



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA.

“Detección de citomegalovirus humano, en muestras biológicas de pacientes sintomáticos, por reacción en cadena de la polimerasa”.

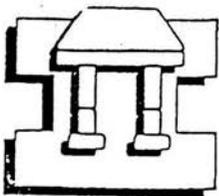
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

Alejandro Rubén Salazar Sánchez



IZTACALA

MEXICO, D. F.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



U.N.A.M. CAMPUS

La presente tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Pruebas Moleculares del Departamento de Virología " Dr. Carlos Campillo Sáinz", del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE).

AGRADECIMIENTOS

Al Biólogo Baltasar Briseño García, quien me permitió vislumbrar el camino de la virología; los resultados del presente trabajo y la curiosidad por saber acerca de este virus, se originaron de la confianza que tuvo a bien concederme.

Por la paciencia y los consejos que recibí de cada uno de ustedes; desde que se presentó el protocolo de tesis hasta la redacción final de la misma:

Biól. Norma Bautista Matías.

Q.F.B. Arturo Oros Salinas.

Q.F.B. Mauricio Vázquez Pichardo.

Gracias a las siguientes personas por el apoyo logístico sin el cual no hubiera sido posible que un loco soñador, pusiera los pies sobre la tierra.

Dr. en Ciencias Alejandro Escobar Gutiérrez.

Dra. en Ciencias Roxana Pelayo.

M. en Ciencias Mónica Moreno Galván.

DEDICATORIAS

Al ser más maravilloso y noble, que me dio el don de la vida, que me enseñó que la humildad y la tolerancia nos hacen libres, que la paciencia es nuestro mejor compañero.

Sra. Catalina Sánchez Ramos.

Para mis hijas: Adriana Salazar García.
 Gisela Salazar García.
 Qoradyh Salazar Jiménez.

Para mi amigo Antonio Ortega Calderón, por los consejos y apoyo moral, que nunca delataron su sabia mano y hacían que buscara lo que yo siempre soñé.

Gracias a todos ustedes.

Índice de contenido



Índice de contenido	i
Índice de cuadros	v
Índice de figuras	vi
Resumen	vii
1 Introducción.	1
1.1 Estructura del virión	2
1.1.1 Cápsida.	2
1.1.2 Envoltura	2
1.1.3 Tegumento	2
1.1.4 Núcleo	3
1.1.5 Diámetro	3
1.1.6 Taxonomía	3
1.1.6.1 Especificidad al hospedero	5
1.1.6.2 Células infectadas con HCMV	5
1.1.7 Características fisicoquímicas	6
1.2 Ciclo viral	6
1.2.1 Adhesión	6
1.2.2 Entrada	8
1.2.3 Expresión genética	9
1.2.4 Replicación	9
1.3 Estructura y organización del genoma viral	11
1.4 Epidemiología	12
1.4.1 Reservorio	14
1.4.2 Transmisión	14
1.4.2.1 Intrauterina	15
1.4.2.2 Perinatal	15

1.4.2.3 En la infancia	15
1.4.2.4 En los adultos	16
1.4.2.5 Transfusión sanguínea	16
1.4.2.6 Transplante	16
1.4.3 Fuente de infección	16
1.5 Patología	17
1.5.1 Hospedero inmunocompetente	18
1.5.2 Pacientes transplantados	18
1.5.3 Pacientes con VIH	18
1.5.4 Recién nacidos	19
1.5.5 Mujeres embarazadas	20
1.5 Patogénesis	20
1.6.1 Enfermedad de las inclusiones citomegálicas	22
1.6.1.1 Riñón	23
1.6.1.2 Pulmón	23
1.6.1.3 Sistema gastrointestinal	23
1.6.1.4 Sistema urogenital	24
1.6.1.5 Sistema nervioso central	24
1.6.2 Latencia y reactivación del HCMV	24
1.7 Diagnóstico.	26
1.7.1 Diagnóstico clínico	27
1.7.2 Histopatología	28
1.7.3 Aislamiento viral	28
1.7.4 Serología	31
1.7.5 Anticuerpos monoclonales	32
1.7.6 Reacción en cadena de la polimerasa	33
1.7.6.1 Desnaturalización	34
1.7.6.2 Alineación	35
1.7.6.3 Extensión	35
1.8 Prevención y tratamiento	36
2 Antecedentes	38
3 Objetivos	39

3. 1 Objetivo general	39
3. 2 Objetivos particulares	39
4 Hipótesis	39
5 Justificación	39
6 Plan de trabajo	40
7 Material y métodos	41
7.1 Población de pacientes	41
7.2 Material biológico	43
7.2.1 Cepa celular	43
7.2.2 Cepa viral	43
7.3 Reactivos	44
7.4 Material de laboratorio	44
7.5 Equipo de laboratorio	44
7.6 Procesamiento de las muestras clínicas	45
7.6.1 Procesamiento de la orina	45
7.6.2 Procesamiento de la sangre total	45
7.6.3 Digestión de proteínas	47
7.7 Extracción del DNA (método fenol-cloroformo)	47
7.8 Extracción del DNA con DNAzol	48
7.9 Propagación del virus tipo Ad-169	49
7.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	50
7.10.1 Mezcla de reacción	50
7.10.2 Secuencias de los iniciadores	52
7.10.3 Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 %	54
8 Resultados.	55

9 Discusión	60
10 Conclusiones	62
10.1 Perspectivas	63
11 Bibliografía	64
Apéndice A: Preparación de reactivos.	72
Apéndice B: Abreviaturas	79
Apéndice C: Glosario de términos médicos.	80

Índice de cuadros.

Cuadro 1	Virus pertenecientes a la familia herpesviridae.	4
Cuadro 2	Población de recién nacidos sintomáticos.	41
Cuadro 3	Población de donadores de cordón umbilical	42
Cuadro 4	Población de adultos sintomáticos	42
Cuadro 5.	Población de pacientes con VIH.	43
Cuadro 6	Mezcla de reacción para la PCR.	50
Cuadro 7.	Programa para termociclador (primera amplificación).	51
Cuadro 8.	Programa para termociclador (segunda amplificación.	51
Cuadro 9	Secuencias de los iniciadores de la primera amplificación	52
Cuadro 10	Secuencias de los iniciadores de la segunda amplificación	52
Cuadro 11	Resultados de la población de recién nacidos sintomáticos.	57
Cuadro 12	Resultados de la población de donadores de cordón umbilical.	57
Cuadro 13	Resultados de la población de adultos sintomáticos.	58
Cuadro 14	Resultados de la población de adultos con VIH.	58

Índice de figuras

Figura 1	Virión del citomegalovirus humano (HCMV)	3
Figura 2	Célula citomegálica observada en placenta humana.	5
Figura 3	Células citomegálica observada en el páncreas.	5
Figura 4	Adhesión del virus a la membrana celular.	7
Figura 5	Entrada del virus a la célula.	8
Figura 6	Localización de los iniciadores en el exón 4 de la región del gen inmediatamente temprano de citomegalovirus humano (del virus tipo Ad-169)..	53
Figura 7	Detección por PCR de virus tipo Ad-169.	55
Figura 8	Detección de virus silvestre en recién nacidos sintomáticos.	56
Figura 9	Detección de virus silvestre en un paciente con transplante.	56
Figura 10	Sensibilidad de la PCR.	56
Figura 11a	Células MRC-5 sin infectar.	59
Figura 11b	Células MRC-5 infectadas con el virus tipo AD-169.	59
Figura 11c	Células MRC-5 infectadas con plasma natural del caso 1020.	59
Figura 11d	Células MRC-5 infectadas con plasma leucocitario del caso 1020.	59
Figura 11e	Células MRC-5 infectadas con plasma natural del caso 1030.	59
Figura 11f	Células MRC-5 infectadas con plasma leucocitario del caso 1030.	59

Resumen.

En la actualidad el citomegalovirus humano ha tomado relevancia en casos de infección congénita sintomática y en pacientes transplantados; además es una de las causas significativas de morbilidad y mortalidad entre la población de pacientes con VIH.

La técnica diagnóstica comúnmente utilizada (ELISA) aplicada a recién nacidos sintomáticos presenta dificultades en la obtención de muestra debido a la edad y condiciones del paciente. Por otro lado el aislamiento del virus a partir de muestras de orina requiere mucho tiempo para dar un resultado.

En la presente tesis se logró la detección de citomegalovirus humano por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de orina de recién nacidos y en plasma de un niño y un joven con trasplante. Las condiciones óptimas de la PCR se establecieron después de 14 ensayos durante la fase experimental y se logró amplificar un fragmento de 146 pares de bases de la región principal del exón 4 del gen IE (inmediatamente temprano) que correspondió con el amplificado a partir de la cepa tipo de citomegalovirus humano, Ad-169.

Finalmente se logró aislar el citomegalovirus silvestre en monocapas de fibroblastos diploides de pulmón fetal humano (células MRC-5) en cinco de los casos clínicos estudiados.

1. Introducción.

El citomegalovirus humano (HCMV) es un miembro de la familia Herpesviridae, incluido en la subfamilia betaherpesviridae. Los virus incluidos en esta subfamilia, se caracterizan por tener una predilección restringida por un hospedero específico, ciclo de crecimiento muy largo y diseminación lenta en cultivo celular. Las células infectadas tienden a cambiar su morfología (células citomegálicas) con inclusiones intranucleares; las células infectadas pueden contener al virus por tiempo indefinido, por lo que después de la infección primaria, el virus no es eliminado por el sistema inmune del hospedero y de esta manera causa una infección latente en muchos de los tejidos del hospedero. La reactivación del virus, ocurre principalmente en los pacientes inmunocomprometidos, particularmente en pacientes afectados con VIH con respuesta celular inmune deficiente (Laue 1997; Drew 1992; Monto, 1990). En los pacientes inmunosuprimidos (receptores de trasplante), existe un riesgo alto de desarrollar la enfermedad. La infección con HCMV es acompañada por periodos de excreción intermitente de virus, aún en la presencia de altos títulos de anticuerpo específico. La diseminación del virus ocurre principalmente por contacto cerrado con el individuo excretor, aunque la diseminación a través de la placenta o por transfusión sanguínea, es muy frecuente (Flint et al, 2000; Brown, 1998., Alford, 1996., Fenner and White, 1973).

1.1 Estructura del virión.

El HCMV tiene una cápsida de morfología icosaédrica (fig. 1), constituida por 162 capsómeros, la cual está rodeada por un tegumento, envuelto superficialmente por una capa de glicoproteínas; en forma de espículas. El peso molecular del virión maduro es de 1.5×10^8 Da.

1.1.1 Cápsida.

La cápsida está constituida por una proteína principal (MCP), proteína menor (mCP), proteínas asociadas (pUL 49, pUL 85) y proteína de ensamble (COOH denominada pUL 80).

1.1.2 Envoltura.

Los principales fosfolípidos de la envoltura son los siguientes: El heterodímero de un importante precursor segmentado que participa en la fusión celular y en la transmisión célula-célula, denominado gB, el fosfolípido gH para la adhesión a los receptores de la célula, la glicoproteína gpUL 47-52 que participa en la adhesión del virión con el receptor celular (heparan-sulfato), la glicoproteína gpUS28, que interviene en la unión al receptor de las citocinas y la glicoproteína gpUS27 para el receptor acoplado G.

1.1.3 Tegumento.

Las proteínas del tegumento están fosforiladas y son aproximadamente 20; su función no es del todo conocida. Las proteínas del tegumento son: la proteína de la matriz ó pp65 (ppUL83), transactivador ó pp71 (ppUL82), fosfoproteína alcalina ó pp150 (ppUL32), proteínas de maduración ó pp130, pp128 (pp UL 28 y ppUL 99 respectivamente).

1.1.4 Núcleo.

Está constituido por DNA lineal de doble hélice con aproximadamente 240 kilopares de bases (kb).

1.1.5 Diámetro.

El HCMV es un virus envuelto y el virión completo maduro presenta una cápsida de 150-200 ηm de diámetro.

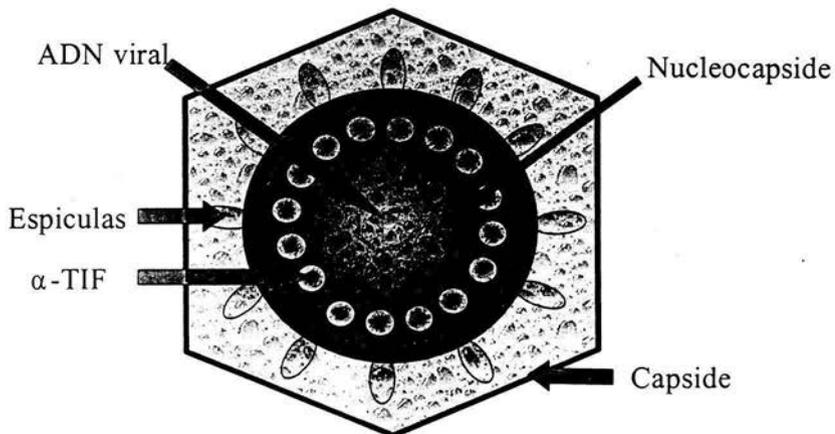


Figura 1. Virión del citomegalovirus humano.

1.1.6 Taxonomía.

El CMVH pertenece a la familia Herpesviridae, se le ha referido en la literatura médica desde 1956 con cualquiera de los siguientes nombres: virus citomegálico humano y virus de las inclusiones citomegálicas. Actualmente se le refiere como: HCMV (por sus siglas en inglés), citomegalovirus, virus del herpes humano tipo 5, betaherpesvirus humano. El HCMV a sido incluido en la subfamilia Betaherpesvirinae (cuadro 1).

Cuadro 1. Virus patógenos para humanos de la familia Herpesviridae.

Nombre común (sinónimos)	Designación	Subfamilia	Género	G+C (Mol %)	Vacuna
Virus del herpes tipo 1	HHV1	α	Simplexvirus	67	No
Virus del herpes tipo 2	HHV2	α	Simplexvirus	69	No
Virus Varicela-zoster	HHV3	α	Varicellovirus	46	Disponible
Virus Epstein-Barr	HHV4	γ	Lymphocryptovirus	60	No
Citomegalovirus	HHV5	β	Cytomegalovirus	57	Fase II*
Virus Linfotrópico B	HHV6	β	Roseolovirus		No
Herpesvirus humano 7	HHV7	β	Roseolovirus		No
Herpesvirus asociado a Sarcoma de Kaposi	HHV8	γ	Rhadinovirus		No

Modificado de Miller, 1997.

- α : Subfamilia Alphaherpesvirinae.
- β : Subfamilia Betaherpesvirinae.
- γ : Subfamilia Gammaherpesvirinae.
- *: Vacuna no disponible

1.1.6.1 Especificidad al hospedero.

Se sabe que los citomegalovirus, requieren de un hospedero determinado para poder llevar a cabo la replicación y de esta manera causar la patogénesis. Solo algunas células son susceptibles a la infección; las células infectadas que no son destruidas por el virus, encubren al virus intracelularmente durante un periodo prolongado de tiempo (infección latente), siendo estas células infectadas una de las fuentes potenciales del virus durante la reactivación.

1.1.6.2 Células infectadas con HCMV.

Las células infectadas por HCMV (fig 2 y 3), tienen una morfología característica; son observadas principalmente en endotelios de pulmón, riñón, hígado, páncreas, placenta de humanos. A las células infectadas se les ha denominado como: células citomegálicas (Gabrielli et al, 2001., Macaset et al, 1975., Robbins, 1974).



Fig. 2 Célula citomegálica observada en placenta humana, 21 días después de la infección con la cepa Toledo de HCMV (Gabrielli et al, 2001).

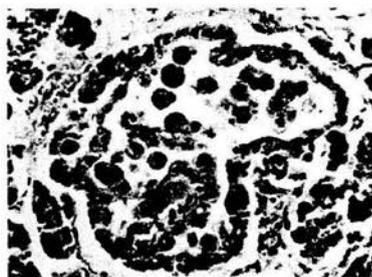


Fig. 3 Célula citomegálica observada en el páncreas de un paciente con la enfermedad de las inclusiones citomegálicas (Robbins, 1974).

1.1.7 Características fisicoquímicas.

El CMVH es lábil en cualquiera de las siguientes condiciones: pH bajo, con solventes no polares, a temperatura de 37°C; se inactiva a 56°C. El virus puede ser inactivado rápidamente a 4°C, a -20°C el virus es viable hasta por 6 meses. La preservación del virus por congelamiento rápido a -80°C es recomendable (agregar sorbitol 30-50%).

El ácido desoxirribonucleico (ADN) del CMVH tiene una densidad de 1.716 g/cm³, lo que corresponde a un contenido de G + C del 58% (Organización Panamericana de la Salud 1997; Stinski, 1990; Gold and Narkervis, 1983).

1.2 Ciclo viral.

1.2.1 Adhesión.

El receptor celular para la interacción inicial con la glicoproteína B (gB) y la glicoproteína M (Gc-II) del CMVH es un proteoglicano de la superficie celular del hospedero, denominado técnicamente como heparan sulfato, el cual permite la adhesión rápida y eficiente a líneas celulares permisivas y no permisivas (fig. 4); sin embargo el CMVH, es capaz de establecer la infección latente en células blanco que expresen superficialmente el marcador celular CD13+, reportado principalmente en endotelios de pulmón y aorta, hígado, riñón y monocitos. (Shukla, 2001; Fish et al, 1998).

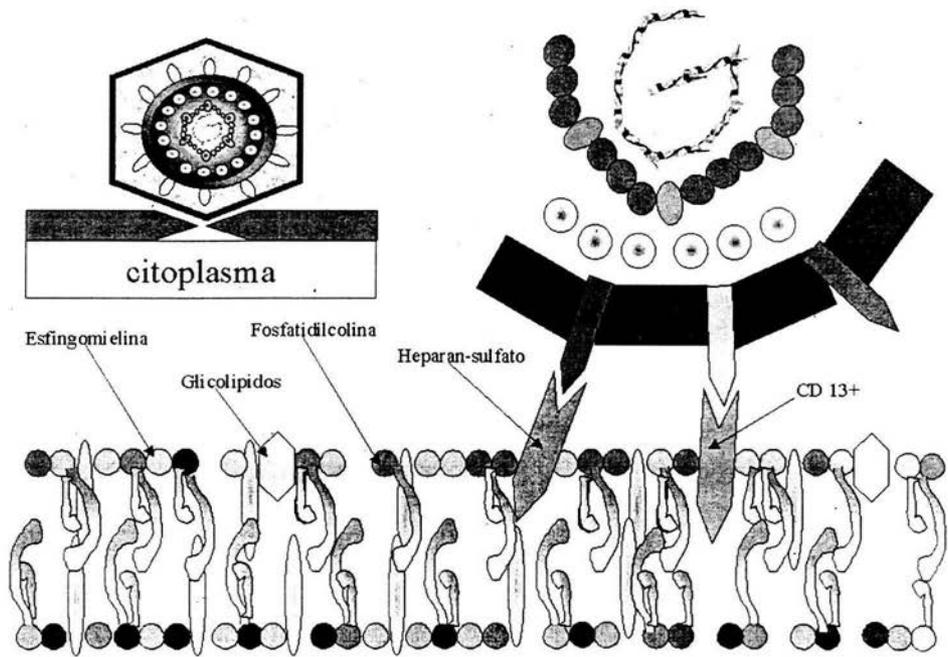


Figura 4. Adhesión del virus a la membrana celular.

