



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**CARGA VIRAL DE CITOMEGALOVIRUS EN LECHE
MATERNA DURANTE EL PRIMER MES DE LACTACIÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

PEDIATRÍA

P R E S E N T A:

DRA. MARÍA FERNANDA HIDALGO MARTÍNEZ



**DIRECTOR DE TESIS
DRA. DINA VILLANUEVA GARCÍA.
DR. JOSÉ ARELLANO GALINDO.**

**ASESOR METODOLÓGICO
M. EN C. RODOLFO RIVAS RUÍZ**

CIUDAD DE MÉXICO FEBRERO 2017



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.

DRA. REBECA GÓMEZ CHICO VELASCO
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO

DIRECTOR DE TESIS

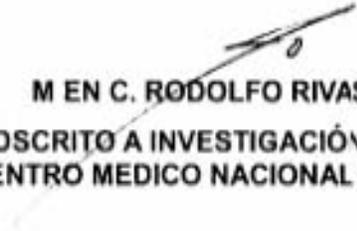


Dra. DINA VILLANUEVA GARCÍA
JEFA DE SERVICIO. DEPARTAMENTO DE NEONATOLOGÍA

TUTORES:



Dr. JOSÉ ARELLANO GALINDO
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS D
LABORATORIO DE VIROLOGÍA DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA



M EN C. RODOLFO RIVAS RUÍZ
ADSCRITO A INVESTIGACIÓN CLÍNICA.
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

INDICE

TITULO	5
ANTECEDENTES	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
PREGUNTA DE INVESTIGACION	12
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y MÉTODOS	13
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	16
CRITERIOS DE SELECCIÓN	17
DESCRIPCIÓN DE VARIABLES	18
RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIÓN	25
LIMITACIONES DE ESTUDIO	26

TITULO

TRANSMISIÓN DE CARGA VIRAL DE CITOMEGALOVIRUS EN LECHE MATERNA DURANTE EL PRIMER MES DE LACTACIÓN.

RESUMEN

OBJETIVO Conocer la carga viral presente en leche de madres de recién nacidos hospitalizados en una unidad de cuidados intensivos neonatales. Analizar las características clínicas de los recién nacidos hijos de madres con carga viral leche materna.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Durante la lactancia, el niño puede ser infectado por patógenos procedentes de la madre mediante diversos mecanismos de transmisión incluyendo la leche materna. La excreción del virus inicia en la primera semana después del parto con una baja carga viral que se va incrementando hasta alcanzar el máximo sobre las 4-8 semanas posterior al nacimiento y desciende hasta desaparecer en la semana 9-12 postparto. La transmisión del citomegalovirus madre-hijo suele coincidir con el máximo de virolactia.¹¹ La virolactia al primer mes es frecuente en madres mexicanas (60% en estudio preliminar) con alto índice de seropositividad. Sin embargo, es menor que en EE.UU. (58%) y Europa (40-97%).¹ Lo que sugiere que, a pesar de que la transferencia vertical de infección por CMV en México es elevada (60% en estudio preliminar), durante la lactación también existe una transferencia pasiva de anticuerpos que al parecer están protegiendo al RN contra genotipos específicos, a los cuales la madre ya fue previamente infectada.

METODOLOGÍA Estudio observacional, transversal, descriptivo y analítico.

Población de estudio: Previo consentimiento informado, se estudiará leche de madres de pacientes recién nacidos hospitalizados en la unidad de cuidados

intensivos neonatal del Hospital Infantil de México Federico Gómez y en el Hospital de la Mujer.

Procedimiento: Se analizaron 58 muestras de leche materna, 51 de saliva y 51 de sangre de talón de recién nacidos, obtenidas durante las 3 primeras semanas de vida, sin antecedente de transfusión de hemoderivados para buscar la asociación entre carga viral y síntomas sugestivos de infección por citomegalovirus. Se realizó extracción de DNA por el método fenol cloroformo y PCR en Tiempo Real, en la cual se preparó una curva de límite de detección con DNA cuantificado a diferentes concentraciones, se emplearon los puntos equivalentes a 10 copias, 1000 copias y 10000 copias.

PLAN DE ANÁLISIS. Se realizó un análisis univariado para las características demográficas. Se estableció como la prevalencia de la enfermedad en las madres como número y porcentaje, lo mismo se realizó con las muestras de saliva y sangre en los RN. Para la evaluación de la carga viral se realizó una prueba de X², cálculo de razón de momios (OR) e intervalo de confianza del 95% (IC 95%) con el fin de evaluar la asociación entre la carga viral en leche materna y la carga viral en orina y saliva de los recién nacidos.

Se analizaron también la asociación entre la infección materna por CMV y las características del nacimiento de los RN, usando OR e IC95% para las variables cualitativas y U de Mann-Whitney para las variables cuantitativas. Se usó el software SPSS versión 21.

RESULTADOS

Se tomaron 180 muestras de leche materna (LM) de mujeres en periodo de puerperio, 180 muestras de saliva y 180 de sangre de los recién nacidos hijos de las madres seleccionadas. Se eliminaron 120 muestras de LM y 120 de saliva y sangre de los recién nacidos por lo que la población final de estudio fue de 58 muestras de LM y 51 recién nacidos con 51 muestras de sangre y de saliva. Los recién nacidos con carga viral en saliva con madre virolactia positiva fueron 32

(63%) con una $p = 0.28$ OR 1.51 IC 95% (0.7, 3.22) y de los pacientes con carga viral en sangre con virolactia positiva fueron 43 (84%) con una $p = 0.41$ OR 1.37 IC 95% (0.64, 2.93). Ninguno de los casos fue significativo. De las muestras de LM, saliva y sangre para carga viral de CMV 100 (80.6%), la mayor detección de CMV por medio de carga viral en madres con virolactia positiva fue de 20 (44.4%) en saliva y en sangre. La microcefalia se encontró en 2 (5.4%) de neonatos con carga viral en sangre $p=0.08$, y 2 (5.4%) en saliva $p=0.08$, ambos no significativos.

