



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

“EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DE  
LAS MUESTRAS DE SALIVA PARA EL  
DIAGNÓSTICO DE LA REACTIVACIÓN  
Y MONITOREO DE LA INFECCIÓN POR  
CITOMEGALOVIRUS EN PACIENTES  
DE LAS UNIDADES DE TRASPLANTE  
DEL INSN-SB”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

PAULINE ESTER MAMANÍ CAJACHAGUA

LIMA - PERÚ

2023



**ASESOR:**

Dr. Holger Maita Malpartida

**JURADO DE TESIS**

Dra. Manuela Renee Verastegui Pimentel

PRESIDENTE

Dra. Patricia Sheen Cortavarria

VOCAL

Mg. Ruth Liliana Cristobal Delgado

SECRETARIA

## **DEDICATORIA**

A mi familia, César, Gladys y Nabhí

Ustedes son mi fuerza y mi inspiración

## **AGRADECIMIENTO**

A mis padres, César y Gladys, por su apoyo incondicional y por motivarme a perseguir mis sueños.

A mi hermano Nabhí por estar siempre conmigo, incluso en las amanecidas.

Agradezco a mi asesor, el Dr. Holger Maita, por su confianza, por la oportunidad y por sus lecciones.

Agradezco también a la Mag. Alejandra Pando, por su guía, por sus enseñanzas y por acompañarme cuando más lo necesitaba.

A Alejandra Ingunza, por su apoyo y sus enseñanzas en el laboratorio.

**FUENTE DE FINANCIAMIENTO:**

El presente trabajo fue financiado por PROCENCIA - CONCYTEC en el marco de la convocatoria Proyecto Investigación Básica, 2018-01 [Convenio N° 107-2018-FONDECYT]

# EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DE LAS MUESTRAS DE SALIVA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA REACTIVACIÓN Y MONITOREO DE LA INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS EN PACIENTES DE LAS UNIDADES DE TRASPLANTE DEL INSN-SB

## INFORME DE ORIGINALIDAD



## FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional Mayor de San Marcos Trabajo del estudiante	1%
2	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	<1%
3	biblioteca.usac.edu.gt Fuente de Internet	<1%
4	Herlinda Reyes-Pérez, José Luis Sánchez-Huerta, Gustavo Varela-Fascinetto, José Carlos Romo-Vázquez et al. "Correlation between viral load of cytomegalovirus and tacrolimus and sirolimus levels in transplanted pediatric patients", Boletín Médico del Hospital Infantil de México, 2016 Publicación	<1%
5	addi.ehu.es Fuente de Internet	<1%



# TABLA DE CONTENIDOS

**Resumen**

**Abstract**

<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>4</b>
<b>1.2.</b>	<b>Planteamiento del problema</b>	<b>8</b>
<b>1.3.</b>	<b>Justificación</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>Marco teórico</b>	<b>12</b>
<b>2.1.</b>	<b>Citomegalovirus</b>	<b>11</b>
<b>2.2.</b>	<b>Vías de transmisión y patogénesis</b>	<b>13</b>
<b>2.3.</b>	<b>Epidemiología</b>	<b>16</b>
<b>2.4.</b>	<b>Diagnóstico de la infección</b>	<b>17</b>
<b>2.5.</b>	<b>Muestras clínicas empleadas en el diagnóstico de la infección</b>	<b>20</b>
<b>3.</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>22</b>
<b>4.</b>	<b>Objetivos</b>	<b>23</b>
<b>4.1.</b>	<b>Objetivo general</b>	<b>23</b>
<b>4.2.</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>23</b>
<b>5.</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>24</b>
<b>5.1.</b>	<b>Diseño del estudio</b>	<b>23</b>
<b>5.2.</b>	<b>Criterios de inclusión</b>	<b>25</b>
<b>5.3.</b>	<b>Enrolamiento de pacientes y recolección de muestras</b>	<b>26</b>
<b>5.4.</b>	<b>Muestras biológicas</b>	<b>26</b>
<b>5.5.</b>	<b>Procedimientos y técnicas</b>	<b>28</b>

5.5.1.	Extracción del ADN	28
5.5.2.	Amplificación mediante PCR en tiempo real.	29
5.6.	Consideraciones éticas	30
5.7.	Análisis de datos	30
6.	Resultados	32
6.1.	Población de estudio	32
6.2.	Frecuencia de casos positivos para CMV y distribución de la carga viral	35 37
6.3.	Cinética de la carga viral en las muestras de sangre y saliva	37
6.4.	Correlación y concordancia de la carga viral en muestras de sangre y saliva	40
7.	Discusión	43
8.	Conclusión	50
9.	Recomendaciones	52
10.	Referencias bibliográficas	53
11.	Anexos	67

## RESUMEN

La infección por citomegalovirus es una de las complicaciones postoperatorias más frecuentes en individuos sometidos a trasplantes de órganos sólidos o de células madre hematopoyéticas. Esta infección es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad entre estos pacientes.

El diagnóstico de la infección por citomegalovirus se realiza mediante técnicas moleculares a partir de muestras de sangre. Sin embargo, el uso de muestras de saliva ha demostrado una sensibilidad significativamente mayor en comparación con las muestras de sangre. Además, las muestras de saliva constituyen una alternativa diagnóstica no invasiva de fácil recolección. A pesar de estas ventajas, hasta el momento no se ha evaluado si la detección de partículas virales en saliva representa un indicador temprano de la infección o reactivación, y menos aún, si puede ser empleada para el seguimiento de la infección post trasplante.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la utilidad de las muestras de saliva en el diagnóstico de la reactivación de la infección por citomegalovirus. Para tal fin se analizaron muestras de saliva líquida, saliva recolectada empleando un hisopo y sangre total empleando el kit comercial GeneProof Cytomegalovirus (CMV) PCR. La frecuencia de casos positivos para CMV fue de 12,6 %, 15,3 % y 12,1 % en sangre, saliva líquida y saliva recolectada con hisopos, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la carga viral entre los 3 tipos de muestra. Se observó una correlación moderada entre la carga viral en saliva líquida y la saliva recolectada con hisopo ( $r = 0,3849$ ,  $P = 0,0129$ ). De manera similar, se observó un buen nivel de concordancia entre los casos positivos de estas muestras (73,17 %,  $P = 0,0564$ ).

Los hallazgos de este estudio sugieren que la saliva podría ser una herramienta de diagnóstico útil para detectar y monitorear la reactivación de CMV en pacientes trasplantados, particularmente niños, debido a su proceso de recolección simple y no invasivo.

**Palabras clave:** Citomegalovirus, Saliva, qPCR, trasplante

## **ABSTRACT**

Cytomegalovirus infection is one of the most common postoperative complications in patients undergoing solid organ or hematopoietic stem cell transplants. This infection is one of the main causes of morbidity and mortality among these patients.

The diagnosis of cytomegalovirus infection is performed using molecular techniques from blood samples. However, the use of saliva samples has shown significantly higher sensitivity compared to blood samples. In addition, saliva samples are easy to collect and are a non-invasive diagnostic alternative. Despite these advantages, to date it has not been evaluated whether the detection of viral particles in saliva represents an early indicator of infection or reactivation, and even less so, whether it can be used to monitor post-transplant infection.

This study aimed to evaluate the usefulness of saliva samples in the diagnosis of reactivation of CMV infection. For this purpose, samples of liquid saliva, swab-collected saliva, and whole blood were analyzed using the commercial GeneProof Cytomegalovirus kit (CMV) PCR. The frequency of CMV-positive cases was 12.6%, 15.3%, and 12.1% in blood, liquid saliva, and swab-collected saliva, respectively. No significant differences in viral load were observed between the 3 sample types. A moderate correlation was observed between viral load in liquid saliva and swab-collected saliva ( $r = 0.3849$ ,  $P = 0.0129$ ). Similarly, a fair level of agreement was observed when positive rates were correlated between these samples (73.17%,  $P = 0.0564$ ).

The findings of this study suggest that saliva could be a useful diagnostic tool to detect and monitor CMV reactivation in transplant patients, particularly children, due to its simple and non-invasive collection process.

**Keywords:** Cytomegalovirus, Saliva, qPCR, transplant

## 1. INTRODUCCIÓN

Citomegalovirus humano (CMV) es un  $\beta$ -herpesvirus cuya prevalencia varía entre el 60% y 100% en la población adulta mundial (1). En las personas inmunocompetentes, la mayoría de las infecciones agudas son asintomáticas (2). En individuos inmunocomprometidos, como los receptores de trasplantes de órganos sólidos (SOT) o células madre hematopoyéticas (HSCT), CMV puede causar enfermedad grave, contribuir al riesgo de rechazo del injerto, enfermedades cardiovasculares, infecciones secundarias bacterianas y fúngicas, e incluso, la muerte del paciente (3).

Las infecciones sintomáticas por CMV se producen en el 20 - 60 % de los receptores de trasplantes, y su aparición depende de diversos factores incluyendo el estado serológico del receptor y el donante, el tipo de órgano trasplantado, el grado de inmunosupresión y el uso de profilaxis antiviral (4). En los pacientes con SOT, el riesgo por la infección por CMV aumenta si el receptor es seronegativo y el donante es seropositivo. Si el paciente y el donante son seropositivos, el riesgo es intermedio; mientras que, si el receptor y el donante son seronegativos, el riesgo es mínimo (5,6). Esto se debe a que la reactivación de CMV, mecanismo por el cual un virus latente que ha infectado una célula huésped reinicia la replicación lítica, podría ocasionar coinfección con otros virus, traumatismo nervioso, inmunosupresión y cambios tanto fisiológicos como físicos (7). Es por esta razón que es importante el monitoreo rutinario de los pacientes post-trasplantados, a fin de evitar futuras complicaciones, como la pérdida del injerto.

Los métodos de diagnóstico para CMV han evolucionado considerablemente, considerándose al cultivo como el *gold standard*. Sin embargo, el cultivo de tejidos puede durar semanas y es menos sensible en comparación con los ensayos moleculares (8). Uno de los primeros métodos de diagnóstico de CMV fue la histopatología; sin embargo, este enfoque está limitado por el hecho de que se requiere un procedimiento invasivo para obtener las muestras a ser analizadas (9). Actualmente se utilizan los ensayos serológicos, que son de gran importancia para determinar el riesgo clínico en el momento del trasplante y para determinar si un paciente tuvo la infección en el pasado (10); no obstante, estos ensayos tienen una utilidad clínica limitada en la etapa post-trasplante y es recomendable no utilizarlos para diagnosticar enfermedades agudas en pacientes con SOT (11).

Las pruebas de diagnóstico molecular pueden detectar ADN o ARN de forma cualitativa o cuantitativa. La mayoría de estas pruebas son bastante sensibles para la detección de CMV; siendo la más usada la prueba de PCR, que utiliza como muestra plasma o sangre completa (12). Además, la cuantificación de la carga viral en CMV realizada mediante PCR cuantitativo (qPCR) es el método de diagnóstico idóneo para evaluar la replicación viral; el resultado facilita tomar una mejor decisión sobre un posible tratamiento preventivo y brinda información de la respuesta al tratamiento (13,14). Asimismo, la prueba de qPCR brinda conocimiento de la carga viral y esto es importante debido a que se ha demostrado que los valores de carga viral más altos están directamente relacionados a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (15).



La cuantificación de la carga viral se puede realizar utilizando plasma, sangre total, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo, lavado broncoalveolar o muestras de biopsia de tejido. Sin embargo, la sensibilidad de la técnica en muestras de sangre es baja (~ 35 - 79 %), en comparación con el uso de saliva u orina (93 - 100 %) (16–18). Para el diagnóstico de la infección congénita de CMV, tanto la saliva como la orina son muestras ideales para el diagnóstico de CMV (12); sin embargo, las muestras de saliva contienen mayor carga viral que la orina, y son más fáciles de recolectar. A pesar de las ventajas mostradas del empleo de muestras de saliva frente a otras muestras clínicas, su uso ha sido pobremente evaluado para la detección en los procesos de reactivación de las infecciones por CMV o para el monitoreo de la progresión de esta infección en poblaciones inmunosuprimidas. Algunos factores que contribuyen a que las muestras de saliva no sean ampliamente empleadas para la determinación y monitoreo de la reactivación de la enfermedad por CMV, posiblemente sean: la incapacidad de determinar el momento exacto en que se inicia la reactivación en individuos naturalmente inmunosuprimidos y el poco acceso a poblaciones inmunosuprimidas como parte de un tratamiento, como, por ejemplo, las poblaciones sometidas a trasplante.

En el presente estudio se evaluó la utilidad de las muestras de saliva, mediante el uso de la prueba de qPCR, para la detección de la reactivación del virus y el monitoreo de la carga viral en los pacientes pediátricos sometidos a trasplante de células madre hematopoyéticas y trasplante de

órganos sólidos del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja en Lima-Perú.

## 1.1. ANTECEDENTES

Las muestras de saliva presentan mayor sensibilidad para el diagnóstico de CMV, es por ello que, en recién nacidos, la detección molecular de CMV en muestras de saliva es considerada la prueba recomendada para el diagnóstico de transmisión congénita de la infección, seguida de pruebas moleculares en orina para la confirmación de la infección (19).

En el año 2006, Yamamoto *et al.*, realizaron un estudio de comparación de las muestras de saliva y orina, con el fin de evaluar la utilidad de la saliva de los recién nacidos para el diagnóstico de CMV congénito utilizando PCR convencional. Encontraron un 99,7% de acuerdo entre los resultados con ambas muestras, por lo que concluyeron que tanto la orina como la saliva son muestras confiables para la detección de citomegalovirus neonatal mediante PCR (20).

En el año 2011, Bopanna *et al.*, realizaron un estudio prospectivo en una población de 34,989 neonatos, comparando la sensibilidad del qPCR en muestras de saliva líquida y saliva seca frente al *gold standard* de cultivo rápido. El resultado mostró una alta sensibilidad y especificidad de la prueba de qPCR para detectar la infección por

CMV con muestras de saliva. La sensibilidad en saliva líquida fue de 100% y en saliva seca de 97,4 %; por lo tanto, concluyeron que se debería considerar el empleo de muestras de saliva para la detección de CMV (21).

En el año 2014, Ross *et al.*, compararon los resultados obtenidos mediante las pruebas de cultivo rápido y el análisis qPCR en muestras de orina y saliva de 80 niños, con el fin de determinar la utilidad clínica del ensayo de qPCR para el diagnóstico de la infección congénita por CMV. Los resultados de la PCR y el cultivo de saliva fueron concordantes en 78 muestras (97,5 %), mientras que en muestras de orina se observó 76 muestras concordantes (96,3 %) (22).

En el año 2015, Cardoso *et al.*, compararon la sensibilidad del qPCR en muestras de saliva frente a la prueba estándar de qPCR en muestras de orina (*gold standard*) en una población de 1000 nacidos. Hallaron que la sensibilidad del qPCR en saliva era de 80 %, concluyendo que esta muestra, al igual que la orina, es viable para el diagnóstico de infecciones congénitas por CMV (23).

