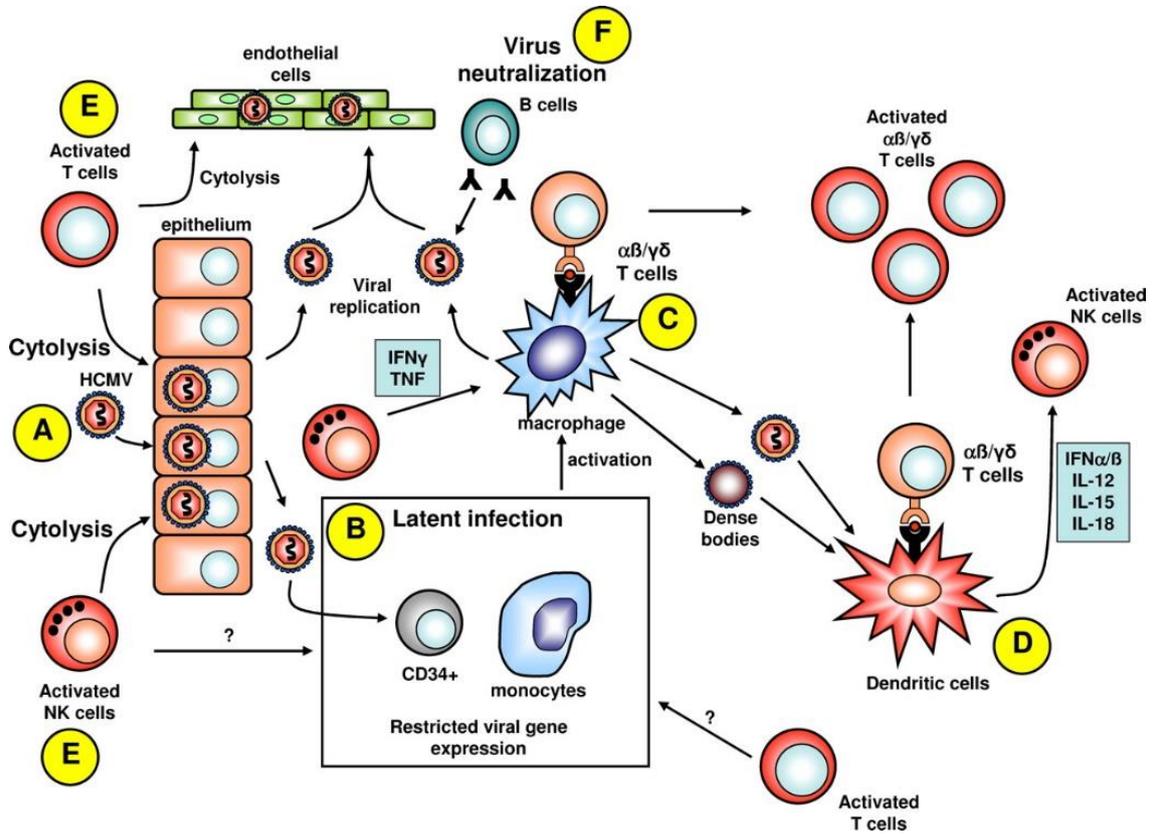


Figura 5. Test QuantiFERON-CMV (Tomado de Giulieri et al. Expert Rev Mol Diagn 2011) (175) Publicado con permiso del editor. Copyright © Taylor and Francis. Todos los derechos reservados.

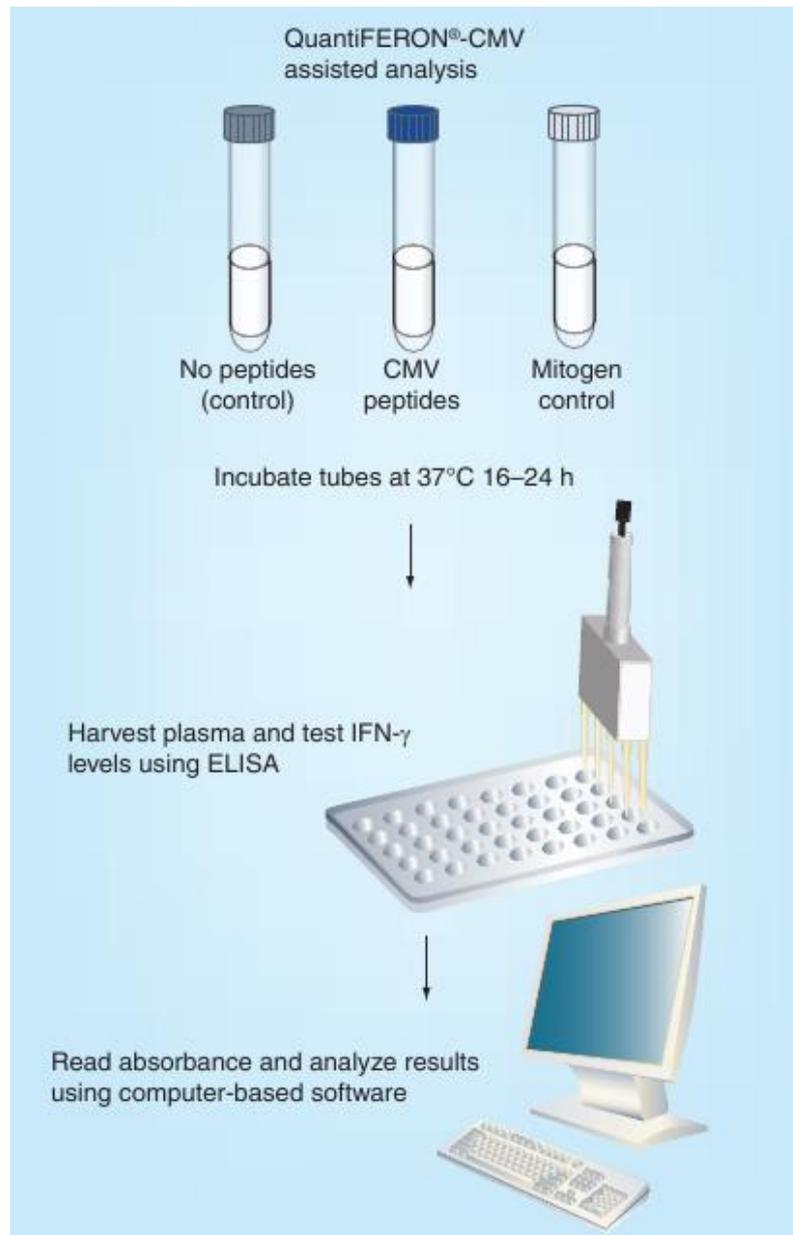
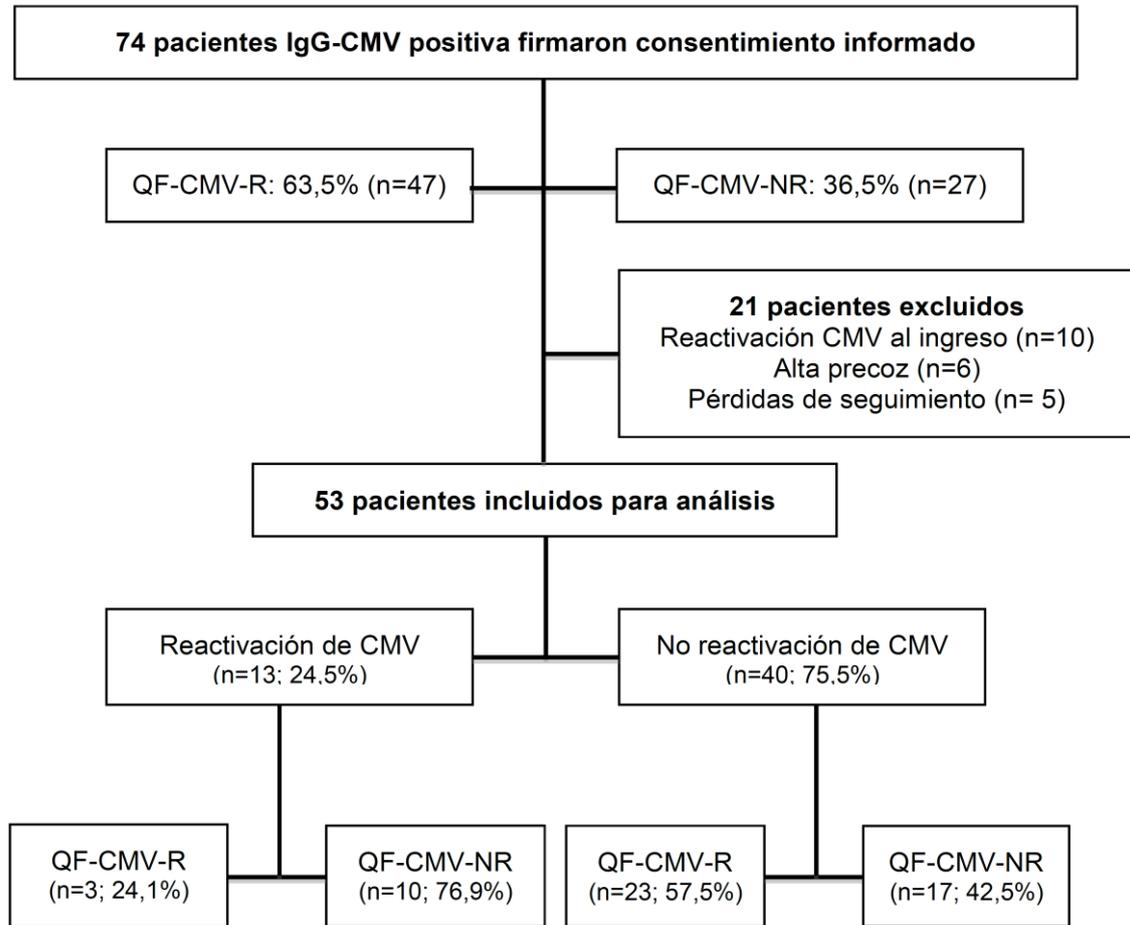
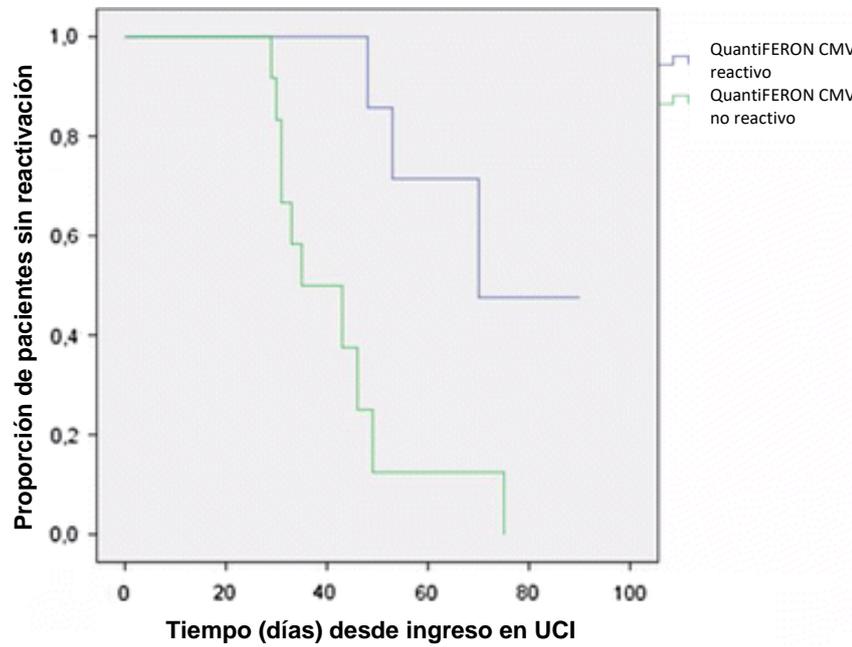