DISCUSIÓN

La incidencia de carga viral en leche materna de nuestro estudio fue de 74.5%. Se sabe que la incidencia de infección postnatal oscila entre un 10-60% en los primeros 6 meses de vida, presente en países industrializados de 60 y 80% a diferencia de países no industrializados que es entre el 80 y 100%.⁸

CONCLUSIONES

La lactancia materna tiene un alto impacto sobre la inmunidad del neonato, lo que ayuda a que la replicación viral se limite. Nuestros resultados apoyan la continuidad de la lactancia materna en pacientes con madres que tengan una reactivación del virus en glándula mamaria y en aquellos en los que adquirieron infección viral durante la gestación.

INTRODUCCIÓN

El citomegalovirus humano es el agente viral más frecuentemente asociado con infecciones congénitas.² La incidencia de infección congénita por citomegalovirus fluctúa entre 0.2% a 2.5% en los recién nacidos vivos tanto pretérmino como de término.³ La mayoría de los recién nacidos portadores de infección congénita por CMV son asintomáticos, sin embargo del 13% al 15% de ellos se encuentran en riesgo de desarrollar sordera progresiva y secuelas neurológicas.⁴ La alimentación con leche materna es la vía de transmisión de citomegalovirus más frecuente, entre 5% hasta 50%.⁵

Dado que la incidencia de la infección por CMV y su importancia como causa de daño neurosensorial se busca constantemente un método de detección de infección. Los beneficios potenciales del tamizaje neonatal son el tratamiento para prevenir el establecimiento y la progresión de la hipoacusia neurosensorial, así como la identificación de niños en riesgo de un desarrollar secuelas tardías.⁶

MARCO TEÓRICO

El CMV es miembro de la familia Herpesviridae, Se trata de un virus desoxirribonucleico de doble cadena, con cápside icosaédrica envuelta en una membrana lipídica de origen celular en la que se insertan varios complejos glucoproteicos como gB, gN y gO. Dichas glicoproteínas cumplen funciones en el ataque y reconocimiento durante la infección a la célula huésped. El blanco de las infecciones por CMV son las células epiteliales, endoteliales y fibroblastos.⁷ El citomegalovirus tiene en común con el resto de la familia herpesviridae la capacidad para mantenerse latente y reactivarse. Se replica lentamente y tarda 24 horas en producir nuevos virus en la célula infectada y varios días y hasta semanas en producir efecto citopático visible en las líneas celulares en el laboratorio.⁸

La primera descripción del citomegalovirus fue realizada en 1904, sin embargo fue aislado hasta 1957 por Craig et al. En 1960, Weller y cols estableció el nombre de citomegalovirus, describiendo la apariencia de la célula infectada, como citomegalia.⁹

El citomegalovirus puede ser transmitido *in utero* como resultado de una infección materna primaria o recurrente, de reinfección por una nueva cadena de CMV o bien por reactivación del virus latente. También puede ser adquirido vía perinatal por exposición a secreciones genitales maternas durante el parto, o postnatal por transfusiones sanguíneas o leche materna infectada.^{10,11} Las mujeres seropositivas para anticuerpos anti IgG de citomegalovirus presentan reactivación viral en las glándulas mamarias durante la lactancia, excretando el virus por la leche sin presentar signos de infección sistémica, sin embargo, el mecanismo es aún desconocido.⁷

El citomegalovirus es una causa común y bien reconocida a nivel mundial de discapacidad en nacidos con infección congénita.¹² Alrededor del 90% de los recién nacidos infectados perinatalmente son asintomáticos. La infección perinatal o postnatal se asocia en pocas ocasiones a enfermedad sintomática en el recién nacido a término y con peso adecuado para la edad de gestación, debido a que resulta de una reactivación materna, y cuenta con anticuerpos adquiridos pasivamente.¹³

Aproximadamente 10-15% de recién nacidos infectados son sintomáticos al nacimiento, y tienen mortalidad cercana a 10%, con supervivencia de 70-80% con secuelas neurológicas mayores. Dichas secuelas abarcan desde hipoacusia neurosensorial unilateral hasta microcefalia, parálisis cerebral, alteraciones visuales y retraso mental.¹⁴ Sin embargo, la mayoría de los recién nacidos pretérmino sintomáticos con infección por CMV presentan un síndrome parecido a sepsis, incluyendo palidez, deterioro ventilatorio, hepatitis, encefalitis,

hepatoesplenomegalia y alteraciones hematológicas, como trombocitopenia, neutropenia y linfocitosis con células atípicas.¹⁵

Los factores de riesgo identificado para la transmisión postnatal de citomegalovirus incluyen la carga viral en leche materna, la excreción temprana de DNA viral, la duración de la lactancia materna, prematuridad y peso bajo para la edad de gestación.¹⁶

A pesar de las secuelas no existe aún un método universal de detección de la infección por citomegalovirus en madres ni en recién nacidos. Las mujeres embarazadas pueden ser diagnosticadas por seroconversión de IgG negativa a IgG positiva. La infección en el feto se puede detectar por cultivo viral positivo o por reacción en cadena de polimerasa de líquido amniótico. En cambio, en el recién nacido se realiza la detección en fluidos corporales por PCR, cultivo viral o antígeno pp65 durante las primeras 3 semanas de vida.¹⁷