1.2.2 Entrada.

La entrada del virus al individuo es a través de mucosas, posteriormente ocurre la diseminación local hacia tejidos linfoides y la diseminación sistémica, utilizando los monocitos circulantes (fig. 5). Una vez que el HCMV, logra albergarse en el monocito, es transportado hacia distintos órganos. Cuando ocurre el proceso de diferenciación celular de monocito a macrófago, se producen nuevos viriones. De manera alterna, el HCMV puede infectar a macrófagos, caracterizándose esta infección por la producción relativamente baja de viriones en relación con la producción de viriones que ocurre en las células tipo fibroblasto ó endoteliales. Es por ello que se ha propuesto que las células del linaje mieloide desempeñan un papel muy importante en la diseminación del HCMV en un proceso de primo-infección y en una infección de tipo agudo (Michelson, 1997)

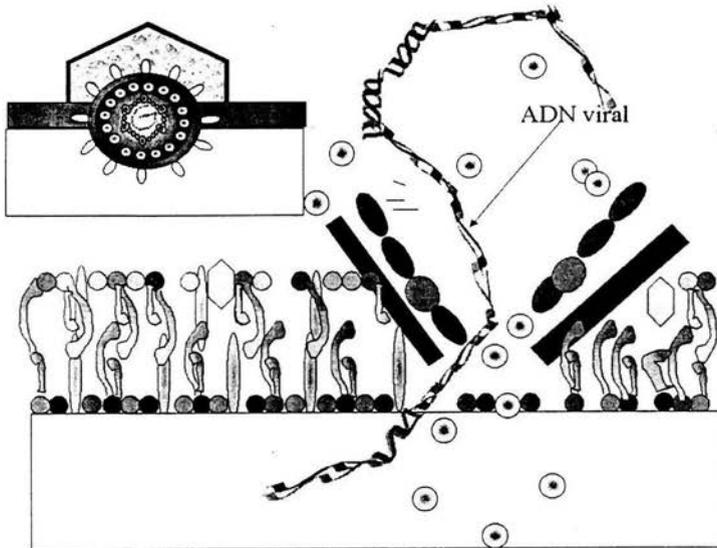


Figura 5. Entrada del virus a la célula.

1.2.3 Expresión genética.

En el primer periodo de la transcripción, después de la entrada del HCMV a la célula susceptible, ocurre la expresión temporal del genoma viral, el cual está controlado de una manera cerrada. La expresión de proteínas depende de la síntesis regulada en cascada de RNA_m y de la proteína inmediatamente temprana (IE), proteína temprana (E) y de la proteína tardía (LA). En términos generales, se acepta que los productos del gen IE, son utilizados por el virus para lograr el control de la síntesis macromolecular de la célula infectada. Mientras que los productos del gen que codifica para la proteína temprana E son requeridos para el control de la producción de progenie viral, en la cual las proteínas tardías forman parte de sus componentes estructurales (Wathen & Stinki, 1982).

1.2.3 Replicación.

En general la replicación del HCMV es similar a la del virus del herpes simple. El HCMV tiene tres familias de genes, denominadas α , β y γ , las cuales son reguladas temporalmente. Estos genes se expresan en las tres fases del ciclo de replicación de células infectadas: inmediatamente temprana (IE), temprana (E) y tardía (LA).

Después de la infección primaria, el genoma viral se traduce en una secuencia regulada, que da como resultado la traducción en serie, a través de tres clases de RNA_m para la producción de las proteínas: inmediatamente temprana (IE), temprana (E) y tardía (LA). Los genes IE, incluyendo el gen que codifica para la proteína IE que tiene un peso aproximado de 72 KDa, son transcritas desde una región restringida de la secuencia única larga del genoma de HCMV (McDonough, 1983). El RNA_m para la proteína IE (72 KDa) se transcribe mas abundantemente que ningún otro RNA_m como resultado de eventos

regulatorios que compiten eficientemente por RNA polimerasa II (Stinski,1984, 1983). Estas secuencias constituyen uno de los primeros pasos de la regulación de la expresión genética.

El promotor MIEP, controla la expresión de dos elementos genéticos denominados IE-1 y IE-2. Al menos tres de los RNAs de IE son transcritos desde esta región. El RNA de IE (IE-1) predominante está constituido por 4 exones. Existe un solo marco de lectura abierto (ORF) denominado UL-123, el cual inicia en el exón 2 y continúa a través del exón 3 y 4 para codificar una fosfoproteína de 72 Kda (IE-72). La región 2 del IE codifica para dos RNAs de 2.25 y 1.7 kb que, a través de mecanismos de empalme diferenciales, contienen tres exones de IE-1 fundidos a la región IE-2.

El transcrito de 1.7 kb difiere del RNA de 2.25 kb por un empalme interno en la región del IE-2 y codifica una proteína de 55 kda, mientras el transcrito grande codifica la proteína de 86 kda (UL-122). IE72 es un transactivador del MIEP, mientras IE-86 es represor. Tanto IE-86 como IE-72 transactivan promotores del gen E. Además otros productos del gen IE tienen funciones regulatorias, incluyendo IRS 1, TRS 1 y UL 36-UL 38.

Una segunda fase denominada temprana, ocurre después y la expresión de sus genes depende de la expresión previa de uno o más de los genes IE. IE-1, IE-2 y otros productos del gen IE, tales como: IRS1/TRS1, UL 36 y UL 38, exhiben una interacción cooperativa con genes E como: UL112 y UL113 para transactivar promotores de genes de replicación del DNA, incluyendo aquellos para la DNA polimerasa (UL54), proteína accesoria de la

polimerasa (UL44), proteína de unión al DNA de cadena sencilla (UL 57), primasa (UL70), proteína asociada a helicasa/ primasa (UL102) y helicasa ADN (UL105), requeridas para la síntesis de DNA.

Durante la tercera fase (LA), la cual inicia con la replicación del DNA del virión, se sintetizan proteínas vírales estructurales. Al igual que otros herpesvirus es probable que la expresión de los genes LA, estén determinados por la activación de los promotores del gen L por los productos del gen E. Los productos del gen E están implicados en la replicación del DNA viral mientras que las proteínas LA están involucradas en la formación de partículas vírales maduras.

1.3 Estructura y organización del genoma viral.

Los betaherpesvirus tienen un genoma constituido por DNA lineal de doble cadena, que por ser infeccioso, requiere de un manejo extremo durante su aislamiento.

El material genético del HCMV tiene un tamaño estimado de 65-68 nanómetros, el cual corresponde aproximadamente a 240 Kilopares de bases (kpb) y una masa molecular relativa de 1.5×10^8 Da. A causa de la estructura y alta complejidad de las secuencias; el genoma de HCMV ha sido clasificado como genoma tipo E, dentro de los virus de la familia herpesviridae. Su genoma puede codificar unas 100 proteínas.

El DNA de HCMV se divide en dos segmentos principales: Largo (L) y corto (C) los cuales contienen secuencias de información genética únicas y secuencias repetidas.

Las secuencias únicas contenidas en las porciones del genoma L y C, han sido denominadas como UL (única larga) y UC (única corta) respectivamente. Los fragmentos L y C tienen la capacidad de invertirse durante la replicación y de esta manera los viriones pueden contener uno de los cuatro posibles isómeros del genoma viral. Cada una de estas regiones están flanqueadas por secuencias terminales repetidas, denominadas como IR_L, IR_C, TR_L y TR_C (McDonough, 1983., Oram, 1982., Fleckenstein, 1982., Westrate, 1980).

En la cepa Towne, la región U_L mide 175 kb y está acompañada por una TR_L de 11 kb. La región U_C es de 38 kb y la region TR_C de 2 kb (Stinski, 1990). Las secuencias repetidas del genoma de HCMV, son altamente ricas en guanina y citosina (Honest, 1984) y contienen secuencias que son capaces de controlar la expresión genética de la célula eucariota.

1.4 Epidemiología.

La incidencia de la infección en la población de individuos con un sistema inmunológico competente, aumenta con la edad, y aproximadamente el 85% de la población adulta de los países desarrollados y el 95% de los adultos de países en vías de desarrollo, tienen antecedentes serológicos de la infección primaria por HCMV (Brown 1998; Garza et al,1996; Monto,1990; Gold,1983; Medearis, 1964).

En la actualidad la infección por citomegalovirus humano, ha tomado relevancia, como una de las causas significativas de morbilidad y mortalidad entre la población de pacientes con SIDA (McCutchan,1995; Gallant et al,1992; Pertell,1992; Klatt y Shibata; 1988., Kumar et

al, 1984; Macher, 1983). En esta población la tasa de incidencia de HCMV es mayor a 90%; En este grupo de pacientes, se ha reportado que al menos causa 25% de los decesos. Las autopsias en estos casos han demostrado evidencias del HCMV. (Schooley,1990; Jacobson y Mills, 1988; Macher,1983). La retinitis se desarrolla en el 25% de aquellos, con un conteo de linfocitos CD4 muy bajo. (Drew,1992; Gallant et al,1992).

En los recién nacidos y prematuros, la incidencia de la infección oscila entre 0.2% y 3%, por lo que en Estados Unidos se ha aceptado desde hace treinta años, que el HCMV es un virus que causa múltiples problemas de salud pública.

En 1987 se detectaron 38,000 recién nacidos con infección transplacentaria. Se ha reportado una asociación directa, entre la edad de la madre y la prevalencia de la infección congénita (Nmumasaki,1996; Fowler, 1993; Boppana et al,1992; CDC, 1988; Freij, 1988; Peckman,1983; Saigal, 1982; Stagno et al,1977; Weller, 1971). Un 90% de los casos con infección congénita causada por citomegalovirus humano son asintomáticos (Kumar, 1973) y otro 5% de estos, desarrollan la enfermedad de las inclusiones citomegálicas. La cual ha sido asociada con la reactivación del virus endógeno en mujeres seropositivas a citomegalovirus, durante cualquier trimestre de la gestación (Davis, 1971); el virus logra atravesar la placenta y comprometer el desarrollo embrionario, aún cuando la madre no presente manifestaciones clínicas (Stagno et al, 1986; Kumar et al, 1984). Se ha reportado que la infección congénita por reactivación del HCMV se asocia con el trasplante (Blau,1997). Se ha reportado que la infección congénita puede ocurrir como resultado de la infección primaria por HCMV en mujeres embarazadas con SIDA (Schewebke, 1995).

En los pacientes suprimidos inmunológicamente con ciclosporina la infección por HCMV se generaliza rápidamente, después del trasplante de corazón ó pulmón y compromete la vida del paciente (Barret-Muir et al,2000.,Chou,1986., Dummer et al,1985).

1.4.1 Reservorio.

El único reservorio conocido del virus citomegálico humano son los humanos; en muchas especies animales se han identificado cepas que no son infecciosas para humanos (Organización Panamericana de la Salud,1997).

1.4.2 Transmisión.

La transmisión del virus ocurre principalmente por contacto íntimo ó próximo; con secreciones cervico-uterinas y esperma. Aún cuando la excreción en orina no ocurra simultáneamente (Collier et al, 1995; Chandler et al, 1985); la transmisión transplacentaria del virus desde la madre infectada al feto (infección congénita) ó el contacto del recién nacido con secreciones infecciosas en el canal de parto ó con leche materna (infección perinatal) son frecuentes. La orina de recién nacidos con infección congénita ó perinatal es una fuente potencial del virus hasta 3 años.

En conclusión las muestras potencialmente infecciosas son: orina, saliva, heces, lágrimas, leche materna, semen y secreciones cervicouterinas de pacientes sintomáticos y de individuos con infección subclínica (Rasmussen et al,1995; Dworsky et al, 1983). Así como productos sanguíneos, médula ósea y órganos sólidos para trasplante pertenecientes a donadores seropositivos.

1.4.2.1 Intrauterina.

La tasa de infección al feto después de la infección maternal primaria es considerablemente alta (40% al 50%) comparada con una tasa de infección del 1% después de la infección maternal recurrente (Fowler et al,1993; Stagno ,1982). En las mujeres embarazadas seropositivas, la principal causa de la infección intrauterina es la ruta ascendente por contacto con las secreciones cervicales infectadas con HCMV en 25%-40%, mientras que 5% de las mujeres embarazadas, excretan el virus en orina aún cuando ellas no presenten manifestaciones clínicas durante la gestación (Peckham, 1991; Montgomery et al,1972). En las mujeres embarazadas seronegativas, que cursan con la infección primaria durante la gestación no ocurre de manera general la infección intrauterina, sin embargo, puede ocurrir la reactivación del virus que causó la infección primaria cuando se vuelve a infectar con otra cepa antigénicamente diferente, comprometiendo el desarrollo embrionario del feto (Alford,1990; Stagno et al, 1977; Hanshaw, 1973).

1.4.2.2 Perinatal.

La transmisión perinatal desde la madre a el infante, ocurre por contacto con secreciones cervico-uterinas infectadas, leche materna, saliva. Aproximadamente el 53% de las mujeres seropositivas a HCMV, excretan el virus en las secreciones cervico-uterinas (Alford et al,1990; Dworsky et al,1983; Stagno et al, 1983,1982).

1.4.2.3 En la infancia.

Muchos de los infantes se infectan durante la edad preescolar, por contacto con la orina de neonatos con infección congénita ó infantes con infección perinatal (Demmler, 1991).

1.4.2.4 En los adultos.

La infección se asocia con un mayor número de parejas sexuales debido a que una proporción elevada de mujeres seropositivas a citomegalovirus son asintomáticas y secretan el virus en secreciones cervicales (Collier et al,1995). En 30% de los pacientes con SIDA, con un conteo celular de 100-800 linfocitos $CD4^+/mm^3$ es posible detectar HCMV en espermatozoides maduros que expresen el receptor celular CD45 (Rasmussen et al, 1995; . Chandler et al, 1985).

1.4.2.5 Transfusión sanguínea.

El primer reporte de mononucleosis asociado a la infección por HCMV a través de la transfusión sanguínea, fue hecho por primera vez por Klemola y Kaarianen, en 1965. Por lo que los pacientes con cirugía de corazón, tienen un riesgo alto para desarrollar mononucleosis, por el hecho de transfundirles varias unidades de sangre.

1.4.2.6 Transplante.

Los pacientes con transplante pueden adquirir el HCMV a partir de los órganos de portadores asintomáticos (Chou, 1986).

1.4.3 Fuente de infección.

Los recién nacidos con infección congénita (sintomática y asintomática), son capaces de excretar el virus en orina, durante 2-3 años; siendo una fuente de infección en guarderías. Las mujeres seronegativas a HCMV que trabajan en dichos lugares, tienen un riesgo alto de adquirir la infección.

1.5 Patología.

La infección causada por HCMV en la mayoría de las personas afectadas es de curso subclínico, por lo que pasa desapercibida para los médicos. En los pacientes con infección sintomática, las principales manifestaciones clínicas son: mononucleosis, hepatitis, coriomeningitis, pneumonitis, colitis, enfermedad de las inclusiones citomegálicas.

Cuando se adquiere la infección primaria por transfusión sanguínea, algunos casos presentan fiebre y linfocitosis atípica; mientras que la esplenomegalia se manifiesta en los primeros 14 a 35 días después de la transfusión (cuadro espontáneo de mononucleosis infecciosa). Los casos más severos desarrollan síntomas similares a la neumonía.

En 1971 se reportó el caso de una mujer con mononucleosis en el tercer mes de embarazo, en la cual fue posible detectar HCMV en líquido amniótico (Davis et al, 1971). La infección por HCMV causa 10% de casos con mononucleosis principalmente entre la población de estudiantes universitarios y adultos hospitalizados (25 a 34 años de edad). El principal daño asociado a la infección con HCMV es el trastorno neurológico (Cinque et al, 1992; Schmitz y Enders, 1977).

La infección primaria ó la reactivación del virus en los hospederos inmunocomprometidos, causa una enfermedad grave y en algunos casos fatal. Actualmente se sabe que existen cuadros clínicos característicos, asociados a la infección por HCMV, en la población de individuos con inmunidad celular deficiente: fetos en desarrollo, prematuros, recién nacidos, niños, mujeres embarazadas y ancianos (Nelson y Demmler, 1997); pacientes con trasplante y pacientes con SIDA.

1.5.1 Hospedero inmunocompetente.

En la mayoría de individuos con un sistema inmune competente, la infección primaria causada por HCMV causa en algunos casos enfermedad febril y usualmente se desarrolla una infección subclínica. El síndrome mononucleósico es frecuente en mujeres inmunocompetentes de edad avanzada.

1.5.2 Pacientes transplantados.

En los pacientes que han recibido trasplante se ha reportado un síndrome característico, en donde se observan manifestaciones clínicas tales como: fiebre, neumonía intersticial, hepatitis y leucopenia (Rubin et al, 1997).

1.5.3 Pacientes con VIH.

El HCMV se reactiva en los pacientes con VIH, cuando el conteo de células CD4+ es menor a 100 células/mm³ (Rasmussen et al, 1995). En la población de pacientes con SIDA, la infección diseminada, se caracteriza por cualquiera de las siguientes manifestaciones clínicas: corioretinitis, retinitis, neumonía intersticial, colitis, esofagitis, hepatitis, enfermedad gastrointestinal (Alberola, 2001; Rasmussen, 1995).

Las principales lesiones causadas por HCMV al SNC de los pacientes con VIH son: mielitis / poliradiculoneuritis, encefalitis con demencia, ventriculoencefalitis, mononeuritis multiplex (McCutchan, 1995; So, 1994).