La reactivación del virus en individuos trasplantados se define en base a la presencia de ADNemia en muestras de sangre. Los estudios en los que se evalúa la utilidad de la saliva para medir reactivación son escasos, habiéndose reportado un único estudio en individuos pediátricos sometidos a HSCT que fueron monitoreados hasta 32

semanas luego del procedimiento mediante PCR en suero y saliva (24).

Existen pocos reportes con referencia a la evaluación de las pruebas moleculares y la utilidad de las muestras de saliva para el diagnóstico de la infección por CMV en receptores pediátricos de trasplante de órganos sólidos o células hematopoyéticas. A pesar de ello, los estudios encontrados se basan en el diagnóstico pretrasplante, mas no en el diagnóstico de CMV en pacientes post-trasplante. En el caso de pacientes receptores adultos, el uso de saliva para el diagnóstico de CMV ha sido documentado en diversas publicaciones científicas.

En 2003, Rhinow *et al.*, realizaron un estudio de pacientes con el objetivo de detectar CMV y cuantificar la carga viral en muestras de saliva de pacientes con trasplante alogénico de médula ósea y células madre mediante qPCR. Para tal objetivo, se realizó un diagnóstico serológico de IgG anti-CMV y se extrajo muestras de saliva de los 20 pacientes trasplantados y de sus donantes. Utilizando la técnica de qPCR se logró detectar ADN de CMV en 7 de los 11 pacientes seropositivos, de los cuales 4 tuvieron donadores seropositivos y 3 seronegativos. No se observó amplificación de ADN en los receptores seronegativos que recibieron trasplantes provenientes de donantes seronegativos o seropositivos. Se concluyó que el qPCR en saliva es un método confiable para la cuantificación del ADN de CMV, además se observó que el riesgo de reactivación del CMV es más probable que el riesgo de reinfección (25).

Nowzari *et al.* 2003, realizaron un estudio en una población de 38 receptores de trasplante renal con el propósito de determinar la replicación activa del CMV en la saliva y el líquido crevicular gingival de pacientes con trasplante renal afectados por periodontitis. Se detectaron transcripciones del gen pp67 en muestras de saliva del 21 % de los pacientes. También se observó que el 100% de los pacientes diagnosticados con muestras de saliva presentaron manifestaciones clínicas de infección viral (26). Se concluyó que la detección del virus en saliva es indicador de infección activa, y que la presencia de periodontitis asociada por CMV está vinculada al desarrollo de complicaciones post-trasplante.

En el año 2007, Correia-Silva *et al.*, evaluaron el efecto del trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas en la excreción de CMV en muestras saliva utilizando la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR anidada). Se analizaron muestras de hisopado de saliva de 124 pacientes con HSCT y 124 voluntarios sanos. Ninguna muestra de los voluntarios fue positiva para CMV; sin embargo, 7,2 % de los pacientes fueron positivos para CMV en la etapa pretrasplante, 45,2 % de los pacientes fueron positivos posterior a los 100 días de trasplante, y 17,5 % fueron positivos 1 año después del trasplante. Lo que demostró que la diseminación oral de CMV ocurre después del trasplante, especialmente después de los 100 días (27).

Los reportes en el Perú están limitados a estudios de individuos adultos con trasplante, infección durante el embarazo, enfermedad no infecciosa, e individuos inmunosuprimidos (28–36). No se han reportado estudios en poblaciones pediátricas, menos aún de seguimiento del curso de infección o reactivación de la infección en poblaciones pediátricas sometidas a HSCT y SOT.

## **1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

CMV es el agente infeccioso más importante asociado a una morbilidad y mortalidad significativa después del trasplante de órganos sólidos o células madre hematopoyéticas sobre todo en poblaciones infantiles. Aunque el *gold standard* para el diagnóstico de las infecciones por CMV es el cultivo; actualmente el diagnóstico y monitoreo de las infecciones causadas por herpesvirus en general se basa en el uso de herramientas de biología molecular.

La prueba de PCR cuantitativo (qPCR) empleando ya sea muestras de sangre total o plasma sanguíneo es el método más empleado para el diagnóstico y monitoreo de las infecciones por CMV. Sin embargo, el uso de sangre y sus derivados como muestra para el qPCR presenta muchas limitaciones, siendo las más importantes el carácter invasivo de la toma de muestra, y la pobre sensibilidad mostrada por el qPCR. Las muestras de saliva presentan mayor sensibilidad para el diagnóstico de CMV, es por ello que, en recién

nacidos, la detección molecular de CMV en muestras de saliva es considerada la prueba recomendada para el diagnóstico de transmisión congénita de la infección, seguida de pruebas moleculares en orina para la confirmación de la infección.

A pesar de la alta sensibilidad mostrada por las muestras de saliva frente a las muestras de sangre, el uso de las muestras de saliva ha sido pobremente evaluada en los procesos de reactivación de las infecciones por CMV o en el monitoreo de la progresión de estas infecciones en poblaciones inmunosuprimidas como son los individuos sometidos a trasplante, sobre todo en poblaciones infantiles sometidas a este proceso.

Por tanto, el presente estudio pretendió responder a la pregunta ¿El uso de muestras de saliva para la prueba de qPCR es adecuado para la detección de la reactivación y el monitoreo de la infección causada por CMV en poblaciones infantiles sometidas a trasplante?

### **1.3. JUSTIFICACIÓN**

En los países en desarrollo, aproximadamente el 90 % de las personas han sido infectadas con CMV, por lo tanto, se puede suponer que prácticamente todos los donantes y receptores de trasplantes serán positivos para este virus (37). Esta situación es clínicamente relevante, ya que es muy probable que se dé la reactivación de una infección latente debido al tratamiento de

inmunosupresión al que son sometidos los pacientes trasplantados. El diagnóstico rápido y sencillo de la infección por CMV es esencial ya que permiten la administración del tratamiento durante la fase presintomática, a fin de reducir en gran medida la alta morbilidad y mortalidad después del trasplante de órganos sólidos o células madre hematopoyéticas. La detección y administración del tratamiento oportuno de la infección permite disminuir la mortalidad incluso frente a la administración de un tratamiento profiláctico, de 19% a 14% ( $p < 0.05$ ) (38). Así mismo, la detección temprana de la reactivación de la infección por CMV y el monitoreo del tratamiento a fin de prevenir la progresión de la enfermedad reduciría grandemente el costo asociado al manejo de pacientes dentro de los programas de trasplante a nivel mundial, por ejemplo, de 8 200 euros a 2 200 euros por paciente.

Aunque el *gold standard* para el diagnóstico de la infección causada por CMV es el cultivo, su uso es muy limitado, debido esencialmente al alto costo y al tiempo requerido para obtener los resultados. Hoy en día el diagnóstico rutinario de la infección por CMV se realiza mediante la detección de anticuerpos IgG e IgM contra el virus. El uso de estas pruebas carece de utilidad para la detección de procesos de reactivación por varias razones, siendo la más importante, la incapacidad de algunos pacientes trasplantados para producir una cantidad de anticuerpos detectables mediante



pruebas serológicas a causa del proceso de inmunosupresión al cual son sometidos los pacientes que recibirán el trasplante.

En la actualidad tanto la detección y el monitoreo de la infección por CMV se realiza mediante qPCR en sangre total dos veces por semana o cada dos semanas, dependiendo del tipo de trasplante, durante un período de 3 meses post-trasplante, que es el período en el cual se han observado mayores casos de reactivación de la infección. Sin embargo, se ha demostrado ampliamente que el uso de sangre o sus derivados cuando se emplean pruebas moleculares como es el qPCR presenta una baja sensibilidad comparada al cultivo. Estudios previos han demostrado que el diagnóstico empleando saliva presenta una mayor sensibilidad en comparación al uso de muestras de sangre (21,23,39–43). Esto es consecuencia del ciclo de replicación del virus; CMV se replica en las células acinares de las glándulas salivales, por lo que se espera encontrar una mayor concentración de partículas virales en esta muestra. Además, se suma el hecho de que la saliva se recolecta fácilmente al ser una muestra no invasiva.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. CITOMEGALOVIRUS**

Citomegalovirus humano (CMV) o virus del herpes humano 5 (HHV 5), es un miembro de la subfamilia Betaherpesvirinae de la familia Herpesviridae (44). Los virus de esta familia se caracterizan por poseer ADN bicatenario lineal y viriones de cápside icosaédrica T=16 (45). Debido a que la familia Herpesviridae posee ADN como material genético, tienen la capacidad de establecer una infección latente de por vida en el huésped (46). El nombre de Citomegalovirus proviene de las primeras investigaciones realizadas por Hugo Ribbert en 1881, donde observó que las células de riñón poseían inclusiones intranucleares, generando un aspecto citomegálico (47).

CMV es un virus grande con un genoma aproximado de 135 000 bp, que codifica aproximadamente 200 proteínas. Se ha encontrado CMV en una amplia gama de células, incluidas las células endoteliales, las células epiteliales, las células sanguíneas, los neutrófilos, y las células del músculo liso (48). Sin embargo, CMV tiene preferencia por las células del sistema hematopoyético, en las que genera una infección latente. Por otro lado, se ha observado que la reactivación del virus se da comúnmente en los fluidos corporales como la orina, la saliva y la leche materna, lo que indica que el ciclo lítico de CMV depende del sitio de la infección (49).

Los  $\beta$ -herpesvirus, como CMV, exhiben ciclos de replicación relativamente largos, ya que permanecen asociados a las células (44). Durante la latencia, los herpesvirus, no producen partículas infecciosas y el virus permanece protegido del ataque del sistema inmunológico del huésped (50). Por este motivo, CMV permanecerá latente de forma estable hasta su activación como consecuencia de la inmunosupresión del individuo, la liberación de factores proinflamatorios, la producción de una reacción alérgica o durante el embarazo (51).

Una vez que ocurre la reactivación viral, el grado de replicación viral y el efecto clínico subsecuente están relacionados con el nivel de inmunosupresión del individuo. La infección primaria de individuos inmunocompetentes rara vez causa enfermedades graves y si se presentan sintomatologías, éstas desaparecen rápidamente (50). Por el contrario, la infección de individuos cuyo sistema inmunológico está comprometido, como los pacientes con VIH/SIDA y pacientes con trasplantes, o aquellos con un sistema inmunológico inmaduro, como el feto en el útero, a menudo presentan una alta replicación viral que conlleva a la diseminación del virus a múltiples órganos. Como consecuencia, la vida del paciente se ve amenazada (52).

## 2.2. VÍAS DE TRANSMISIÓN Y PATOGÉNESIS

CMV utiliza varias rutas para propagarse dentro de la población, a través de la transmisión vertical y la horizontal. La transmisión vertical se produce mediante la transmisión transplacentaria del virus o mediante la lactancia materna cuando la madre está infectada (53). La transmisión horizontal se produce mediante el contacto con secreciones corporales infectadas como saliva, orina, lágrimas, semen, leche materna, sangre y el trasplante de un órgano infectado (19).

La infección primaria por CMV es consecuencia del contacto de las células epiteliales de la mucosa con fluidos corporales contaminados (54). Posterior a esto, los monocitos entran en contacto con las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos y se infectan, lo que produce la diseminación de CMV por el cuerpo debido al tránsito de estos monocitos en el torrente sanguíneo. A esta fase de diseminación se le conoce con el nombre de viremia aguda (55).

Al entrar en contacto con las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea, CMV establece infecciones latentes (46). Además, se ha encontrado que las células endoteliales del tejido también establecen infecciones latentes por lo que contribuyen a la patogénesis del CMV a través del trasplante de órganos (56).

La reactivación del virus en las células hematopoyéticas está asociada a los mecanismos de señalización inflamatoria (57) y a la

diferenciación celular a macrófagos o células dendríticas a través de la inducción del gen mayor inmediato temprano (MIE) (46). Por lo que, la entrada de los monocitos circulantes en los tejidos, y su posterior diferenciación en macrófagos o células dendríticas, conduce a la reactivación del virus, lo cual desembocará en una mayor producción de partículas virales que a su vez generará la infección de varios tejidos en distintos órganos (58).

Generalmente, la reactivación del virus en las personas trasplantadas se realiza en condiciones de inmunosupresión, después de las quimioterapias o radioterapias, y se asocia con un mayor riesgo de enfermedad multiorgánica, disminución de la supervivencia del injerto, infección por otros patógenos, trastornos linfoproliferativos postrasplante y mayor mortalidad (49,59,60).

El riesgo en pacientes trasplantados por la infección por CMV depende del estado serológico del donante y del receptor. En los trasplantes de órganos sólidos, cuando el donante es positivo y el receptor negativo para CMV, el receptor tiene mayores riesgo de complicaciones (61), a diferencia de los receptores positivos previo el trasplante que tienen baja probabilidad de reactivación de CMV (25).

### 2.3. EPIDEMIOLOGÍA

Al ser un virus ubicuo, CMV presenta una alta prevalencia en todo el mundo. Según un estudio de seroprevalencia realizado en el 2019, la prevalencia de CMV en la región europea, americana, asiática, africana, del pacífico occidental, y del mediterráneo oriental, es de 66 %, 75 %, 86 %, 88 %, 88 %, y 90 %, respectivamente (39). Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (19) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), más del 50 % de los adultos (hasta los 40 años) están infectados con CMV, y aproximadamente uno de cada tres niños se infecta con CMV a la edad de cinco años en los Estados Unidos (19).

En el 2019, se realizó un estudio de metaanálisis de la seroprevalencia de IgG por la infección por CMV de donadores de sangre y órganos. Los resultados fueron presentados agrupando a los países en las 6 regiones que conforman a los Estados Miembros de la OMS. La región del Mediterráneo oriental presentó la seroprevalencia más alta alcanzando el 90 %. En la región de las Américas, la seroprevalencia alcanzó el 78 %, mientras que la cifra más baja reportada fue de 66 %, correspondiente a la región europea (37).

En México, el 90 % de los residentes son seropositivos a CMV a la edad de 50 años (62); en Italia, el 88 % de individuos con trasplante de células madre son seropositivos para CMV. También se ha evidenciado que la prevalencia específica por edad aumenta a partir

de los dos años en 28 % y a partir de los 45 a 54 años en 95,7 % (60,63). En el sur de Brasil, la seroprevalencia de CMV alcanza el 96 % (64).

En el Perú, son escasos los estudios sobre la prevalencia de CMV, sobre todo en niños que requieren o reciben trasplantes (29–31,34). Sin embargo, en el año 2017, se reportó que la seroprevalencia de CMV en adultos alcanzaba el 93 % (65), siendo la región de Lambayeque la que poseía el mayor número de casos (35 %).