Desde hace aproximadamente 20 años se han realizado estudios para determinar cuál es el mejor método para eliminar la carga viral en leche materna, sin alterar la bioquímica de la misma, preservando sus características nutrimentales e inmunológicas.¹⁸ Aunque se sabe que la pasteurización convencional es efectiva en limitar la transmisión de CMV por leche materna, dicha manipulación puede afectar de forma grave la calidad de la leche y limitar sus beneficios. La refrigeración a -20° C por varios días ha demostrado reducir o destruir la infectividad viral *in vitro*, pudiendo preservar sus propiedades.¹⁹ Sin embargo, el paso inicial para ello es determinar la carga viral no solo en la leche materna, sino también en suero y orina de la madre.

ANTECEDENTES

El citomegalovirus, es un miembro de la familia *Herpesviridae*, cosmopolita y la seropositividad en población mexicana llega a ser hasta el 100% en algunas

poblaciones. En edad reproductiva más del 90% está relacionado con infección congénita (IC) e infección perinatal (IP). Es fácilmente adquirible mediante transmisión vertical (leche materna).

La prevalencia de la virolactia, que se define como la presencia del virus en la leche materna, es del 27% durante los tres primeros meses posteriores al parto. La tasa de transmisión en recién nacidos prematuros expuestos a leche materna positiva a CMV es entre 5%-50%.²⁰

Alrededor del 96% de las madres seropositivas para CMV tienen reactivación del virus durante la lactancia y su eliminación a través de la leche materna; la transmisión es de alrededor de 38% y el 18% de los niños expuestos pueden infectarse.

Se han publicado estudios de detección molecular basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que sugieren que la reactivación del virus se produce a nivel local en la glándula mamaria de madres seropositivas.²¹ La transmisión del virus mediante la lactancia materna en recién nacidos a término suele ser asintomática y presenta un baja morbilidad, caso contrario de los recién nacidos pretérmino y de bajo peso, donde los rangos de porcentaje de infección y enfermedad son variables. El diagnóstico clásico de la infección congénita por CMV se basa en el aislamiento del virus en saliva y orina del recién nacido durante las primeras 3 semanas de vida extrauterina.²²

El diagnóstico de la infección por CMV en el recién nacido, se establece mediante la detección del virus en orina, en cultivo y por PCR, este último es el método diagnóstico más utilizado por su rapidez (24-48h), con una sensibilidad de 94.5% y especificidad de 99%. La PCR para CMV en saliva y en muestras de sangre seca (tamiz neonatal) con sensibilidad del 99% y una especificidad del 100%, por lo que deben considerarse para el diagnóstico de infección en el recién nacido.²³

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la lactancia, el niño puede ser infectado por patógenos procedentes de la madre mediante diversos mecanismos de transmisión incluyendo la leche materna. Se han identificado diferentes tipos de microorganismos en el calostro y en la leche materna, aunque sólo en algunos casos se ha considerado clínicamente significativo. ¹⁹

La excreción del virus inicia en la primera semana después del parto con una baja carga viral que se va incrementando hasta alcanzar el máximo sobre las 4-8 semanas posterior al nacimiento y desciende hasta desaparecer en la semana 9-12 postparto. La transmisión del citomegalovirus madre-hijo suele coincidir con el máximo de virolactia. ¹¹

La virolactia al primer mes es frecuente en madres mexicanas (60% en estudio preliminar) con alto índice de seropositividad. Sin embargo, es menor que en EE.UU. (58%) y Europa (40-97%). ²⁴ Lo que sugiere que, a pesar de que la transferencia vertical de infección por CMV en México es elevada (60% en estudio preliminar), durante la lactación también existe una transferencia pasiva de anticuerpos que al parecer están protegiendo al RN contra genotipos específicos, a los cuales la madre ya fue previamente infectada.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuáles son las características clínicas de pacientes con carga viral positiva de citomegalovirus transmitido por leche materna?

OBJETIVOS

General: Conocer la carga viral presente en leche de madres de recién nacidos hospitalizados en una unidad de cuidados intensivos neonatales.

Particular: Analizar las características clínicas de los recién nacidos hijos de madres con carga viral en leche materna.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Estudio prospectivo, que implicó la toma de muestras de sangre extraída mediante punción venosa y de leche obtenida mediante colección por la madre, así como toma de muestra de sangre por punción del talón de su hijo (a) y toma de muestra de saliva con hisopo, por lo que se trata de un estudio con riesgo mínimo. Las muestras se tomaron bajo consentimiento informado de la madre del paciente de acuerdo a los lineamientos internacionales de los postulados de Helsinki, siguiendo la Ley General de Salud en materia de investigación. Se respetó la decisión del paciente o familiar que no desearon participar en el estudio, se le informó que su decisión de no participar no afectaría su atención médica en el Hospital de atención y que en caso de publicación, se mantendría de forma confidencial sus datos personales y de su hijo (a). Se les dio información suficiente sobre los investigadores de este proyecto para comunicarse con ellos en caso de alguna pregunta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio:

Estudio prospectivo, descriptivo y analítico.

Población de estudio: Previo consentimiento informado, se estudió leche de madres de pacientes recién nacidos hospitalizados en la unidad de cuidados

intensivos neonatal del Hospital Infantil de México Federico Gómez y en el área de hospitalización de neonatología del Hospital de la Mujer.