Figura 6. Selección de Pacientes.



Abreviaturas: CMV: Citomegalovirus; IgG: Immunoglobulina G; QF-CMV-R: QuantiFERON reactivo; QF-CMV-NR: QuantiFERON no-reactivo.

Figura 7. Proporción de pacientes sin reactivación de CMV en función del QuantiFERON CMV



Análisis comparativo emplando curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia estimada libre de enfermedad por CMV en los pacientes con QuantiFERON CMV reactivo (morado) frente a los pacientes con QuantiFERON CMV no reactivo (azul). Long rank test $p=0,04$

Tabla 1. Características clínicas de la infección por CMV.

Tipo de paciente	Manifestaciones clínicas
Sanos	Generalmente asintomática; raramente síndrome mononucleósido (fiebre, malestar general, adenopatías, esplenomegalia).
Fetal / congénita	Ictericia, hepatoesplenomegalia, petequias, microcefalia, hipotonía, convulsiones, letargo
Trasplante de órgano sólido	Síndrome febril con leucopenia y quebrantamiento del estado general; neumonitis; enterocolitis, esofagitis, o gastritis; hepatitis; retinitis; y otras afectaciones de tejidos (nefritis, cistitis, miocarditis, pancreatitis)
Trasplante de progenitores hematopoyéticos	Neumonía; enterocolitis, esofagitis o gastritis; raramente retinitis, encefalitis, hepatitis
VIH	Retinitis; enterocolitis, esofagitis o gastritis; retinitis; neumonía; hepatitis

Tabla 2. Utilidad de los métodos diagnósticos para citomegalovirus (CMV) en función de la situación clínica (Tomado de Gámez Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014) (6) Publicado con permiso del editor. Copyright © Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados

Técnica	Infección congénita		Infección primaria sintomática	Trasplante de órganos		Enfermedad por CMV en inmunodeprimido
	Madre	RN		Donante	Receptor	
Indirecta						
IgM	+	+++ ^a	+	nr/na	nr/na	nr/na
IgG (seroconversión)	+++	nr/na	++	nr/na	nr/na	nr/na
IgG (estatus serológico)	± ^b	nr/na	nr/na	+++ ^f	+++ ^f	nr/na
IgG (avidez)	+++	nr/na	+	nr/na	nr/na	nr/na
Directa						
Antigenemia pp65	nr/na		nr/na	nr/na	+++ ^g	+
Cultivo celular SV (antígeno precoz p72)	+++ ^c	+++ ^d	nr/na	nr/na	+++ ^{g,h}	+++ ^h
ADN (o ARNm) cuantificado	+++ ^c	+++ ^e	nr/na	nr/na	+++ ^g	+++ ^g

RN: recién nacido; SV: Shell vial; nr/na: no recomendado/no aplicable; ±, +, ++, +++: controvertida, opcional, aceptable y alta recomendación, respectivamente.

^aLa determinación es diagnóstica en sangre de cordón o en las 2 primeras semanas de vida (baja sensibilidad).

^bNo recomendada actualmente en España.

^cEn líquido amniótico.

^dEn orina (2 primeras semanas).

^eEn orina (2 primeras semanas) y sangre de talón.

^fEn pretrasplante.

^gEn sangre y/o plasma para seguimiento postrasplante o en inmunodeprimidos.

^hEspecialmente útil en enfermedad por CMV con afectación orgánica del órgano afectado.

Tabla 3. Métodos inmunológicos para el estudio de la respuesta mediada por linfocitos T frente a CMV (Tomado de Cantisan Enferm Infecc Enferm Infecc 2011) (139) Publicado con permiso del editor. Copyright © Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados

Características	Multímeros HLA-péptido	ICS	ELISPOT	Quantiferon-CMV
Muestra/ volumen	CMNSP/0,5-1 ml	SC o CMNSP/1-2 ml	CMNSP/10 ml	SC/3-5 ml
Duración	1 - 2 h	8 - 10 h	24-48 h	24-48 h
Antígeno	Péptido individual (pp65, IE-1, pp50)	Péptido individual/librería de péptidos / lisado / proteínas recombinantes / células dendríticas infectadas con CMV-VR-1814	Péptido individual/librería de péptidos / lisado / proteínas recombinantes / células dendríticas infectadas con CMV-VR-1814	Combinación de péptidos pp65/ gB/IE-1/pp50
Conocimiento previo del epítipo	Sí	No	No	No
Distingue T CD4+ de T CD8+	Sí	Sí	No	Péptidos diseñados para estimular a CD8+
Análisis funcional	No (sólo si se combina con ICS)	Sí	Sí	Sí
Análisis fenotípico	Sí	No	No	No
Conocimiento previo de HLA necesario	Sí	No	No	No
Ventajas	Resultados en 1-2 h	Caracterización cuali y cuantitativa	Permite congelación de muestras y su envío a laboratorio de referencia	Aprobado en Europa Fácil de hacer y mínima manipulación
Limitaciones	Requiere citómetro de flujo No estandarizado	Requiere citómetro de flujo No estandarizado	Requiere purificar CMNSP No estandarizado	Sensible a linfopenia No cubre pacientes con alelos raros HLA clase I

CMNSP: células mononucleares de sangre periférica; ICS: marcaje intracelular; SC: sangre completa.

Tabla 4: Ventajas e inconvenientes entre profilaxis universal y tratamiento anticipado (Adaptado de Cordero. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010) (144). Publicado con permiso del editor. Copyright © Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Estrategia	Ventajas	Inconvenientes
Profilaxis	<ul style="list-style-type: none">• Disminución de incidencia de enfermedades oportunistas• Aumenta supervivencia del injerto• Disminuye episodios de rechazo	<ul style="list-style-type: none">• Aparición de enfermedad tardía• Mayor incidencia de resistencia antiviral• Mayor riesgo de leucopenia
Tratamiento anticipado	<ul style="list-style-type: none">• Enfermedad tardía excepcional.• Menores efectos secundarios• Menor coste	<ul style="list-style-type: none">• Logística complicada

Tabla 5. Metaanálisis de exitus y reactivación de CMV (Adaptado de Kalil. Crit Care 2011) (165). Reproducido bajo licencia Creative Commons.