#### **2.4. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN**

Generalmente, el diagnóstico de enfermedades virales en individuos inmunocompetentes se basa en manifestaciones clínicas y exámenes de laboratorio. Sin embargo, un diagnóstico definitivo requiere de la detección del virus específico en muestras obtenidas de tejidos o secreciones involucradas en el ciclo de replicación del virus (66). El *gold standard* para el diagnóstico de CMV se basa en el aislamiento del virus en un cultivo celular (67). Este método utiliza muestras clínicas que se inoculan en células de fibroblastos humanos, se incuban y se observan durante un periodo de tiempo de entre 2 y 21 días (12). Sin embargo, realizar la extracción de muestras por biopsia a menudo es inviable debido a que la infección o reactivación viral se observa durante las primeras etapas postrasplante, etapas que van acompañadas con trombocitopenia o

signos vitales inestables que elevan el riesgo de sangrado severo (66). El cultivo viral es una técnica compleja que normalmente requiere de días o semanas para la obtención del resultado final, además de líneas celulares específicas, por lo que no es adecuado para el diagnóstico precoz (67).

Otros de los métodos de detección de CMV son las pruebas serológicas; éstas se basan en la detección de las inmunoglobulinas IgG o IgM. Se han descrito varios ensayos para la detección de inmunoglobulinas, entre ellos se encuentran el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), la inmunofluorescencia anti-complemento (AVI), el radioinmunoensayo (RIA) y la hemaglutinación indirecta (IHA) (12). De todos estos, el ensayo de ELISA es el más utilizado. Sin embargo, está demostrado que la detección de CMV-IgM sigue siendo un problema, ya que existen grandes diferencias entre las pruebas ELISA comerciales en cuanto a la eficacia diagnóstica y la interferencia con la presencia de anticuerpos IgM del virus de Epstein-Barr (EBV-IgM) y el factor reumatoideo (RF) (68). Además, los análisis de anticuerpos IgM tienen baja especificidad en el diagnóstico de la infección primaria debido a que los IgM pueden persistir durante meses después de la infección o pueden reaparecer por la reactivación del virus en el paciente (69).

Aunque el diagnóstico histopatológico es el *gold standard* para el diagnóstico, los ensayos cuantitativos de PCR (qPCR) son los



métodos más utilizados actualmente. El qPCR es un método rápido y sensible basado en la amplificación de ácidos nucleicos del virus (70). Una de las ventajas de este método es que el ADN puede extraerse de varias fuentes como sangre completa, leucocitos, muestras de biopsia de tejidos, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo líquido, lavado broncoalveolar, etc. (71,72). Esta técnica suele dirigirse a genes conservados de antígenos tempranos y tardíos, como es el caso del gen codificante para la proteína temprana 4 (IE4).

Dentro del genoma de ADN del CMV, se cree que los genes IE tiene un papel decisivo tanto para la infección aguda como para la reactivación de la latencia viral. De las proteínas expresadas a partir de los genes IE, 2 fosfoproteínas nucleares IE1 y IE2 son las más abundantes e importantes (73). Ambas comparten 85 aminoácidos amino-terminales correspondientes a los exones 2 y 3; sin embargo, tienen distintas partes carboxi-terminales codificadas por el exón 4 para IE1 o el exón 5 para IE2 (74). La proteína IE1 de CMV es la primera proteína multifuncional viral que se expresa durante la infección. Una de sus funciones es la transactivación de los promotores del huésped y del promotor temprano inmediato (MIEP) (75,76). IE1 mejora la expresión de varias proteínas del ciclo celular como la ADN polimerasa  $\alpha$  (77) y también mejora la actividad de transactivación de IE2 (78).

## **2.5. MUESTRAS CLÍNICAS EMPLEADAS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN**

Las muestras clínicas que se emplean habitualmente en el diagnóstico de la infección por CMV son suero, para detección de anticuerpos; sangre completa, para estudio de la inmunidad celular y para técnicas de detección directa; y orina, saliva, sangre completa, plasma, suero, lavado broncoalveolar (LBA), líquido cefalorraquídeo y tejido, para técnicas de detección directa (79). Las muestras de sangre se emplean en forma rutinaria para la detección de CMV, mediante la técnica de PCR, en los pacientes que requieren o son sometidos a trasplante, aplicándose la técnica de PCR para la detección de CMV (80). No obstante, la sensibilidad del PCR en muestras de sangre es baja, alcanzando el 34,4 %, 66,7 % o 79 %, en caso de sangre seca en papel de celulosa, plasma sanguíneo y sangre total, respectivamente (80–82).

El diagnóstico de CMV mediante la técnica de PCR ha demostrado tener mayor sensibilidad en muestras de saliva y orina en comparación con las muestras de sangre (16–18). A pesar de que ambas muestras presentan una sensibilidad alta, las muestras de orina son difíciles de coleccionar debido a que para obtener una muestra con menor contaminación se recomienda aspiración suprapúbica y cateterismo uretral, metodologías que son difíciles de aplicar en niños y bebés (17,83,84).

Las muestras de saliva representan la mejor opción para la detección de CMV en niños, debido a que la recolección de esta muestra es no invasiva, el proceso de colección es simple y probablemente las probabilidades de detección de CMV sean mayores debido a que el virus se replica en las células acinares de las glándulas salivales. Previamente, se ha evaluado el empleo de este espécimen para el diagnóstico de CMV mediante PCR, evidenciándose una sensibilidad de la técnica significativamente mayor en comparación con el PCR en sangre e incluso orina (80).

Del mismo modo, una revisión sistemática reciente ha demostrado que el PCR en saliva exhibe una alta sensibilidad y especificidad frente al PCR en orina, alcanzando valores de 87 % y 100 %, respectivamente. Asimismo, al comparar el PCR en saliva frente al *gold standard* (cultivo celular), se ha observado que la sensibilidad de la prueba incrementa a 97 %, mientras que la especificidad se mantiene en 100 %. Estos hallazgos confirman la utilidad de la saliva para el desarrollo de pruebas moleculares de diagnóstico de la infección por CMV (85).

### **3. HIPÓTESIS**

El uso de muestras de saliva para la prueba de qPCR permitirá la detección de la reactivación y el monitoreo de la infección causada por CMV en pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja sometidos a trasplante.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el uso de las muestras de saliva para la detección de la reactivación y el monitoreo de la infección por CMV mediante PCR en tiempo real en pacientes de las unidades de trasplante del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja durante el periodo de marzo del 2019 a marzo del 2020.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la proporción de casos positivos a Citomegalovirus en sangre total, saliva líquida y saliva recolectada con hisopo.
- Describir y comparar la carga viral de Citomegalovirus en sangre total, saliva líquida y saliva recolectada con hisopo.
- Describir la cinética de la carga viral de Citomegalovirus en muestras de sangre total, saliva líquida y saliva colectada con hisopo en el período post-trasplante.
- Evaluar la correlación y concordancia de la carga viral y resultados del qPCR entre las muestras de sangre, saliva líquida y saliva colectada con hisopo.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se realizó un estudio observacional de tipo longitudinal, analítico. El estudio se considera de tipo observacional porque no se realizaron intervenciones en la población de estudio; longitudinal, porque realizó un seguimiento de los pacientes durante el tiempo de estudio; y analítico, porque se aplicaron pruebas estadísticas para probar la hipótesis. Se enrolaron 16 pacientes atendidos en la Sub-Unidad de Atención Integral Especializada al Paciente de Progenitores Hematopoyéticos y la Unidad de Donación y Trasplante del INSN-SB durante el periodo marzo 2019 a marzo 2020.

Se enrolaron a todos los pacientes que cumplieron con todos los criterios de inclusión. No se calculó un tamaño de muestra a priori por la limitada cantidad de pacientes trasplantados al año (máximo 20).

Todos los pacientes recibieron ganciclovir 5 mg/kg de peso corporal dos veces al día por un promedio de 12 días antes del trasplante, como profilaxis antiviral universal.

Es importante considerar que si bien el Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja, está abocado a la atención de pacientes pediátricos entre los 0 y 18 años, los pacientes que ingresan a trasplante suelen permanecer tiempos muy prolongados en hospitalización superando, algunos de ellos, los 18 años permitidos

durante su estadía en el instituto. Debido a que algunos de los niños en este estudio superan los 18 años, se empleará el término “pacientes” en lugar de “niños”.

## **5.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

### **Criterios de inclusión**

- Pacientes que se encuentren hospitalizados en las unidades de trasplante de HSCT y SOT del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja.
- Pacientes pediátricos entre 0 y 18 años de edad al diagnóstico de la enfermedad, independientemente de la edad al momento de la toma de la muestra.

### **Criterios de exclusión**

- Pacientes en seguimiento ya enrolados en el estudio.
- Pacientes cuyo seguimiento post-trasplante se realiza en establecimientos externos al INSNSB.
- Pacientes inmunocomprometidos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).
- Pacientes que se encuentren con intubación endotraqueal.

### **5.3. ENROLAMIENTO DE PACIENTES Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS**

Previo a la toma de muestra se solicitó que los padres y/o apoderados llenen un consentimiento informado. Paralelamente, se llenó una ficha de recolección de datos (Anexo 3). Se recolectaron muestras de sangre total y saliva durante dos etapas: antes y después del trasplante. Antes del trasplante, las muestras fueron recolectadas en un único momento, antes o durante la administración del régimen de acondicionamiento. Después del trasplante, las muestras fueron recolectadas regularmente dos veces por semana.

Las muestras de sangre y saliva fueron conservadas en la ultra congeladora a -70 °C, ubicada en el área de Seroteca de la Sub-Unidad de Investigación e Innovación Tecnológica del INSN-SB, hasta su procesamiento.

Los datos demográficos y los resultados de los análisis para IgG anti-CMV e IgM anti-CMV que se registraron en la ficha de recolección de datos se obtuvieron del sistema integrado de gestión hospitalaria (SISGalenPlus) del INSN-SB.

### **5.4. MUESTRAS BIOLÓGICAS**

La presencia de CMV en los pacientes se determinó mediante la técnica de qPCR utilizando 3 tipos de muestras biológicas: sangre total, saliva recolectada con hisopo de algodón (saliva recolectada



con hisopo) y saliva líquida colectada por aspiración (saliva-líquida).

Las muestras de sangre total se obtuvieron en el momento de la extracción rutinaria de sangre indicada por el médico tratante del INSN-SB. Durante este proceso de extracción rutinaria se recolectó un tubo adicional de sangre sobre EDTA en un volumen de aproximadamente 3 mL, a fin de evitar múltiples punciones venosas. Para la obtención de saliva recolectada con hisopo se colocó un hisopo de algodón estéril (Copan Diagnostics Inc., Italia) debajo de la lengua del paciente por 15 segundos. Seguidamente, el hisopo se transfirió a un tubo de 2,0 mL que contenía 500  $\mu$ L de PBS 1X (Invitrogen, Estados Unidos). Las muestras se llevaron al vórtex durante 15 segundos y luego se desecharon los hisopos. El tubo se centrifugó a 21,000 x g durante 10 min y el sobrenadante se utilizó para la extracción de ADN.

La saliva líquida se recolectó en un tubo de 2 mL mediante un aspirado de saliva acumulada debajo de la lengua del paciente empleando una pipeta Pasteur de plástico estéril desechable (Thermo Scientific, Estados Unidos). Las muestras se centrifugaron a 21,000 x g durante 10 minutos, a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para la extracción de ADN.

## **5.5. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS**

Las muestras obtenidas se procesaron en los laboratorios de la Sub-  
Unidad de Investigación e Innovación Tecnológica (SUIIT) del  
INSN-SB y en la Unidad de Virología Molecular del Laboratorio de  
Investigación en Enfermedades Infecciosas, Departamento de  
Ciencias Celulares y Moleculares, Facultad de Ciencias y Filosofía  
de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, para los fines  
indicados.

### **5.5.1. EXTRACCIÓN DEL ADN**

El aislamiento de ADN a partir de la muestra de sangre y  
saliva se realizó empleando el kit comercial GeneProof  
PathogenFree DNA Isolation Kit (GeneProof, República  
Checa), siguiendo las especificaciones y recomendaciones  
del fabricante.

Como paso previo al aislamiento, se añadió un control  
interno (ISEX) a las muestras de sangre y saliva, el cual está  
contenido en el kit de PCR, para verificar que tanto el  
proceso de extracción de ADN como el PCR se llevaron a  
cabo de manera adecuada.

### **5.5.2. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL**

Para la detección y cuantificación de la carga viral de CMV se utilizó el kit comercial GeneProof Cytomegalovirus (CMV) PCR kit (GeneProof), según las instrucciones del fabricante. La amplificación se realizó en el termociclador Light Cycler 480® (Roche, Suiza).

La amplificación estuvo dirigida a una secuencia conservada del gen codificante para la proteína IE4, debido a que su expresión tiene un papel decisivo en la infección aguda y su presencia es un indicador de la reactivación viral según el análisis de secuencias de CMV previamente publicadas (74).

Para la cuantificación de la carga viral en las muestras de saliva y sangre, se construyó una curva de referencia o estándar mediante diluciones seriadas a partir de un stock conteniendo  $10^4$  copias/mL (cp/mL), el cual está incluido en el kit de qPCR. Estas diluciones fueron procesadas tal como una muestra clínica para la detección de CMV mediante qPCR (incluyendo la adición del control interno). Cada dilución de la curva fue procesada por triplicado en el ensayo.

## **5.6. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Se cumplió con todos los requerimientos éticos propuestos en la Declaración de Helsinki. Los datos confinados en las historias clínicas de los pacientes que ingresaron al estudio se almacenaron en forma anónima en una base de datos creada exclusivamente para este estudio.

La protección de la confidencialidad se estableció desde el inicio del estudio; los datos recogidos fueron desvinculados de identificadores personales y contaron con un único código número seleccionado de acuerdo con el orden en el que se reclutaron los pacientes. Los padres y/o apoderados de los pacientes firmaron el consentimiento informado para la obtención de muestras y para el almacenamiento de estas (Anexo 1 y 2).

Las muestras almacenadas fueron desvinculadas de los datos personales que pudieran identificar a los sujetos de investigación. Estas muestras fueron preservadas en una ultra congeladora en el Área de Seroteca de la Sub-Unidad de Investigación e Innovación Tecnológica del INSN SB hasta su procesamiento (Anexo 2).

El presente proyecto contó con la aprobación del Comité institucional de ética en Investigación del INSN SB para su desarrollo; habiendo sido aprobado con el código de proyecto PI-178-2018 el día 28 de junio del 2018.

## 5.7. ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizó el software R Studio versión 4.2.3 (RStudio team, 2020) para el análisis de datos. Se determinó la proporción de casos positivos para CMV y su respectivo intervalo de confianza al 95 %. Adicionalmente, se calculó el promedio y rango de carga viral con su respectivo intervalo de confianza del 95% para cada tipo de muestra.