El 10% de estos pacientes desarrollan colitis por HCMV (diarrea, pérdida de peso, anorexia y fiebre). Mientras que la esofagitis por HCMV es parecida a la que causa



U.N.A.M. CAMPUS

Cándida albicans. En ellos se desarrolla una enfermedad pulmonar descrita clínicamente como neumonía intersticial en la que se reporta la presencia simultánea de Pneumocystis carinii (Pertell, 1992).

IZT.

1.5.4 Recién nacidos.

La infección congénita diseminada causada por HCMV ha sido denominada como enfermedad de las inclusiones citomegálicas (CID por sus siglas en inglés), se caracteriza por la presencia de calcificaciones intracerebrales, hepatoesplenomegalia con ictericia, coriorretinitis, púrpura trombocitopénica, exantema macular, anemia hemolítica, hiperbilirrubinemia, apnea, virurias al nacer y diversos deterioros estructurales y funcionales de órganos, anomalías en el tercer arco branquial, atrofia óptica, neumonitis intersticial, dificultad respiratoria, retardo en el crecimiento intrauterino, microcefalia (Brow, 1998; Alford, 1990 et al; Binder, 1988; Conboy et al, 1987; Pass, 1980; Hanshaw, 1973; Weller, 1971; Berenberg, 1970). En 90% de los casos con CID se observan daños teratogénicos ó anomalidades: hernia inguinal, síndrome del primer arco y defectos cardiacos (Fowler, 1993; South y Alford, 1973).

Mientras que 90% de los casos con infección congénita asintomática, no presentan manifestaciones clínicas al momento de nacer (casos subclínicos). Los neonatos que sobreviven a la infección congénita, presentan secuelas tardías (primeros cuatro años de edad): displegia espástica, cuadriplegia, coriorretinitis, defectos en la dentición, retardo mental; daño cerebral y/ó pérdida auditiva progresiva (Fowler, 1997, 1993; Melish, 1993; Williamson, 1992; Williamson et al, 1990; Stagno, 1983; Saigal, 1982; Alfors, 1981;

Reynolds, 1974; Kumar, 1973; Haymaker et al, 1954). Algunas manifestaciones asociadas a la infección por HCMV son el síndrome de Gianotti-Crosti, esclerema, dermatitis del pañal severa y síndrome KID (queratitis, ictiosis y sordera) (Sánchez, 2000).

1.5.5 Mujeres embarazadas.

En 40% de las mujeres embarazadas seropositivas a HCMV, el virus se reactiva en cualquier trimestre de la gestación, atraviesa la placenta y compromete el desarrollo del feto, causándole la enfermedad generalizada denominada: Enfermedad de las inclusiones citomegálicas (CID por sus siglas en inglés) (Liebert, 1998; Alford, 1990^a; Ahlfords, 1981). Cuando una mujer seronegativa, adquiere la infección primaria durante la primera relación sexual y se da la fecundación; el feto en desarrollo tiene un alto riesgo de presentar alguna malformación congénita. Aún cuando la madre no presente manifestaciones clínicas durante la gestación (Stagno et al,1986; Kumar et al,1984). Se ha reportado que la infección congénita causada por reactivación del citomegalovirus ocurre en mujeres con antecedente de transplante (Blau, 1997; Laifer et al, 1995). La infección congénita puede ocurrir como resultado de la infección primaria por HCMV en mujeres embarazadas con SIDA (Schewebke,1995).

1.6 Patogénesis.

Durante la infección primaria en la mayoría de los casos no se observan manifestaciones clínicas y la respuesta inmunológica no basta para eliminar al virus del cuerpo, por lo que el virus permanece en estado latente en algunas células diana: monocitos, endotelios de riñón y de pulmón.

Mientras, en la población de pacientes inmunocomprometidos, fetos en desarrollo, recién nacidos, prematuros, pacientes postransplantados ó individuos con SIDA, causa una enfermedad severa ó fatal (Macher,1983).

El 33% de los pacientes con CID mueren durante el periodo neonatal, en su mayoría son prematuros y el tamaño corporal para su edad gestacional es pequeño, debido al retardo en el crecimiento intrauterino. Los principales órganos afectados, son el riñón, hígado y pulmón. En algunos casos las células citomegálicas en forma de ojo de búho se han observado en páncreas, tiroides y cerebro. Muy raramente en intestino, ovario, pituitaria, paratiroides y timo (Sweet, 1999; Hendrix et al, 1991).

En la enfermedad diseminada, existen evidencias de la infección en todos los órganos. Las células infectadas mas frecuentemente son los endotelios de pulmón, riñón, así como los fibroblastos. Sólo en 32% de los casos se ha reportado la infección de las glándulas salivales. La glándula parótida es infectada frecuentemente, sin embargo en algunos casos es posible la infección de las glándulas submandibular y sublingual.

La infección de la glándula salival está directamente relacionada con el padecimiento crónico, que resulta de la infección congénita asintomática (subclínica) y en la mayoría de casos con infección perinatal. Por esto, el virus es excretado principalmente a nivel de faringe en estos pacientes (Alford, 1990).

Los primeros estudios realizados sobre la patología de la infección causada por HCMV fueron enfocados primariamente a describir la presencia y distribución de células citomegálicas en tejidos. Las células citomegálicas han sido observadas en diferentes estructuras del oído interno: células epiteliales de la coclea, stria vascularis, membrana de Reissner's, limbus spiralis, sacculi y canal semicircular (Davis, 1979)

1.6.1 Enfermedad de las inclusiones citomegálicas.

Se caracteriza por la presencia de calcificaciones intracerebrales, hepatoesplenomegalia, coriorretinitis, purpura trombocitopenica, exantema macular, anemia hemolítica, hiperbilirrubinemia, apnea, citomegaloviruria al nacer y diversos deterioros estructurales y funcionales en diferentes órganos: hidrocefalia obstructiva, microcefalia, encefalitis, hernia inguinal, atresia de vías biliares. La secuela tardía de esta infección es la pérdida gradual del oído, retraso mental y dificultades en el aprendizaje (Conboy, 1987).

En el hígado de recién nacidos con CID, se ha observado una hematopoyesis extramedular con infiltración. Cuando se observan las células citomegálicas, estas se distribuyen principalmente en el epitelio del ducto biliar, menos frecuentemente en los endotelios de los capilares y muy raramente en las células del parénquima (McCracken, 1969). En los adultos se ha observado que los hepatocitos pueden contener una gran cantidad de células citomegálicas (Macasaet, 1975).

Aproximadamente 5% de los recién nacidos con infección congénita causada por HCMV, cursan con CID. En estudios realizados en casos con infección congénita sintomática, se

ha registrado desenlace mortal en el 30% de los casos durante el periodo neonatal ó algunos meses después de la CID. Solamente 5% de estos recién nacidos, presentan manifestaciones clínicas atípicas.

1.6.1.1 Riñón.

Las células citomegálicas han sido observadas en el epitelio de los túbulos proximales del área cortical del riñón. También se ha demostrado su presencia en el asa de Henle y los tubos colectores, así como en los túbulos colectores distales, tejido intersticial y glomérulos. En los recién nacidos con infección sintomática y en los casos con infección congénita subclínica es frecuente la citomegaloviruria.

1.6.1.2 Pulmón.

En los pacientes con terapia inmunosupresora para recibir trasplante de medula ósea, corazón, pulmones y riñón, la lesión pulmonar es similar en adultos y recién nacidos. La neumonitis puede ser bilateral ó unilateral e implica generalmente al lóbulo bajo. Se manifiesta el daño al epitelio broncoalveolar, el cual puede ocasionar una disfunción pulmonar ó la muerte por neumonitis. En el pulmón afectado se observan células gigantes, en el epitelio alveolar y bronquial con grados variables de inflamación por células mononucleares. La membrana mucosa de la tráquea y el tracto traqueo-bronquial son menos frecuentemente implicadas (Ishigaki et al, 1991; Ho, 1982).

1.6.1.3 Sistema gastrointestinal.

En los pacientes con SIDA, la infección causada por HCMV puede desarrollarse a cualquier nivel del tracto gastrointestinal, principalmente en el colon, esófago, recto

(Chachoua et al, 1987). En dos pacientes con leucemia y síndrome de enterocolitis neutropénica, se ha reportado la infección por citomegalovirus en la glándula mucosa del colon (Soriano, 1996).

1.6.1.4 Sistema urogenital.

Durante la gestación esta infección puede causar inflamación difusa, villositis, infiltración de células plasmáticas, necrosis focal y hemorragia, con ó sin detección de células citomegálicas en la placenta (Benirschke et al, 1974).

1.6.1.5 Sistema Nervioso Central.

La encefalitis por HCMV durante la infección congénita es una de las lesiones al SNC; ocasionalmente se observan calcificaciones intracerebrales en el cuarto ventrículo, las cuales pueden estar asociadas con los casos de pacientes con hidrocefalia obstructiva. Actualmente la infección por HCMV en el SNC, es frecuente en los adultos con SIDA. En la infección fetal el SNC es el principal órgano blanco y las complicaciones a este nivel son principalmente: microcefalia, hidrocefalia, y calcificaciones periventriculares. Por ello, el daño cerebral permanente está asociado a los casos con CID (Haymaker et al, 1954., Weller y Hanshaw, 1962).

1.6.2 Latencia y reactivación del HCMV.

El término latencia ha sido definido operacionalmente como una infección persistente en donde el genoma está presente sin la expresión genética y el virus infeccioso no se produce.

Los mecanismos de entrada del genoma y el establecimiento del estado latente, no son conocidos totalmente. En las células infectadas con alfa herpesvirus y gamma herpesvirus, se ha observado que el genoma viral está presente en forma circular ó como moléculas concatenadas, no integradas al DNA de las células diana del hospedero. El número de copias de DNA de HCMV en los tejidos infectados latentemente, no refleja cuantitativamente la cantidad de virus en replicación en dicho tejido (Banks, 1992).

El HCMV permanece en estado de latencia en los monocitos que expresan el CD13+, así como en los endotelios de riñón, pulmón y glándulas salivales, durante toda la vida. Asimismo se ha reportado que las células de la pared arterial, son otro de los sitios de latencia del virus. (Flint, 2000., Fish, 1998., Michelson, 1997., Barbi, 1996., Hendrix, 1991., Jordan, 1983., Ho, 1982, Garnett 1982).

Después de la infección primaria, el HCMV establece frecuentemente la infección latente en algunas células del hospedero durante el resto de su vida. Así, el virus persiste en un estado de no replicación (Jordan, 1983). El citomegalovirus puede emerger de su estado latente y causar una reactivación endógena asintomática ó sintomática. Los factores que determinan el control de la latencia y la reactivación no han sido dilucidados, sin embargo en la población de pacientes inmunocomprometidos, la reactivación del virus es muy frecuente.

El HCMV endógeno (en estado de latencia) se reactiva principalmente en individuos con antecedente serológico de infección primaria sólo si su sistema inmune está deprimido ó

es deficiente (recién nacidos prematuros, pacientes con transplante, pacientes con SIDA). En este último grupo de pacientes inmunocomprometidos, la reactivación generalizada pone en peligro la vida del paciente (Roizman, 1996; Gallat et al. 1992). En 40% de las mujeres seropositivas a HCMV, la reactivación del virus durante la gestación ocurre en los últimos trimestres.

El HCMV se reactiva en las mujeres embarazadas seropositivas (Morris, 1994., Alford, 1990), por lo que puede ocurrir la infección intrauterina y comprometer el desarrollo del feto. Cuando ocurre la reactivación viral, la mujer embarazada no presenta manifestaciones clínicas evidentes. Sin embargo en algunos casos, el principal daño interno es: villositis, corioamnitis, y placentitis (Horn, 1998; Rutter et al. 1985; Benirschke et al. 1974).

Entonces, la infección congénita puede ocurrir por reactivación del HCMV en mujeres embarazadas seropositivas ó como consecuencia de la infección primaria, durante la gestación. La inmunidad materna no confiere protección contra el virus durante la gestación. La reactivación del virus, en mujeres embarazadas con antecedente de transplante ó con SIDA es frecuente (Blau, 1997; Schewebke, 1995; Laifer et al. 1995).

1.7 Diagnóstico.

Los signos y síntomas de la infección congénita causada por HCMV, son muy parecidos a los observados en la infección con: Toxoplasma gondii, virus de la rubéola y herpes virus simple tipo 1 y tipo 2, que conforman el síndrome llamado TORCH; así como con el virus

de la coriomeningitis linfocitaria, por lo que se recomienda hacer el diagnóstico diferencial en el caso de observar efectos teratogénicos.

El diagnóstico clínico de la infección congénita por HCMV es difícil porque sus características no son patognomónicas, por ello se requiere de una metodología de laboratorio específica. Los métodos frecuentemente utilizados son la identificación de IgM en suero, así como el aislamiento viral (Melish, 1993; Weller y Hanshaw, 1962).

1.7.1 Diagnóstico clínico.

Es posible diagnosticar clínicamente los casos con infección congénita sintomática por HCMV cuando el recién nacido sintomático cursa con manifestaciones clínicas de la CID: hepatoesplenomegalia, coriorretinitis, púrpura trombocitopénica, exantema macular, anemia hemolítica, hiperbilirrubinemia, apnea y deterioros estructurales y funcionales de algunos órganos (Alford, 1967).

En algunos casos es necesario confirmar el diagnóstico médico utilizando radiografías, que permitan detectar calcificaciones intracerebrales y periventriculares. Otro de los problemas relacionados con el diagnóstico de la infección congénita, es que 90% de casos son subclínicos (es decir no presentan manifestaciones clínicas), por lo que no son detectados en el nacimiento. Sin embargo constituyen una fuente de infección para las mujeres embarazadas sin antecedentes de esta infección; debido a que son capaces de excretar el virus en orina y saliva (Balcareck et al. 1993).

1.7.2 Histopatología.

En 1952, Fetterman asoció la enfermedad de las inclusiones citomegálicas, con la presencia de las células citomegálicas en orina; se consideró que la forma diseminada de CID era fatal y se estableció como un criterio diagnóstico la sola presencia de las células citomegálicas. Se reportó que en mortinatos con una enfermedad hemorrágica parecida a la eritroblastosis es posible observar las células citomegálicas.

1.7.3 Aislamiento viral.

Desde que Margaret Smith logró aislar por primera vez al HCMV de un paciente con CID en 1956; otros grupos de investigación han logrado aislar el citomegalovirus humano a partir de tejidos obtenidos en la autopsia: tejido adenoidal, glándulas salivales y biopsias de hígado. Durante la infección activa el virus puede ser aislado de exudado faringeo, leucocitos de sangre periférica, leche materna, orina, heces, lágrimas, saliva, exudado cervical y semen. Existen reportes de la posibilidad de aislarlo del oído interno (Dummer et al. 1985; Davis et al. 1979, 1969; Stagno et al. 1975; Montgomery et al. 1972; Smith, 1956).

Actualmente el aislamiento viral a partir de muestras clínicas es un procedimiento diagnóstico certificado como prueba de oro, que utiliza la cepa celular MRC-5 (fibroblastos diploides de pulmón fetal humano. Esta línea celular tiene un corto tiempo de vida, y es susceptible a la infección por HCMV, principalmente la generación 33 a 36.

De manera tradicional se utiliza la orina, sangre y muestras obtenidas de garganta; aún cuando es posible aislar el virus de una amplia variedad de muestras durante la infección activa. En la mayoría de individuos infectados es posible detectar partículas virales

infecciosas en la orina. Por lo que se recomienda inocular la muestra de orina en cultivo celular de MRC-5 en las primeras 24 horas después de obtenida la muestra (Jones et al. 2000).

La viremia se demuestra por aislamiento del HCMV a partir de leucocitos; aún cuando algunos individuos virémicos puedan cursar con una enfermedad subclínica. Cuando se intenta aislar el HCMV a partir de leucocitos, se presentan algunas dificultades técnicas, debido a su citotoxicidad para las células MRC-5. La fracción de polimorfonucleares contiene partículas virales infecciosas (Barbi et al. 1996; Howell, 1979).

Para observar el efecto citopático (ECP) se requieren al menos dos semanas. En algunos casos es necesario hacer varios subcultivos para obtener un título viral alto. Así, las limitaciones de este método están en función del tiempo requerido para observar el ECP y de la posible contaminación del cultivo (Mc Donough, 1983).

La interacción entre el virus y la célula depende de la cepa de virus de referencia (adaptado) o si es un virus silvestre recientemente obtenido de un caso clínico. Los virus silvestres pueden ser subcultivados *in vitro* para adaptar la cepa a la producción extracelular del virus. Los mecanismos responsables del cambio en la habilidad replicativa se desconocen aún.

Las monocapas celulares infectadas con virus de referencia, deben ser fijados con solución de Bouin y teñidos con hematoxilina-eosina; el agrandamiento celular y/ó el

redondeamiento celular (depende del virus utilizado) se podrá visualizar dentro de las primeras 6 horas después de la infección. En las primeras 24 horas, el núcleo se desplaza hacia el centro y se observa un nucléolo prominente. Las inclusiones paranucleares eosinófilas se desarrollan y el agrandamiento celular se hace más evidente. Entre las 48 horas y las 72 horas después de la infección, se observa una madeja irregular con inclusiones nucleares basófilas.

En algunas ocasiones las inclusiones se observan en un tono bajo y las inclusiones eosinófilas densas se observan en el citoplasma. Las células multinucleadas pueden ser observadas con una morfología de "ojo de búho", es decir, un núcleo central rodeado por una gran inclusión eosinófila.

Existen dos cepas virales de referencia, la Ad-169 y el Davis, los cuales desarrollan efecto citopático (ECP) con marcadas diferencias celulares. El virus Davis causa en los primeros estados de la infección una distorsión en forma de riñón en el núcleo y se desarrolla una inclusión paranuclear eosinófila muy prominente. Mientras que el virus Ad-169 no modifica a las células infectadas en cuanto a su forma de fibroblasto. La morfología nuclear es también conservada a excepción de la marginación, y las inclusiones paranucleares formadas son menos distintas y recientemente bipolares. El virus de referencia Ad-169 es usado recientemente por su amplio rango de reactividad.

En general el HCMV posee una baja patogenicidad, sin embargo algunas cepas son más virulentas que otras (Huang, 1976). Actualmente, una gran cantidad de observaciones

clínicas y experimentales, han sugerido la hipótesis de que existen cepas de HCMV más virulentas (Elek y Stern, 1974; Quinnan et al. 1984). Existen algunas evidencias experimentales de que el HCMV, es potencialmente oncogénico (Albrecht, 1973; Geder, 1976).