Estudio y año	Resultados individuales			Exitus/Total	
	OR	IC 95%	p	CMV +	CMV -
Domart 1990	2,18	0,93-5,13	0,0731	16 / 29	31 / 86
Kutza 1998	0,62	0,13-2,88	0,54	7 / 11	17 / 23
Heininger 2001	2,16	0,71-6,58	0,1744	11 / 20	13 / 36
Cook 2003	2,76	0,74-10,35	0,1321	5 / 10	25 / 94
Jaber 2005	2,64	1,04-6,669	0,0412	20 / 40	11 / 40
Mueller 2006	3,06	0,53-17,46	0,2091	5 / 8	6 / 17
Limaye 2008	0,21	0,03-1,72	0,1465	1 / 39	9 / 81
Ziemann 2008	3,26	1,11-,54	0,0312	10 / 35	7 / 64
Chiche 2009	2,08	1,04-4,17	0,0396	23 / 39	83 / 203
Heininger 2011	1,08	0,44-2,65	0,8608	13 / 35	18 / 51
Total	1,81	1,31-2,50	0,0003	111 / 266	220 / 695

CMV, Citomegalovirus; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza

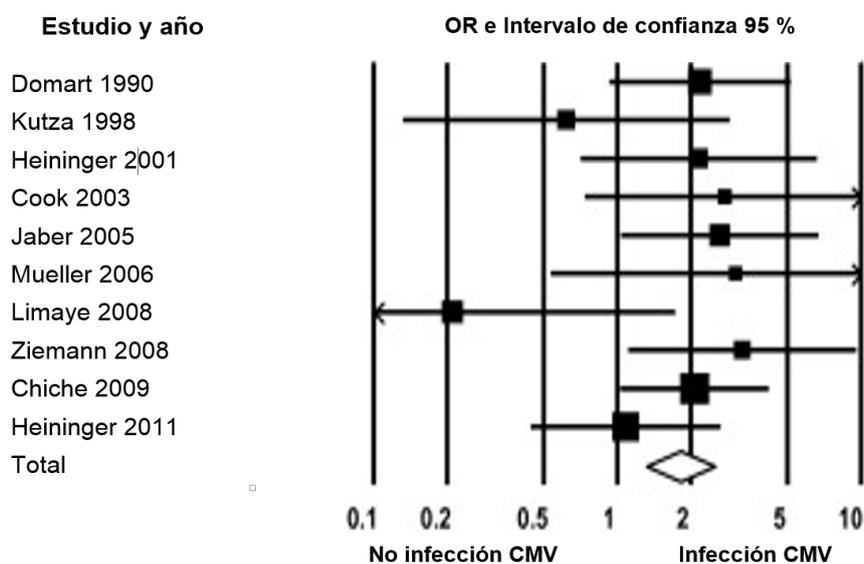


Tabla 6. Características de los pacientes

Características de los pacientes	
Sexo: Varón ^b	40 (75,5%)
Edad (años) ^a	64 (20 – 83)
Diabetes mellitus ^b	10 (18,9%)
APACHE II ^a	16 (3 – 26)
SAPS 2 ^a	34 (13 – 68)
Tipo de ingreso	
Médico ^b	18 (34%)
Quirúrgico ^b	35 (66%)
Cirugía urgente ^b	34 (97,1%)
Tipo de Cirugía	
Neurocirugía ^b	23 (65,7%)
General ^b	5 (14,3%)
ORL y Maxilofacial ^b	2 (5,7%)
Traumatológica ^b	3 (8,6%)
Urológica ^b	1 (2,9%)
Vascular ^b	1 (2,9%)
Ventilación mecánica (VM) ^b	47 (88,7%)
Duración de VM (días) ^a	15 (2 – 90)
Hepatitis ^b	7 (13,2%)
Fracaso renal agudo ^b	25 (47,2%)
Técnicas de reemplazo renal ^b	3 (5,7%)
Bacteriemia ^b	25 (47,2%)
Candidemia ^b	7 (13,2%)
Neumonía asociada a la ventilación mecánica ^b	21 (40,4%)
Traqueobronquitis ^b	18 (35,3%)
Traqueostomía ^b	28 (54,9%)
Duración de ingreso (Días) ^a	37 (8 – 132)
Duración de Estancia en UCI (días) ^a	23 (5 – 90)
Exitus ^b	11 (20,8%)

^a Media (Rango) ^b Recuento (Porcentaje)

Tabla 7. Características de los pacientes en función de la reactivación de CMV

Variable	Total n = 53 (100%)	Replicación de CMV		p
		Sí n=13 (24,5%)	No n=40 (75,5%)	
Sexo: Varón #	40 (75,5%)	8 (61,5%)	32 (80%)	0,2 ^a
Edad (años) *	59,28 (46-75)	58,54 (43-76)	59,53 (46-64)	0,8
Ingreso médico #	18 (34%)	6 (46,2%)	12 (30%)	0,3 ^a
APACHE II *	16 (6-26)	16,54 (8-26)	15,80 (6-24)	0,6
SAPS 2 *	34,89 (13-68)	37,23 (26,5-46)	34,13 (28-37,5)	0,4
Diabetes mellitus #	10 (18,9%)	6 (46,2%)	4 (10%)	0,009^b
Complicaciones				
Ventilación mecánica #	47 (88,7%)	13 (100%)	34 (85%)	0,3 ^a
Duración de Ventilación mecánica *	21,63 (10-27)	33,46 (21-45)	17,23 (6-22)	0,007
Fracaso renal agudo #	25 (47,2%)	8 (61,5%)	17 (42,5%)	0,2 ^a
Bacteriemia #	25 (47,2%)	7 (53,8%)	18 (45%)	0,5 ^a
Fungemia #	7 (13,2%)	2 (15,4%)	5 (12,5%)	1,0 ^b
Neumonía asociada a la ventilación mecánica #	21 (40,4%)	8 (61,5%)	13 (32,5%)	0,1 ^a
Traqueobronquitis #	18 (35,3%)	6 (50%)	12 (30,8%)	0,3 ^a
Traqueostomía #	28 (54,9%)	12 (92,3%)	16 (42,1%)	0,002^b
QF-CMV-Reactivo #	26 (49,1%)	3 (23,1%)	23 (57,5%)	0,03^b
Duración de ingreso *	45,33 (29-61)	56,17 (31-76)	42 (23-54)	0,9
Duración de estancia en UCI *	28,15 (13-36)	44,08 (31-51)	22,98 (12-26,5)	0,01
Exitus #	11 (20,7%)	6 (46,2%)	5 (12,5%)	0,01^b

#Expresado como n (porcentaje). Estadístico de contraste: ^aChi cuadrado (o ^bexacto de Fisher).

*Expresado como mediana (rango intercuartílico). Estadístico de contraste: U-Mann-Whitney

Tabla 8. Factores asociados a reactivación de CMV por regresión de Cox.

Variable	OR	p	IC 95%
Diabetes mellitus	4,73	0,15	0,57-39,21
SAPS II	1,02	0,47	0,96-1,07
Edad	0,97	0,40	0,92-1,03
QF-CMV-Reactivo	0,09	0,003	0,02-0,44

Tabla 9. Características de los pacientes en función de la mortalidad

Variable	Total n = 53 (100%)	Exitus		p
		Sí n=11 (20,8%)	No n=42 (79,2%)	
Sexo: Varón #	40 (75,5%)	7 (63,6%)	33 (78,6%)	0,4
Edad (años) *	59,28 (46-75)	67 (51-76)	63 (44,5-70,5)	0,4
Ingreso médico #	18 (34 %)	7 (63,6%)	11 (26,2%)	0,03
Cirugía urgente #	34 (64,2%)	3 (27,3%)	31 (92,2%)	0,1
APACHE II *	16 (3-26)	18 (14-23)	16 (11-19)	0,1
SAPS 2 *	34,89 (13-68)	34 (27-38)	34 (28-38,3)	0,1
Diabetes mellitus #	10 (18,9%)	6 (54,5%)	4 (9,5%)	0,003
Complicaciones				
Ventilación mecánica #	47 (88,7%)	10 (90,9%)	37 (88,1%)	1,0
Días de ventilación mecánica *	21,6 (10-27,5)	35 (12-57)	14 (7-24)	0,02
Fracaso renal agudo #	25 (47,2%)	8 (72,7%)	17 (40,5%)	0,06
Bacteriemia #	25 (47,2%)	6 (54,5%)	19 (45,2%)	0,6
Candidemia #	7 (13,2%)	2 (18,2%)	5 (11,9%)	0,6
Neumonía asociada a ventilación mecánica #	21 (40,4%)	6 (54,5%)	15 (36%)	0,3
Traqueobronquitis #	18 (35,3%)	5 (50%)	13 (31,7%)	0,3
Traqueostomía #	28 (54,9%)	9 (81,8%)	19 (47,5)	0,08
Replicación cuantificable #	13 (24,5%)	6 (54,5%)	7 (16,7%)	0,015
Carga viral inicial (UI/mL) *	52 (40,5-112,5)	56 (38-370,3)	48 (41-110)	0,4
Carga viral máxima (UI/mL) *	384 (56,5-1333,5)	412,5 (47-3023,5)	370 (61-757)	0,5
QF-CMV-Reactivo #	26 (49,1%)	4 (36,4%)	22 (52,4%)	0,3
Duración de ingreso *	45,3 (29-61)	62 (35-82)	36,5 (24,5-52,8)	0,01
Duración de estancia en UCI *	28,1 (13,5-36)	35 (23-75)	20,5 (12,8-31)	0,026

#Expresado como n y porcentaje. Estadístico de contraste: Chi cuadrado (o exacto de Fisher).