La cinética de la carga viral en saliva y sangre se describió mediante la representación de la carga viral versus el tiempo de seguimiento en un gráfico de líneas o puntos, desde la etapa de pre-trasplante hasta el último punto de seguimiento.

Con la finalidad de determinar la correlación de la carga viral entre las muestras de sangre y saliva líquida y las muestras de sangre y saliva recolectada con hisopo, se empleó el coeficiente de correlación de Spearman y Kappa.

Adicionalmente, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre la carga viral en muestras de sangre y saliva líquida y las muestras de sangre y saliva recolectada con hisopo.

Finalmente, la información recolectada para las variables epidemiológicas y clínicas se resumieron empleando la estadística descriptiva. Las variables continuas se reportaron con medias y

desviación estándar; mientras que, las variables categóricas están reportadas utilizando frecuencias y porcentajes.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Durante el periodo de marzo de 2019 y marzo de 2020 se enrolaron 16 pacientes pediátricos en las unidades de trasplante del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja. Un total de 12 pacientes participantes se sometieron a trasplantes de células madre hematopoyéticas (HSCT, n=12) y 4 se sometieron a trasplante de órganos sólidos (SOT, n=4).

En el estudio se analizaron un total de 85 muestras pareadas de sangre total y saliva líquida obtenidas de 10 pacientes y 91 muestras pareadas de sangre total y saliva recolectada con hisopo obtenidas de 15 pacientes. De los 16 pacientes, 9 proporcionaron saliva líquida y muestras de saliva recolectada con hisopo, 6 proporcionaron solo muestras de saliva recolectada con hisopo y un paciente proporcionó solo saliva líquida. La disparidad en el número de muestras de saliva líquida y saliva recolectada con hisopo se debe a que no todos los pacientes eran capaces de proporcionar ambos tipos de muestra por incomodidades asociadas al tratamiento; primordialmente, náuseas.

La edad promedio de los pacientes fue de 10,84 años. El 87,5 % (14) de los pacientes enrolados fue de sexo masculino mientras que el

12,5 % (2) de los pacientes fue de sexo femenino. Los 16 (100 %) pacientes trasplantados sobrevivieron con éxito a la cirugía de trasplante; sin embargo, 4 (25 %) de ellos fallecieron entre los 3 meses a 1 año posterior al trasplante (Tabla 1). El examen serológico mostró que 13 pacientes fueron positivos para IgG anti-CMV, pero solo 1 paciente fue positivo para IgM anti-CMV. Entre los donantes, 11 fueron positivos para IgG anti-CMV.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

<b>Característica</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
Edad (media, rango)	10,84 (2,06-19,14) años
Sexo	
Femenino	2 (12,5)
Masculino	14 (87,5)
Enfermedad	
Anemia aplásica	4 (25)
Leucemia linfoblástica aguda	4 (25)
Leucemia mieloide aguda	2 (12,5)
Síndrome mielodisplásico	2 (12,5)
Glomerulopatía primaria	1 (6,25)
Hipoplasia renal bilateral	1 (6,25)
Cirrosis biliar	1 (6,25)
Hepatoblastoma	1 (6,25)

Lugar de procedencia	
Lima	8 (50)
Junín	1 (6,25)
Huánuco	1 (6,25)
San Martín	3 (18,75)
Lambayeque	2 (12,5)
Venezuela	1 (6,25)
Tipo de trasplante	
Trasplante de órganos sólidos (SOT)	4 (25)
Trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT)	12 (75)
Haploidéntico	6 (50)
Donantes hermanos HLA-idénticos	6 (50)
Estado serológico anti CMV-IgG	
Donador + /Receptor +	9 (56,25)
Donador + / Receptor -	1 (6,25)
Donador - / Receptor -	0 (0)
Donador - / Receptor +	2 (12,5)
Información no disponible	4 (25)
Estado serológico anti CMV-IgM	
Donador + / Receptor +	0 (0)
Donador + / Receptor -	0 (0)
Donador - / Receptor -	13 (81,25)
Donador - / Receptor +	0 (0)
Información no disponible	3 (18,75)



## **6.2. FRECUENCIA DE CASOS POSITIVOS PARA CMV Y DISTRIBUCIÓN DE LA CARGA VIRAL**

Las muestras de saliva se recolectaron el mismo día de la toma rutinaria de las muestras de sangre o 1 día después de la toma de muestra de sangre. La frecuencia de casos positivos para CMV mediante qPCR en sangre total fue de 12,6 % (CI: 0,079-0,193); mientras que en saliva líquida y saliva recolectada con hisopo fue de 15,3 % (CI: 0,090-0,247) y 12,1 % (CI: 0,067-0,206), respectivamente.

La carga viral de CMV osciló entre 148,94 a 6526,31 cp/mL en sangre total, de 150,52 a 7 263,15 cp/mL en saliva líquida y de 165,26 cp/mL a 16 789,47 cp/mL en saliva recolectada con hisopo (Figura 1). La carga viral promedio en sangre total, saliva líquida y saliva recolectada con hisopo fue de 1 581,02 cp/mL (CI: -1 122,38-5 441,13), 1 294,94 cp/mL (CI: 157,00-2 432,88) y 2 159,38 cp/mL (CI: 683,42-2478,62), respectivamente (Figura 1). No se observaron diferencias estadísticas de la carga viral entre la sangre total, saliva líquida y saliva recolectada con hisopo ( $P = 0,6935$ ), lo que sugiere que la saliva podría proporcionar la misma información que la sangre total.

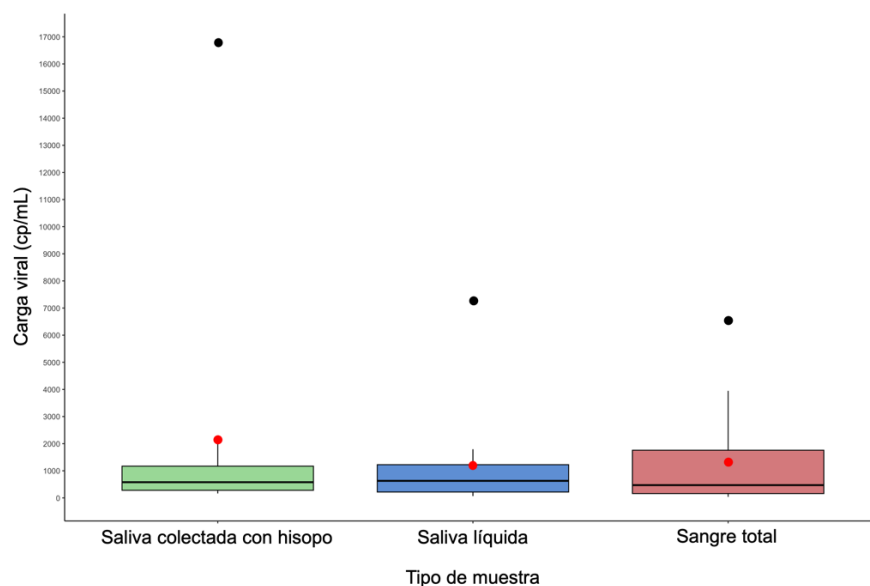


Figura 1. Distribución de la carga viral en muestras de sangre, saliva recolectada con hisopo y saliva líquida. La carga viral media para cada tipo de muestra está representada por círculos rojos.

Del total de 91 muestras pareadas de sangre y saliva recolectada con hisopo, 4 fueron positivas en ambos tipos de muestra, 7 fueron positivas en las muestras de saliva recolectada con hisopo, pero negativas en las de sangre, y 10 fueron negativas en las muestras de saliva recolectada con hisopo, pero positivas en las de sangre (Tabla 2).

Se obtuvieron 85 muestras pareadas de sangre y saliva-líquida. De ellas, solo un par resultó positivo tanto en la muestra de sangre como en la de saliva-líquida. Del total, 12 muestras de saliva líquida fueron positivas y sus pares en las muestras de sangre fueron negativas. Asimismo, se obtuvo 12 muestras negativas de saliva

líquida pero positivas en sus respectivos pares en las muestras de sangre.

Adicionalmente, se observó una alta frecuencia de casos negativos coincidentes en los tres grupos de muestras pareadas: 70 de 91 muestras pareadas de sangre total y saliva recolectada con hisopo, 60 de 85 muestras pareadas de sangre total y saliva-líquida, y 26 de 41 muestras pareadas de saliva recolectada con hisopo y saliva líquida.

Tabla 1. Resultados del qPCR en muestras de saliva líquida y saliva recolectada con hisopo, frente a las muestras de sangre.

qPCR en muestras de sangre	qPCR en saliva recolectada con hisopo			qPCR en saliva líquida		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
<b>Positivo</b>	4	10	14	1	12	13
<b>Negativo</b>	7	70	77	12	60	72
<b>Total</b>	11	80	91	13	72	85

### 6.3. CINÉTICA DE LA CARGA VIRAL EN LAS MUESTRAS DE SANGRE Y SALIVA

Todas las muestras recolectadas durante el período previo al trasplante dieron negativo por qPCR. Entre las muestras

recolectadas durante el período postrasplante, 12 muestras resultaron positivas en saliva líquida y negativas en sus respectivos pares de sangre total (Figura 2). Estos resultados fueron observados entre los 14 y 260 días postrasplante. Del mismo modo, 7 muestras fueron positivas en las muestras de saliva recolectada con hisopo y negativas en sus respectivos pares de sangre total (Figura 2). En este caso, los resultados fueron observados entre los 21 y 253 días postrasplante, evidenciándose la carga viral más alta el día 253 (16 789,47 cp/mL). La cinética de la carga viral para cada uno de los pacientes que presentaron al menos un resultado positivo en sangre y saliva se muestra en el Anexo 1.

La detección de ADN del CMV en saliva líquida precedió a la ADNemia en 3 (30 %) de los pacientes de los que se recogieron muestras pareadas de saliva líquida y sangre, con una media de 12 días (rango, 4 a 28 días) (Figura 3). Por el contrario, este patrón no se observó en los pacientes de los que se obtuvieron las muestras pareadas de sangre total y saliva recolectada con hisopo.

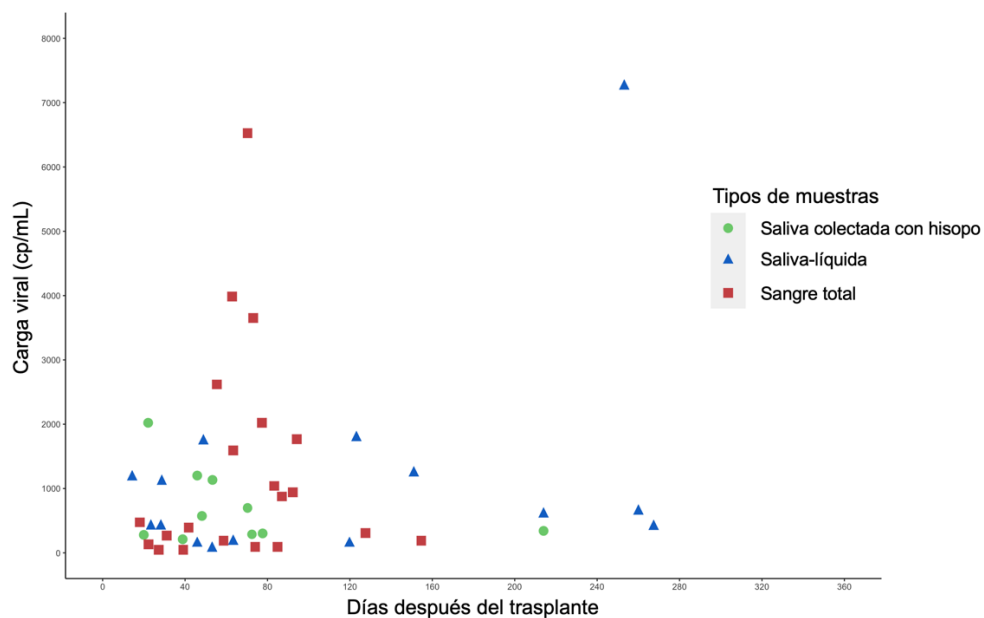


Figura 2. Cinética de la carga viral en las muestras de sangre, saliva recolectada con hisopo y saliva líquida. Solo se incluyeron en la figura los casos positivos para CMV por PCR. No se muestra el valor atípico correspondiente a la carga viral de 16789,47 cp/mL en saliva recolectada con hisopo obtenida 253 días después del trasplante.

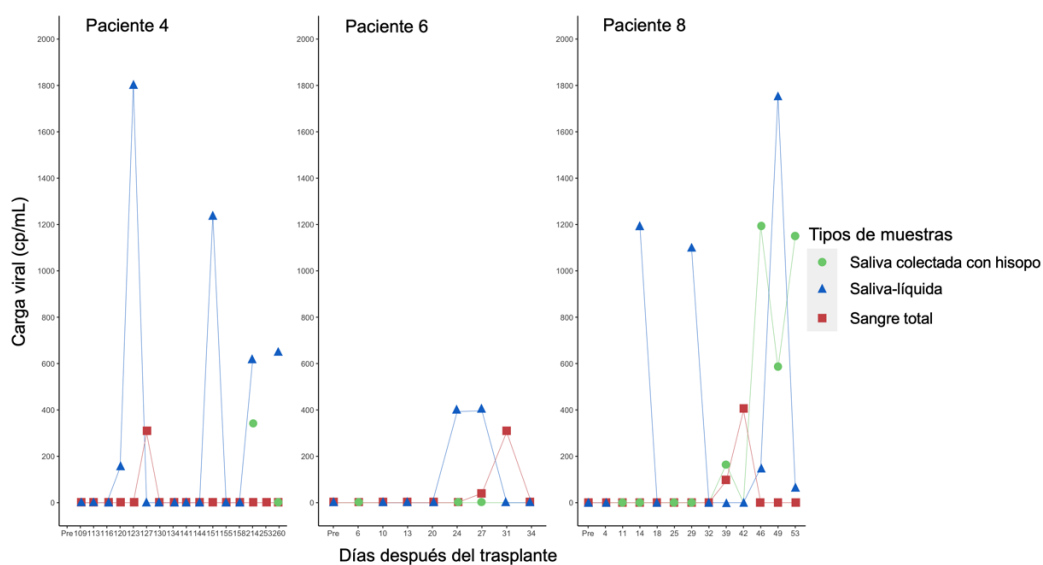


Figura 3. Detección de ADN del CMV en saliva previo a la ADNemia. Los valores atípicos que corresponden a las cargas

virales de 16 789,474 cp/mL y 7 263,158 cp/mL en saliva recolectada con hisopo y saliva-líquida, respectivamente, obtenidas 253 días después del trasplante del mismo paciente, no se incluyen en la figura.