1.7.4 Serología.

Dependiendo de la población estudiada; la prevalencia de individuos seropositivos a HCMV es de aproximadamente 30% a 100%. Los anticuerpos específicos contra HCMV pueden ser detectados en las primeras semanas después de la infección. Los anticuerpos no confieren protección contra la reactivación del virus endógeno (estado de latencia), ni contra la reinfección con una cepa viral diferente.

La razón principal del uso clínico de las pruebas serológicas, es determinar la susceptibilidad de una persona hospitalizada a adquirir la infección primaria. Otra de las aplicaciones es contar con unidades de sangre, libres de este agente etiológico, para no poner en riesgo a un paciente.

De esta manera, las pruebas serológicas permiten disminuir el riesgo de adquirir la infección primaria por transfusión sanguínea. En los recién nacidos prematuros, cuya madre sea seronegativa a HCMV, existe un alto riesgo de desarrollar la infección sintomática, por transfusión sanguínea ó por contacto con orina de recién nacidos con infección congénita sintomática. En la práctica médica la seroconversión, es un criterio para determinar la infección primaria ó la reinfección. Siendo observada principalmente en la población de pacientes postransplantados.

La determinación de un título alto de IgM, durante las primeras semanas de vida extrauterina, es un criterio preliminar para el diagnóstico clínico de infección congénita, aún cuando no todos los casos de recién nacidos infectados presenten títulos elevados de IgM. Ocasionalmente se detectan niveles elevados de inmunoglobulina IgM como resultado del escape de sangre materna hacia el feto. Los títulos de IgM, adquirida pasivamente, descienden en los primeros 7 días de vida extrauterina (Reynolds, 1974).

El incremento en el título de IgG contra HCMV antes del principio de la gestación permite establecer de manera directa el desarrollo de la infección congénita. En 73% de las mujeres embarazadas con infección primaria durante la gestación y en 69% de sus productos infectados transplacentariamente es posible detectar IgM (Stagno, 1985). En los adultos la IgM persiste durante un tiempo prolongado en torrente sanguíneo, mucho tiempo después de la infección activa, por lo que no es un criterio confiable para diagnosticar la infección activa. En pacientes con SIDA, no se detectan títulos elevados de dicha inmunoglobulina.

1.7.5 Anticuerpos monoclonales.

El conocimiento de las proteínas víales específicas codificadas por HCMV ha permitido desarrollar una gran variedad de anticuerpos monoclonales (Rasmussen, 1988), sin embargo en un estudio con 21 cepas distintas de HCMV, se reportó que dos de ellas no habían sido detectadas por el anticuerpo monoclonal inmediatamente temprano (Winston, 1987).

1.7.6 Reacción en cadena de la polimerasa.

En 1985 el equipo de Saiki y colaboradores reportaron dos métodos de diagnóstico prenatal para la anemia falciforme; uno de esos métodos se basaba en la amplificación mediada por la enzima denominada DNA polimerasa; desde entonces, a esta prueba se le denominó técnicamente como: reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Desde que se desarrolló esta metodología, algunas áreas de investigación biomédica han sido beneficiadas. La primera de ellas es la Genética Humana (detección de mutaciones, diagnóstico prenatal de desordenes hereditarios, determinación prenatal del sexo, identificación forense de individuos), en la Investigación Clínica (detección de agentes patógenos y tipificación, identificación de oncogenes activados y tipificación tumoral, seguimiento de enfermedades progresivas y terapia, susceptibilidad a enfermedades) y en el área de Biología Molecular (secuenciación del genoma humano y de otras especies, síntesis genética y modificaciones genéticas, estudios de expresión de algunos genes, seguimiento de un gene específico) (Barrera,1993., Vosberg, 1989., Saiki, 1985)

Actualmente se hace un seguimiento virológico a la mayoría de pacientes con transplante y a los pacientes con SIDA; debido a que la infección por HCMV es común en ellos. De tal manera que cuando se detecta el material genético ó el virus en el plasma, se debe sospechar la replicación viral activa (William et al. 2000; Hansen et al. 1997; Spector et al. 1992; Gershon et al. 1985).

En 1995, Nelson y colaboradores, sugirieron que la PCR, es un método altamente específico, sensible y rápido para diagnosticar la infección congénita en recién nacidos con manifestaciones clínicas al nacer, así como en recién nacidos sin manifestaciones clínicas (Nelson y Demmler, 1995). La PCR ha permitido detectar el genoma de HCMV a partir de diferentes muestras biológicas y es más sensible que el aislamiento viral (Liebert, 1998; Shibata et al.1988; Britting et al.1991).

Por lo anterior, ésta metodología es utilizada para la detección de HCMV en algunas partes del mundo (Fischer y Masur, 1997; Tsai et al. 1996; Nnumazaki, 1996). La detección prenatal de la infección congénita a partir de la placenta de mujeres embarazadas con antecedentes serológicos y/o evidencias histológicas de células citomegálicas, ya ha sido reportada. (Ozono et al.1997).

La PCR es un proceso bioquímico *in vitro*, que permite obtener un gran número de copias a partir de un fragmento de DNA blanco que puede ser de doble cadena o de cadena sencilla, por acción de la enzima Taq-polimerasa, después de 20-30 ciclos. Cada ciclo de amplificación se divide en tres fases fundamentales:

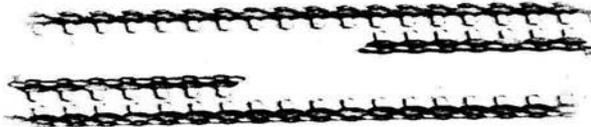
1.7.6.1 Desnaturalización.



La muestra de DNA se somete a una temperatura de 92-98°C durante 30 a 90 segundos,

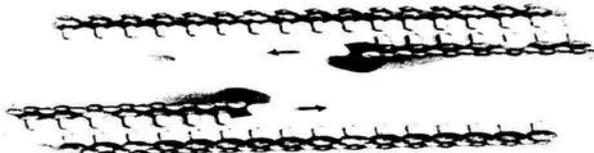
con el objeto de romper los puentes de hidrógeno entre los nucleótidos y de esta manera separar la doble cadena de DNA blanco.

1.7.6.2 Alineación.



Cuando se reduce la temperatura rápidamente a 50-60°C durante 30 a 60 segundos, los iniciadores de la mezcla de reacción se alinean complementariamente (apareamiento específico) con el fragmento de interés, en una dirección 5'-3'

1.7.6.3 Extensión.



Se realiza a una temperatura de 70-74°C durante 30-90 segundos, debido a que en esta temperatura la enzima *Taq*-polimerasa y el cofactor catiónico (Cloruro de Magnesio), extienden la longitud de los iniciadores debidamente apareados con el fragmento de interés, al incorporar (polimerizar) los desoxinucleótidos libres de la mezcla de reacción (dTTP; dGTP; dATP; dCTP). De esta forma se obtienen nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción. En teoría una sola molécula de DNA permite iniciar una reacción de amplificación de PCR. Por lo que al final del primer

ciclo de amplificación se obtienen cuatro cadenas; las cuales servirán como molde durante el segundo ciclo. El aumento exponencial del número copias del fragmento de interés es de aproximadamente 2×10^{17} al final de 28 ciclos (Saiki, 1985., Barrera, 1993).

1.8 Prevención y tratamiento.

La detección oportuna de HCMV en pacientes con un alto riesgo de adquirir la infección, permite prevenir el riesgo de infección al feto ó al recién nacido. Las mujeres seropositivas que laboran en guarderías y las enfermeras en contacto con pacientes inmunocomprometidos, deben de ser periódicamente evaluadas con pruebas serológicas; antes del embarazo y durante la gestación.

A las mujeres sin antecedentes serológicos de infección primaria por HCMV, que laboran en dichos lugares, se les recomiendan las siguientes medidas de higiene, con el fin de reducir el riesgo de adquirir la infección primaria; las medidas preventivas básicas sugeridas incluyen el lavado de manos continuo; lavado de juguetes, lavado de los utensilios para comer y limpieza de superficies o áreas de juego. También se les recomienda evitar el contacto con saliva y la orina de recién nacidos con infección congénita por HCMV y de pacientes inmunocomprometidos; en el caso de los recién nacidos sintomáticos y asintomáticos, el virus es excretado en la orina hasta por 4 años.

Las mujeres seronegativas pueden adquirir el HCMV por transfusión sanguínea, trasplante de órganos y por transmisión sexual, por lo que se recomienda la evaluación de este agente etiológico en los bancos de sangre y en los posibles donadores de

órganos, con el objeto de prevenir la infección. En cuanto a la transmisión sexual, se debe considerar que si adquiere el virus en la primera relación sexual y ocurre la fecundación, el feto tiene un alto riesgo de desarrollar alguna malformación congénita.

El tratamiento preventivo, se recomienda en los pacientes inmunosuprimidos. En las infecciones herpéticas y en la inflamación de la retina causada por citomegalovirus, son utilizados los siguientes antivirales (Acyclovir, Ganciclovir y Penciclovir). La ruta específica de estos análogos de nucleósidos, es inhibir a la enzima que duplica el DNA viral. El Fomivirsen es una molécula antisentido que bloquea la traducción de RNA viral y en consecuencia la síntesis de proteínas del virus (Haseline, 2001). El Valaciclovir es utilizado de manera preventiva en los pacientes con SIDA observándose una efectividad de al menos dos años (Griffiths et al.1998). El Ganciclovir 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethylguanidine) ha sido utilizado en el tratamiento de la neumonía de pacientes con infección congénita causada por HCMV (Hocker, 1994; Trang et al. 1993; Chachoua et al. 1987), otros autores proponen el tratamiento con éste mismo antiviral a fin de evitar los daños irreversibles durante la infección intrauterina (Whitley, 1997). Desafortunadamente la vacuna aún no está disponible y la bioseguridad de las vacunas experimentales aún no ha sido confirmada (Sierra y Acosta, 2000; Demmler, 1991; Quinan et al. 1984; Elek y Stern, 1974).

2. Antecedentes.

La infección causada por HCMV, es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en los individuos inmunocomprometidos, pacientes transplantados, pacientes con SIDA y recién nacidos. Para dar seguimiento a los pacientes de estas poblaciones de alto riesgo, se han desarrollado pruebas rápidas, específicas y sensibles. Una de ellas es la PCR (Saiki et al.1988), la cual permite detectar el DNA de HCMV en leucocitos, suero y plasma. Desde la primera detección de HCMV en suero y plasma (Britting y Xu, 1992; Dickover, 1990; Nelson, 1997, 1995), algunos investigadores han reportado la aplicación de la PCR en pacientes con transplante de médula ósea (Hebart et al.1996; Nolte et al.1995; Aspin, 1994; Wolf y Spector, 1993; Ishigaki, 1991), con transplante renal (Britting y Xu, 1992; Cunningham et al. 1995; Freymuth et al. 1994; Wolf, 1993) y con transplante hepático (Freymuth, 1994., Patel et al.1995,1994; Spector et al.1992).

Actualmente se acepta que la detección de DNA de HCMV en plasma ó en suero es un marcador temprano de la infección por HCMV; incluso de un mes a tres meses, antes del desarrollo de la enfermedad (Dodt et al.1997; Hansen et al. 1994), en cualquiera de los siguientes grupos: recién nacidos con infección congénita (Jones, 2000; Nelson, 1995), niños con SIDA (Nigro,1996)y pacientes seropositivos a VIH.

Algunos investigadores han reportado que los niveles de DNA del HCMV detectados en plasma o suero, son significativamente más bajos que los que se detectan en leucocitos (Drouet, 1993., Zipeto, 1995). El procedimiento de la PCR, puede ser implementado en los laboratorios de Virología Clínica.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general.

Utilizar la PCR en el diagnóstico de rutina, para confirmar el diagnóstico clínico de pacientes con signos y síntomas asociados a la infección sintomática causada por HCMV.

3.2 Objetivos particulares.

3.2.1 Implementar el método como una herramienta alternativa para el diagnóstico de HCMV en el Departamento de virología.

3.2.2 Establecer las condiciones fisicoquímicas óptimas de la PCR para detectar el DNA de HCMV.

3.2.3 Aislar cepas silvestres de citomegalovirus humano a partir de muestras clínicas positivas a PCR.

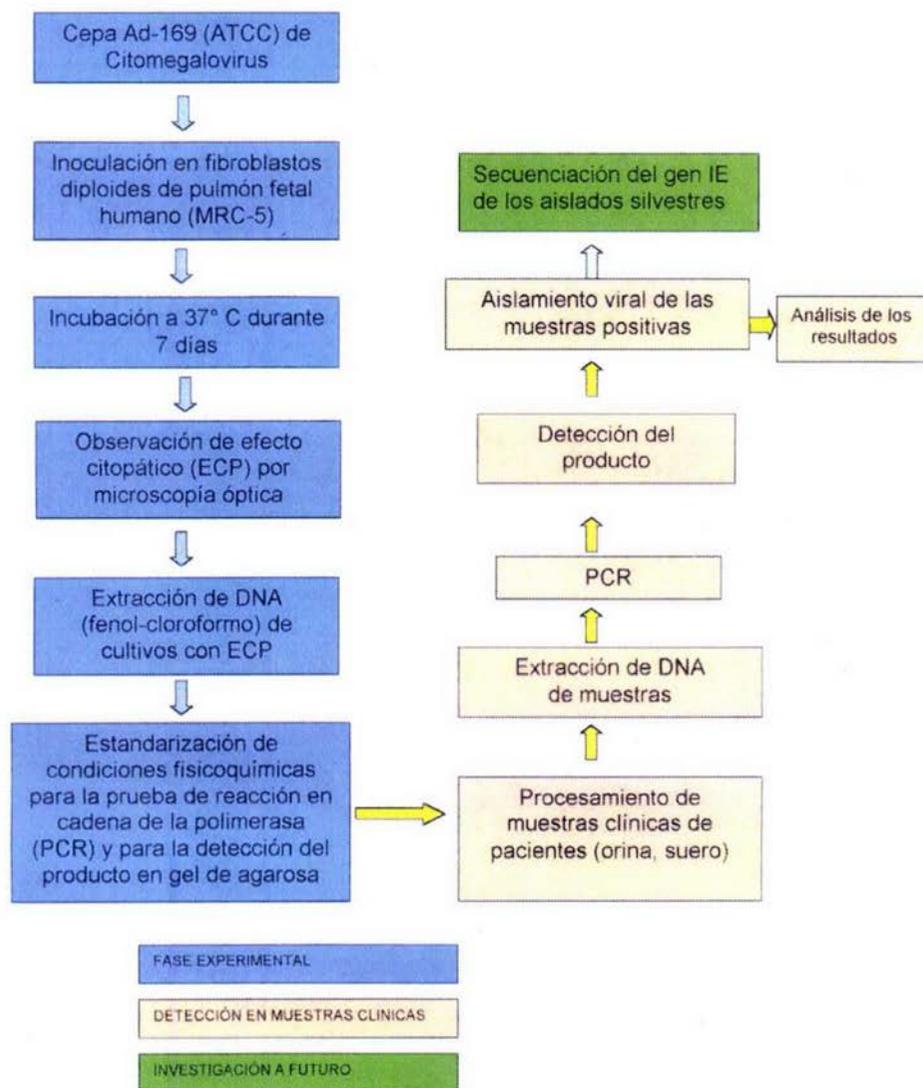
4. Hipótesis

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa para citomegalovirus humano es altamente sensible y específica, por lo que se pretende aplicar dicha prueba, para diagnosticar casos sospechosos de infección por citomegalovirus humano.

5. Justificación

Hasta el momento el sector médico depende del ensayo de ELISA, para tomar decisiones correctas y evitar infecciones nosocomiales y de esta manera dar el tratamiento antiviral. Actualmente la PCR no está disponible para el diagnóstico de rutina en México.

6. Plan de trabajo.



7. Material y métodos.

7.1 Población de pacientes y muestras clínicas.

En este estudio se incluyeron 5 recién nacidos que cumplieran con al menos uno de los siguientes criterios de inclusión: hepatomegalia, ictericia, síndrome de prematuridad, síndrome colestásico, púrpura trombocitopenica, petequias, microcefalia, dificultad respiratoria (cuadro 2). La muestra clínica de orina de dichos pacientes, fue colectada por personal médico y paramédico, en condiciones de asepsia, en los primeros 7 días de vida extrauterina (dveu). Asimismo se incluyeron muestras de sangre de cordón (como se le llama técnicamente) de 3 recién nacidos asintomáticos, así como de la sangre periférica de sus respectivas progenitoras asintomáticas. Enviadas por el hospital Español al departamento de Inmunogenética del InDRE (cuadro 3). Se incluyó un joven con trasplante. Así como un niño de 8 años de edad con antecedente de alucinaciones audiológicas, que acudieron a la consulta externa del InDRE (cuadro 4).

Cuadro 2. Población de recién nacidos sintomáticos.

Caso	Diagnóstico inicial	Manifestación clínica	Hospital	Área clínica	Edad (d v e u)	Clave
1	EHI	Infartos cerebrales	InPer	UCIREN	18	1724
2	Pretérmino eutrófico	Síndrome colestásico	InPer	UCIREN	8	1755
3	Pretérmino	Síndrome de dificultad respiratoria secundaria	HGM	Cunero patológico	15	1892
4	CMVH	Infección congénita	HIM	UCIN	60	113
5	Prematuridad	Hepatoesplenomegalia	HGM	UCIN	21	328

Cuadro 3. Población de donadores de cordón umbilical.

Caso	Diagnóstico inicial	Manifestación clínica	Hospital	Área clínica	Edad (d v e u)	Clave de Inmunogenética
6	Ninguno.	Asintomático	Español	Ginecología	1	CC010
7	Ninguno.	Asintomático	Español	Ginecología	2	CC013-R
8	Ninguno.	Asintomática	Español	Ginecología	34 años	CC013-M
9	Ninguno.	Asintomático	Español	Ginecología	1	CC014-R
10	Ninguno.	Asintomática	Español	Ginecología	26 años	CC014-M

Cuadro 4. Población de adultos sintomáticos.

Caso	Diagnóstico inicial	Manifestación clínica	Hospital.	Área clínica	Edad (años)	Clave de aislamiento
11	Transplante de médula ósea.	Asintomático	InDRE	Consulta externa.	18	1020
12	Ninguno.	Alucinaciones audiológicas.	InDRE	Consulta externa.	8	1030
13	Ninguno.	Visión periférica.	InDRE	Consulta externa.	43	1040
14	Ninguno	Productos con malformaciones congénitas	InDRE	Consulta externa.	28	1050

Cuadro 5. Población de pacientes con VIH.