Procedimiento:

Se obtuvo DNA de 180 muestras de leche materna, sangre absorbida en papel filtro y saliva de neonatos que resultaron positivas a la región IE4 de CMV por PCR anidada; cuantificación de DNA viral mediante PCR en tiempo real utilizando el método SYBR® Green Tipo I.

Protocolo

Se utilizó el equipo Tiempo Real SmartCycler®, con guantes de látex estériles, micropipetas calibradas de 10mcl, 100mcl y 200mcl, con puntas nuevas y estériles de 10 y 100mcl; tubos SmartCycler® de 25mcl, gradilla para tubos Smartcycler®.

Los reactivos utilizados fueron SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems) lote: 0605229 y lote: 1505002, agua inyectable libre de pirógenos, oligonucleótidos para la región: 5'->3': ACTGGAACTTTACTCGCAGAAAGA; 5'->3': CTCCACGTA CTTTACCCGCTG, muestras de DNA de leche materna, sangre y saliva de neonatos, DNA de citomegalovirus AD169 como control positivo.

Métodos

Extracción de DNA por el método fenol cloroformo. Se separó la muestra en alícuotas de 500mcl por tubo, en los que se agregaron 200mcl de buffer de lisis y 200mcl de proteinasa K, incubando toda la noche en agitación a 90rpm a 56° C. A esta muestra se adicionó 1 ml de solución fenol- cloroformo, posteriormente se centrifuga a 13000rpm durante 10 minutos. Se obtiene fase orgánica y se adicionan 700mcl de etanol absoluto y 70mcl de acetato de sodio y se conserva la muestra a -20° C toda la noche. Después se centrifuga la muestra a 13000rpm de 2-4°C durante 30 minutos; se decanta y resuspende el botón en 1ml de etanol al 70%, nuevamente se centrifuga a 13000rp, durante 10 minutos, se decanta y se deja secar 40 minutos a 40° C.

PCR en Tiempo Real: se prepara una curva de límite de detección con DNA cuantificado a diferentes concentraciones, se emplearon los puntos equivalentes a 10 copias, 1000 copias y 10000 copias. Las reacciones de amplificación se realizaron con base en la tabla siguiente:

Tabla 1. Mezcla de reacción para el ensayo de amplificación para la cuantificación de DNA en las muestras clínicas.

Reactivos	Volumen para una reacción
SYBR® GREEN (2X)	25mcL
Iniciador sentido (10pmol)	2.5mcL
Iniciador antisentido (10pmol)	2.5mcL
Agua libre de pirógenos	15mcL
DNA molde	5mcL
Volumen total	50mcL

Todos los reactivos deben mantenerse en refrigeración, ser descongelados y homogenizados antes de su uso, así como mantenerlos cubiertos evitando la luz directa. Las muestras de DNA a procesar se mantienen en hielo hasta ser colocadas en la reacción a procesar. Una vez colocada la mezcla de reacción en los tubos SmartCycler® se centrifugaron para llevar el contenido al fondo del tubo y eliminar burbujas que puedan interferir con la lectura. Se preparó el equipo y programación de las condiciones de amplificación de acuerdo a la tabla 2.

Tabla 2. Descripción del programa de amplificación.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95°C	10 minutos	1
2	95°C	30 segundos	45
	65°C	30 segundos	
	72°C	30 segundos	
3	72°C	10 minutos	1

Al obtener los datos se exportan a una hoja de cálculo, donde se realizaron los cálculos de forma manual utilizando una regresión logarítmica de los puntos obtenidos en el límite de detección. Se estableció en el gráfico el número de copias como variable independiente y el valor umbral o CT como variable dependiente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó estadística descriptiva usando medidas de tendencia central y dispersión correspondientes al tipo de distribución de la muestra.

El análisis univariado se realizó con el cálculo de razón de momios (OR) para asociar las variables clínicas de complicaciones y alteraciones neurológicas de los recién nacidos con la presencia de infección en la leche materna. En todos los caso se calculó el IC 95%.

Se realizó el análisis con el programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 21.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión

- Madres con serología positiva que aceptaron previo consentimiento informado donar leche.
- Neonatos hospitalizados hijos de madres con serología positiva para CMV y que las madres dieron consentimiento de toma y análisis de muestras de sangre de talón y saliva.

Criterios de exclusión

- Madres con diagnóstico conocido de virus de inmunodeficiencia humana (por seguridad biológica en el manejo de las muestras).
- Muestras incompletas.
- Fallecimiento de la madre o del recién nacidos antes de la toma de muestra.
- Alta de las madres y recién nacidos antes de la toma de muestra.

Criterios de eliminación

- No requirió por ser un estudio transversal.