*Expresado como mediana y rango intercuartílico. Estadístico de contraste: U-Mann-Whitney

Abreviaturas empleadas:

ADN: Ácido dexosirribonucleico

AL: Aglutinación por látex

APACHE: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

CV: Cardiovascular

CE: Célula endotelial

CI: Confidence interval (intervalo de confianza)

CMV: Citomegalovirus

CML: Células de músculo liso

CTL: Linfocitos T citotóxicos

D/R: Donante/Receptor

ECMV: Enfermedad por CMV

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ELISPOT: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos

HCMV: Citomegalovirus humano

HGUCR: Hospital General Universitario de Ciudad Real

HLA: Antígenos leucocitarios humanos

HOPE: Evaluación de la Prevención de los Resultados Cardíacos

HR: Hazard ratio (razón de riesgo)

HURS: Hospital Universitario Reina Sofía

IC: Intervalo de confianza

ICU: Intensive Care Unit (Unidad de Cuidados Intensivos)

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

ISCI: Marcaje intracelular

Kb: kilobase

LBA: Lavado broncoalveolar

MCMV: CMV murino

NAV: Neumonía asociada a la ventilación mecánica

NK: Natural killer

OR: Odds ratio

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

QF: QuantiFERON®

SAPS: Simplified Acute Physiologic Score

SAS: Servicio Andaluz de Salud

SESCAM: Servicio de Salud de Castilla – La Mancha

SHF: Síndrome hemofagocítico

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida

SMN: Síndrome mononucleósido

SOFA: Sequential Organ Failure Assessment

SV: Shell - vial

TARGA: Terapia antirretroviral de gran actividad

TCR: Receptor de células T

TLR: Receptor tipo Toll

TNF: Factor de necrosis tumoral

TOS: Trasplante de órgano sólido

TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UI: Unidades internacionales

VEB: Virus de Epstein-Barr.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

Anexos

ANEXO I: Artículo científico

Castón JJ, Cantisán S, González-Gasca F, Páez-Vega A, Abdel-Hadi H, Illescas S, et al.

Interferon- γ production by CMV-specific CD8+ T lymphocytes provides protection against cytomegalovirus reactivation in critically ill patients.

Intensive Care Med. 2016 Jan;42(1):46-53. doi: 10.1007/s00134-015-4077-6. Epub 2015 Nov 4.(180)

Factor de impacto en 2015: 10,125



Juan José Castón
Sara Cantisán
Francisco González-Gasca
Aurora Páez-Vega
Hasania Abdel-Hadi
Soledad Illescas
Gema Alonso
Julián Torre-Cisneros

Interferon- γ production by CMV-specific CD8+ T lymphocytes provides protection against cytomegalovirus reactivation in critically ill patients

Received: 23 May 2015
Accepted: 16 September 2015
Published online: 4 November 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg and ESICM 2015

J. J. Castón and S. Cantisán contributed equally to this work.

Take-home message: Cytomegalovirus reactivation is frequent in critically ill patients and is associated with poor outcome. The study of clinical risk factors such as underlying disease and its severity has not shown conclusive results for the prediction of CMV reactivation; therefore, we need immunological markers to determine which patients could receive prophylaxis with antiviral drugs. The results of our study show that the determination of interferon- γ by CMV-specific CD8+ T cells can be useful for predicting the risk of CMV reactivation.

J. J. Castón · F. González-Gasca
Unit of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Hospital General Universitario, Universidad de Castilla La Mancha, Ciudad Real, Spain

J. J. Castón · S. Cantisán · J. Torre-Cisneros
Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), Madrid, Spain

S. Cantisán (✉) · A. Páez-Vega · J. Torre-Cisneros
Clinical Unit of Infectious Diseases, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Reina Sofía University Hospital, University of Córdoba, Avda, Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain
e-mail: sacanti@hotmail.com
Tel.: +34-957011636

H. Abdel-Hadi
Intensive Care Unit, Hospital General Universitario, Ciudad Real, Spain

S. Illescas
Service of Microbiology, Hospital General Universitario, Ciudad Real, Spain

G. Alonso
Intensive Care Unit, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain

Abstract Purpose: To evaluate the usefulness of the secretion of interferon- γ (IFN γ) by cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells to determine the risk of CMV reactivation in critically ill non-immunosuppressed patients. **Methods:** Two-center prospective cohort study including critically ill non-immunosuppressed CMV-seropositive

patients admitted between December 2012 and March 2013. The incidence of CMV reactivation by polymerase chain reaction (real-time PCR) in plasma was investigated. IFN γ secretion by CMV-specific CD8+ T lymphocytes was determined at the time of admission to the intensive care unit (ICU) by means of the QuantiFERON[®]-CMV (QF-CMV) test. Cox regression analyses were performed to investigate CMV reactivation risk factors. **Results:** Fifty-three patients were included, of whom 13 (24.5 %) presented CMV reactivation. Twenty-six patients (49.1 %) were QF-CMV “reactive” (QF-CMV_R). Of the 26 QF-CMV_R patients, 11.5 % (3/26) had CMV reactivation, whereas 37 % (10/27) of QF-CMV “non reactive” patients (QF-CMV_{NR}) presented reactivation ($p = 0.03$). By Cox regression, the presence of QF-CMV_R at ICU admission (HR 0.09, 95 % CI 0.02–0.44; $p = 0.003$) was associated with a decreased risk of CMV reactivation. The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of QF-CMV were 77, 57, 37, and 88 %,

respectively. Eleven of the 53 patients (20.7 %) died during the follow-up period. Mortality was more frequent in patients with CMV reactivation (6/13, 46.1 vs. 5/40, 12.5 %; $p = 0.015$). *Conclusions:* In critically ill non-immunosuppressed

patients, the presence of functional CMV-specific CD8+ T lymphocyte response at intensive care unit admission provides protection against CMV reactivation.

Keywords Cytomegalovirus · Critical care · Interferon- γ · Mechanical ventilation · Replication · Mortality

Introduction

Cytomegalovirus (CMV) has a high seroprevalence in adults. Once primary infection has occurred, the virus remains dormant in tissues and can be reactivated during periods of immunosuppression, as frequently occurs in solid organ transplant patients or hematopoietic progenitors [1–3].

In addition to immunosuppressed patients, in recent years it has been shown that up to 40 % of critically ill CMV-seropositive patients present reactivation of the virus despite not presenting immunosuppression previously [4–7]. Some studies have associated these reactivations with higher rates of nosocomial infection, prolonged hospitalization, longer duration of mechanical ventilation, and increased mortality [4, 8, 9]. Therefore the performance of randomized placebo-controlled trials has been proposed to determine the benefit of prophylaxis against CMV in the prognosis of these patients [10]. However, these studies have significant limitations, such as the scarcity of data demonstrating a direct causal relationship between CMV reactivation and the worst prognosis, and primarily the lack of factors associated with the development of reactivation, which would allow higher-risk patients to be identified and avoid exposing lower-risk patients to antiviral drugs.

Until now, the study of clinical risk factors such as underlying disease and its severity have not shown conclusive results for the prediction of CMV reactivation [4, 9]. Added to this is the fact that the heterogeneity of the pathologies presented by patients admitted to intensive care units (ICU) represents a major constraint for drawing conclusions in this regard.

Some studies have therefore analyzed immunological variables to identify patients at greater risk of CMV reactivation. In this respect, it was recently shown that the weakness in natural killer (NK) cells function, measured according to the decrease in the secretion of interferon- γ (IFN γ), preceded CMV reactivation in critically ill patients [11]. In addition to NK cells, the immunity produced by T cells plays a crucial role in the prevention of CMV reactivation [12]. In this sense, studies have shown that the assessment of T cell functionality has the potential to become a useful tool for managing CMV infection in transplant patients [13]. Indeed, decreased secretion of IFN γ by CMV-specific CD8+

T lymphocytes has been associated with increased risk of CMV reactivation in transplant recipients [14–17].

Therefore, the aim of this study was to prospectively analyze the impact of the functionality of CMV-specific CD8+ T lymphocytes on the risk of CMV reactivation in critically ill non-immunosuppressed patients. To do this, we determined whether the decreased secretion of IFN γ by CMV-specific CD8+ T cells at the time of ICU admission is associated with increased risk of reactivation in these patients.