Caso	Diagnóstico inicial	Manifestación clínica	Hospital	Área clínica	Edad (años)	Clave de aislamiento
15	VIH	coriorretinitis	InDRE	Consulta externa.	47	AR-1
16	VIH	fiebre, diarrea, vómito, cefalea, adenomegalia	InDRE	Consulta externa.	32	AR-2
17	VIH	adenomegalia, tos	InDRE	Consulta externa.	46	AR-3

7. 2 Material biológico.

7. 2. 1 Cepa celular.

En este estudio se utilizaron cultivos de la cepa celular de fibroblastos diploides de pulmón fetal humano (MRC-5) en el pase 33-37, con una confluencia del 50%.

7. 2. 2 Cepa viral.

El control viral positivo utilizado en la estandarización de la prueba, durante la fase experimental, fue la cepa Ad-169 de citomegalovirus humano (ATCC- 538).

7.3 Reactivos.

Acetato de sodio.	Agarosa.
Agua desionizada.	Agua inyectable.
Agua tratada.	Azul de bromofenol .
Bicarbonato de sodio 4.4%.	Bromuro de etidio.
Cloroformo-Alcohol isoamílico.	Cloruro de magnesio.
Dextran T500.	Dietyl pirocarbonato (DEPC).
dNTPs.	EDTA.
Etanol absoluto (grado biología molecular).	Etanol al 75%.
Fenol bidestilado.	Fenol equilibrado (pH 8.4) .
Fenol-Cloroformo.	8-hidroxiquinoleína.
Histopaque 1119.	Histopaque 1077.
Iniciadores (330, 331, 332, 333).	Marcador de peso molecular ϕ x 174.
Marcador VIII.	Medio crecimiento (MEM).
Penicilina-Estreptomicina.	Proteinasa K.
Taq-polimerasa.	TBE 10X.
Trizma base.	Tween 20.
Solución amortiguadora de corrida.	Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).
Solución amortiguadora para PCR 10X.	

7.4 Material de laboratorio

Matraces aforados (50, 100, 250 mL).	Guantes desechables.
Matraz Erlenmeyer (500 mL).	Cubre bocas.
Pipetas de vidrio estériles .	Recipientes para residuos biológico-infecciosos.
Pipetas de plástico desechables.	Criotubos con tapón de rosca (2 mL).
Botellas para cultivo celular (25 cm).	Puntas desechables para micropipeta.
Probetas (50, 100, 1000 mL).	Vaso de precipitados (50, 100, 250, 500 mL).
Tubos de polipropileno (15, 50 mL).	Tubos eppendorf (1.5 mL).
Tubos con EDTA.	Jeringas estériles

7.5 Equipo de laboratorio

Campana de bioseguridad (Nivel 2).	Centrífuga clínica (Rolco 2080)
Microcentrífuga refrigerada (HERMLE Z233 MK-2)	Baño María.
Cámara polaroid para UV.	Ultracongelador -70°C
Congelador de -20°C .	Agitador magnético
Termómetro.	Vortex
Microscopio invertido (Zeiss 47-1203-9901)	Termociclador (Perkin Elmer 2400)
Transiluminador de UV.	Potenciometro (Corning 220)
Cámara de electroforesis.	Balanza analítica
Fuente de poder (Powerpac 300).	Incubadora a 37°C (Forma Scientific)
Procesador de imágenes Eagle-Eye	Micropipeta de pistón
Espectrofotómetro de luz UV.	

7.6 Procesamiento de las muestras clínicas.

7.6.1 Procesamiento de la Orina.

- 1) Cada muestra de 10 mL de orina se centrifugó a 2800 r. p. m. durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue filtrado con un filtro de membrana de 0.45 μm y se dividió en varias fracciones, las cuales fueron tratadas con penicilina al 0.25 %. Las muestras de orina procesadas fueron conservadas a - 70°C y posteriormente utilizadas en el aislamiento viral.
- 2) El paquete celular obtenido fue transferido a un tubo de centrifuga y resuspendido con 2 mL de orina del paso anterior y se mezcló vigorosamente con el vórtex
- 3) Se tomaron 300 μL del paquete celular resuspendido y se transfirieron a un tubo para centrifuga de 1.5 mL al cual se le agregaron previamente 300 μL de proteinasa K.
- 4) Posteriormente esta mezcla se incubó en baño María a 56 °C , durante 2 horas. Los tubos fueron cubiertos con parafilm.
- 5) Se inactivó por calor a 96°C en baño maría, durante 10 min. asegurando la tapa de los tubos, para evitar la formación de burbujas.
- 6) Se enfrió gradualmente en hielo y se incubó a -20°C durante 2 horas.

7. 6.2 Procesamiento de la sangre total.

1. La sangre total fue colectada en un tubo con anticoagulante (EDTA), para procesarla de inmediato, conservando la cadena de frío. Después del tratamiento de la sangre se obtuvieron tres fracciones: plasma natural (PN), plasma leucocitario (PL) y leucocitos (L). Todos los pasos se ejecutaron en campana de bioseguridad .

2. La sangre total se transfirió a un tubo de polipropileno de 15 mL. Inmediatamente después se agregaron 2 mL de Dextran T500 y se homogenizó utilizando una pipeta desechable.
3. Posteriormente se incubó a 37°C en baño María, durante treinta min.
4. Se transfirieron 1.5 mL del sobrenadante obtenido (PN) a un tubo eppendorf de 2.0 mL. Posteriormente se utilizaron 300 µL de la fracción PN, para realizar la digestión con proteinasa K. El resto de la fracción PN se conservó a -20 °C, para el aislamiento viral.
5. Inmediatamente después se centrifugó el resto de la sangre a 1640 rpm durante 10 min, a temperatura ambiente.
6. Se transfirieron 1.5 mL del sobrenadante, denominado plasma leucocitario (PL), a un tubo eppendorf de 2.0 mL. Posteriormente se utilizaron 300 µL de dicha fracción, para la digestión con proteinasa K. La muestra se guardó para aislamiento viral a -20 °C.
7. Se agregaron 2.0 mL de cloruro de amonio al 0.83% al resto de la sangre y se agitó vigorosamente con el vórtex.
8. Posteriormente se incubaron, en hielo durante 5 min.
9. Luego se agregaron 10 mL de amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.36) y se mezclaron por inversión con la mano, durante 2 min.
10. Inmediatamente después se centrifugaron a 1640 r.p.m durante 10 min a temperatura ambiente.
11. Se descartó el sobrenadante con un bulbo de transferencia; teniendo cuidado de no arrastrar la capa de leucocitos.
12. Se lavaron las células con 7 mL de amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.36) por centrifugación a 1640 r.p.m, durante 10 min a temperatura ambiente.

13. Se descartaron los sobrenadantes y se transfirió cuidadosamente la capa de leucocitos (L) a un tubo eppendorf. Guardar una porción de las muestras para aislamiento viral a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7. 6. 3. Digestión de proteínas.

1. A cada $300\text{ }\mu\text{L}$ de las muestras obtenidas de sangre total: plasma natural (PN), plasma leucocitario (PL), leucocitos (L) y orina, se les agregó un volumen igual de proteinasa K.
2. Se procedió a incubar en baño María a 56°C durante dos horas.
3. Posteriormente se inactivaron las muestras con calor, utilizando baño María a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min.
4. Las muestras fueron enfriadas gradualmente y conservadas a -20°C durante 2 horas.
5. Las muestras fueron descongeladas y centrifugadas a $14,000\text{ r.p.m.}$ durante 2 min.
6. Se transfirieron $300\text{ }\mu\text{L}$ de sobrenadante a tubos de 1.5 mL .

7. 7 Extracción orgánica del DNA por el método Fenol- Cloroformo.

1. Las muestras digeridas con proteinasa K, fueron centrifugadas a $10,000\text{ r.p.m.}$ a temperatura ambiente durante 2 min. Inmediatamente después se transfirieron $300\text{ }\mu\text{L}$ de sobrenadante (SN) a tubos para microcentrifuga de 1.5 mL .
2. A cada SN se le agregaron $300\text{ }\mu\text{L}$ de la mezcla fenol / cloroformo. Posteriormente se agitaron utilizando el vórtex.
3. Se realizó una nueva centrifugación a $5,000\text{ r.p.m.}$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. El SN obtenido, se transfirió a otro tubo de 1.5 mL .

4. Se agregan 200 μL de TE 1X al restante de cada tubo y se repitió la centrifugación a 5,000 r.p.m a 4 °C durante 10 min. El SN obtenido se transfirió al tubo de 1.5 mL del paso 3.
5. Al volumen de SN obtenido en los pasos 3 y 4, se le agregó un volumen igual de la mezcla cloroformo / alcohol isoamílico. Posteriormente se realizó una centrifugación a 14,000 r.p.m. a 4° C durante 10 min.
6. El SN obtenido del paso 5 se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se le agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto, así como 30 μL de acetato de sodio, por cada 300 μL de SN. Posteriormente se incubó a -20 °C durante 2 horas.
7. Finalmente se centrifugaron a 14000 r.p.m. a 4°C durante 30 min; el precipitado obtenido se desecó a temperatura ambiente.
8. Finalmente el DNA obtenido se hidrata con 70 μL de TE 1X y se almacenó a -20 °C.

7. 8 Extracción del DNA con DNA zol (Gibco).

- 1) A una botella de cultivo de 75 cm^2 con aproximadamente 2×10^6 fibroblastos diploides de pulmón fetal humano, se le agregó 1 mL de tripsina al 0.025%, para desprender la monocapa celular, mediante una agitación moderada.
- 2) La suspensión celular obtenida, fue transferida a un tubo de polipropileno de 50 mL. Posteriormente se realizó una centrifugación a 4050 r.p.m. durante 15 minutos a 25°C, descartando el sobrenadante obtenido.
- 3) Posteriormente se agregó 1 mL del reactivo comercial DNA_{ZOL} al precipitado celular, agitando con pipeta desechable varias veces, hasta observar un líquido denso.
- 4) Se centrifugó a 13000 r.p.m. a temperatura ambiente durante 5 min.

- 5) Se transfirieron 500 μL de sobrenadante a tubos de 1.5 mL, a los que previamente se les agregó 1000 μL de etanol absoluto.
- 6) Inmediatamente después se mezclaron por inversión; durante 3 min.
- 7) Se centrifugó a 14000 r.p.m. a 4°C durante 15 min, y se descartó el sobrenadante.
- 8) Posteriormente, se realizó un lavado por centrifugación a 14000 r.p.m. a 4°C, agregando 500 μL de etanol al 70%.
- 9) Se descartó el sobrenadante y se colocaron los tubos en la platina a 37 °C durante 15 minutos.
- 10) Finalmente se hidrató con 200 μL de NaOH 8 mM a 37 °C y se dejó en agitación continua durante 12 horas.

7.9 Propagación del virus tipo Ad-169.

1. Se observó que la monocapa de fibroblastos diploides de pulmón fetal humano, tuviera su morfología característica y una confluencia celular de aproximadamente el 80%.
2. Se descartó el medio de crecimiento.
3. Posteriormente se agregaron 14 mL de medio D-MEM al 2%. Se agitó levemente y se descartó el medio.
4. Se inocularon 200 μL de virus tipo Ad-169 ó de la muestra problema. Agregando posteriormente 4 mL de D-MEM.
5. Se dejó adsorber el virus durante dos horas a 37°C, agitando cada 10 minutos.
6. Se descartó el sobrenadante y se agregó el medio de mantenimiento
7. Se procedió a incubar a 37°C, durante al menos 14 días, observando diariamente, hasta detectar ECP.

7.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

7.10.1 Mezcla de reacción.

Las condiciones fisicoquímicas óptimas para la prueba de PCR fueron determinadas durante la fase experimental (cuadro 6), y permitieron la detección de citomegalovirus humano Ad-169.

Cuadro 6. Mezcla de reacción para la PCR.

REACTIVO	PRIMERA AMPLIFICACIÓN (Concentración final)	SEGUNDA AMPLIFICACIÓN (Concentración final)
Cloruro de magnesio	8.6 mM	8.6 mM
Taq polimerasa	1.375 U/ μ L	1.375 U/ μ L
Buffer 10X	1.5 mM	1.5 mM
Iniciador 330	20 ρ M	
Iniciador 331	20 ρ M	
Iniciador 332		80 ρ M
Iniciador 333		80 ρ M
dNTPs	250 μ M	250 μ M
Tween 20	0.5	
Agua inyectable	12.05 μ L	25.83 μ L

Cuadro 7. Programa para termociclador (primera amplificación).

PROGRAMA FINAL UTILIZADO EN LA PRIMERA AMPLIFICACIÓN. (25 ciclos)		
	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
PRECALENTAMIENTO	94	5 min
DESNATURALIZACIÓN	94	30 seg
ALINEACIÓN	55	30 seg
EXTENSIÓN	72	30 seg
EXTENSIÓN FINAL	72	7 min
INCUBACIÓN	4	∞

Cuadro 8. Programa para termociclador (segunda amplificación).

PROGRAMA FINAL UTILIZADO EN LA SEGUNDA AMPLIFICACIÓN. (30 ciclos)		
	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
DESNATURALIZACION	91	30 seg
ALINEACIÓN	56	1 min
EXTENSIÓN	72	1 min
EXTENSIÓN FINAL	72	10 min
INCUBACIÓN	4	∞

7. 10. 2 Secuencias de los iniciadores.

En este estudio se utilizaron 4 iniciadores para el gene IE (Cuadros 9 y 10), los cuales fueron diseñados por Brytting y cols. en 1991 (Figura 6).

Cuadro 9. Secuencia de los iniciadores de la primera amplificación.

	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	Producto (pb)	NUCLEÓTIDOS	
330	5'TGAGGATAAGCGGGAGATGT3'	242	2242-2261	SENTIDO
331	5'ACTGAGGCAAGTTCTGCAGT3'	242	2483-2464	ANTISENTIDO

Cuadro 10. Secuencia de los iniciadores de la segunda amplificación.

	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS	Producto (pb)	NUCLEÓTIDOS	
332	5'AGCTGCATGATGTGAGCAAG3'	146	2279-2299	SENTIDO
333	5'GAAGGCTGAGTTCTTGTTAA3'	146	2425-2406	ANTISENTIDO

Los iniciadores fueron sintetizados por los laboratorios *Bio-Synthesis* en Estados Unidos. Posteriormente, los iniciadores liofilizados, se hidrataron con 2 mL de agua tratada con DEPC y se mantuvieron a -20°C durante 2 semanas. Posteriormente se prepararon diluciones 1:20 de cada uno de los cuatro iniciadores y se evaluó su concentración en el espectrofotómetro. Los iniciadores 330 y 331 fueron agregados a la mezcla de reacción de la primera amplificación, a una concentración final de 20 μM . Mientras que los iniciadores 332 y 333 fueron agregados a la mezcla de reacción de la segunda amplificación, a una concentración final de 80 μM .