#### **6.4. CORRELACIÓN Y CONCORDANCIA DE LA CARGA VIRAL EN MUESTRAS DE SANGRE Y SALIVA**

Debido a que no se obtuvieron muestras pareadas de saliva líquida y saliva recolectada con hisopo para todas las muestras de sangre recolectadas; los pares de sangre y saliva recolectada con hisopo, y sangre y saliva líquida fueron analizados de forma individual durante la evaluación de la correlación y concordancia.

No se observó correlación cuando se comparó la carga viral en muestras de saliva líquida y muestras de sangre total utilizando el coeficiente de Spearman ( $r = -0,0742$ ,  $P = 0,4999$ ) (Figura 4). Asimismo, el coeficiente Kappa no mostró concordancia entre los resultados obtenidos con estas muestras (71,76 %,  $P = 0,7960$ ).

Se observó una correlación débil cuando se comparó la carga viral en saliva recolectada con hisopo y muestras de sangre total mediante la prueba de Spearman ( $r = 0,2679$ ,  $P = 0,0102$ ). Por el contrario, se observó una correlación moderada cuando se comparó la carga viral en saliva recolectada con hisopo y muestras de saliva líquida

mediante la prueba de Spearman ( $r = 0,3849$ ,  $P = 0,0129$ ) (Figuras 5 y 6).

Se observó un buen nivel de concordancia cuando se compararon los resultados de sangre total versus saliva recolectada con hisopo y saliva líquida versus saliva recolectada con hisopo utilizando Kappa (81,32 %,  $P = 0,0199$  y 73,17 %,  $P = 0,0564$ , respectivamente). Únicamente la concordancia entre la sangre total y saliva recolectada con hisopo fue estadísticamente significativa, mientras que la concordancia entre la saliva líquida y la saliva recolectada con hisopo fue marginalmente significativa.,32 %,  $P = 0,0199$  y 73,17 %,  $P = 0,0564$ , respectivamente).

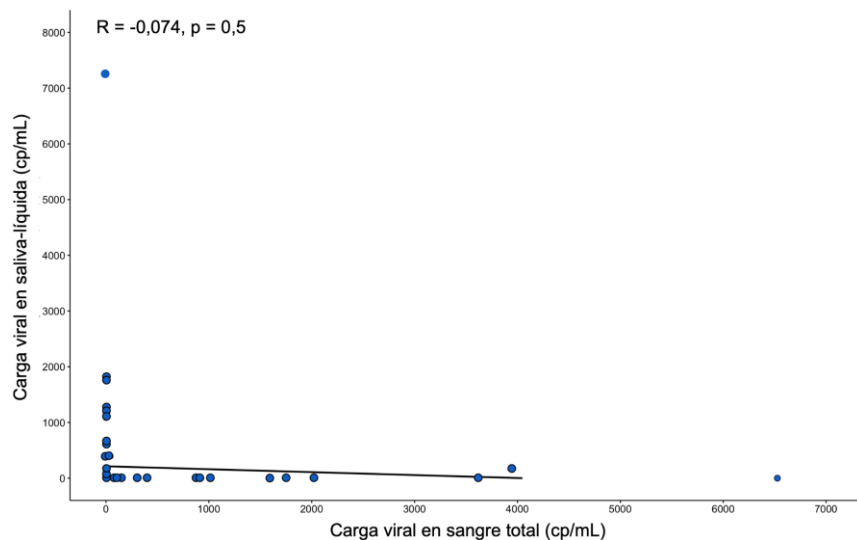


Figura 4. Correlación entre carga viral en saliva líquida y muestras de sangre total. Cada punto representa los resultados de una muestra individual.

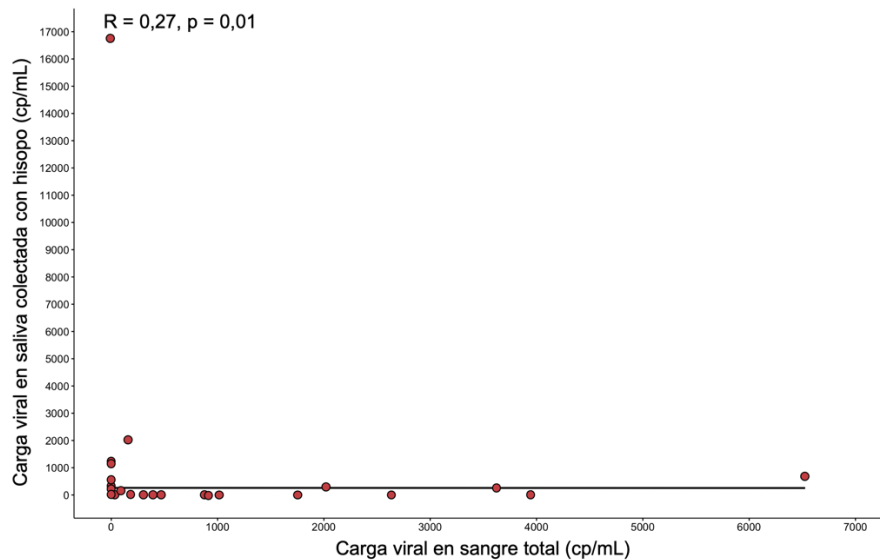


Figura 5. Correlación entre la carga viral en saliva recolectada con hisopo y muestras de sangre total. Cada punto representa los resultados de una muestra individual.

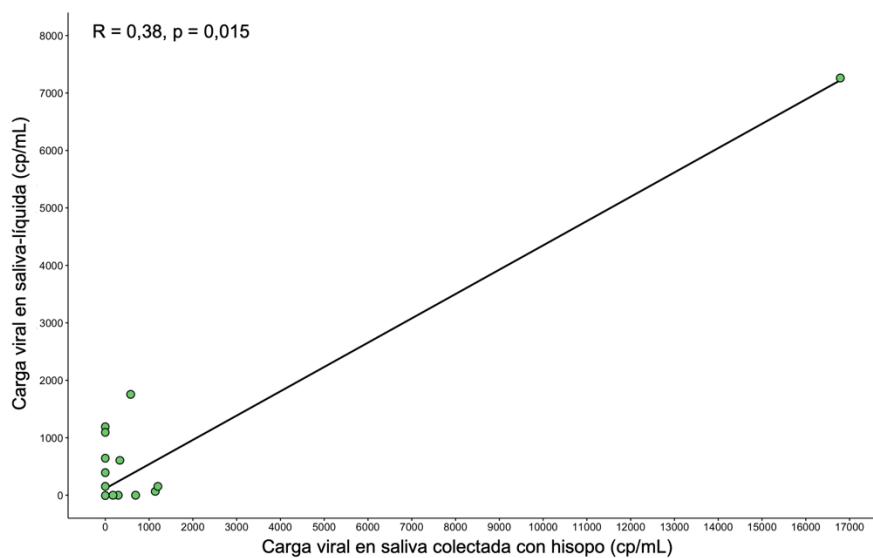


Figura 6. Correlación entre la carga viral en saliva colectada con hisopo y muestras de saliva-líquida. Cada punto representa los resultados de una muestra individual.



## 7. DISCUSIÓN

El diagnóstico y especialmente el seguimiento de la infección por CMV se realizan en pacientes pediátricos sometidos a trasplante debido a que la reactivación de CMV sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad. La principal metodología empleada para este propósito se basa en qPCR a partir de muestras de sangre; sin embargo, el uso de estas muestras tiene varios inconvenientes al requerir de técnicas invasivas para su recolección, así como el incremento del riesgo de desarrollar anemia, y sobre todo la baja sensibilidad que muestra esta prueba cuando se emplean muestras de sangre y sus derivados.

Debido a que CMV se replica en las glándulas salivales, el uso de las muestras de saliva ha mostrado una mayor sensibilidad que las muestras de sangre (21). Además, tienen la ventaja de ser muestras no invasivas, de fácil y rápida recolección, lo cual es especialmente importante en pacientes pediátricos. Este estudio de detección de la reactivación de CMV en pacientes pediátricos sometidos a trasplante demostró que la saliva podría ser una muestra útil para el diagnóstico y seguimiento de la infección por CMV mediante qPCR.

En poblaciones no trasplantadas, la sensibilidad y especificidad del ensayo de qPCR en saliva son variables, con valores mínimos de 30 % y 91,5 %, respectivamente (40,86–90). Por otro lado, el único estudio realizado en población pediátrica trasplantada demostró una sensibilidad de 80 %, una especificidad de 53,3 % y un AUC de 0,684 (IC al 95 %: CI: 0,5-0,8), tomando como *gold standard* al qPCR en suero. En otro estudio

desarrollado en una cohorte de adultos receptores de HSCT seguidos hasta los 100 días postrasplante, reportó una sensibilidad y especificidad de 18,6 % (IC 95%: 6,9 %-30,2 %) y 90 % (IC 95 %: 70,4 %-100 %), respectivamente, empleando la técnica de qPCR con muestras de plasma como *gold standard* (91). Las diferencias en las técnicas empleadas para recolectar la saliva, las dianas genómicas utilizadas para realizar el qPCR y los tipos de muestra considerados como *gold standard* (muestras derivadas de sangre, orina y tejido de fibroblastos) podrían explicar la variabilidad y las discrepancias observadas en estos parámetros. En este estudio, no fue posible evaluar la precisión de la prueba de qPCR en saliva, debido a que el aislamiento del virus por cultivo aún es considerado el *gold standard* para el diagnóstico de CMV (92).

Tal como se observó en la Tabla 2, los resultados de qPCR de saliva líquida recolectada por aspiración y saliva recolectada con hisopo no fueron completamente concordantes, evidenciándose un escaso número de casos positivos en los pares de sangre y saliva (4 casos en los pares de sangre y saliva recolectada con hisopo y solo 1 caso en los pares de sangre y saliva líquida).

La observación de estas discrepancias podría estar influenciada por varios factores, como la composición de las poblaciones (niños mayores de 2 años) que estaban bajo una terapia farmacológica severa, especialmente terapia antiviral e inmunosupresora. Además, las muestras se tomaron en diferentes momentos del día; en ocasiones la recolección se realizó justo después de que los pacientes terminaran de desayunar, almorzar o cenar, por lo que es

muy probable que hayan tomado medicación junto con la comida. Según lo reportado por Khan et al. y Mahony et al., diversas sustancias inhibidoras del PCR pueden estar presentes tanto en fluidos corporales como en metabolitos, fármacos u otras sustancias biológicas, impidiendo la correcta determinación de la presencia del virus y afectando la tasa de detección del ensayo (93,94). Sin embargo, en este caso, el control interno ISEX incluido en el kit qPCR dio positivo en todas las muestras analizadas, lo cual indica que la reacción de amplificación fue realizada de forma adecuada y que, por tanto, los resultados obtenidos son confiables.

Dos factores adicionales también pueden haber contribuido a las discrepancias observadas en este estudio: los niños menores de 5 años tienden a morder el hisopo durante la recolección de muestras, y por otro lado, el hisopo de algodón utilizado para la recolección de muestras no está diseñado específicamente para la recolección de saliva en niños. En general, se cree que estos factores pueden haber impedido la correcta absorción de la saliva dando como resultado un volumen variable de muestra recolectada. El uso de hisopos diseñados específicamente para la recolección de saliva en niños podría solucionar este problema.

Se ha reportado que la recolección de saliva con hisopos tradicionales (almacenados secos o en medios líquidos) para los ensayos de PCR presentan alta sensibilidad y especificidad (12). Sin embargo, existe una escasez de datos publicados sobre el rendimiento del PCR de CMV utilizando diferentes tipos de hisopos almacenados en varios medios y a

diferentes temperaturas, factores que podrían influir significativamente en el resultado de la carga viral.

En el presente estudio, la frecuencia de muestras positivas fue del 15,3 % y del 12,1 % para saliva líquida y saliva recolectada con hisopo, respectivamente, lo que contrasta con los valores obtenidos en investigaciones previas que presentaban tasas de positividad mayores a 40 % (27,95,96). Esto podría ser consecuencia de la baja seroprevalencia de IgM observada en la población analizada, además de las diferencias de edad, así como de los materiales y reactivos utilizados en este estudio. En 2007, Correia Silva *et al.* documentó una tasa de detección del 45,2 % en muestras de hisopos bucales durante el período posterior al trasplante de células madre hematopoyéticas en población adulta (28). Tres años después, el mismo grupo de investigación reportó una tasa de detección del 42,3 % en el mismo tipo de muestra en un grupo de pacientes adultos que recibieron un trasplante de órgano sólido (96). Además, en 2019, Barani *et al.* detectaron ADN de CMV en 14 de 30 muestras de saliva líquida (46,7 %) pertenecientes a pacientes que recibieron trasplante renal con edades entre los 12 y 18 años (95).

Por otro lado, se ha reportado que los ensayos de PCR en saliva para la detección de CMV en recién nacidos presentan una alta sensibilidad y especificidad (21). Sin embargo, el número de las publicaciones sobre el rendimiento de la PCR en saliva para el diagnóstico y seguimiento de CMV en receptores pediátricos de trasplantes, es limitado. En la actualidad, solo se dispone de un estudio publicado que evaluó la utilidad de las muestras de

saliva para el diagnóstico molecular de la infección por CMV en pacientes pediátricos sometidos a trasplante renal o hepático (27). En dicho estudio, el ensayo de PCR alcanzó una sensibilidad del 80 %, una especificidad del 53,3 % y un AUC de 0,684; sin embargo, el estudio como *gold standard* la técnica de qPCR realizadas en muestras de suero.

En este estudio no se observó una asociación significativa entre la carga viral en sangre total y saliva líquida ( $P = 0,4999$ ), o sangre total y la saliva recolectada con hisopo ( $P = 0,3849$ ). Este hallazgo es similar al reportado en un estudio previo realizado en muestras de sangre y enjuague bucal pareadas (97). Por el contrario, otros estudios han demostrado una correlación significativa entre muestras derivadas de saliva y sangre, aunque el grado de correlación entre estas muestras difiere considerablemente; 0,33 % y 0,86 % para diferentes estudios (96,98).

Se han documentado altos niveles de concordancia entre los resultados de qPCR en saliva y muestras de orina, y entre los resultados de qPCR en saliva y cultivos celulares en orina ( $>90$  %) (22,99). Si bien en este estudio se observaron buenos niveles de concordancia entre los resultados de sangre total y saliva recolectada con hisopo, y saliva líquida y saliva recolectada con hisopo (81,32 % y 73,17 %, respectivamente), solo la concordancia entre la sangre total y la saliva recolectada con hisopo fue estadísticamente significativa. Por otro lado, no se observó concordancia entre los resultados en saliva líquida y sangre. Una posible explicación de la falta de concordancia entre los resultados en muestras de saliva y sangre observados en este estudio puede ser explicada por el estudio de Luck *et al.* quienes

realizaron un seguimiento de la carga de CMV en muestras de sangre, orina y saliva recolectadas de lactantes diagnosticados con infección congénita por CMV y demostraron que existía una dinámica compartimentada de excreción viral durante y después de la administración del tratamiento (100). Durante la administración del tratamiento, las cargas virales en saliva y orina disminuyen rápidamente en contraste con la sangre y, a largo plazo, el ADN del CMV permanece indetectable en las muestras de sangre, pero detectable en la mayoría de las muestras de orina y saliva (100). Este aumento de carga viral en saliva y la simultánea disminución a niveles indetectables de ADN de CMV en sangre tras el tratamiento no se observó de forma notoria en la población analizada en el presente estudio tras el trasplante (Figura 2). Debido a que todos los pacientes recibieron profilaxis antiviral antes del trasplante, que se interrumpe después del trasplante, la ausencia de un aumento notable de la carga viral en saliva y el escaso número de casos de CMV positivos durante el periodo postrasplante podrían atribuirse a la administración de este tratamiento .