Materials and methods

Study population and design

This prospective observational study was conducted in the ICUs of two third-level centers (Ciudad Real General University Hospital and Reina Sofia University Hospital in Córdoba) between December 2012 and March 2013. All adult patients who were newly admitted to both ICUs either without hospitalization or after a stay in hospital wards were assessed daily for inclusion in the study. The inclusion criteria were as follows: (1) age over 18 years; (2) seropositivity for CMV; (3) expected survival more than 72 h; (4) expected stay in the ICU more than 4 days; (5) no antiviral medication used in the previous month; (6) absence of congenital or acquired immunosuppression; (7) no steroid treatment in the previous month; (8) no hemoconcentrated blood transfusions in the week prior to admission.

At the time of ICU admission (within the first 24 h) and after verification of compliance with the inclusion criteria, blood samples were obtained to determine (1) CMV serology; (2) quantification of CMV-DNA; and (3) production of IFN γ by CMV-specific CD8+ T lymphocytes. Clinical variables were also collected at this time to determine risk factors for CMV reactivation. Patients with evidence of viral reactivation at admission were not included in the study. Patients were monitored for CMV reactivation by measuring viral load upon admission and at least once a week until discharge from ICU or death. Duration of viremia was considered as the number of days that elapsed between detection of the first positive viral load and the first negative viral load or until ICU

discharge. The attending physicians were unaware of the virological and immunological results gathered in an internal database designed for the study. No patient was given antiviral treatment against CMV during follow-up.

The research protocol was approved by the ethics committees of each center. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and its later amendments. All patients gave their informed consent prior to the inclusion in the study.

Determination of anti-CMV IgG antibodies and CMV viral load

Antibodies to CMV indicating prior CMV infection were assessed using a commercial chemiluminescence immunoassay kit (Architect CMV IgG 6C15, Abbott, Sligo, Ireland). The assay was performed and interpreted according to the manufacturer's recommendations. The serological study was processed independently in the microbiology laboratory at each center.

The quantification of CMV-DNA was tested by an Abbott RealTime CMV kit (Abbott Molecular, Illinois, USA). DNA extractions were performed from 500 μ L of plasma using an Abbott mSample preparation system DNA kit on an m2000sp instrument (Abbott Molecular, Illinois, USA) and eluted in a volume of 70 μ L. Amplification and real-time detection of CMV DNA was performed on an m2000rt instrument. Results were standardized to international units per milliliter (IU/mL) using the World Health Organization (WHO) International Standard for Human CMV for Nucleic Acid Amplification Technique (National Institute for Biological Standards and Controls, NIBSC 09/162).

CMV viral load was determined by real-time PCR at least once per week during the ICU stay. All viral load determinations were performed at Ciudad Real University General Hospital. According to the manufacturer, the detection limit of this method is 31.2 IU/mL (20 copies/mL). CMV reactivation was considered upon detection of CMV viral load by PCR.

The laboratory personnel who performed the analyses had no contact with patients or knowledge of their clinical data.

QuantiFERON-CMV assay

The QuantiFERON-CMV® test was performed in accordance with the manufacturer's instructions (Cellestis, a Qiagen company, Melbourne, Australia) (Fig. 1). In brief, 1 mL of heparinized whole blood was collected in three QuantiFERON-CMV blood collection tubes. Tubes contained either (1) a mix of 22 CMV peptides from a variety of proteins; (2) no antigens (negative control); or (3) phytohemagglutinin (positive mitogen control). All

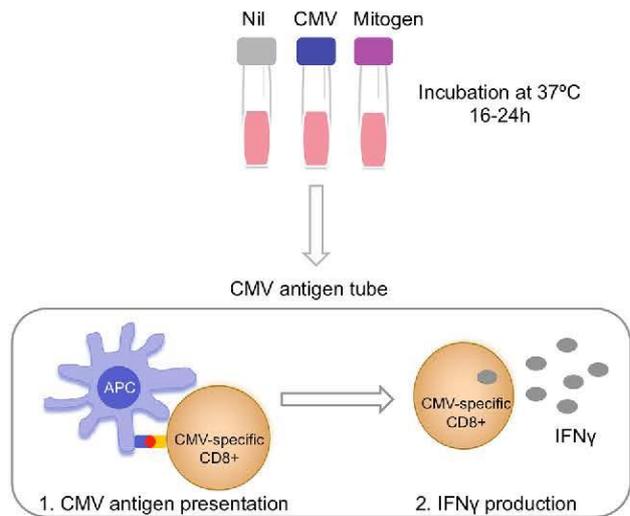


Fig. 1 Schematic representation of QuantiFERON-CMV assay. In the cytomegalovirus antigen tube, CMV-specific CD8⁺ T cells of patients who have been previously exposed to the virus recognize cytomegalovirus antigen and respond by secreting interferon- γ

candidates enrolled in the study had HLA class I alleles capable of binding CMV peptides. After collection, the tubes were shaken vigorously and incubated for 16–24 h at 37 °C. Subsequently, supernatants were recovered and analyzed for IFN γ (IU/mL) by standard ELISA. According to the manufacturer's instructions a result for the CMV antigen was considered "reactive" when the CMV antigen response minus the negative control response was greater than 0.2 IU/mL of IFN γ . The result of QuantiFERON-CMV was considered "indeterminate" when the IFN γ level in the CMV antigen tube minus the negative control was less than 0.2 IU/mL and the IFN γ level in the mitogen tube (once the negative controls had been subtracted) was less than 0.5 IU/mL. For the purpose of statistical analysis, "indeterminate" results were considered as "non-reactive".

Statistical analysis

Data were analyzed using the SPSS statistical package (version 15.0). The baseline characteristics of patients with and without CMV reactivation were compared using the Chi-square test or Fisher's exact test for categorical variables and the Mann–Whitney *U* test for continuous variables. To study the factors associated with CMV reactivation, a Cox regression analysis was performed that included clinically relevant variables taken upon completion of the QuantiFERON-CMV in spite of not being significant in the univariate analysis. The multivariate model was limited to four factors present at admission to the ICU because of the limited number of events or patients in each case. The following variables

were analyzed: age (years), SAPS II at inclusion (score points), diabetes mellitus (yes/no), and QuantiFERON-CMV (reactive/non-reactive). The model included testing for co-linearity, interactions, and proportional hazard assumption for the risk factors. The sensitivity, specificity, positive predictive values (QuantiFERON-CMV non-reactive patients presenting reactivation), and negative predictive values (QuantiFERON-CMV reactive patients not presenting reactivation) of QuantiFERON-CMV were calculated. *p* values below 0.05 were considered statistically significant for all tests.

Results

A total of 98 patients were initially assessed for inclusion in the study. Of them, 24 were excluded because of high probability of death or discharge within the first 4 days of admission ($n = 13$), negative serology for CMV ($n = 4$), need for hemoconcentrated blood transfusion ($n = 4$), and immunosuppression ($n = 3$). A total of 74 patients signed informed consent (Fig. 2). Twenty-one of these patients were excluded because of presence of CMV reactivation at ICU admission ($n = 10$), unexpected early discharge ($n = 6$), and lost to follow-up ($n = 5$). Thus a total of 53 patients completed the study. The median time of ICU stay was 23 days (interquartile range 13–36 days). The demographic and clinical characteristics of these patients are shown in Table 1.

QuantiFERON-CMV assay results

Because all QuantiFERON-CMV tests were performed at ICU admission we have the results of the 74 patients initially included in the study. Forty-seven of them (63.5 %) were “reactive”. Of the 53 patients who completed the study, 26 (49.1 %) were QuantiFERON-CMV reactive. Of the remaining patients, 25 (47.2 %) were QuantiFERON-CMV non-reactive and two patients (3.7 %) were indeterminate. The median level of IFN γ in QuantiFERON-CMV reactive patients was 2.02 IU/mL (interquartile range 0.8–15.6 IU/mL).

Characteristics of CMV reactivation

CMV reactivation was detected in 13 of the 53 patients (24.5 %). The characteristics of these patients are shown in Table 1. In these 13 patients, the median time of onset of viremia was 14 days (interquartile range 12–27 days). The cumulative incidence of reactivation greater than 1000 IU/mL was 23.1 % (3/13 patients), occurring at a median of 10 days (interquartile range 7–20 days). The

median duration of viremia was 18 days (interquartile range 8–33 days). The frequency of reactivation was higher in the QuantiFERON-CMV non-reactive individuals than in the QuantiFERON-CMV reactive individuals (37 vs. 11.5 %; $p = 0.03$). The median onset of viremia was 20 days (interquartile range 14–63 days) in QuantiFERON-CMV reactive patients and 14 days (interquartile range 9–27 days) in QuantiFERON-CMV non-reactive patients ($p = 0.28$). Median peak viral load in QuantiFERON-CMV reactive patients was 3521 IU/mL (interquartile range 40–6376 IU/mL) and in QuantiFERON-CMV non-reactive patients 377 IU/mL (interquartile range 58–520 IU/mL) ($p = 0.39$). No significant differences in the duration of viremia were detected in QuantiFERON-CMV reactive patients (median 35 days, interquartile range 12–57 days) compared to QuantiFERON-CMV non-reactive patients (median 15 days, interquartile range 10–24 days), ($p = 0.63$). The percentage of patients without CMV reactivation according to the result of the QuantiFERON-CMV test is shown in Fig. 3. The sensitivity and specificity of QuantiFERON-CMV were 77 and 57 %, respectively. The positive predictive and negative predictive values were 37 and 88 %, respectively.