7.10.3 Localización de los iniciadores en la región de interés.

1 ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCCGCCCAT TGACGTCAAT 81
AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC CATTGACGTC AATGGGTGGA 121 GTATTTACGG
TAAACTGCCC ACTTGGCAGT ACATCAAAGT TATCATATGC CAAGTACGCC 181 CCCTATTGAC GTCAAATGACG
GTAATATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCCAAGT ACATGACCTT 241 ATGGGACTTT CCTACTTGGC AGTACATCTA
CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGTGTAT 301 GCGGTTTTGG CAGTACATCA ATGGGCGTGG ATAGCGGTTT
GACTCACGGG GATTTCCAAG 361 TCTCCACCCC ATTGACGTCA ATGGGAGTTT GTTTTGGCAC CAAAATCAAC
GGGACTTTCC 421 AAAATGTCGT ACAAACCTCCG CCCCATTGAC GCAAATGGGG GGTAGGCGTG
TACGGTGGGA 481 GGTCTATATA AGCAGAGCTC GTTTAGTGAA CCGTCAGATC GCCTGGAGAC GCCATCCACG
541 CTGTTTTGAC CTCCATAGAA GACACCGGGA CCGATCCAGC CTCCGCGGCC GGAACCGTG 601
CATTGGAACG CGGATTTCCC GTGCCAAGAG TGACGTAAGT ACCGCCTATA GAGTCTATAG 661 GCCCACC
TTGGCTTCTT ATGCATGCTA TACTGTTTTT GGCTTGGGGT CTATACACCC 721 CCGCTTCTCT ATGTTATAGG
TGATGGTATA GCTTAGCCTA TAGGTGTGGG TTATTGACCA 781 TTATTGACCA CTCCCCTATT GGTGACGATA
CTTTCCATTA CTAATCCATA ACATGGCTCT 841 TTGCCACAAC TCTCTTTATT GGCTATATGC CAATACACTG
TCCTTCAGAG ACTGACACGG 901 ACTCTGTATT TTTACAGGAT GGGGTCTCAT TTATTATTTA CAAATTCACA
TATAACAAC 961 CACCGTCCC AGTGCCGCA GTTTTTATTA AACATAAGT GGGATCTCCA CGGAATCTC
1021 GGTAGCTGT TCCGGACATG GGCTTCTCTC CGGTAGCGGC GGAGCTTCTA CATCCGAGCT 1081
CTGCTCCCAT GCCTCCAGCG ACTCATGGTC GCTCGGCAGC TCCTTGCTCC TAACAGTGGA 1141
GGCCAGACTT AGGCACAGCA CGATGCCAC CACCACCAGT GTGCCGCACA AGGCCGTGGC 1201
GGTAGGGTAT GTGTCTGAAA ATGAGCTCGG GGAGCGGGCT TGCACCGCTG ACGCATTTGG 1261
AAGACTTAA GCAGCGGCAG AAGAAGATGC AGGCAGTGA GTTGTGTGT TCTGATAAGA 1321
GTCAGAGGTA ACTCCGTTG CGGTGCTGTT AACGGTGGAG GGCAGTGTAG TCTGAGCAGT 1381
ACTCGTTGCT CGCCGCGCGC CCACAGACA TAATAGTGA CAGACTAACA GACTGTCTCT 1441
TTCATGGGT CTTTTCTGCA GTCACCGTCT TTGACACGAT GGAGTCTCT GCCAAGAGAA 1501 AGTGGAGCC
TGATAATCT GACGAGGGCC CTTCCTCAA GGTGCCCGG TACGTGTGGG 1561 GGTTTGTGGG CCGCTTTT
TTTTATATA ATGATTAAT TTTATATA ATATCTCTG 1621 TATGTAGGAC ATCTCTTAT GACTTATTT
TTCTATGTTT TATGCCCGAG ACACCCGTGA 1681 CCAAGGCCAC GACGTTCCTG CAGACTATGT
TGAGGAAGGA GGTAAACAGT CAGCTGAGTC 1741 TGGGAGACCC GCTGTTTCCA GAGTTGGCCG
AAGAATCCCT CAAAATTTT GAACAAGTGA 1801 CCGAGGATTG CAACGAGAAC CCGAGAAAG
ATGCTCTGGC AGAATCGT AAGTCTGTTG 1861 ACATGTATGT GATGTATAAT AACCTGCAATG GGCAGTGGAT
TTAATTTGTG ATGTAGATA 1921 GAGTAAAGAT TAACTCTTGC ATGTGAGCGG GGCATCGRGA TAGCGATAAA
TGAGTCAGGA 1981 GGACGGATAC TTATATGTGT TGTATTCTC CTCTACAG TC AAACAGATA AGGTTCCGAT
2041 GGACATGGTG CGGCATAGAA TCAAGGAGCA CATGCTGAAA AAATATACCC AGACGGGAAGA 2101
GAAATTCAC TGGCCTTTA ATATGATGG AGGATGTTG CAGAATGCC TAGATATCTT 2161 AGATAAGGTT
CATGAGCCTT TCGAGGAGAT GAAGTGATT GGGCTAATA TGCAGAGCAT 2221 GTATGAGAAC TACATTGTAC
CTGAGGATAA GCGGGAGATG TGGATGGCT GTATTAAGGA 2281 GCTGCATGAT GTGAGCAAGG
GCGCCGTAA CAAGTTGGGG GTTGCACTGC AGGCTAAGCC 2341 CCGTGCTAAA AAGGATGAAC
TTAGGAGAAA GATGATGAT ATGTGCTACA GGAATATAGA 2401 GTTCTTACC AAGAACTCAG CTTCCCTTAA
GACCACAAAT GGCTGCAGT AGGCCATGGC 2461 GGCACCTGAG AACTTGCCTC AGTGTCTCCC
TGATGAGATT ATGGCTTATG CCCAGAAAAT 2521 ATTTAAGATT TTGGATGAGG AGAGAGACAA GGTGCTCAG
CACATTGATC ACATATTTAT 2581 GGATATCCTC ACTACATGTG TGGAAACAAT GTGTAATGAG TACAAGGTCA
CTAGTGACGC 2641 TTGTATGATG ACCATGTACG GGGGCATCTC TCTCTAAGT GAGTCTGTG GGGTCTGTG
2701 CTGCTATGTC TTAGAGGAGA CTAGTGTGAT GCTGGCCAAG CCGGCTCTGA TAACCAAGCC 2761
TGAGGTTATC AGTGAATGA AGCAGCCCAT TGAGGAGATC TGCATGAAGG TCTTTGCCA 2821 GTACATTCTG
GGGGCCGATC CTCTGAGAT CTGCTCTCT AGTGTGGATG ACCTACGGGC 2881 CATCGCCGAG
GAGTCAGATG AGGAAGAGGC TATTGTAGCC TACACTTTGG CCACCGCTGG 2941 TGTCACTCC TCTGATCTC
TGGTGTACC CCCAGAGTCC CCTGTACCCG CGACTATCCC 3001 TCTGTCTCA GTAATTGTGG CTGAGAACAG
TGATCAGGAA GAAAGTGAC AGAGTGTAGA 3061 GGAAGAGGAG GAGGGTGTCT AGGAGGAGCG
GGAGGACACT GTGTCTGCA AGTCTGAGCC 3121 AGTGTCTGAG ATAGAGGAAG TTGCCCAAG
GGAAGAGGAG GATGGTGTG AGGAACCCAC 3181 CGCCTCTGGA GGCAAGAGCA CCCACCCTAT
GGTGACTAGA AGCAAGGCTG ACCAGTAAAC 3241 TATTGTATAT ATATATCAGT TACTGTTATG TATCCACGT
CACTATTGTA TACTTATAT 3301 TATACTAT GTTATACTT GTAATCTAC TCAATAAACG GTCCAGCCT
GTGAAACCGT

■ iniciador 330 ■ iniciador 331 ■ iniciador 332 ■ iniciador 333
■ exon 4 ■ exon 3

Figura 6. Localización de los iniciadores en el exón 4 de la región del gen inmediatamente temprano de citomegalovirus humano (del virus tipo AD-169).

7. 10. 3 Electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.

1. Se pesaron 0.75 g de agarosa y se diluyeron con 35 mL de TBE 1X.
2. Se calentó a ebullición, hasta ver que el líquido estuviera claro.
3. Esperar a que bajara la temperatura y agregar 2.5 μL de bromuro de etidio. Agitar cuidadosamente. Procurar no estar mucho tiempo en contacto con los vapores, ya que son mutagénicos..
4. Posteriormente se vació a la cámara de electroforesis y se dejó gelificar durante 30 minutos. Posteriormente se agregó la solución de TBE 1X.
5. Se diluyeron 5 μL del producto de la segunda amplificación en 3 μL de solución de corrida. Se agregaron a los carriles correspondientes, teniendo cuidado de no contaminar los carriles vacíos.
6. Se sometió a una corriente de 60 volts durante 90 minutos.
7. Se observó en el transiluminador. Si era positivo se guardó la imagen y posteriormente se hizo la propagación del virus.

8. Resultados.

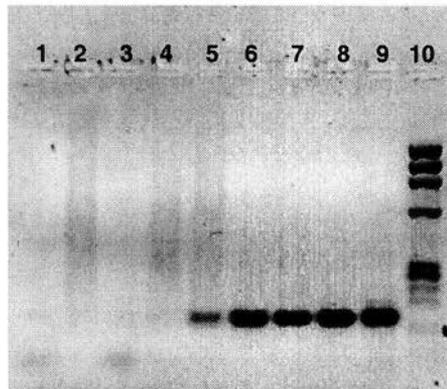


Figura 7.

Detección de la región de interés en células infectadas con el virus tipo, Ad-169: carril 1) DNA del caso 6 (control negativo); carril 2) DNA del caso 7 (control negativo); carril 3) DNA del caso 8 (control negativo); carril 4) DNA del caso 9 (control negativo); carril 5) DNA del virus silvestre del caso 10; carril 6) DNA del sobrenadante de cultivo del virus tipo Ad-169; carril 7) DNA del sobrenadante de cultivo del virus tipo Ad-169 (duplicado); carril 8) DNA del paquete celular infectado con el virus tipo Ad-169; carril 9) DNA del paquete celular infectado con el virus tipo Ad-169 (duplicado); carril 10) Marcador de peso molecular Φ X174.

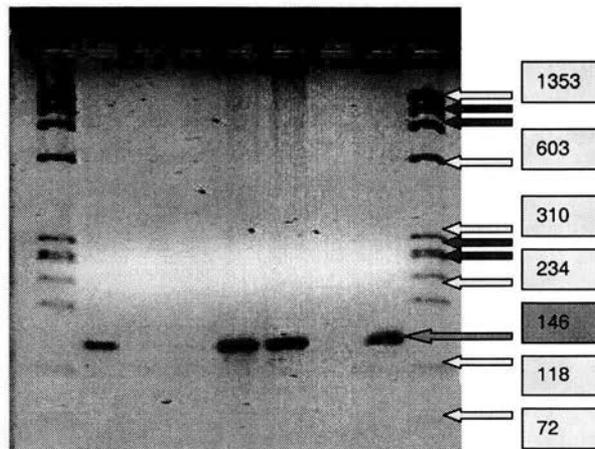


Figura 8.

Detección de la región de interés en la orina de tres casos clínicos (recién nacidos sintomáticos), infectados con HCMV silvestre: carril 1) Marcador de peso molecular 174; carril 2) DNA del virus silvestre del caso 1; carril 3) DNA del caso 2; carril 4) DNA del caso 3; carril 5) DNA del virus silvestre del caso 4; carril 6) DNA del virus silvestre del caso 5; carril 7) DNA de un portador sano (control negativo); carril 8) DNA del virus tipo Ad-169; carril 9) Marcador de peso molecular Φ X174.



Figura 9.

Detección de la región de interés en sangre periférica de un paciente sintomático, con antecedente de trasplante de medula ósea: carril 1) DNA del virus silvestre en el plasma natural del caso 11; carril 2) DNA del virus silvestre en el plasma leucocitario del caso 11; carril 3) DNA obtenido a partir de la orina del caso 11; carril 4) DNA obtenido a partir de monocitos del caso 15 ; carril 5) DNA obtenido de monocitos del caso 16; carril 6) DNA del virus tipo Ad-169; carril 7) DNA de MRC-5 ; carril 8) DNA de un portador sano (control negativo); carril 9) marcador de peso molecular escalera de 100 p.b.

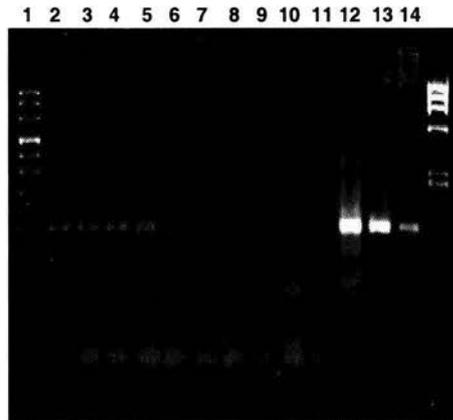


Figura 10.

Sensibilidad de la PCR: carril 1) Marcador de peso molecular ΦX174; carril 2) DNA del virus tipo Ad-169 (Fenol-cloroformo) ; carril 3) DNA del virus tipo Ad-169 (duplicado); carril 4) DNA del virus tipo Ad-169 (Fenol-cloroformo) en una dilución 1:2; carril 5) DNA del virus tipo Ad-169 (duplicado) en una dilución 1:2 ; carril 6) DNA del virus tipo Ad-169 (Fenol-cloroformo) en una dilución 1:20 ; carril 7) DNA del virus tipo Ad-169 (duplicado) en una dilución 1:20; carril 8) DNA del virus tipo Ad-169 (Fenol-cloroformo) en una dilución 1:200; carril 9) DNA del virus tipo Ad-169 (duplicado) en una dilución 1:200; carril 10) DNA del virus tipo Ad-169 (Fenol-cloroformo) en una dilución 1:2,000; carril 11) DNA del virus tipo Ad-169 (duplicado) en una dilución 1:2,000; carril 12) DNA del virus tipo Ad-169 (DNA zol); carril 13) DNA del virus tipo Ad-169 (DNA zol); carril 14) DNA del virus tipo Ad-169 (Fenol-cloroformo); carril 15) Marcador de peso molecular ΦX174.

Cuadro 11. Resultados obtenidos en las pruebas de serología, aislamiento y PCR, en la población de recién nacidos sintomáticos.

Manifestación clínica	Caso	PCR	Serología (IgM)	Serología (IgG)	Aislamiento (ECP)	Edad (dveu)
Infartos cerebrales	1	+	0.260 NEGATIVO	1.601 POSITIVO	+	17
Síndrome colestásico	2	-	?	?		8
Síndrome de dificultad respiratoria secundaria	3	-	?	?		15
Infección congénita	4	+	3.363 POSITIVO	1.363 POSITIVO	+	60
Hepatoesplenomegalia	5	+	0.244 NEGATIVO	1.298 POSITIVO	+	21

Cuadro 12. Resultados obtenidos en las pruebas de serología, aislamiento y PCR, en la población de donadores sanos de cordón umbilical.

Manifestación clínica	Caso	PCR	Serología (IgM)	Serología (IgG)	Edad (años)	Edad (dveu)
Ninguna.	6	-	0.225 NEGATIVO	1.038 POSITIVO		1
Ninguna.	7	-	0.288 NEGATIVO	1.458 POSITIVO		2
Ninguna.	8	-	0.217 NEGATIVO	1.190 POSITIVO	34	
Ninguna.	9	-	0.235 NEGATIVO	0.132 NEGATIVO		1
Ninguna.	10	+	0.204 NEGATIVO	0.168 NEGATIVO	26	

Cuadro 13. Resultados obtenidos en las pruebas de serología, aislamiento y PCR, en la población de adultos sintomáticos.

Manifestación clínica	Caso	PCR	Serología (IgM)	Serología (IgG)	Aislamiento (ECP)	Edad (años)
Transplante de medula	11	+	0.225 NEGATIVO	1.545 POSITIVO	+	21
Alucinaciones auditivas	12	+	0.212 NEGATIVO	0.111 NEGATIVO	+	8
Vista periférica	13	+	0.219 NEGATIVO	1.021 POSITIVO		42
Madre asintomática de recién nacido con malformaciones congénitas.	14	-	0.048 NEGATIVO	1.918 POSITIVO		28

Cuadro 14. Resultados obtenidos en las pruebas de serología, aislamiento y PCR, en la población de pacientes con VIH.

Manifestación clínica	Caso	PCR	Serología (IgM)	Serología (IgG)	Aislamiento (ECP)	Edad (años)
Coriorretinitis.	15	-	0.260 NEGATIVO	1.601 POSITIVO		47
Fiebre, diarrea, vomito adenomegalia, cefalea	16	-	0.200 NEGATIVO	2.134 POSITIVO		32
adenomegalia, tos	17	-	0.485 POSITIVO	1.085 POSITIVO		46

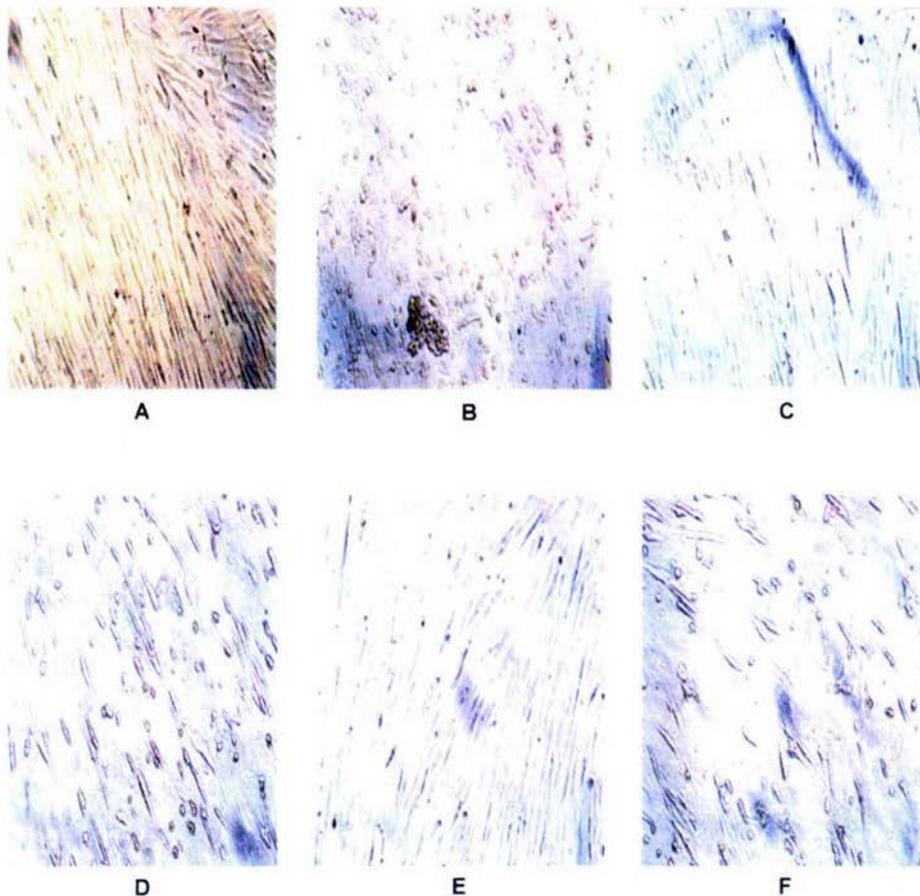


Figura 11. A) células MRC-5 sin infectar, incubadas durante 21 días a 37°C. B) células MRC-5 infectadas con el virus tipo Ad-169 (cosechadas 21 días después de la infección). C) células MRC-5 infectadas con virus silvestre del caso 11, aislado a partir de plasma natural (cosechadas a los 21 días, después de la infección) D) células MRC-5 infectadas con virus silvestre del caso 11, aislado a partir de plasma leucocitario (cosechadas a los 21 días, después de la infección) E) células MRC-5 infectadas con virus silvestre del caso 12, aislado a partir de plasma natural (cosechadas a los 21 días, después de la infección) F) células MRC-5 infectadas con virus silvestre del caso 12, aislado a partir de plasma leucocitario (cosechadas a los 21 días, después de la infección).

IZT.



U.N.A.M. CAMPUS

9. Discusión.

Con la utilización del protocolo de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa de esta tesis, se logró la amplificación del la región de interés IE-1 del exón 4 de citomegalovirus humano; por lo que fue posible la confirmación clínica de 5 casos de infección sintomática y un caso de infección asintomático, causados por HCMV.

Los iniciadores utilizados en la primera y segunda amplificación nos permitieron detectar el fragmento de interés de 146 pb. Dicho fragmento no se presenta en el genoma de otros miembros de la familia Herpesviridae; lo que nos permite descartar una respuesta cruzada.

La detección de estos casos, hizo posible el aislamiento del HCMV silvestre, a partir de tres muestras de orina de recién nacidos. Así como un aislamiento de HCMV silvestre en el plasma natural y plasma leucocitario de un joven con trasplante de médula ósea y un aislamiento del virus en el plasma natural y plasma leucocitario de un niño con alucinaciones audiológicas.

En los tres casos de infección congénita sintomática causada por HCMV, confirmados por la PCR. Los recién nacidos presentaron signos y síntomas de la enfermedad de las inclusiones citomegálicas. En el caso 1 se reportó una manifestación clínica no reportada en el síndrome clásico de CID (infarto cerebral). Cabe mencionar que el resultado para anticuerpos IgM fue negativo, mientras para IgG fue positivo. Lo que hace pensar en una posible infección congénita por reactivación del citomegalovirus durante la gestación.

Por ello considero que la prueba de PCR puede ser útil para detectar la presencia del citomegalovirus humano silvestre, aún en los casos que presenten un resultado de IgM negativo por el método de ELISA (técnica utilizada de rutina para el diagnóstico de esta enfermedad, en México).