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	UNIDADES DE MEDICIÓN
Carga viral en leche materna	Presencia de copias virales en leche materna	Obtenida de leche materna por personal de laboratorio	Cualitativa Nominal	Positivo Negativo
Carga viral en saliva de RN	Presencia de copias virales en saliva de recién nacido	Obtenida de leche materna por personal de laboratorio	Cualitativa Nominal	Positivo Negativo
Carga viral en sangre de RN	Presencia de copias virales en sangre de recién nacido	Obtenida de leche materna por personal de laboratorio	Cualitativa Nominal	Positivo Negativo
INDEPENDIENTES				
Edad materna	Años al momento del nacimiento	Clasificación de acuerdo al riesgo de mortalidad en embarazo	Cuantitativa Ordinal	< 20 años 21-35 años >35 años
Estado civil	Estado conyugal en que se encuentra la madre	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente	Cualitativa Nominal	Soltera Unión libre Casada Viuda
Escolaridad	Nivel educativo de acuerdo a lo establecido en el país	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente	Cualitativa Ordinal	Primaria Secundaria Bachillerato Licenciatura
Nivel socioeconómico	Número que indica la posición económica de los padres	Se obtuvo de estudio socioeconómico de trabajo social en expediente clínico	Cualitativa Ordinal	Nivel 1 Nivel 2 Nivel 3
Control prenatal	Número de consultas de control prenatal ideal	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente clínico	Cualitativa Ordinal	< 5 > 5
Número de embarazo	Número de embarazos que ha tenido la madre	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente clínico	Cuantitativa Ordinal	1 >1
Abortos	Antecedente previo de aborto	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente clínico	Cuantitativa Ordinal	Sí No
Óbitos	Antecedente previo de óbito	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente clínico	Cuantitativa Ordinal	Sí No
Complicaciones durante el embarazo	Complicaciones potencialmente relacionadas con infección durante el embarazo.	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente clínico	Cualitativa Nominal	Presente Ausente AA AP CV
Peso del recién	Gramos al	Se obtuvo de la	Cuantitativa	PEBEG

nacido	nacimiento del recién nacido	nota de ingreso en expediente clínico	Ordinal	PMBEG PBEG PAEG PGE
SDG por FUM	Semana de acuerdo a fecha de última menstruación	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente clínico	Cualitativa Ordinal	< 28 SEG 28.1-34 SEG 34.1-36.6 SEG 37-41.6 SEG > 41 SEG
Días de estancia intrahospitalaria	Tiempo de hospitalización	Se obtuvo de la nota de egreso en expediente clínico	Cualitativa Ordinal	Días
Vía de nacimiento	Modo de nacimiento	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente clínico	Cuantitativa Nominal	Vaginal Abdominal
Ruptura prematura de membranas	Ruptura de amnios antes del trabajo de parto (>18 hrs)	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente clínico	Cualitativa Nominal	Sí No
Sexo	Genitales fenotípicamente	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente clínico	Cualitativa Nominal	Femenino Masculino
APGAR	Calificación ideal a los 5 minutos	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente clínico	Cuantitativa Ordinal	>7 <7
Microcefalia	Perímetro cefálico menor a la percentil 5	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente clínico, percentilando el perímetro cefálico	Cualitativa Dicotómica	Sí No
Ictericia	Presencia clínica de tinte icterico	Se obtuvo de las notas de evolución en expediente clínico	Cualitativa Dicotómica	Sí No
Hiperbilirrubinemia	Nivel de bilirrubinas que ameritaron algún tipo de tratamiento	Se obtuvo de las notas de evolución en expediente clínico	Cualitativa Dicotómica	Sí No
Hepatomegalia	Hígado palpable mayor a 2cm por debajo del borde costal	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente clínico	Cualitativa Dicotómica	Sí No
Esplenomegalia	Bazo palpable	Se obtuvo de la nota de ingreso en expediente clínico	Cualitativa Dicotómica	Sí No
Sepsis	Reportado con manejo antibiótico completo	Se obtuvo de las notas de ingreso y evolución en expediente clínico	Cualitativa Dicotómica	Sí No
Patología respiratoria	Alteración en la ventilación que requirió oxígeno suplementario,	Se obtuvo de las notas de ingreso y evolución en expediente clínico	Cualitativa Dicotómica	Sí No

	surfactante o antimicrobiano			
Ventrículomegalia	Ventrículos cerebrales de tamaño y volumen mayor al esperado para la edad del RN	Se obtuvo de reportes de USG transfontanelar en expediente clínico	Cualitativa Dicotómica	Sí No
Hemorragia intraventricular	Derrame sanguíneo intraventricular	Se obtuvo de las notas de evolución y reportes de USG transfontanelar en expediente clínico	Cualitativa Ordinal	I II III IV
Alteraciones estructurales SNC	Alteración estructural del SNC detectados por estudios de imagen	Se obtuvo de las notas de evolución y reportes de USG transfontanelar en expediente clínico	Cualitativa Dicotómica	Sí No
Coriorretinitis	Inflamación de la coroides y retina	Se obtuvo de las notas de valoración realizadas por oftalmología en expediente clínico	Cualitativa Dicotómica	Sí No
Trombocitopenia	Cuenta plaquetaria menor a 150,000	Se obtuvo de reportes de laboratorio en expediente clínico	Cualitativa Dicotómica	Sí
Trombocitosis	Cuenta plaquetaria mayor a 450,000	Se obtuvo de reportes de laboratorio en expediente clínico	Cualitativa Dicotómica	No
Colestasis	Bilirrubinas directas > 2 o > 15% de bilirrubina total	Se obtuvo de reportes de laboratorio en expediente clínico	Cualitativa Dicotómica	Sí No
USG transfontanelar	Estudio de imagen por ondas que utiliza la fontanela como ventana	Se obtuvo en expediente clínico	Cualitativa Dicotómica	Sí No

RESULTADOS

De las 180 muestras de leche materna (LM) de mujeres en periodo de puerperio, (primeras 3 semanas postparto), 180 muestras de saliva y 180 de sangre de los recién nacidos de las madres seleccionadas. Se eliminaron 120 muestras de LM y 120 de saliva y sangre de los recién nacidos por lo que la población final de estudio fue de 58 muestras de LM y 51 recién nacidos con 51 muestras de sangre y de saliva cada una. Diagrama de Flujo 1.