Eleven of the 53 patients (20.7 %) died during hospitalization (median 52 days, interquartile range 32–105 days). In-hospital mortality was significantly more frequent in patients with CMV reactivation than those without CMV reactivation (6/13, 46.1 % vs. 5/40, 12.5 %; $p = 0.015$). Unfortunately, as a result of the small number of patients who died, the confidence interval was very wide in the Cox regression and we could not analyze the joint association of these variables.

Factors associated with CMV reactivation

To evaluate factors associated with CMV reactivation in critically ill non-immunosuppressed patients a Cox regression was performed. This analysis included the following variables: age, SAPS II, diabetes mellitus, and reactive QuantiFERON-CMV. In Cox regression, QuantiFERON-CMV test result was the only variable with statistically significant association with CMV reactivation (HR 0.09, 95 % CI 0.02–0.44; $p = 0.003$). In particular, display CD8+ T cell response to CMV (i.e., being QuantiFERON-CMV reactive) at ICU admission was associated with a protection against CMV reactivation. Other factors included in the analysis such as the severity of the underlying disease at ICU admission determined by the SAPS II (HR 1.02, 95 % CI 0.96–1.07; $p = 0.47$), diabetes mellitus (HR 4.73, 95 % CI 0.57–39.21; $p = 0.15$), and age (HR 0.97, 95 % CI 0.92–1.03; $p = 0.40$) were not associated with CMV reactivation.

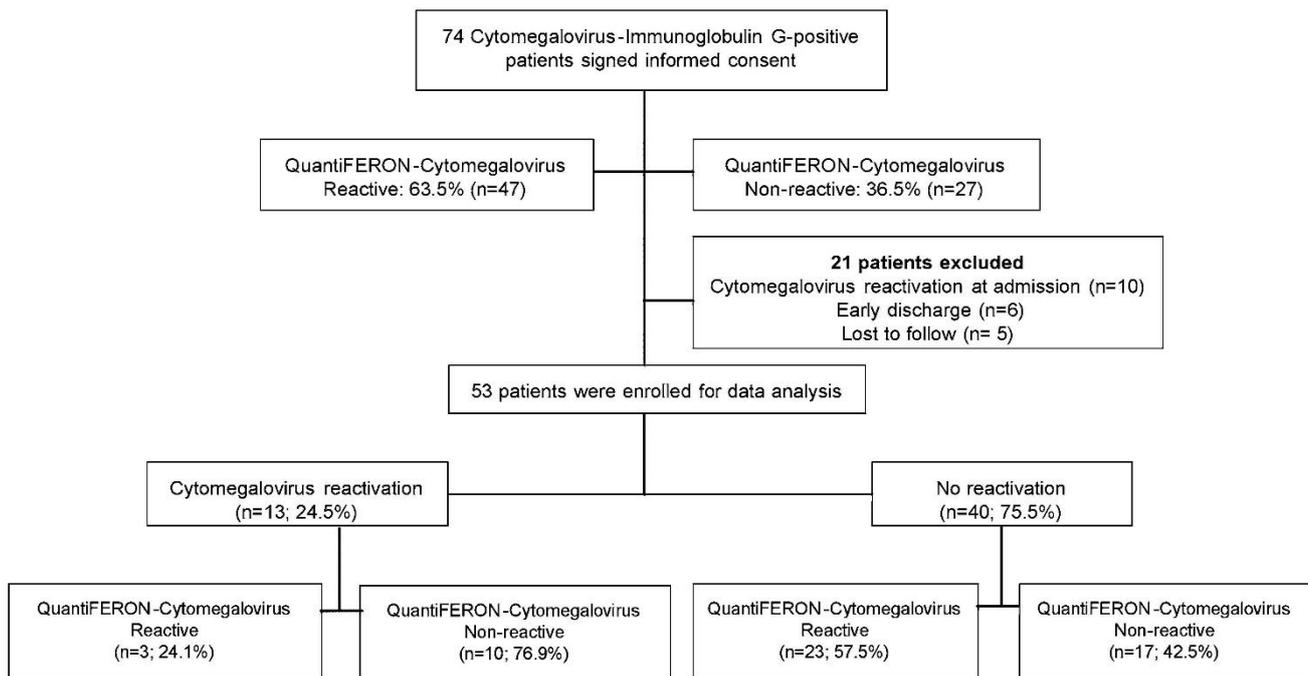


Fig. 2 Patient selection

Table 1 Patient characteristics according to CMV reactivation

Variable	All patients $n = 53$ (100 %)	CMV reactivation		p
		Yes ($n = 13$)	No ($n = 40$)	
Sex: male	40 (75.5 %)	8 (61.5 %)	32 (80 %)	0.2 ^b
Age (years) ^a	59.28 (46–75)	58.54 (43–76)	59.53 (46–64)	0.8 ^c
Type of admission				
Medical	18 (34 %)	6 (46.2 %)	12 (30 %)	0.3 ^b
Surgical	35 (66 %)	7 (53.8 %)	28 (70 %)	
APACHE II ^a	16 (6–26)	16.5 (8–26)	15.8 (6–24)	0.6 ^c
SAPS II ^a	34.9 (13–68)	37.2 (26.5–46)	34.1 (28–37.5)	0.4 ^c
Septic shock	28 (52.8 %)	8 (61.5 %)	20 (50 %)	0.4 ^b
Diabetes mellitus	10 (18.9 %)	6 (46.2 %)	4 (10 %)	0.009 ^d
Mechanical ventilation	47 (88.7 %)	13 (100 %)	34 (85 %)	0.3
Duration of mechanical ventilation (days) ^a	21.6 (10–27.5)	33.5 (21–45.5)	17.2 (6–22)	0.007 ^c
Acute kidney failure	25 (47.2 %)	8 (61.5 %)	17 (42.5 %)	0.2 ^b
Bacteremia	25 (47.2 %)	7 (53.8 %)	18 (45 %)	0.5 ^b
Candidemia	7 (13.2 %)	2 (15.4 %)	5 (12.5 %)	1 ^d
Ventilator-associated pneumonia	21 (39.6 %)	8 (61.5 %)	13 (32.5 %)	0.1 ^b
QuantIFERON®-CMV reactive	26 (49.1 %)	3 (23.1 %)	23 (57.5 %)	0.03 ^b
Hospitalization time (days) ^a	45.3 (29–61)	52 (37–76)	34 (23–54)	0.9 ^c
ICU stay (days) ^a	28.1 (13.5–36)	43 (31–51)	17 (12–26.5)	0.01 ^c
Mortality	11 (20.7 %)	6 (46.2 %)	5 (12.5 %)	0.01 ^d

CMV cytomegalovirus, SAPS simplified acute physiology score, ICU intensive care unit

^a Median (interquartile range)

^b Chi-square test

^c Mann–Whitney U test

^d Fisher's exact test

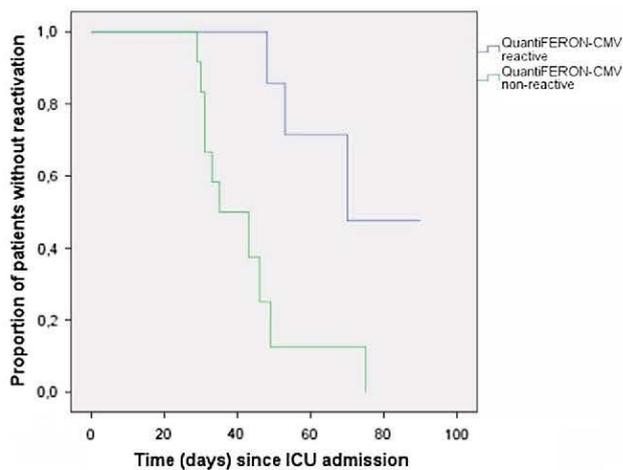


Fig. 3 Comparative analysis using Kaplan–Meier curves of the estimated survival free of cytomegalovirus reactivation in QuantiFERON-CMV reactive patients (*blue line*) and in QuantiFERON-CMV non-reactive patients (*green line*) (Log rank test $p = 0.004$)

Discussion

The results of this prospective observational study show that the determination of IFN γ production by CMV-specific CD8+ T lymphocytes using the QuantiFERON-CMV test at admission in ICU is a good marker for identifying the risk of CMV reactivation in critically ill non-immunosuppressed patients.

The main utility of QuantiFERON-CMV® in these patients is its high negative predictive value as patients with QuantiFERON-CMV® reactive show protection against CMV reactivation. The administration of prophylaxis is therefore not recommended in these patients, thus preventing the effects of exposure to antiviral drugs (adverse reactions, resistance) [18].