En el caso 4 la detección del virus por PCR fue positiva y permitió confirmar el diagnóstico clínico presuntivo de infección congénita (en este caso, por motivos burocráticos, no nos fue posible el acceso a mas información clínica). El caso 5 (es un recién nacido de 21 días de edad), el cual presentó al nacer, las siguientes manifestaciones clínicas: síndrome de prematuridad, plaquetopenia, leucopenia, hepatoesplenomegalia y síndrome colestásico. En este caso en particular el hospital de procedencia, refirió el aislamiento de *Enterobacter cloacae* multirresistente.

En los casos 1,5, 11 y 12 los resultados de las pruebas serológicas para IgM, fueron negativos; sin embargo, la detección por la PCR y el aislamiento del virus silvestre fueron positivos. Solo el caso 5 presentó un valor positivo para la IgM. Lo que me hace suponer el fenómeno de reactivación en los primeros cuatro casos, mencionados anteriormente y un caso de infección primaria en el caso 5.

10. Conclusiones.

1. Las condiciones óptimas del protocolo de la PCR para citomegalovirus humano, presentadas en este trabajo, permitieron detectar tres casos con infección congénita sintomática; así como un caso con infección por citomegalovirus en un paciente con trasplante de médula ósea, un paciente con alucinaciones audiológicas.
2. La obtención de aislamientos de virus silvestre en las muestras estudiadas, permitirá realizar estudios de secuenciación de las cepas de citomegalovirus humano distribuidas en nuestro país.
3. La comunicación oportuna entre el departamento de virología y los médicos, permitirá tomar decisiones en cuanto al manejo de estos casos al interior del nosocomio y de esta manera evitar el contagio intrahospitalario (pacientes, personal médico y paramédico, mujeres embarazadas seronegativas, personal de aseo). Debido a que la excreción del virus es frecuente en esta infección, la PCR puede ser aplicada en muestras de casos con ICA.
4. Por todo lo anterior considero que la prueba de PCR es útil para detectar la presencia del citomegalovirus humano silvestre, aún cuando los con resultados de IgM sean negativos por ELISA.

10.1 Perspectivas

La aplicación de esta prueba en el sector salud nos permitirá detectar casos subclínicos y de una manera indirecta, agilizar la toma de decisiones en cuanto a la terapia antiviral oportuna, con el objeto de evitar las secuelas tardías irreversibles. La obtención de los resultados y la comunicación rápida de los mismos, permitirá tomar medidas epidemiológicas para el control de su diseminación al interior de los diferentes hospitales de México.

11. Bibliografía

1. **Adler SP, Starr SE, Plotkin SA, Hempfling SH, Buis J, Manning ML and Best AM.** (1991). Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *J Inf Dis* 171: 26-32.
2. **Adler SP.** (1996). Current prospects for immunization against cytomegaloviral disease. *Infect Agen dis* 5(1): 29-35.
3. **Alford CA.** (1967). A correlative immunologic, microbiologic and clinical approach to diagnosis of acute and chronic infections in newborn infants. *New Eng J Med.* 277: 437-449.
4. **Alford CA.** (1982). Chronic congenital infection of man. *Yale J Bio Med* 55: 187-192.
5. **Alford CA.** (1990). Cytomegalovirus (chapter 70) in : *Fields BN Virology.* 1981-2010.
6. **Alford CA, Stagno S, Pass RF and Britt WJ.** (1990) Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Reviews of infectious diseases.* 12: 745-753.
7. **Ahlfors.** (1981) Secondary maternal cytomegalovirus infection causing symptomatic congenital infection *N Engl J Med.* 305:284.
8. **Aspin MA, Gallez-Hawkins GM, Giugni TD, Tegtmeier B, Lang DJ, Schimidt GM, Forman SJ and Zaia J.** (1994) Comparison of plasma PCR and bronchoalveolar lavage fluid culture for detection of cytomegalovirus infection in adult bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 32:2266-2269.
9. **Balcarek KB, Warren W, Smith RJ, Lyon MD and Pass RF.** (1993). Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection by detection of virus in saliva. *The Journal of Infectious Diseases* 167: 1433-1436.
10. **Balthesen M, Dreher L, Lucin P and Reddenhase MJ.** (1994). The establishment of cytomegalovirus latency in organs is not linked to local virus production during primary infection. *J Gen Vir* 75: 2329-2336.
11. **Barbi M, Binda S, Primache V and Novelli C.** (1996) Cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of infant with congenital or postnatal infection. *Pediatr Infect Dis J* 15: 898-903.
12. **Barrera SHA, Ortiz LR, Rojas MA y Resendez PD.** (1993). Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo.*
13. **Barret-Muir W, Breuer J.** (2000). CMV viral load measurements in whole blood and plasma which is best following renal transplantation. *Transplantation* 70(1): 116-119.
14. **Benirschke K, Mendoza GR and Bazeley PL.** (1974): Placental and fetal manifestations of cytomegalovirus infection. *Virchows Arch Cell Pathol* 16: 121-139.
15. **Berenberg.** (1970). Long-term follow-up of cytomegalic inclusion disease of infancy. *Pediatrics* 46: 403-410.
16. **Bia FJ, Griffith BP and Tarsio MC.** (1980). Vaccination for the prevention of maternal and fetal infection with guinea pig cytomegalovirus. *J Inf Dis* 142 (5) : 732-738.
17. **Binder ND.** (1988). Outcome for fetus with ascites and cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 82(1): 100-103.

18. **Blau.** (1997). Congenital cytomegalovirus infection after recurrent infection in a mother with a renal transplant. *Pediatr Nephrol* **11**: 361-362
19. **Boppana SB, Pass RF, Britt WJ, Stagno S and Alford CA.** (1992). Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality *11* (2):93-99.
20. **Britting M., Sundqvist VA., Stalhandske P., Linde A and Wahren B.** (1991). Cytomegalovirus DNA detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. *J Virol Methods*.**32**:127-138
21. **Britting M., Xu W., Wahren B and Sundqvist V.** (1992). Cytomegalovirus DNA detection in sera from patients with active citomegalovirus infections *J Clin Microbiol* **30**:1937-1941
22. **Brown.** (1998). Cytomegalovirus infection. *Seminars in Perinatology* **22**(4): 260-266.
23. **Center for Disease Control.** (1988). Monthly vital statistics. Atlanta, GA: Center for Disease Control: April 25,. Public Health Service. U.S. Dept. of Health and Human Services Vol. **37** No.1.
24. **Chandler SH, Holmes KK, Wentworth BB, Gutman LT, Wiesner PJ, Gutman LT, Wiesner PJ, Rusell AE and Hunter HH.** (1985).The epidemiology of cytomegaloviral infection in women attending a sexually transmitted disease clinic. *J infect Dis* **152**: 597-605.
25. **Chachoua A, Dieterich D, Krasinski K.** (1987). 9-(1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl)guanidine (ganciclovir) in the treatment of cytomegalovirus gastrointestinal disease with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* **107**: 133-137.
26. **Chou S.** (1986). Acquisition of donor strains of citomegalovirus by renal-transplant recipients. *The New England Journal of Medicine* **314** (22): 1418-1423.
27. **Cinque P, Vago L, Brytting M, Castagna A, Accordini A, Sundqvist VA, Zanchetta N, Wahren B, Lazzarin A, and Linde A.** (1992). Cytomegalovirus infection of the central nervous system in patients with AIDS: Diagnosis by DNA amplification from cerebrospinal fluid. *J Infect Dis*.**166**:1408-1411
28. **Cinque P, Marenzi R, Ceresa D.** (1997). Cytomegalovirus infectious of the nervous system. *Intervirolgy* **40**: 85-97.
29. **Collier AC, Handsfield HH, Ashley R, Roberts PL, DeRouen T and Meyers JD.** (1995). Cervical but not urinary excretion of cytomegalovirus is related to sexual activity and contraceptive practices in sexually active women. *J Inf Dis* **171**: 33-38.
30. **Conboy TJ, Pass RF, Stagno S, Alford CA, Myers GJ, Britt WJ, McCollister FP, Summers MN, McFarland CE and Boll TJ.** (1987). Early clinical manifestations and intellectual outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of Pediatrics* **111** (3): 343-348
31. **Cunningham R, Harris A, Frankton A and Irving W.** (1995). Detection of cytomegalovirus using PCR in serum from renal transplant recipients *Clin Pathol* **48**: 575-577
32. **Davis LE, Tweed GV and Stewart JA.** (1971).Cytomegalovirus mononucleosis in a first trimester pregnant female with transmission to the fetus. *Pediatrics* **48**:200-206.
33. **Davis LE, James CG, Fiber F and McLaren LC.** (1979).Cytomegalovirus isolation from a human inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **88**: 424-426.
34. **Davis GL.** (1969).Cytomegalovirus in the inner ear. Case report and electron microscopic study. *Ann Otol Rhinol Layngol* **78**: 1179-1188. :

35. **Demmler GJ.** (1991). Vaccines for cytomegalovirus. *Semin Pediatr Infect Dis* 2: 186.
36. **Demmler GJ.** (1991). infectious Disease Society for America and Centers for Disease Control. Summary of workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. *Rev Infect Dis* 13:315-329.
37. **Dotz KK, Jacobsen PH, Hofmann B, Meyer C, Kolmos HJ, Skinhoj P, Norrild B and Mathiesen L.** (1997). Development of cytomegalovirus (CMV) disease may be predicted in HIV-infected patients by CMV polymerase chain reaction and the antigenemia test. *AIDS* 11:F21-F28.
38. **Drew WL.** (1992). Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 14:608-615.
39. **Drouet E, Michelson S, Denoyel G and Colimon R.** (1993). Polymerase chain reaction detection of human cytomegalovirus in over 2000 blood specimens correlated with virus isolation and related to urinary virus excretion *J Vir Methods* 45:259-276
40. **Dummer JS, White LT, Ho M, Griffith BP, Hardesty RL, and Bahnson HT.** (1985). Morbidity of cytomegalovirus infection in recipients of heart or heart-lung transplants who received ciclosporine. *J Inf Dis* 152(6): 1182-1191
41. **Dworsky M, Yow M, Stagno S, Pass RF and Alford C.** (1983). Cytomegalovirus infection of Breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics* 72(3): 295-299.
42. **Elek SD and Stern H.** (1974). Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection *in utero*. *Lancet* 1, 1-5.
43. **Fenner F and White DO.** (1973). *Virologia médica*. La prensa medica mexicana.
44. **Fish KN, Soderberg-Naucler C, Mills LK, Stenglein S and Nelson JA.** (1998). Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cell. *J Virol* 72, 5661-5668.
45. **Fischer SH and Masur H.** (1997). Laboratory monitoring of cytomegalovirus disease. is polymerase chain reaction the answer (editorial; comment). *Clin Infect Dis* 24(5) : 841-842.
46. **Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR and Skalka AM.** (2000). *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control.* ASM Press. Washington, D.C.
47. **Fowler.** (1993). Maternal Age and Congenital Cytomegalovirus Infection: Screening of Two Diverse Newborn Population. *J Infected Dis* 1993; **168**: 552-556.
48. **Fowler.** (1997). Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 130: 624-630
49. **Freij.** (1988). Herpesvirus infection in pregnancy : Risk to embryo, fetus, and neonate. *Clin Perinatol* 15:203
50. **Freytmuth F, Gennetay E, Petitjean J, Eugene G, Hurault de Ligny B, Ryckelynck JP, Legoff C, Hazera P and Bazin C.** (1994). Compararison of nested PCR for detection of DNA in plasma with pp65 leukocytic antigenemia procedure for diagnosis of human cytomegalovirus infection *J Clin Microbiol* 32 :1614-1618.
51. **Gabrielli L, Losi L, Varani S, Lazzarotto T, Eusebi V and Landini MP.** (2001). Complete replication of Human Cytomegalovirus in Explants of First Trimester Human Placenta. *J Med Virol* 64 : 499-504.

52. Gallat JE, Moore RD, Richman DD, Keruly J, Chaisson RE and Zidovudine Epidemiology Study Group. (1992). Incidence and natural history of cytomegalovirus disease en patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. *J Infect Dis*.166:1223-1227.
53. Garnett HM. (1982). *J Lab clin Med* 99: 92-97
54. Garza VR, Peniche QE y Gomez OMR. (1996). La importancia clínica del citomegalovirus humano. *Lab Acta*. 8(1): 7-14.
55. Gershon A, Mazon MC, Colimon R and Plotkin S. (1985). Rapid detection of human cytomegalovirus in the urine of humans. *Journal Infect Dis* 152(3):631-633
56. Gold E and Narkervis GA. (1983). Cytomegalovirus (chapter 8) in : *Viral infections of humans. Epidemiology and control*. Plenum medical book company.
57. Griffiths PD, Feinberg JE, Fry J, Sabin L, Ansari A and Emery VC. (1998).The effect of Valaciclovir on cytomegalovirus viremia and viruria detected by Polymerase Chain reaction in patients with advanced Human Immunodeficiency. *J Inf Dis* 177:57-64.
58. Hansen KK, Vestbo J, Benfield T, Lundgren JD and Mathiesen LR. (1997). Rapid detection of citomegalovirus in bronchoalveolar Lavage fluid and serum samples by polimerase chain reaction: Correlation of virus isolation and clinical outcome for patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 24: 878-883
59. Hanshaw JB. (1973). Congenital citomegalovirus infection. *N Engl J Med* 288:1406-1407.
60. Haymaker W, Girdany BR, Stephens J, Little RD and Fetterman GH. (1954).Cerebral involvement with advanced periventricular calcification in generalized cytomegalic inclusion disease in the newborn. *J Neurophatol Exp Neurol* 13: 562-586.*
61. Hebart H, Muller C, Loffler J, Jahn G and Einsele H. (1996). Monitoring of CMV infection: a comparison of PCR from whole blood, plasma-PCR, pp65-antigenemia and virus culture in patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 17:861-868.
62. Hendrix MGR, Daeman M and Bruggerman CA. (1991). Cytomegalovirus nucleic acid distribution within the human vascular tree. *Am J Pathol* 13, 563-567-
63. Ho M. (1982). Pathology of cytomegalovirus infection. In: Greenoug WB III, Merigan TC, Eds. *Cytomegalovirus, biology and infection: current topics in infectious disease*. New York: Plenum Press 1982: 119-129*
64. Horn L-C. (1998). Placental and fetal pathology in intrauterine viral infections. *Intervirolgy* 41: 219-225
65. Ishigaki S, Takeda M, Kura T, Ban N, Sato T, Sakamaki S, Watanabe N, Kogho Y and Nitsu Y. (1991). Cytomegalovirus DNA in the sera of patients with citomegalovirus pneumonia.Br *J Haematol* 79:198-204
66. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (1997). IV Curso teórico-practico de Genética Molecular.
67. Jacobson MA and Mills J. (1988). Serious cytomegalovirus disease in the acquired immunodeficiency sindrome (AIDS): clinical finding, diagnosis and treatment. *Ann Intern Med* 1988: 108: 585-594

68. **Jones RN, Neale ML, Beattie B, Westoreland D and Fox JD.** (2000). Development and Application of PCR-Based Method Including an Internal Control for Diagnosis of Congenital Citomegalovirus Infection. *J Clin Microbiol* **38**(1):1-6.
69. **Jordan MC.** (1983). Latent infection and the elusive citomegalovirus. *Rev Infect* **5**: 205-215.*
70. **Klatt EC and Shibata D.** (1988). Cytomegalovirus infection in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* **112**: 540-544.
71. **Kumar ML, Gold E, Jacobs IB, Ernhart CB and Nankervis GA.** (1984). Primary cytomegalovirus infection in adolescent pregnancy. *Pediatrics* **74**(4): 493-500
72. **Kumar ML.** (1973). Innapparent congenital cytomegalovirus infection a follow up study *N Engl J Med* **288**:1370-1372.
73. **Laifer SA, Ehrlich GD, Huff DS, Balsan MD and Scantlebury VP.** (1995). Congenital cytomegalovirus infection in offspring of liver transplant recipients. *Clin Infect Dis* **20**: 52-55.
74. **Laue T, Mertenskotter, Grewing T, Degen O, van Lunzen J, Dietrich M and Schmitz H.** (1997). Clinical significance of qualitative human citomegalovirus (HCMV) detection in cell-free serum samples in HIV-infected patients at risk for HCMV disease. *AIDS* **11**:1195-1196
75. **Liebert UG.** (1998). Viruses and Pregnancy. *Intervirolgy* **41**: 145-148.
76. **Ljunggren K and Kidd AH.** (1991). Enzymatic amplification and sequence analysis of precore DNA in HbsAg-positive patients. *J Med Virol.* **34**: 179-183
77. **Macasaet FF, Holley KE, Smith TF and Keys TF.** (1975). Cytomegalovirus studies of autopsy tissue. II. Incidence of inclusion bodies and related pathologic data. *Am J Clin Pathol* **63**: 859-865.
78. **Macher.** (1983). Death in the AIDS patients: role of cytomegalovirus. *N. Engl J Med.* **309**:1454.
79. **McCracken GJ Jr, Shinefield HR, Cobb K, Rausen AR, Dishe MR and Eichenwald HF.** (1969). Congenital cytomegalic inclusion disease. A longitudinal study of 20 patients. *Am J Child* **117**: 522-539
80. **McCutchan JA.** (1995). Clinical impact of cytomegalovirus infections of the nervous system in patients with AIDS. *Clin Infect Dis.* **21**:S196-S201.
81. **McDonough S and Spector DH.** (1983). Transcription in human fibroblasts permissively infected by human citomegalovirus strain AD 169. *Virology* **125**: 31-46.
82. **Medearis.** (1964). Observation concerning human cytomegalovirus infection and disease. *Bull Johns Hopkins Hosp.* **114**: 181
83. **Melish.** (1993). Congenital cytomegalovirus infection progress of infants detected by routine screening. *Am J Dis Child.* **126**: 190-194
84. **Michelson S.** (1997). Interaction of human citomegalovirus with monocytes-macrophages: a love-hate relationship. *Path Biol.* **45**: 146-158
85. **Mongomery R, Youngblood L and Medearis DN Jr.** (1972). Recovery of citomegalovirus from the cervix in pregnancy. *Pediatrics.* **49**:525-531.
86. **Monto H.** (1990). Epidemiology of citomegalovirus infections. *Rev Infect Dis* **12**:S701-S710.