La tabla 1, muestra las características demográficas de población de estudio. La mediana de la edad materna fue de 24 años. El nivel socioeconómico de acuerdo a la Secretaría de Gobernación en el sector Salud comprende 6 niveles, siendo el 1X pobreza extrema y ascendiendo acorde a la posición social y económica. Se encontró el predominio de 3 niveles de pobreza, 30 (50%) corresponden al nivel 1, considerándose muy pobre, en el nivel 2, 25 (42%), y en menor proporción 1 (2%) nivel 3; 8 (4%) de las mujeres estudiadas no contaban con nivel socioeconómico reportado en el expediente. La escolaridad de las madres se encontró en 4 niveles: Primaria 5%, secundaria 50%, bachillerato 32% y solo el 8% cuenta con licenciatura.

Las mujeres con más de 1 embarazo comprendió 39/51 (76%) y de estas 15 (38%) tuvieron al menos un aborto, ninguna paciente contaba con antecedente de óbito.

De 51 recién nacidos, la vía de nacimiento fue para los nacidos por cesárea 16 (31%) y parto 35 (69%). La media del peso al nacimiento fue de 1997g (860 - 4130g), clasificándolo con base al mismo en peso extremadamente bajo 3% (< 1000g), muy bajo 23% (1001 - 1500g), bajo 56% (1501 - 2499g), adecuado 16% (2500 - 4000g) y grande 2% (> 224001g) al nacimiento y la edad de gestación de acuerdo a fecha de última menstruación en prematuro extremo 6.6% (< 28.⁰⁶ SDG), prematuro 33.3% (28-33.⁰⁶ SDG), prematuro tardío 20% (34⁰¹ - 36.⁰⁶ SDG),

de término 31% (37 - 41.⁰⁶ SDG) y postérmino 9% (> 42 SDG). El perímetro cefálico varió entre 20 a 35 cm, con media de 30.7cm en relación al peso y edad de gestación.

Los recién nacidos con carga viral en saliva con madre virolactia positiva fueron 21 (46.6%) con una $p = 0.28$ OR 1.51 IC 95% (0.7, 3.22) y de los pacientes con carga viral en sangre con virolactia positiva fueron 29 (64.4%) con una $p = 0.41$ OR 1.37 IC 95% (0.64, 2.93). Ninguno de los casos fue significativo.

De las muestras de LM, saliva y sangre para carga viral de CMV que se obtuvieron antes de las 3 semanas de vida del recién nacido, alimentados con leche materna, la mayor detección de CMV por medio de carga viral en madres con virolactia positiva fue de 24 (47%) en saliva como en sangre. La estancia hospitalaria tuvo una media de 25 días con un mínimo de 1 día y un máximo de 106 días.

La presencia de ictericia, sepsis y alteraciones respiratorias, fueron las mayormente encontradas en los recién nacidos (Figura 2). La microcefalia se encontró en 2 (5.4%) de neonatos con carga viral en sangre $p=0.08$, y 2 (5.4%) en saliva $p=0.08$, ambos no significativos.

Los recién nacidos con carga viral positiva en saliva y sangre, alimentados con leche materna virolactia positiva 11 (55%) presentaron trombocitosis y 7 (35%) trombocitopenia. Solo se encontró colestasis en 1/51 pacientes, representando el 1.9%.

En la gráfica 2 se observa mayor replicación en saliva y una limitación de la replicación en leche y sangre, se hace notar que la mayor replicación se concentra en los pacientes menores de 16 días, mientras que el paciente con 28 días de vida presenta una replicación baja. Esto hace pensar que probablemente la vía de contagio es distinta a la leche materna.

En la gráfica 3, podemos observar una alta replicación en leche y en saliva, en pacientes asintomáticos, lo que nos indica que la transmisión a glándulas salivales posiblemente se presentó por otra vía aparte de la leche materna.

En la gráfica 4 observamos una replicación en leche aumentada con respecto a la replicación en saliva y sangre, sin embargo no sobrepasa las 300 copias/ml. Aquí, la infección se limita a la leche materna, sin transmisión significativa a saliva.

En las gráficas 5 y 6, las pruebas negativas o con baja replicación de CMV en leche materna, presentan en saliva y sangre de varios una cuenta de copias muy alta, predominando en sangre en los pacientes de menor edad. Esto nos habla de una probable infección congénita que hasta el momento no ha dado manifestaciones. Los pacientes mayores presentan una carga viral alta tanto en saliva como en sangre, lo cual se explica pues al tener una mayor edad se ha dado mayor tiempo para la replicación del virus, aun así esto no explica la vía de transmisión. En este caso, la vía de transmisión probable fue congénita.

En la gráfica 7 se muestran 2 casos en los que existe replicación del virus tanto en leche materna como en sangre, pero que en saliva es muy poca, en ambos casos son pacientes de edad menores a 5 días, de estos la replicación en sangre es más significativa que la de leche materna, y por su corta edad en lugar de transmisión vertical del virus pensamos en que nos encontramos frente a 2 casos de infección congénita que hasta el momento no ha producido manifestaciones, pero que probablemente cursen con secuelas tardías o manifestaciones posteriores a la toma de muestras.

En la gráfica 8 observamos una alta replicación, siendo la menor en leche. En cambio, en 2 casos se puede observar una alta replicación en saliva que se limita en sangre a pesar de la diferencia significativa de edades entre ambos pacientes (44 y 5 días respectivamente).

En las muestras de la gráfica 9 podemos observar replicación muy baja en leche y en saliva; en cambio, tenemos una alta replicación en sangre, ya que son pacientes menores a 21 días, seguramente por transmisión congénita del CMV.