In our study, only 10 of the 27 (37 %) QuantiFERON-CMV non-reactive patients presented CMV reactivation. Given this low positive predictive value, the QuantiFERON-CMV non-reactive result would not be adequate for identifying patients who may develop subsequent reactivation as 63 % of the QuantiFERON-CMV non-reactive patients would receive prophylaxis unnecessarily. Therefore, the QuantiFERON-CMV non-reactive result would be useful to select a population in which monitoring for early detection and treatment of CMV reactivation (pre-emptive therapy) during their stay in the ICU would be a better strategy than universal prophylaxis.

The potential usefulness of evaluating the function of CMV-specific T cells using the QuantiFERON-CMV test has been demonstrated in both hematopoietic progenitor and solid organ transplant recipients [13, 15, 19]. Cantisán et al. reported that the decreased production of IFN γ by CMV-specific CD8+ T lymphocytes has been shown

to predict CMV reactivation in both the pre-transplant and post-transplant periods [13].

At present, data on the functionality of CMV-specific T lymphocytes in critically ill patients are scarce and present contradictory results. Two previous studies reported no differences in terms of the functionality of CMV-specific T cells in patients with and without CMV reactivation [20, 21]. Subsequently, the results of one study of cases and controls, which included 31 patients subjected to mechanical ventilation, showed how decreased levels of IFN γ -producing CMV-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes were associated with the presence of active CMV infection or increased risk of subsequent viral reactivation, although the absence of multivariate analysis does not rule out the possible existence of confounding factors [22].

Studies conducted so far show that although it may be variable, the mean incidence of CMV reactivation in critically ill patients is 25 % [9]. This variability in the incidence of reactivation may be due to differences in the type of population and the technique and frequency of viral monitoring employed. In our series, an incidence of CMV reactivation of 24.5 % was found, which is similar to the level reported previously [6, 11, 23]. Similarly, the median time of onset of viremia in our study was 14 days, which is similar to that reported in previous studies using PCR in viral monitoring [6]. Our results show that although reactivation is more frequent in QuantiFERON-CMV non-reactive, no differences were found in the timing of onset, duration, and magnitude of viremia. A study with a larger sample would probably reveal differences in these aspects.

As a result of the limited number of patients in the study, the multivariate analysis included only three risk factors (age, diabetes mellitus, and SAPS II score) in addition to the QuantiFERON-CMV. Numerous studies have shown the influence of age on immune response to CMV [24, 25], although our study did not find age to be associated with increased risk of CMV reactivation. In a similar manner, although diabetes mellitus has been associated with increased risk of infections and sepsis [26, 27], it was not associated with increased risk of CMV reactivation in our study. Moreover, in line with previously published data [6], this study found no association between severity of illness (as assessed by the SAPS II score) and CMV reactivation, thus decreasing the likelihood of CMV reactivation being an intermediate marker of disease severity.

In our study, the mortality rate was significantly higher in patients who developed CMV reactivation compared to those who did not. However, because of the small sample size (only 6 of the 13 patients with replication died), we did not perform a multivariate analysis to verify the joint influence of other potential risk factors. Studies evaluating the influence of CMV reactivation on the mortality of critically ill patients have reported contradictory results

[5, 7]. This may be because these studies include different populations with different degrees of severity and different strategies for monitoring CMV reactivation. A placebo-controlled clinical trial of antiviral prophylaxis would have to be conducted in order to determine the real influence of CMV reactivation on mortality in this population.

Our study has some strengths, among them the prospective design, the use of a robust PCR-based method to detect CMV reactivation, the evaluation of immune function using a standardized method, and the inclusion of representative patients in a general ICU setting.

Our study also has certain limitations. The main limitation is the small size of the sample studied, which does not allow definitive conclusions to be drawn regarding the existence of differences in the kinetics of viral reactivation based on the results of the QuantiFERON-CMV test. Another limitation is that the sample size does not allow one to perform an adequate assessment of the possible role of clinical variables on CMV reactivation. On the other hand, we do not know the value of QuantiFERON-CMV immediately before CMV reactivation because the QuantiFERON-CMV test was performed at admission. However, our objective is to identify patients according to their risk of reactivation at the time of admission to the ICU, and on the other hand, we cannot know the moment at which viral reactivation will occur.

Conclusions

This study shows that patients with functional CD8+ T lymphocyte response to CMV at ICU admission are protected against CMV reactivation, thus demonstrating that the use of prevention strategies (universal prophylaxis or pre-emptive therapy) should not be indicated in this group of patients. In patients lacking this specific response the monitoring of CMV viral load for the detection and early treatment of the virus can be an alternative to prophylaxis.

Acknowledgments This work was supported by Plan Nacional de I+D+I 2008–2011 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015) co-financed by European Development Regional Fund “A way to achieve Europe” ERDF, Spanish Ministry of Science and Innovation and the Carlos III Health Institute (Grant Number FIS PI11/01236 to JJC and FIS PI11/02091 to JTC).

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest The authors do not have any financial relationship with the organization that sponsored the research. The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danzinger-Isakov et al (2013) Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 96:333–360
- Humar A, Snyderman D (2009) Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 9(Suppl 4):S78–S86
- Boeckh M, Nichols WG, Chemaly RF, Papanicolaou GA, Wingard JR, Xie H et al (2015) Valganciclovir for the prevention of complications of late cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a randomized trial. *Ann Intern Med* 162:1–10
- Kalil AC, Florescu DF (2009) Prevalence and mortality associated with cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in the intensive care unit. *Crit Care Med* 37:2350–2358
- Heininger A, Haeberle H, Fischer I, Beck R, Riessen R, Rohde F et al (2011) Cytomegalovirus reactivation and associated outcome of critically ill patients with severe sepsis. *Crit Care* 15:R77
- Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM, Neff MJ et al (2008) Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA* 300:413–422
- Frantzeskaki FG, Karampi ES, Kottaridi C, Alepaki M, Routsis C, Tzanela M et al (2015) Cytomegalovirus reactivation in a general, nonimmunosuppressed intensive care unit population: incidence, risk factors, associations with organ dysfunction, and inflammatory biomarkers. *J Crit Care* 30:276–281
- Chiche L, Forel JM, Roch A, Guervilly C, Pauly V, Allardet-Servent J et al (2009) Active cytomegalovirus infection is common in mechanically ventilated medical intensive care unit patients. *Crit Care Med* 37:1850–1857
- Osawa R, Singh N (2009) Cytomegalovirus infection in critically ill patients: a systematic review. *Crit Care* 13:R68
- Florescu DF, Kalil AC (2012) Can we predict cytomegalovirus reactivation in critically ill patients? *Crit Care Med* 40:3313–3314
- Chiche L, Forel JM, Thomas G, Famarier C, Cognet C, Guervilly C et al (2012) Interferon-gamma production by natural killer cells and cytomegalovirus in critically ill patients. *Crit Care Med* 40:3162–3169
- Crough T, Khanna R (2009) Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* 22:76–98
- Cantisán S, Lara R, Montejo M, Redel J, Rodriguez-Bernot A, Gutierrez-Aroca J et al (2013) Pretransplant interferon-gamma secretion by CMV-specific CD8+ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am J Transplant* 13:738–745

14. Nebbia G, Mattes FM, Smith C, Hainsworth E, Kopycinski J, Burroughs A et al (2008) Polyfunctional cytomegalovirus-specific CD4+ and pp65 CD8+ T cells protect against high-level replication after liver transplantation. *Am J Transplant* 8:2590–2599
15. Mattes FM, Vargas A, Kopycinski J, Hainsworth EG, Sweny P, Nebbia G et al (2008) Functional impairment of cytomegalovirus specific CD8 T cells predicts high-level replication after renal transplantation. *Am J Transplant* 8:990–999
16. Fleming T, Dunne J, Crowley B (2010) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8(+) T-cell responses using the QuantiFERON-CMV assay in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients attending an Irish hospital. *J Med Virol* 82:433–440
17. Forel JM, Martín-Loeches I, Luyt CE (2014) Treating HSV and CMV reactivations in critically ill patients who are not immunocompromised: pro. *Intensive Care Med* 40:1945–1949
18. Chanques G, Jaber S (2014) Treating HSV and CMV reactivations in critically ill patients who are not immunocompromised: con. *Intensive Care Med* 40:1950–1953
19. Tey SK, Kennedy GA, Cromer D, Davenport MP, Walker S, Jones LI et al (2013) Clinical assessment of anti-viral CD8+ T cell immune monitoring using QuantiFERON-CMV® assay to identify high risk allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients with CMV infection complications. *PLoS One* 8:e74744
20. von Muller L, Klemm A, Durmus N, Weiss M, Suger-Wiedeck H, Schneider M et al (2007) Cellular immunity and active human cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *J Infect Dis* 196:1288–1295
21. Chilet M, Aguilar G, Benet I, Belda J, Tormo N, Carbonell JA et al (2010) Virological and immunological features of active cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in a surgical and trauma intensive care unit. *J Med Virol* 82:1384–1391
22. Navarro D (2010) Active cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in the ICU. *Chest* 140:269–270
23. Ong DS, Klein Klouwenberg PM, Verduyn Lunel FM, Spitoni C, Frencken HA et al (2015) Cytomegalovirus seroprevalence as a risk factor for poor outcome in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 43:394–400
24. Linton PJ, Dorshkind K (2004) Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5:133–139
25. Weinberger B, Lazuardi L, Weiskirchner I, Keller M, Neuner C, Fischer KH et al (2007) Healthy aging and latent infection with CMV lead to distinct changes in CD8+ and CD4+ T-cell subsets in the elderly. *Hum Immunol* 68:86–90
26. Muller LM, Gorter KJ, Hak E, Goudzwaard WL, Schellevis FG, Hoepelman AI et al (2005) Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Infect Dis* 41:281–288
27. Shah BR, Hux JE (2003) Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. *Diabetes Care* 26:510–513