87. **Morris.** (1994). Symptomatic congenital cytomegalovirus infection after maternal recurrent infection *pediatr infect Dis J.* **13:**61-64.
88. **Nelson CT, Istas AS, Wilkerson MK and Demmler GJ.** (1995). PCR detection of cytomegalovirus DNA in serum as a diagnostic test for congenital cytomegalovirus infection *J Clin Microbiol.* **33:** 3314-3318
89. **Nelson CT and Demmler GJ.** (1997). Cytomegalovirus infection in the pregnant mother, fetus, and newborn infant. *Infection in perinatology.* **24 (1):**151-160.
90. **Nmumazaki.** (1996). PCR detection of cytomegalovirus DNA in serum as test for congenital cytomegalovirus infection *Journal of Clinical Microbiology.* **34(7):**1871-1872.
91. **Nolte FS, Emmens RK, Thurmond C, Mitchell PS, Pascuzzi C, Devine SM, Saral R and Wingard JR.** (1995). Early detection of human cytomegalovirus viremia in bone marrow transplant recipients by DNA amplification. *J Clin Microbiol* **33:**1263-1266.
92. **Nigro G, Krzysztofciak A, Gattinara, Mango T, Mazzocco M, Porcaro MA, Provvedi S, Booth JC** (1996). Rapid progression of HIV disease in children with cytomegalovirus DNAemia. *AIDS* **10:**1127-1133.
93. **Oram JD, Downing RG, Akrigg A, Dollery AA, Duggleby CJ, Wilkinson GWG and Greenaway PJ.** (1982). Use of recombinant plasmids to investigate the structure of the human cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* **59:** 111-129
94. **Ozono K, Mushiake S, Takeshima T and Nakayama M.** (1997). Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by examination of placenta: application of polymerase chain reaction and *in situ* hybridization. *Pediatr Pathol Lab Med.* **17(2) :** 249-258.
95. **Pass.** (1980). Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of long-term longitudinal follow-up. *Pediatrics.* **66:** 758-762.
96. **Patel R, Smith TF, Espy M, Wiesner RH, Krom RAF, Portela D and Paya CV.** (1994). Detection of cytomegalovirus DNA in sera of liver transplant recipients. *J Clin Microbiol* **32 :**1431-1434.
97. **Patel R, Smith TF, Espy M, Portela D, Wiesner RH, Krom RAF and Paya C.** (1995). A prospective comparison of molecular diagnostic techniques for the early detection of cytomegalovirus in liver transplant recipients. *J Infect Dis* **171 :**1010-1014.
98. **Pertell.** (1992). Risk of developing cytomegalovirus retinitis in persons infected with the human immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr Human Retrovirol.* **5 :**1069-1074.
99. **Peckham.** (1983). Cytomegalovirus infection in pregnancy preliminary findings from a prospective study. *Lancet (June 18) :*1352-1355
100. **Peckham CS.** (1991). Cytomegalovirus infection : Congenital and neonatal disease. *Scand J Infect Suppl.* **78:** 82-81
101. **Quinan GV, Delery M, Rook AH, Frederick WR, Epstein JS, Manischewitz JF, Jackson L Ramsey KM, Mittal K and Plotkin SA.** (1984). Comparative virulence and immunogenicity of the Towne strain and a nonattenuated strain of cytomegalovirus. *Annals of Internal Medicine.* **101,** 478-483.
102. **Rasmussen L, Nelson M, Neff M, Merigan TC Jr.** (1988). Characterization of two different human cytomegalovirus glycoproteins which are targets for virus neutralizing antibody. *Virology* **163:**308-318.

103. **Rasmussen L, Morris S, Hamed K and Merigan TC.** (1995). Human cytomegalovirus DNA is present in CD45⁺ cells in semen from Human immunodeficiency virus-infected patients. *J Inf Dis.* **171**: 432-436.
104. **Reynolds.** (1974). Inapparent congenital cytomegalovirus infection with elevated cord IgM levels: causal relationship with auditory and mental deficiency. *N Engl J Med.* **290**: 291-296.
105. **Robbins SL.** (1974). *Pathologic Basis of Disease.* WB Saunders Company. pp 563-564.
106. **Rubin RH, Russell PS, Levin M and Cohen C.** (1979). Summary of a workshop on cytomegalovirus infections during organ transplantation. *J Infect Dis.* **139**(6) : 728-734
107. **Rutter D, Griffiths P and Trompeter RS.** (1985). Cytomegalovirus inclusion disease after recurrent maternal infection. *Lancet.* **2**:1182
108. **Saigal.** (1982). The Outcome in Children with congenital cytomegalovirus infection: a longitudinal follow-up study. *Am J Dis Child.***136**: 836-
109. **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N** (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* **230** : 1350-1354
110. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Eelich.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
111. **Schwebke K.** (1995). Congenital cytomegalovirus infection as a result of nonprimary cytomegalovirus disease in a mother with acquired immunodeficiency syndrome. *J Pediatr.* **126**:293-295.
112. **Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Cusey DM, Leedom JM and Arnheim N.** (1988). Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis.***158**:1185,1192
113. **Schooley RT.** (1990). Cytomegalovirus in the Setting of Infection with Human Immunodeficiency Virus. *Rev Infect Dis* **12**:811-819.
114. **Schmitz H and Enders G.** (1977). Cytomegalovirus as a frequent cause of Guillain-Barré syndrome. *J Med Virol.***1**: 21-27.
115. **Sierra Gonzalez G y Acosta A.** (2000). Vacunas (capítulo 21) en: *Genética y Biomedicina molecular.* Limusa Noriega Editores/ Instituto Politécnico Nacional.
116. **Smith MG.** (1956). *Proc. Soc. Exp. Biol. And Med.* **92**: 424.
117. **So Y and Olney R.** (1994). Acute lumbosacral polyradiculopathy in immune deficiency syndrome: experience in 23 patients. *Ann Neurol* **35**: 53-58.
118. **South MA and Alford CA Jr.** (1973). *Immunologic disorders in infants and children.* Saunders Company London. pp 565-576.
119. **Spector SA, Merli R, Wolf D and Danker WM.** (1992). Human citomegalovirus is detected by DNA amplification in plasma of AIDS patients during acute visceral disease. *J Clin Microbiol.***30** : 2359-2365.

120. **Stagno S, Reynolds D, Tsiatos A, Fucillo DA, Smith R, Tiller M and Alford CA Jr** (1975). Cervical cytomegalovirus Excretion in pregnant and nonpregnant women: suppression in Early Gestation. *J infect dis.* **131**(5): 522-527
121. **Stagno S, Reynolds DW, Huang E-S, Thames SD, Smith RJ and Alford CA Jr.** (1977). Congenital cytomegalovirus infection: Occurrence in an immune population. *N Engl J Med* **296** (22):1254-1258.
122. **Stagno.** (1982). Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. *Clin. Obstet Gynecol.* **25**:563-576.
123. **Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, et al.** (1982). Congenital cytomegalovirus infection : The relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N Engl J Med* **306** : 945.
124. **Stagno.** (1983). Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Semin perinatal.* **7**: 31-42.
125. **Stagno S, Tinker MK, Elrod C, Fucillo DA, Cloud G and O'Beirne AJ.** (1985). Immunoglobulin M antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay in the diagnosis of cytomegalovirus infections in pregnant women and newborn infants. *J Clin Microbiol* **21**: 930-935
126. **Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, Veren DA, Page F and Alford CA.** (1986). Primary cytomegalovirus Infection in Pregnancy. Incidence, Transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA.* **256**(14): 1904-1908.
127. **Sweet C.** (1999). The pathogenicity of cytomegalovirus
128. **Trang J, Kidd L, Gruber W, et al.** (1993). Linear single-dose pharmacokinetics of ganciclovir in newborn with congenital cytomegalovirus infections. *Clin Pharmacol Ther.* **53**:15.
129. **Tsai C-H, Tsai F-J, Shih Y-T, Wu S-F, Liu, S-C and Tseng Y-H.** (1996). Detection of congenital cytomegalovirus infection in Chinese newborn infants using polymerase chain reaction. *Acta Paediatr.* **85**: 1241-1243
130. **Vosverg HP.** (1989). The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. *Hum Genet* **83**:1-15
131. **Wathen MW and Stinski MF.** (1982). *J Virol.* **41**: 462-477.
132. **Weller TH.** (1971). The cytomegalovirus: ubiquitous agents with protean clinical manifestations (Two parts) *N Engl J Med*; **285**: 203-214, 267-274
133. **Weller TH and Hanshaw JB.** (1962). Virologic and clinical observations on cytomegalic inclusion disease. *N Engl J Med* **114**: 181-211
134. **Whitley.** (1997). *J Infect Dis* **175** : 1080-1086.
135. **William T, Cuevas LE, Williams H and Bacran A.** (2000). Comparison of two commercial methods for measurement of cytomegalovirus load in blood samples after renal transplantation. *J Clin Microbiol* **38**(3): 1209-1213.
136. **Williamson WD, Percy AK and Yow MD.** (1990). Asymptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection. *AJDC.* **144**: 1365-1368
137. **Williamson.** (1992). Progressive hearing loss in infants with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics.* **90**: 862-86

138. **Winston DJ, Ho WG, Lin CH, Bartoni K, Budinger MD, Gale RP and Champlin RE.** (1987). Intravenous immune globulin for prevention of cytomegalovirus infection and interstitial pneumonia after bone marrow transplantation. *Ann Intern Med.* 106: 12-18.
139. **Wolf DG and Spector SA.** (1993). Early diagnosis of human cytomegalovirus disease in transplant recipients by DNA amplification in plasma. *Transplantation* 56: 330-334.
140. **Zipeto D, Baldanti F, Zella D, Furione M, Cavicchini A, Milanesi G and Gerna G.** (1993). Quantification of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood polymorphonuclear leukocytes of immunocompromised patients by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 44:45-56.

Apéndice A : Preparación de reactivos.

1. Agua tratada con 0.1% DEPC

Dietil pirocarbonato (DEPC)	2 mL
Agua destilada c.b.p.	2 L

Agitar durante 18 horas y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 libras y una temperatura de 115 °C. Posteriormente se enfría la solución y se filtra con 0.22 μ m. Dividir en alícuotas de trabajo y conservar a - 10°C.

2. Amortiguador de corrimiento 5X

Tris-HCl (pH 7.6)	0.788 g
EDTA (pH 8.0)	0.605 g
Azul de bromofenol	0.1 g
SDS (dodecil sulfato de sodio)	0.5 g
Sacarosa	40 g
Agua tratada con DEPC c.b.p.	100 mL

3. Amortiguador 10X con Mg (15 mM) para PCR.

Tris-HCl 1M (pH 8.3)	50 mL.
KCl 4M	17.5mL.
MgCl ₂ 1M	5.0 mL.
DTT 1M.	10.0 mL.
Agua esterilizada destilada	17.5 mL.

Hacer soluciones de trabajo de 150 μ L y conservar a -20° C.

4. Acetato de sodio 3M

Disolver 102 g de acetato de sodio 3H₂O en 200 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 5.2 con ácido acético y aforar a 250 mL. Esterilizar por autoclave

5. Bromuro de etidio (10 mg/mL)

Bromuro de etidio	1 g
Agua destilada c.b.p.	100 mL

Este reactivo es mutagénico, por lo que se deberán utilizar guantes y cubrebocas durante su manipulación. El reactivo deberá ser protegido de los rayos del sol con papel aluminio. Almacenar a temperatura ambiente.

6. Cloruro de magnesio 100 mM

Cloruro de Magnesio 1M	1mL
Agua tratada con 1% DEPC	9 mL

Después de preparar el reactivo, se dividirá en varias alícuotas y se conservará a -20°C .

7. dNTP's (concentración 2500 μM de cada uno)

dCTP(25 mM)	100 μL
dTTP(25 mM)	100 μL
dATP(25 mM)	100 μL
dGTP(25 mM)	100 μL
Agua tratada con DEPC	600 μL

Los dNTP_s que se utilizaron tienen una concentración de 25 mM cada uno, por lo que se tomaron 100 μL y se agregaron 600 μL de agua libre de DNasas y RNasas para obtener un volumen final de 1 mL. De esta mezcla se tomaron 5 μL para la mezcla de reacción de la PCR, quedando a una concentración final de 250 μM .

8. Fenol saturado equilibrado

Fenol bidestilado (Boehringer)	500 mL
Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0	500 mL
Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0	500 mL

Calentar 500 g de fenol bidestilado (grado biología molecular), en baño María a 68°C durante 90 minutos (hasta que se disuelva). Posteriormente agregar un volumen igual de Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 a temperatura ambiente. Agitando con una barra magnética durante 15 minutos y permitir que se separen dos fases; realizar un segundo lavado con Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 y descartar la fase superior (acuosa) del primer y segundo lavado. A la fase inferior (fenólica) se le agrega un volumen igual de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0 y se agita con una barra magnética durante 15 minutos y se descarta la fase acuosa. Medir el pH con papel tornasol que el pH de la fase fenólica sea de 7.8. A partir del tercer paso de este procedimiento, se realizaron en una campana de flujo laminar

9. Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamilico (25:24:1)

Fenol saturado equilibrado	48 mL
Cloroformo	46 mL
Alcohol isoamilico	2 mL

Medir y mezclar los reactivos en una campana de extracción, posteriormente dividir en frascos ámbar; conservando a una temperatura de 4°C.

10. Medio de crecimiento celular.

Suero Fetal de Ternera	10 mL
Bicarbonato de sodio 4.4%	2.5 mL (0.11%)
Antibióticos	1 mL
Medio mínimo esencial de Eagle	c.b.p. 100 mL

Preparar esta mezcla, en condiciones de esterilidad

11. Medio de mantenimiento

Suero Fetal de Ternera	2 mL
Bicarbonato de sodio 4.4%	5 mL (0.22%)
Antibióticos	1 mL
Medio mínimo esencial de Eagle	c.b.p. 100 mL

Preparar esta mezcla en condiciones de esterilidad.

12. Proteínasa K

Proteínasa K	300 mg
Agua bidestilada estéril	300 mL

Pesar 300 mg de proteínasa K y aforar a 300 mL. Dividir en alícuotas de 50 mL y conservar a -20°C

13. TBE 10 X (para electroforesis)

Trisma- base	108 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA	6.8 g
Agua destilada c.b.p.	1L

Disolver 108 g de Trizma- base y 27.5 g de ácido bórico, posteriormente añadir 6.8 g de EDTA y aforar a 1L con agua destilada. Esterilizar con una unidad de filtro y conservar a -10°C .

14. TBE 1 X

TBE 10 X	200 mL
Agua desionizada	1800 mL

Se diluye un volumen de la solución TBE 10 X en nueve de Agua desionizada. Almacenar en un lugar fresco y seco.

15. TE

Agua bidestilada	900 mL
Tris base	1.21 g
EDTA (sal disódica)	0.372 g

Ajustar a un pH de 7.4, aforar a un litro y esterilizar con filtro de membrana al vacío. Dividir en varias alícuotas y conservar a temperatura ambiente.

Apéndice B : Abreviaturas.

Ad-169	Cepa tipo de citomegalovirus humano.
ATCC	American Type Culture Collection.
CITV	Comité Internacional de Taxonomía de los virus.
CID	Cytomegalic inclusion disease.
Da	Dalton.
DEPC	Dietil pirocarbonato.
dveu	Días de vida extrauterina.
ECP	Efecto citopático.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ELISA	Inmunoensayo enzimático.
HCMV	Citomegalovirus humano.
IE	Gen inmediatamente temprano.
ICA	Infección congénita asintomática.
ICS	Infección congénita sintomática.
InDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.
KDa	Kilodaltones.
LA	Gen tardío.
MRC-5	Fibroblastos diploides de pulmón fetal humano.
Kb	Kilopares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PK	Proteinasa K.

Apéndice C : Glosario de términos médicos (Diccionario terminológico de ciencias medicas,1996)

Anemia hemolítica. La causada por excesiva destrucción eritrocitaria. Según su etiopatogenia se distinguen las anemias hemolíticas heredoconstitucionales hemoglobinoeritropáticas, como la anemia drepanocítica, las talasemias, las anemias por hemoglobinas inestables (caracterizadas por la aparición de los cuerpos de Heinz), las hemoglobinopatías con afinidad alterada por el O₂, la anemia eliptocitaria y la anemia esférica, las anemias hemolíticas adquiridas, de origen inmunológico, por iso y autoanticuerpos, de origen tóxico, bacteriano, por agentes físicos ó cardioangiopático (por rugosidad de las paredes vasculares), y las anemias hemolíticas de mecanismo complejo ú obscuro, como el Síndrome de Marchiafava-Micheli y el de Zieve.

Adenomegalia. Hipertrofia de una glándula ó ganglio.

Coriorretinitis. Inflamación simultánea de la coroides y la retina.

Enfermedad de las inclusiones citomegálicas. Afección causada por citomegalovirus de la familia Herpesviridae, que aparece principalmente en recién nacido; en esta enfermedad se encuentran células gigantes multinucleares características, con cuerpos de inclusión protoplásmica y nuclear, en el hígado, pulmón y cerebro. La enfermedad es muy grave y cursa con esplenomegalia y hepatoesplenomegalia.

Hepatomegalia. Aumento de volumen del hígado, que lo hace palpable por debajo del borde costal derecho.

Hernia inguinal oblicua o hernia congénita. Localizada detrás de la prolongación funicular del peritoneo.

Hidrocefalia obstructiva. Hidrocefalia causada por un bloqueo en cualquier nivel del sistema de circulación del líquido cefalorraquídeo.

Leucopenia. Reducción del numero de leucocitos en la sangre por debajo de 5000, puede ser basófila ó maligna.

Microcefalia. Pequeñez anormal de la cabeza generalmente asociada con retardo mental.

Mononucleosis infecciosa. Presencia de gran número de leucocitos mononucleares en la sangre, asociada a faringitis, fiebre o adenopatías.

Neumonía intersticial. Cirrosis del pulmón; tisis fibroide.

Placentitis. *Inflamación de la placenta.*

Prematuro. *Niño nacido antes de que haya cumplido la 38ª semana de gestación*

Púrpura trombocitopénica. *Púrpura muy grave con hemorragias diversas, trastornos neurológicos, insuficiencia hepática y sepsis en los cuadros terminales. Se desconoce su causa. Existen anemia hemolítica y formación de microtrombos en los vasos pequeños. Sinónimo de Síndrome de Moschcowitz.*

Retinitis. *Inflamación aguda ó crónica de la retina.*