DISCUSIÓN

La leche materna es considerado un alimento ideal para recién nacidos, tanto de término como pretérmino, por su valor nutricional y sus propiedades únicas. También puede ser un vehículo para infecciones virales y bacterianas, dado que se sabe el impacto que tiene la lactancia en la epidemiología de la infección por citomegalovirus postnatal.²⁵ En comparación con recién nacidos que reciben fórmula maternizada, los niños pretérmino y término presentan menor riesgo para desarrollar un amplio rango de problemas médicos tanto en el periodo neonatal inmediato como tardío, incluyendo infecciones, enterocolitis necrosante, alergias, enfermedades crónicas y autoinmunes, y disminución en el desarrollo cognitivo.²⁶

La incidencia de carga viral en leche materna de nuestro estudio fue de 74.5%. Se sabe que la incidencia de infección postnatal oscila entre un 10-60% en los primeros 6 meses de vida, con una incidencia en países industrializados de 60 y 80% a diferencia de países no industrializados que es entre el 80 y 100%.⁸

No se conoce el mecanismo por el que las mujeres con IgG anti-CMV positiva pueden presentar reactivación durante la lactancia. Esta reactivación puede ocurrir en las glándulas mamarias y el CMV podría ser excretado en la leche sin presentar signos de infección sistémica. En recién nacidos prematuros o con peso bajo para la edad se pueden presentar consecuencias serias.²⁵

En este estudio encontramos muestras con alta replicación viral, principalmente en saliva y sangre de recién nacidos, en contraste con las muestras de leche materna, en que la replicación es prácticamente nula. Esto nos sugiere que la

transmisión por leche materna no es significativa, aunque en algunos casos también es posible explicarlo por la transferencia de inmunidad pasiva de la madre al neonato, ya sea por inmunoglobulinas o micro RNAs.

CONCLUSIÓN

La lactancia materna tiene un alto impacto sobre la inmunidad del neonato, lo que ayuda a que la replicación viral se limite. Nuestros resultados apoyan la continuidad de la lactancia materna en pacientes con madres que tengan una reactivación del virus en glándula mamaria y en aquellos en los que adquirieron infección viral durante la gestación.

Se necesitan estudiar otros factores que influyen en la infectividad del virus como su genotipo, para aclarar la influencia que tuvo el mismo sobre la infección de nuestros pacientes, además se necesitan realizar más estudios para delimitar que factor protector de la leche materna es el que influye de manera predominante en la respuesta del neonato al virus.

Los recién nacidos prematuros clasificados como moderados con peso bajo para edad de gestación 55.5% fueron la mayor población estudiada; los recién nacidos de término representan únicamente el 15.5%; la edad de gestación predominante fue la de recién nacidos pretérmino con un 33.3%

El único marcador en esta población fue la hiperbilirrubinemia con asociación directa con CMV detectado en saliva y en leche, sin embargo también encontramos datos de sepsis y trastornos respiratorios. En este estudio no resultó significativa como característica clínica.

No se detectaron casos de infección sintomática lo que parece indicar que la respuesta pasiva ofrecida por la madre protegió al recién nacido de la infección.

LIMITACIONES DE ESTUDIO

El presente estudio tiene como limitantes el no contar con la serología materna para CMV, se desconoce si la presencia de CMV en leche materna fue secundaria a infección primaria, reactivación o si la madre al momento no tenía infección.

Los estudios de valoración para infección por CMV no fueron realizados en todos los pacientes.

La muestra en orina de los recién nacidos es un determinante para la valoración de la infección del CMV tanto en madres como en el recién nacido, muestras con las cuales no contamos por la dificultad para el traslado de las mismas.