Con respecto al uso de la saliva como herramienta para anticipar la reactivación por CMV, los resultados de este estudio mostraron que la excreción oral de CMV pudo anticipar la DNAemia en el 30 % de los niños. Dos estudios previos han demostrado una frecuencia limitada de este patrón anticipatorio de ADNemia de CMV. Pascual et al. y Correia *et al.*, documentaron una frecuencia de anticipación de 18,8 % y 40 %, respectivamente, en dos cohortes de pacientes adultos sometidos a HSCT (96,98). Esta discrepancia podría explicarse por las diferencias en los

métodos utilizados para recolectar y analizar las muestras. Debido al bajo tamaño de la muestra y al inconveniente del muestreo de saliva, estos resultados deben validarse con un tamaño de muestra mayor, prestando especial atención al proceso de muestreo. Además, considerando que la presencia de herpesvirus en general se ha asociado con una alta mortalidad en los receptores de trasplantes pediátricos (28 %), se recomienda la detección simultánea de otros miembros de la familia Herpesviridae en muestras de saliva, como se informó previamente para el diagnóstico de infecciones virales. en receptores de trasplantes adultos (91,97,101–104).

Finalmente, futuros estudios deben enfocarse en evaluar la utilidad de las muestras de saliva como fuente de ADN viral para caracterizar la resistencia genética viral, ya que esta condición se ha asociado con una alta tasa de pérdida del injerto y los estudios previos publicados solo se han centrado en el uso de muestras derivadas de sangre para realizar este análisis, cuya recolección posee importantes limitaciones en poblaciones pediátricas trasplantadas. En conclusión, este estudio demostró que la saliva podría ser una muestra útil para el diagnóstico y seguimiento de la infección por CMV mediante qPCR en pacientes sometidos a trasplante.

## 8. CONCLUSIÓN

- La frecuencia de casos positivos para CMV mediante qPCR en sangre total, saliva líquida y saliva recolectada con hisopo fue de 1,6 %, 15,3 % y 12,1 %, respectivamente.
- La carga viral promedio en sangre total, saliva líquida y saliva recolectada con hisopo fue de 1,581,02 cp/mL, 1 294,94 cp/mL y 2 159,38 cp/mL, respectivamente.
- No se observaron diferencias significativas entre la carga viral en sangre, saliva líquida y saliva recolectada con hisopo.
- Todas las muestras recolectadas durante el período previo al trasplante dieron negativo mediante qPCR. Asimismo, durante el período postrasplante, 19 muestras resultaron positivas en saliva líquida o saliva recolectada con hisopo y negativas en sus respectivos pares de sangre total.
- Se observó una correlación débil y moderada entre la carga viral en saliva recolectada con hisopo y sangre, y entre la carga viral en saliva recolectada con hisopo y saliva-líquida, respectivamente.
- No se observó correlación entre la carga viral en muestras de saliva líquida y sangre.
- La concordancia entre los resultados de sangre total y saliva recolectada con hisopo, y saliva líquida y saliva recolectada con hisopo, fue de 81,32 % y 73,17 %, respectivamente.



- No se observó concordancia entre los resultados en saliva líquida y sangre. La concordancia entre los resultados de sangre total y saliva-hisopado, y saliva-líquida y saliva-hisopado, fue de 81,32 % y 73,17 %, respectivamente.
- Los hallazgos sugieren que la saliva podría ser una mejor muestra para el diagnóstico de reactivación y monitoreo de CMV en comparación con la sangre completa, basándose en la mayor frecuencia de casos positivos y la observación de cargas virales positivas en la saliva y cargas virales negativas en sus respectivos pares de sangre durante el período post-trasplante.

## 9. RECOMENDACIONES

A futuro, se recomienda plantear estudios que puedan evaluar de forma más precisa la utilidad de la saliva para el diagnóstico de la reactivación de CMV en niños sometidos a trasplante, teniendo en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Emplear hisopos diseñados de forma exclusiva para la recolección de saliva en recién nacidos, bebés y preescolares.
- Realizar la toma de muestras antes del desayuno, y luego de que el paciente se haya enjuagado la boca con agua.
- Ampliar el tamaño de muestra del estudio (por ejemplo, planteando estudios multicéntricos).
- Evaluar la posible interacción de CMV con otros virus tanto de la familia Herpesviridae como de otras familias (por ejemplo, Coronaviridae).
- Evaluar la potencial utilidad de la saliva para la caracterización de resistencia genómica de CMV a fármacos antivirales.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol.* julio de 2010;20(4):202-13.
2. Wang H, Peng G, Bai J, He B, Huang K, Hu X, et al. Cytomegalovirus Infection and Relative Risk of Cardiovascular Disease (Ischemic Heart Disease, Stroke, and Cardiovascular Death): A Meta-Analysis of Prospective Studies Up to 2016. *J Am Heart Assoc.* 6 de julio de 2017;6(7):e005025.
3. Cukuranovic J, Ugrenovic S, Jovanovic I, Visnjic M, Stefanovic V. Viral infection in renal transplant recipients. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:820621.
4. Fischer SA, Avery RK, AST Infectious Disease Community of Practice. Screening of donor and recipient prior to solid organ transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* diciembre de 2009;9 Suppl 4:S7-18.
5. Fishman JA, Emery V, Freeman R, Pascual M, Rostaing L, Schlitt HJ, et al. Cytomegalovirus in transplantation - challenging the status quo. *Clin Transplant.* abril de 2007;21(2):149-58.
6. Humar A, Snyderman D, AST Infectious Diseases Community of Practice. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* diciembre de 2009;9 Suppl 4:S78-86.
7. Traylen CM, Patel HR, Fondaw W, Mahatme S, Williams JF, Walker LR, et al. Virus reactivation: a panoramic view in human infections. *Future Virol.* abril de 2011;6(4):451-63.

8. Mazzulli T, Drew LW, Yen-Lieberman B, Jekic-McMullen D, Kohn DJ, Isada C, et al. Multicenter comparison of the digene hybrid capture CMV DNA assay (version 2.0), the pp65 antigenemia assay, and cell culture for detection of cytomegalovirus viremia. *J Clin Microbiol.* abril de 1999;37(4):958-63.
9. Colina F, Jucá NT, Moreno E, Ballestín C, Fariña J, Nevado M, et al. Histological diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in liver allografts. *J Clin Pathol.* abril de 1995;48(4):351-7.
10. Lazzarotto T. The Best Practices for Screening, Monitoring, and Diagnosis of Cytomegalovirus Disease, Part II. *Clin Microbiol Newsl.* 15 de enero de 2010;32(2):9-15.
11. Humar A, Mazzulli T, Moussa G, Razonable RR, Paya CV, Pescovitz MD, et al. Clinical utility of cytomegalovirus (CMV) serology testing in high-risk CMV D+/R- transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* mayo de 2005;5(5):1065-70.
12. Ross SA, Novak Z, Pati S, Boppana SB. Diagnosis of Cytomegalovirus Infections. *Infect Disord Drug Targets.* octubre de 2011;11(5):466-74.
13. de la Torre-Cisneros J, Fariñas MC, Castón JJ, Aguado JM, Cantisán S, Carratalá J, et al. GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* diciembre de 2011;29(10):735-58.
14. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation.* 27 de agosto de 2013;96(4):333-60.
15. Levitsky J, Freifeld AG, Puumala S, Bargenquast K, Hardiman P, Gebhart C, et al. Cytomegalovirus viremia in solid organ

transplantation: does the initial viral load correlate with risk factors and outcomes? *Clin Transplant*. abril de 2008;22(2):222-8.

16. de Vries JJC, Barbi M, Binda S, Claas ECJ. Extraction of DNA from dried blood in the diagnosis of congenital CMV infection. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2012;903:169-75.
17. Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis*. diciembre de 1988;158(6):1177-84.
18. Tsai CH, Tsai FJ, Shih YT, Wu SF, Liu SC, Tseng YH. Detection of congenital cytomegalovirus infection in Chinese newborn infants using polymerase chain reaction. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. octubre de 1996;85(10):1241-3.
19. Acerca del citomegalovirus y la infección congénita por CMV | CDC [Internet]. 2022 [citado 23 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/cmV/overview-sp.html>
20. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Marin LJ, Brito RM, Oliveira PFC, Coelho TB. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. julio de 2006;36(3):228-30.
21. Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels MG, et al. Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborns. *N Engl J Med*. 2 de junio de 2011;364(22):2111-8.
22. Ross SA, Ahmed A, Palmer AL, Michaels MG, Sánchez PJ, Bernstein DI, et al. Detection of congenital cytomegalovirus infection by real-

time polymerase chain reaction analysis of saliva or urine specimens. *J Infect Dis.* 1 de noviembre de 2014;210(9):1415-8.

23. Cardoso ES de C, Jesus BLS de, Gomes LG da S, Sousa SMB, Gadelha SR, Marin LJ. The use of saliva as a practical and feasible alternative to urine in large-scale screening for congenital cytomegalovirus infection increases inclusion and detection rates. *Rev Soc Bras Med Trop.* abril de 2015;48(2):206-7.
24. Imlay H, Dasgupta S, Boeckh M, Stapleton RD, Rubenfeld GD, Chen Y, et al. Risk Factors for Cytomegalovirus Reactivation and Association With Outcomes in Critically Ill Adults With Sepsis: A Pooled Analysis of Prospective Studies. *J Infect Dis.* 15 de junio de 2021;223(12):2108-12.
25. Rhinow K, Schmidt-Westhausen AM, Ellerbrok H, Pauli G, Schetelig J, Siegert W. [Quantitative determination of CMV-DNA in saliva of patients with bone marrow and stem cell transplantation using TaqMan-PCR]. *Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie MKG.* noviembre de 2003;7(6):361-4.
26. Nowzari H, Jorgensen MG, Aswad S, Khan N, Osorio E, Safarian A, et al. Human cytomegalovirus-associated periodontitis in renal transplant patients. *Transplant Proc.* diciembre de 2003;35(8):2949-52.
27. Correia-Silva J, Victória J, Guimarães A, Salomão U, De Abreu M, Bittencourt H, et al. Cytomegalovirus shedding in the oral cavity of allogeneic haematopoietic stem cell transplant patients. *Oral Dis.* 2007;13(2):163-9.
28. Arévalo Suarez F, Cerrillo Sánchez G, Sandoval Campos J. [Cytomegalovirus in ulcerative colitis in «Hospital Nacional 2 de Mayo»]. *Rev Gastroenterol Peru Organo Of Soc Gastroenterol Peru.* junio de 2007;27(2):150-4.

29. Carranza-Quispe LE, Carranza-Quispe CG. DETECCIÓN DE IgG E IgM ANTI-CITOMEGALOVIRUS EN DONANTES VOLUNTARIOS DE SANGRE EN CAJAMARCA, PERÚ. *Biol Lima* [Internet]. 2014 [citado 1 de marzo de 2022];12(1). Disponible en: <https://revistas.unfv.edu.pe/rtb/article/view/386>
30. Ledermann W. Una mirada crítica sobre la medicina en el Antiguo Egipto. *Rev Chil Infectol.* diciembre de 2016;33(6):680-5.
31. Mejias Quintero ME, Huertas González JM, Salem Salem H. Citomegalovirus y embarazo: reporte de dos casos clínicos. *Rev Peru Ginecol Obstet.* enero de 2016;62(1):77-83.
32. Monzón Castillo EP, Tejada Martínez G, Oliva García AB. Citomegalovirus y gestación: Reporte de un caso en gestación gemelar. *Rev Peru Ginecol Obstet.* enero de 2019;65(1):87-92.
33. Panez-Gallardo JK, Atamari-Anahui N, Limache-Ontiveros Y, Ccorahua-Rios MS, Miranda-Abarca I, Orellana-Siuce CA, et al. Hepatitis por citomegalovirus en una lactante de 2 meses: reporte de un caso. *Rev Gastroenterol Perú.* 30 de septiembre de 2021;41(2):121-5.
34. Pérez-Pereyra J, Morales D, Díaz R, Yoza M, Frisancho O. Úlcera gástrica gigante por citomegalovirus en infección VIH/SIDA. *Rev Gastroenterol Perú.* octubre de 2008;28(4):379-82.
35. Rojas-Contreras C, De la Cruz-Ku G, Valcarcel-Valdivia B. Enfermedad por citomegalovirus en pacientes receptores de trasplante de corazón en un centro de referencia nacional. *Rev Chil Infectol.* diciembre de 2016;33(6):675-9.
36. Salazar Huayna L, Vélez Segovia E, Ruelas Figueroa J, Mendo Urbina F, Montiel-Gonzales M. Pancreatitis por citomegalovirus en inmunocomprometidos. Reporte de casos. *Univ Peru Cienc Apl UPC*

[Internet]. 14 de julio de 2014 [citado 2 de marzo de 2022]; Disponible en: <https://repositorioacademico.upc.edu.pe/handle/10757/322906>

37. Zuhair M, Smit GSA, Wallis G, Jabbar F, Smith C, Devleeschauwer B, et al. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* mayo de 2019;29(3):e2034.
38. Nicastro E, Giovannozzi S, Stroppa P, Casotti V, Callegaro AP, Tebaldi A, et al. Effectiveness of Preemptive Therapy for Cytomegalovirus Disease in Pediatric Liver Transplantation. *Transplantation.* abril de 2017;101(4):804-10.
39. Bélec L, Brogan TV. Real-time PCR-based testing of saliva for cytomegalovirus at birth. *Expert Rev Anti Infect Ther.* diciembre de 2011;9(12):1119-24.
40. Eventov-Friedman S, Manor H, Bar-Oz B, Averbuch D, Caplan O, Lifshitz A, et al. Saliva Real-Time Polymerase Chain Reaction for Targeted Screening of Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis.* 22 de octubre de 2019;220(11):1790-6.
41. Pasternak Y, Oikawa MT, Mendelson E, Osovsky M, Klinger G, Bilavsky E. Diagnosing congenital cytomegalovirus by saliva on Guthrie paper. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* mayo de 2020;126:104337.
42. Pinninti SG, Ross SA, Shimamura M, Novak Z, Palmer AL, Ahmed A, et al. Comparison of Saliva PCR Assay versus Rapid Culture for Detection of Congenital Cytomegalovirus Infection. *Pediatr Infect Dis J.* mayo de 2015;34(5):536-7.
43. Waters S, Lee S, Lloyd M, Irish A, Price P. The Detection of CMV in Saliva Can Mark a Systemic Infection with CMV in Renal Transplant Recipients. *Int J Mol Sci.* 22 de octubre de 2019;20(20):5230.



44. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, et al. The order Herpesvirales. *Arch Virol.* 2009;154(1):171-7.
45. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, editores. Order - Herpesvirales. En: *Virus Taxonomy* [Internet]. San Diego: Elsevier; 2012 [citado 22 de febrero de 2022]. p. 99-107. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123846846000057>
46. Dupont L, Reeves MB. Cytomegalovirus latency and reactivation: recent insights into an age old problem. *Rev Med Virol.* marzo de 2016;26(2):75-89.
47. Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol (Berl).* junio de 2008;197(2):65-73.
48. Sinzger C, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;325:63-83.
49. Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol.* enero de 2015;235(2):288-97.
50. Rubin RH. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* 2001;3 Suppl 2:1-5.
51. Zhu D, Pan C, Sheng J, Liang H, Bian Z, Liu Y, et al. Human cytomegalovirus reprogrammes haematopoietic progenitor cells into immunosuppressive monocytes to achieve latency. *Nat Microbiol.* abril de 2018;3(4):503-13.
52. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol.* julio de 2006;87(Pt 7):1763-79.
53. Dogra P, Sparer TE. What we have learned from animal models of HCMV. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2014;1119:267-88.

54. Britt W. Virus entry into host, establishment of infection, spread in host, mechanisms of tissue damage. En: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editores. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 2007 [citado 23 de febrero de 2022]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47407/>
55. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev.* octubre de 2002;15(4):680-715.
56. Jarvis MA, Nelson JA. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr Opin Microbiol.* agosto de 2002;5(4):403-7.
57. Söderberg-Nauclér C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell.* 3 de octubre de 1997;91(1):119-26.
58. Forte E, Zhang Z, Thorp EB, Hummel M. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Front Cell Infect Microbiol.* 31 de marzo de 2020;10:130.
59. Azevedo LS, Pierrotti LC, Abdala E, Costa SF, Strabelli TMV, Campos SV, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics.* julio de 2015;70(7):515-23.
60. Ljungman P, Brand R, Hoek J, de la Camara R, Cordonnier C, Einsele H, et al. Donor cytomegalovirus status influences the outcome of allogeneic stem cell transplant: a study by the European group for blood and marrow transplantation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 de agosto de 2014;59(4):473-81.

61. Fishman JA. Infection in Organ Transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* abril de 2017;17(4):856-79.
62. Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 de junio de 2010;50(11):1439-47.
63. Natali A, Valcavi P, Medici MC, Dieci E, Montali S, Chezzi C. Cytomegalovirus infection in an Italian population: antibody prevalence, virus excretion and maternal transmission. *New Microbiol.* abril de 1997;20(2):123-33.
64. Souza MA, Passos AM, Treitinger A, Spada C. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* agosto de 2010;43(4):359-61.
65. Instituto Nacional de Salud. Anuario estadístico 2017 [Internet]. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4217.pdf>
66. Lin R, Liu Q. Diagnosis and treatment of viral diseases in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol.* 17 de diciembre de 2013;6:94.
67. Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev.* enero de 2007;20(1):49-78.
68. Genser B, Truschnig-Wilders M, Stünzner D, Landini MP, Halwachs-Baumann G. Evaluation of five commercial enzyme immunoassays for the detection of human cytomegalovirus-specific IgM antibodies in the absence of a commercially available gold standard. *Clin Chem Lab Med.* enero de 2001;39(1):62-70.
69. Rasmussen L, Kelsall D, Nelson R, Carney W, Hirsch M, Winston D, et al. Virus-specific IgG and IgM antibodies in normal and

immunocompromised subjects infected with cytomegalovirus. *J Infect Dis.* febrero de 1982;145(2):191-9.

70. Drew WL. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* agosto de 2007;20(4):408-11.
71. Einsele H, Ehninger G, Steidle M, Vallbracht A, Müller M, Schmidt H, et al. Polymerase chain reaction to evaluate antiviral therapy for cytomegalovirus disease. *Lancet Lond Engl.* 9 de noviembre de 1991;338(8776):1170-2.
72. Evans PC, Soin A, Wreghitt TG, Alexander GJ. Qualitative and semiquantitative polymerase chain reaction testing for cytomegalovirus DNA in serum allows prediction of CMV related disease in liver transplant recipients. *J Clin Pathol.* diciembre de 1998;51(12):914-21.
73. Tripathi V, Chatterjee KS, Das R. Non-covalent Interaction With SUMO Enhances the Activity of Human Cytomegalovirus Protein IE1. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:662522.
74. Paulus C, Nevels M. The Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Proteins as Antagonists of Intrinsic and Innate Antiviral Host Responses. *Viruses.* 5 de noviembre de 2009;1(3):760-79.
75. Cherrington JM, Mocarski ES. Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element. *J Virol.* marzo de 1989;63(3):1435-40.
76. Hayhurst GP, Bryant LA, Caswell RC, Walker SM, Sinclair JH. CCAAT box-dependent activation of the TATA-less human DNA polymerase alpha promoter by the human cytomegalovirus 72-kilodalton major immediate-early protein. *J Virol.* enero de 1995;69(1):182-8.

77. Poma EE, Kowalik TF, Zhu L, Sinclair JH, Huang ES. The human cytomegalovirus IE1-72 protein interacts with the cellular p107 protein and relieves p107-mediated transcriptional repression of an E2F-responsive promoter. *J Virol.* noviembre de 1996;70(11):7867-77.
78. Adamson CS, Nevels MM. Bright and Early: Inhibiting Human Cytomegalovirus by Targeting Major Immediate-Early Gene Expression or Protein Function. *Viruses.* 16 de enero de 2020;12(1):E110.
79. Sanbonmatsu Gámez S, Ruiz MP, Navarro Marí JM. [Infection by human cytomegalovirus]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* febrero de 2014;32 Suppl 1:15-22.
80. Boppana SB, Ross SA, Novak Z, Shimamura M, Tolan RW, Palmer AL, et al. Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA.* 14 de abril de 2010;303(14):1375-82.
81. Miller MJ, Bovey S, Pado K, Bruckner DA, Wagar EA. Application of PCR to multiple specimen types for diagnosis of cytomegalovirus infection: comparison with cell culture and shell vial assay. *J Clin Microbiol.* enero de 1994;32(1):5-10.
82. Weinberg A, Hodges TN, Li S, Cai G, Zamora MR. Comparison of PCR, antigenemia assay, and rapid blood culture for detection and prevention of cytomegalovirus disease after lung transplantation. *J Clin Microbiol.* febrero de 2000;38(2):768-72.
83. Evans JHC. Investigation of urinary tract infection in children. *Curr Paediatr.* 1 de agosto de 2006;16(4):248-53.
84. May OW. Urine Collection Methods in Children: Which is the Best? *Nurs Clin North Am.* junio de 2018;53(2):137-43.

85. Zheng B, Wu FF, Li XX, Shen R, Zheng Z, Liu HY. Diagnostic test accuracy of PCR by saliva specimen for cytomegalovirus infection in newborn: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 25 de noviembre de 2022;101(47):e31776.
86. Pasternak Y, Oikawa MT, Mendelson E, Osovsky M, Klinger G, Bilavsky E. Diagnosing congenital cytomegalovirus by saliva on Guthrie paper. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. mayo de 2020;126:104337.
87. Mukhopadhyay S, Itell HL, Hartman E, Woodford E, Dhudasia MB, Steppe JT, et al. Breast Milk and Saliva for Postnatal Cytomegalovirus Screening among Very Low Birth Weight Infants. *Pediatr Infect Dis J*. 1 de noviembre de 2022;41(11):904-10.
88. Shlonsky Y, Smair NS, Mubariki R, Bamberger E, Hemo M, Cohen S, et al. Pooled saliva CMV DNA detection: A viable laboratory technique for universal CMV screening of healthy newborns. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. mayo de 2021;138:104798.
89. Silva J, Fernandes C, Marques A, Maria AT, Correia C, Tuna ML, et al. Evaluation of saliva pools method for detection of congenital human cytomegalovirus infection. *J Virol Methods*. enero de 2020;275:113759.
90. Warren WP, Balcarek K, Smith R, Pass RF. Comparison of rapid methods of detection of cytomegalovirus in saliva with virus isolation in tissue culture. *J Clin Microbiol*. abril de 1992;30(4):786-9.
91. Correa Sierra CB, Kourí Cardellá V, Pérez Santos L, Silverio CE, Hondal N, Florin J. Herpesviruses excretion in saliva of pediatric transplant recipients. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. diciembre de 2017;19(6).

92. Jakharia N, Howard D, Riedel DJ. CMV Infection in Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Prevention and Treatment Strategies. *Curr Treat Options Infect Dis.* 2021;13(3):123-40.
93. Khan G, Kangro HO, Coates PJ, Heath RB. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J Clin Pathol.* mayo de 1991;44(5):360-5.
94. Mahony J, Chong S, Jang D, Luinstra K, Faught M, Dalby D, et al. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. *J Clin Microbiol.* noviembre de 1998;36(11):3122-6.
95. Barani R, Seshan V, Ravi Y, Soundararajan P, Palani G, Srikanth P. Detection of cytomegalovirus disease by real-time quantitative PCR targeting immediate early gene (ppUL83) in different samples among post-renal-transplant recipients. *Indian J Med Microbiol.* junio de 2019;37(2):281-4.
96. Correia-Silva JF, Bruna-Romero O, Resende RG, Miranda LPM, Oliveira FE, Costa FO, et al. Saliva as a source of HCMV DNA in allogeneic stem cell transplantation patients. *Oral Dis.* marzo de 2010;16(2):210-6.
97. Sarmiento DJ de S, Tozetto-Mendoza TR, de Souza ACMF, Maciel R, Paiao H, Lima SH, et al. Herpesviruses oral shedding and viremia in renal transplant recipients: A longitudinal study. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* agosto de 2020;22(4):e13330.
98. Pascual T, Solano C, Torres I, Talaya A, Giménez E, Vinuesa V, et al. Monitoring of oral cytomegalovirus DNA shedding for the prediction

- of viral DNAemia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Med Virol.* agosto de 2018;90(8):1375-82.
99. Exler S, Daiminger A, Grothe M, Schalasta G, Enders G, Enders M. Primary cytomegalovirus (CMV) infection in pregnancy: Diagnostic value of CMV PCR in saliva compared to urine at birth. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* agosto de 2019;117:33-6.
100. Luck SE, Emery VC, Atkinson C, Sharland M, Griffiths PD. Compartmentalized dynamics of cytomegalovirus replication in treated congenital infection. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* septiembre de 2016;82:152-8.
101. Bohórquez SP, Díaz J, Rincón CM, Estupiñán M, Chaparro M, Low-Calle AM, et al. Shedding of HSV-1, HSV-2, CMV, and EBV in the saliva of hematopoietic stem cell transplant recipients at Fundación HOMI - Hospital de la Misericordia, Bogotá, D.C. *Biomed Rev Inst Nac Salud.* 19 de mayo de 2016;36(0):201-10.
102. Costa ALF, Santos BA, Torregrossa VR, Miranda ECM, Vigorito AC, Palmieri M, et al. Oral shedding of CMV and HSV-1 in hematopoietic stem cell transplantation patients. *Oral Dis.* septiembre de 2021;27(6):1572-9.
103. Düver F, Weißbrich B, Eyrich M, Wölfl M, Schlegel PG, Wiegering V. Viral reactivations following hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients - A single center 11-year analysis. *PloS One.* 2020;15(2):e0228451.
104. Sarmiento DJ de S, Caliento R, Souza AO de, Tozetto-Mendoza TR, Palmieri M, Martins VA de O, et al. Salivary shedding of herpesviruses in renal transplant recipients. *J Investig Clin Dent.* noviembre de 2018;9(4):e12356.



## 11. ANEXOS

### Anexo 1

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título del proyecto:** Utilidad de muestras no invasivas para el diagnóstico de la reactivación y monitoreo de la infección por Citomegalovirus en pacientes de las unidades de trasplante del INSNSB.

**Investigador responsable:** Dr. Holger Mayta Malpartida

**Centro, unidad, servicio:** Sub Unidad de Investigación y Transferencia Tecnológica del INSN - SB

**Entidad financiadora:** Concytec - Fondecyt

#### 1. Descripción general:

Mi nombre es Holger Mayta, soy biólogo e investigador del INSN – SB. Estamos realizando un trabajo de investigación que tiene como objetivo detectar un virus, cuyo nombre es Citomegalovirus humano, en la saliva y orina, y determinar la resistencia de este virus a ciertos medicamentos en los niños atendidos en la Sub-Unidad de Atención Integral Especializada al Paciente de Progenitores Hematopoyéticos y la Unidad de Donación y Trasplante del INSN - SB. Le estamos solicitando su autorización para tomar muestras de sangre, saliva y orina de su niño con el objetivo de estudiar si es factible detectar este virus en estas muestras y determinar porque es resistente a algunos medicamentos, eso quiere decir que el medicamento no lo puede eliminar. Esta investigación ayudará a encontrar un método fácil y seguro para detectar este virus sin necesidad de sacar muestras de sangre y comprender mejor el mecanismo de resistencia de estos virus a algunos medicamentos.

Antes de decidir si quiere que su niño participe o no, le rogamos lea detenidamente este documento que incluye la información sobre esta investigación. Puede formular todas las preguntas que le surjan y solicitar aclaración sobre cualquier aspecto del mismo.

El proyecto cuenta con el informe favorable del Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja.

Su participación en este estudio es voluntaria: si usted decide no participar, su niño recibirá todos los cuidados médicos que pudiera necesitar y la relación con el equipo médico que le atiende no se verá afectada.

#### 2. Propósito del estudio:

El objetivo de este estudio es detectar el virus Citomegalovirus humano en muestras de saliva, orina y sangre, así como determinar su resistencia a medicamentos en niños atendidos en la Sub-Unidad de Atención Integral Especializada al Paciente de Progenitores Hematopoyéticos y la Unidad de Donación y Trasplante del INSNSB. El conocimiento generado de esta investigación contribuirá a establecer un método no invasivo para detectar este virus y determinar si es resistente o no a algunos medicamentos.