ANEXO II: Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

El citomegalovirus es un virus que se encuentra presente en la mayoría de las personas de forma latente, es decir, sin producir enfermedad alguna. Sin embargo, en ocasiones este virus puede reactivarse dando lugar a infecciones pulmonares, intestinales, inflamación hepática o simplemente fiebre. Existen estudios que demuestran que esta reactivación se produce fundamentalmente en personas que presentan algún grado de inmunodepresión como los pacientes trasplantados o aquellos que toman fármacos que disminuyen las defensas para otro tipo de enfermedades. En estos pacientes está demostrado que el tratamiento de la reactivación de este virus es beneficioso para los pacientes.

Actualmente se están estudiando otros pacientes en los que podría presentarse una reactivación de citomegalovirus. Entre estos pacientes se encuentran aquellos que ingresan en Unidades de Cuidados Intensivos, en los cuales diversos estudios plantean la posibilidad de que esto ocurra, aunque el conocimiento a este respecto es todavía muy escaso.

Por eso queremos realizar un estudio para comprobar si los pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos presentan riesgo de reactivación del virus. Concretamente queremos comprobar si los pacientes que tengan un determinado tipo de células de defensa frente a las infecciones, presentan mayor riesgo de reactivación. Para ello necesitamos la extracción de algunas muestras de sangre de forma similar a cuando se le realiza una analítica. Estas muestras se tratarán de forma estrictamente confidencial, sin que en ningún caso aparezca su nombre o algún dato que pueda identificarle.

Apreciado/a Sr/a

Ha sido Usted invitado a participar en un estudio de investigación que lleva por título "Estudio de la frecuencia, fenotipo y función de los linfocitos T CD8 CMV específicos como factor de riesgo de replicación de citomegalovirus en pacientes críticos".

Este estudio será llevado a cabo en los hospitales General de Ciudad Real y Reina Sofía de Córdoba por los investigadores D. Juan José Castón Osorio, Dr. Alfonso Ambrós, Dra. Lourdes Porras, Dra. María Luisa Gómez, Dr. José Martínez y Dr. Francisco González

Antes de confirmar su participación en este estudio de investigación es importante que entienda en qué consiste. Por favor, lea detenidamente este documento y haga todas las preguntas que le puedan surgir.

Objetivo del estudio

- 1) Estudiar si el nivel de producción de IFN-gamma se asocia con el riesgo de replicación de CMV en pacientes críticos.
- 2) Determinar la incidencia de replicación de CMV en pacientes críticos
- 3) Estudiar factores de riesgo clínicos de replicación de CMV en pacientes críticos.
- 4) Estudiar factores pronósticos de los pacientes críticos que presentan replicación de CMV

Participación voluntaria

Usted es completamente libre de elegir participar o no en el estudio. Su decisión no influirá en su atención médica.

Procedimientos del estudio

El médico investigador valorará si es usted un candidato adecuado para el estudio, esta valoración se basa en factores clínicos y en resultados analíticos. Una vez que haya otorgado su consentimiento y el médico investigador haya verificado que cumple los criterios para participar, se le realizarán análisis de sangre con objeto del estudio

en el que analizarán los niveles de carga viral de citomegalovirus. Estas muestras serán codificadas y almacenadas de forma que se garantice absolutamente la confidencialidad en la procedencia de las mismas.

Riesgos e inconvenientes

Su participación en el estudio no implica la realización de exploraciones invasivas ni medidas terapéuticas no habituales para su tratamiento y control.

Confidencialidad

Si usted accede a colaborar en este estudio, debe saber que serán utilizados algunos datos sobre su salud los cuales serán incorporados a una base de datos informatizada sin su nombre.

Sus datos serán objeto de un tratamiento disociado, vinculándose a un código, de modo que la información que se obtenga no pueda asociarse a persona identificada o identificable. Todos sus datos se mantendrán estrictamente confidenciales y sólo el equipo investigador conocerá su identidad. Ningún dato personal que permita su identificación será accesible a ninguna persona que no forme parte del equipo investigador, ni podrán ser divulgados por ningún medio, conservando en todo momento la confidencialidad médico-paciente (Ley Orgánica de Protección de Datos 15/1999).

Preguntas/ Información

Si desea hacer alguna pregunta o aclarar algún tema relacionado con el estudio, no dude en ponerse en contacto con:

Dr.Teléfono:.....

El equipo investigador le agradece su inestimable colaboración.

Yo,.....

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con los médicos responsables del estudio.
- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:
 - 1.º Cuando quiera.
 - 2.º Sin tener que dar explicaciones.
 - 3.º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma

En _____, a __ de _____ de 201_.

ANEXO III: Hoja de recogida de datos

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS CITOCRIT

Paciente Número

NHC: _____ Hospital: _____ Edad: _____ años Sexo: Hombre / Mujer

Procedencia basal: Domicilio / Institucionalizado / _____

Fecha de ingreso Hospital: _____ Servicio de Ingreso Hospital: _____

Fecha de Ingreso UCI: _____

Tipo de Ingreso: Médico/Quirúrgico/Traumatológico

Tipo de Cirugía: Urgente /Programada

General/Urológica/Ginecológica/Obstétrica/Neuroquirúrgica/ORL/Maxilofacial/Otra _____

Antecedentes Personales

- Diabetes mellitus 1. No 2. Sí
- Neoplasia sólida 1. No 2. Sí
- Neoplasia hematológica 1. No 2. Sí
- Neutropenia (Neut<500/ml) 1. No ... 2. Sí
- Cirrosis hepática 1. No ... 2. Sí
- Corticoides(≥10 mg predn/d) 1. No ... 2. Sí

Complicaciones durante el ingreso

- Transfusiones de hemoderivados (primeras 48 horas) 1.No 2.Sí
- Ventilación mecánica 1.No 2.Sí.....Días _____
- Desarrollo de hepatitis (x5 valor transaminasas normal) 1.No 2.Sí
- Fracaso renal (Cr>1,4 mg/dl o aumento mayor 50% basal) 1.No 2.Sí
- Hemodiálisis 1.No 2.Sí
- Hemofiltración 1.No 2.Sí
- Bacteriemia..... 1.No 2.Sí
- NAVM 1.No 2.Sí

Factores relacionados con el CMV:

- Tiempo desde ingreso en UCI hasta replicación CMV _____ días
- Carga viral inicial CMV _____ copias. Días hasta replicación: _____
- Carga viral máxima CMV _____ copias
- Duración de viremia CMV _____ días
- Manifestaciones replicación viral
 - Sd viral 1.No 2.Sí
 - Fiebre (T³≥38°C) durante al menos 2 días en un periodo de 4 días Y leucopenia, trombocitopenia o elevación de transaminasas Y PCR positiva para CMV
 - Afectación visceral..... 1.No 2.Sí
 - Presencia de signos o síntomas del órgano afectado no explicables por otra causa Y PCR positiva para CMV.

Resultado:

- Tiempo de ingreso en UCI: _____ días
- Tiempo de hospitalización total: _____ días
- Exitus: 1.No 2.Sí
- Tiempo desde primera replicación hasta exitus: _____ días

CHECK LIST CITOCRIT

Paciente número:

Iniciales: _____ NHC: _____

Número de Estudio:

- Firma de Consentimiento informado
- Serología CMV Ig G+ IgM - al ingreso
- Determinación APACHE II 24 h Ingreso UCI:
- Determinación SOFA 24 h Ingreso UCI: _____
- Determinación SAPS-II 24 h Ingreso UCI: _____
- Extracción Quantiferon CMV (fecha) _____
- Extracción Linfocitos (fecha) _____

Semana UCI	Carga Viral CMV		Bacteriemia	NAVM
	Lunes	Jueves		
Semana 1				
Semana 2				
Semana 3				
Semana 4				
Semana 5				
Semana 6				
Semana 7				
Semana 8				
Semana 9				
Semana 10				
Semana 11				
Semana 12				
Semana 13				
Semana 14				
Semana 15				
Semana 16				
Semana 17				

- Fecha de alta de UCI: _____
- Fecha de alta hospitalaria: _____