### 3. Procedimientos del estudio:

La muestra de sangre será recolectada dos veces a la semana, antes del trasplante y durante tres meses luego del trasplante. La recolección se realizará en el momento que se extraigan las muestras de rutina solicitadas por el médico tratante, no se le realizará un pinchazo adicional a su niño. La cantidad recolectada será de 5 ml, que es aproximadamente 1 cucharadita de té. Asimismo, se tomará 1 muestra de saliva de su niño usando una especie de cañita llamada pipeta, que permite aspirar un poquito de saliva, y un hisopo de algodón, que permite absorber la saliva al colocarlo debajo de la lengua y dejarlo ahí durante unos segundos. Esta muestra será recolectada dos veces a la semana, antes del trasplante y durante tres meses luego del trasplante, cada vez que se extraiga la muestra de sangre solicitada por el médico tratante. En cuanto a la muestra de orina, esta será recolectada los días de la toma de las muestras de saliva. Solo se recolectará una muestra por cada día de toma, equivalente a aproximadamente una taza de té.

Las muestras obtenidas serán procesadas en los laboratorios de investigación de nuestro Instituto y de la Universidad Peruana Cayetano Heredia para los fines indicados.

### 4. Riesgos e inconvenientes para el participante

No se requerirá realizar un pinchazo adicional para extraerle la sangre a su niño, esta será recolectada adicionalmente en el momento que le extraigan sangre para una muestra de rutina indicada por su médico. No existe ningún riesgo para su niño en la obtención de las muestras de saliva u orina.

### 5. Beneficios

Usted no recibirá ningún beneficio por su participación en este estudio. En cualquier caso, este estudio ayudará a encontrar una forma simple y fácil de detectar este virus a través de la saliva, sin necesidad de sacar muestras de sangre a los niños. Además, los datos recogidos en el mismo podrán derivar en un mayor conocimiento sobre las infecciones por este virus que afectan a los niños trasplantados, en relación al diagnóstico y a la resistencia de este virus a ciertos medicamentos.

### 6. Derechos del participante

Usted puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin necesidad de dar explicaciones y sin ningún perjuicio en el tratamiento médico que recibe su niño.

#### 7. Confidencialidad

La muestra será asociada a los datos del niño. El nombre de su niño será codificado y eliminado para mantener el anonimato. Una vez que se hayan procesado las muestras estas serán eliminadas.

#### 8. Personas de contacto

Si tuviese usted alguna duda puede contactarse con la Bióloga Alejandra Pando, al teléfono [REDACTED] o a su correo electrónico [REDACTED], así mismo si siente que sus derechos han sido vulnerados puede contactarse con el presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación del INSN SB, el Dr. Melitón Arce al teléfono 2300600, anexo 4041 o al correo electrónico [REDACTED] o acercarse al Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja localizado en Av. Agustín de la Rosa Toro 1399 - San Borja, Lima.

## CONSENTIMIENTO

### I. Datos del estudio para el que se otorga el consentimiento

**Investigador principal:** Dr. Holger Mayta Malpartida

**Título proyecto:** Utilidad de muestras de saliva para el diagnóstico de la reactivación y monitoreo de la infección por Citomegalovirus en pacientes de las unidades de trasplante del INSNSB.

### II. Datos del padre o apoderado

Nombre completo y apellidos:

---

### III. Persona que proporciona la información y la hoja de consentimiento

Nombre completo y apellidos:

---

He leído, he sido informado y comprendo el contenido de la presente hoja de Información, lo que acredito con mi firma en prueba de mi consentimiento en todo lo que en ella se contiene. He preguntado y aclarado las posibles dudas al Dr. /Dra/ Biólogo:

---

Entiendo que mi participación es voluntaria y gratuita y comprendo que puedo solicitar la revocación de este consentimiento en cualquier momento, sin tener que ofrecer explicaciones y sin que esto repercuta en los cuidados médicos presentes y/o futuros brindados a mi hijo.

Entiendo que una copia de esta ficha de consentimiento me será entregada y doy mi consentimiento para que mi hijo participe en esta investigación.

Firma del Padre o apoderado:

---

Firma de la persona que proporciona la información:

---

Nombre y firma del testigo:

---

Fecha: 09 de diciembre del 2019

## Anexo 2

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

**Título de proyecto:** Utilidad de muestras no invasivas para el diagnóstico de la reactivación y monitoreo de la infección por Citomegalovirus en pacientes de las unidades de trasplante del INSNSB.

**Investigador responsable:** Dr. Holger Mayta Malpartida

**Centro, unidad, servicio:** Sub Unidad de Investigación y Transferencia Tecnológica del INSN - SB

**Entidad financiadora:** Concytec - Fondecyt

Mi nombre es Holger Mayta, soy biólogo e investigador del INSN – SB. Estamos realizando un trabajo de investigación que tiene como objetivo detectar un virus, cuyo nombre es Citomegalovirus humano, en la saliva y orina, y determinar la resistencia de este virus a ciertos medicamentos en los niños atendidos en la Sub-Unidad de Atención Integral Especializada al Paciente de Progenitores Hematopoyéticos y la Unidad de Donación y Trasplante del INSN - SB. Como parte de este estudio estamos solicitando el almacenamiento de las muestras de sangre, saliva y orina obtenidas de su niño.

#### 1. Descripción general:

Le estamos solicitando su autorización para almacenar las muestras de saliva, orina y sangre obtenidas del estudio “Utilidad de muestras no invasivas para el diagnóstico de la reactivación y monitoreo de la infección por Citomegalovirus en pacientes de las unidades de trasplante del INSN - SB”, el cual cuenta con el informe favorable del Comité de Ética en Investigación del INSN - SB. El almacenamiento de las muestras se realizará con el objetivo de realizar estudios a futuro sobre la resistencia antiviral de este virus a drogas, a fin de dar un reporte oportuno que contribuya a un mejor manejo terapéutico de los niños que son trasplantados.

Antes de decidir si quiere participar o no, le rogamos lea detenidamente este documento. Puede formular todas las preguntas que le surjan y solicitar la aclaración sobre cualquier aspecto del mismo.

El lugar donde se almacenará la muestra será el área de Seroteca de la Sub Unidad de Investigación e Innovación Tecnológica del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja.

El proyecto cuenta con el informe favorable del Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja para que pueda ser desarrollado.

Su participación en este estudio es voluntaria; si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que pudiera necesitar y su relación con el equipo médico que le atiende no se verá afectada.

## 2. Propósito del estudio:

El objetivo es almacenar las muestra de sangre, saliva y orina obtenidas para el estudio “Utilidad de muestras no invasivas para el diagnóstico de la reactivación y monitoreo de la infección por Citomegalovirus en pacientes de las unidades de trasplante del INSN - SB”, con el propósito de realizar futuras investigaciones en relación al diagnóstico y detección de resistencia a medicamentos de este virus.

## 3. Procedimientos del estudio:

Se recolectarán los datos de la historia clínica de su niño que está hospitalizado. Las muestras de sangre, orinasaliva serán almacenadas en el área de Seroteca de la Sub Unidad de Investigación e Innovación tecnológica del INSN - SB para realizar estudios especiales de resistencia a medicamentos

## 4. Muestras a recoger:

Esta investigación está aprobada por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja, no implica toma de muestras a su niño ya que las muestras ya fueron tomadas y serán almacenadas.

## 5. Riesgos e inconvenientes para el participante

No existe ningún riesgo para su niño, pues se le está solicitando su autorización para el almacenamiento de las muestras ya tomadas. Nosotros no lo contactaremos para que nos brinde información adicional

## 6. Beneficios

Usted no recibirá ningún beneficio personal por su participación. En cualquier caso, los datos recogidos en el mismo podrán derivar en un mayor conocimiento sobre las infecciones por Citomegalovirus que afectan a los niños trasplantados, en relación al diagnóstico y detección de resistencia a medicamentos del virus, para contribuir a dar un tratamiento oportuno y adecuado.

## 7. Derechos del participante

Usted puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin necesidad de dar explicaciones y sin ningún perjuicio en el tratamiento médico de su niño. Asimismo, tiene derecho a incluir las restricciones que desee respecto del uso de las muestras de su niño.

## 8. Confidencialidad

La muestra donada en un inicio será asociada a los datos del niño. Para mantener el anonimato del nombre de su niño, este será codificado y luego eliminado.

## 9. Información sobre la muestra donada

Las muestras donadas serán almacenadas en una ultracongeladora en el área de Seroteca de la Sub Unidad de Investigación e Innovación Tecnológica por 10 años y luego serán eliminadas. Estas muestras podrán ser usadas para futuras investigaciones en relación al diagnóstico y detección de resistencia a drogas del virus Citomegalovirus aislado.

## 10. Personas de contacto

Si tuviese usted alguna duda puede contactarse con la Bióloga Alejandra Pando, al teléfono [REDACTED] o a su correo electrónico [REDACTED], así mismo si siente que sus derechos han sido vulnerados puede contactarse con el presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación del INSN SB, el Dr. Melitón Arce al teléfono 2300600, anexo 4041 o al correo electrónico [REDACTED] o acercarse al Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja localizado en Av. Agustín de la Rosa Toro 1399 - San Borja, Lima.

## CONSENTIMIENTO

### I. Datos del estudio para el que se otorga el consentimiento

**Investigador principal:** Dr. Holger Mayta Malpartida

**Título proyecto:** Utilidad de muestras no invasivas para el diagnóstico de la reactivación y monitoreo de la infección por Citomegalovirus en pacientes de las unidades de trasplante del INSNSB.

### II. Datos del padre o apoderado

Nombre completo y apellidos:

---

---

### III. Persona que proporciona la información y la hoja de consentimiento



Nombre completo y apellidos:

---

---

He leído, he sido informado y comprendo el contenido de la presente hoja de Información, lo que acredito con mi firma en prueba de mi consentimiento en todo lo que en ella se contiene. He preguntado y aclarado las posibles dudas al Dr. /Dra/ Biólogo:

---

---

Entiendo que mi participación es voluntaria y gratuita y comprendo que puedo solicitar la revocación de este consentimiento en cualquier momento, sin tener que ofrecer explicaciones y sin que esto repercuta en los cuidados médicos presentes y/o futuros brindados a mi hijo.

Entiendo que una copia de esta ficha de consentimiento me será entregada y doy mi consentimiento para que las muestras se conserven con fines de investigación y se utilicen en investigaciones futuras relacionadas con la enfermedad en estudio.

Firma del Padre o apoderado:

---

Firma de la persona que proporciona la información:

---

Nombre y firma del testigo:

---

Fecha: 09 de diciembre del 2019

## Anexo 3

### Ficha de recolección de datos

1. **Código de identificación:** \_\_\_\_\_

2. **Número de historia clínica:** \_\_\_\_\_

3. **Edad:** \_\_\_\_\_ años

4. **Sexo:**

Masculino

femenino

5. **Lugar de procedencia**

Lima

Provincia

6. **Enfermedades según órgano afectado motivo del trasplante:**

Riñón

Riñón poli quístico y enfermedad de Allport.

Lupus eritematoso sistémico.

Hipertensión arterial.

Pielonefritis crónica y glomerulonefritis.

Diabetes mellitus y enfermedad obstructiva por cálculos renales.

Hígado

Cirrosis hepáticas de diversos orígenes (hepatitis B o C, alcohol, enfermedades autoinmunes, tóxicos, trastornos del metabolismo del hierro y del cobre).

Enfermedades congénitas (atresia de vías biliares, enfermedades metabólicas).

Insuficiencia hepática aguda grave (Hepatitis fulminante o subfulminante).

Tumores hepáticos

Corazón

Cardiopatía isquémica.

Miocardopatías.

Cardiopatía valvular.

Cardiopatía congénita.

Pulmón

Patología pulmonar obstructiva crónica (enfisema).

Patología restrictiva (fibrosis pulmonar idiopática o secundaria).

Patología séptica (bronquiectasias o fibrosis quística).

Patología vascular (hipertensión pulmonar primaria o secundaria)

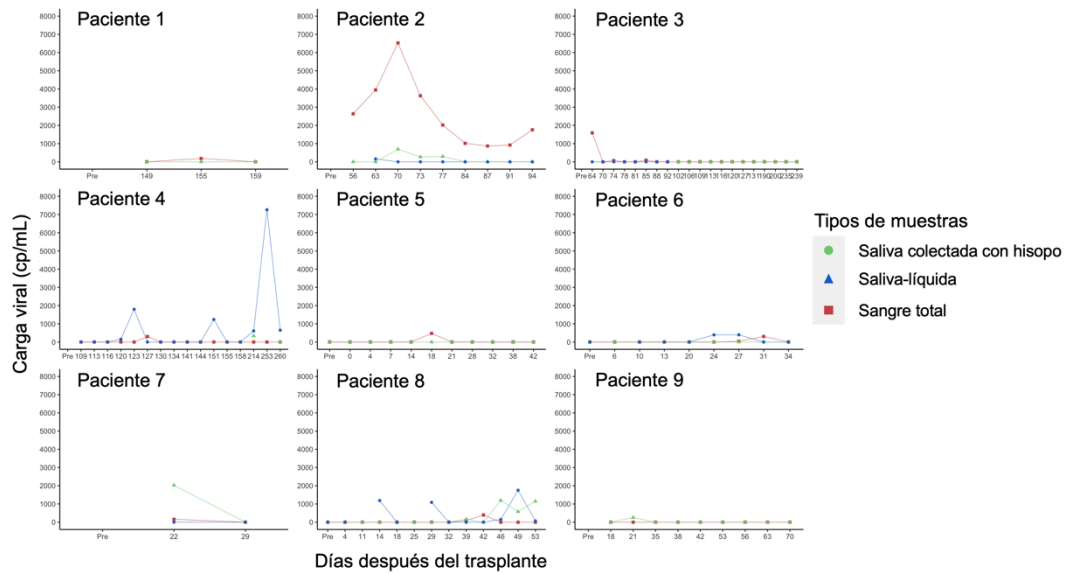
Páncreas

Enfermedad pancreática.  
Diabetes mellitus insulino dependiente  
Médula ósea  
Leucemia linfoblástica aguda.  
Leucemia mieloide aguda.  
Leucemia mieloide crónica.  
Anemia aplásica.  
Linfoma Hodgkin y no-Hodgkin.  
Talasemia.  
Enfermedad de células falciformes.  
Córnea  
Queratocono.  
Queratopatía bullosa  
Leucoma.  
Úlceras

**7. Tipo de trasplante:**

Autotrasplante,  
Autoinjerto o trasplante autólogo  
Isotrasplante o trasplante singénico  
Alotrasplante u homotrasplante  
Xenotrasplante,  
Heterotrasplante, o trasplante xenogénico

## Anexo 4



Cinética de la carga viral en las muestras de sangre, saliva recolectada con hisopo y saliva líquida, para los 9 pacientes que presentaron al menos un resultado positivo en alguna de estas muestras. Para el paciente 4, no se muestra el valor atípico correspondiente a la carga viral de 16789,47 cp/mL en saliva recolectada con hisopo obtenida 253 días después del trasplante.