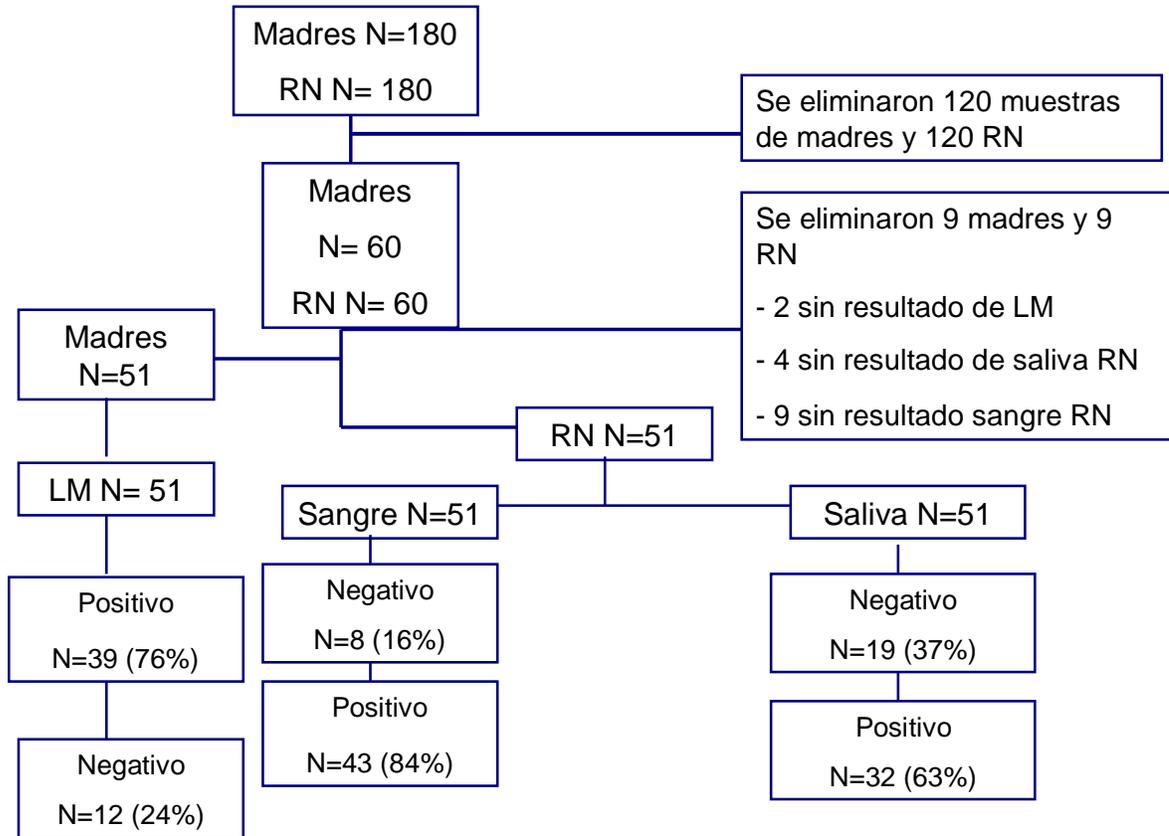
BIBLIOGRAFIA

- ¹ Arellano-Galindo J¹, Villanueva-García D, Cruz-Ramirez JL, Yalaupari-Mejía JP, Uribe-Gutiérrez G et al Detection and gB genotyping of CMV in mexican preterm infants in the context of maternal seropositivity. *J Infect Dev Ctries*. 2014 Jun 11;8(6):758-67
- ² Distéfano AL, Alonso A, Martin F, Pardon F. Human Cytomegalovirus: detection of congenital and perinatal infection in Argentina. *BMC Pediatr* 2004 Jun 23;4:11.
- ³ Syggelou A, Iacovidou N, Kloudas S, Christoni Z, Papaevangelou V (2010) Congenital cytomegalovirus infection. *Ann NY Acad Sci* 1205: 144-147.
- ⁴ Okulu E, Akin IM, Atasay B, Ciftci E, Arsan S, Türmen T (2012) Sever postanatl cytomegalovirus infection with multisystem involvement in an extremely low birth weight infant. *J Perinatol* 32: 72-74.
- ⁵ Alarcón A, Baquero- Artigao F, Grupo de estudio de la Infección por citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (2011). Revisión y recomendaciones sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección postnatal por citomegalovirus. *An Pediatr (Barc)* 74: 52.31-52.e12.
- ⁶ Leruez- Ville M, Vauloup- Fellous C, Parat S, Castel C, Avettand- Fenoel V, Guillerminot T, Grangeot- Keros L, Ville Y, Grabar S, Magny JF. Prospective identification of congenital cytomegalovirus infection in newborns using real- time polymerase chain reaction assays in dried blood spots. *Clin Infect Dis*. 2011 Mar 1; 52(5): 575- 81.
- ⁷ Chun s. Congenital and perinatal cytomegalovirus infection. *Korean J Pediatr* 2010; 53: 14-20.
- ⁸ Martín Peinador, Y. Grupo de Patología Infecciosa AEPap. Aproximación diagnóstica a la infección por citomegalovirus. Junio de 2014. Disponible <https://aepap.org/grupos/grupo-de-patologia-infecciosa/contenido/documentos-del-gpi>
- ⁹ Plosa EJ, Esbenshade JC, Fuller MP, Weitkamp JH. Cytomegalovirus infection. *Pediatr Rev*. 2012 Apr;33(4):156-63; quiz 163. doi: 10.1542/pir.334-156.
- ¹⁰ Stagno S, Reynolds DW, Pass RF, Alford CA. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 1980; 302:1073-6
- ¹¹ Lanzieri TM, Dollard SC, Josephson CD, Schmid DS, Bialek SR. Breast milk acquired cytomegalovirus infection and disease in VLBW and premature infants. *Pediatrics*. 2013 Jun;131(6):e1937-45
- ¹² Tookey PA, Ades AE, Peckham CS. Cytomegalovirus prevalence in pregnant women: the influence of parity. *Arch Dis Child*. 1992 Jul;67(7 Spec No):779-83.

-
- ¹³ Alarcón Allen y F. Baquero-Artigao. Revisión y recomendaciones sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección posnatal por citomegalovirus. *An Pediatr (Barc)*. 2011; 74 (1): 52.e1-52.e13
- ¹⁴ Lazzarotto T, Lanari M. Why is cytomegalovirus the most frequent cause of congenital infection? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011 Oct;9(10):841-3.
- ¹⁵ Lanzieri TM, Dollard SC, Josephson CD, Schmid DS, Bialek SR. Breast milk acquired cytomegalovirus infection and disease in VLBW and premature infants. *Pediatrics*. 2013 Jun;131(6):e1937-45.
- ¹⁶ Ehlinger EP et al. Maternal cytomegalovirus specific immune responses and symptomatic postnatal cytomegalovirus transmission in very low-birth-weight preterm infants. *J Infect Dis*. 2011 Dec 1;204(11):1672-82. doi: 10.1093/infdis/jir632. Epub 2011 Oct 7.
- ¹⁷ Lazzarotto T, Lanari M. Why is cytomegalovirus the most frequent cause of congenital infection? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011 Oct;9(10):841-3.
- ¹⁷ Hamprecht K¹, Maschmann J, Müller D, Dietz K, Besenthal I. et al. Cytomegalovirus (CMV) Inactivation in breast milk: Reassessment of pasteurization and freeze-Thawing. *Pediatr Res*. 2004 Oct;56(4):529-35.
- ¹⁸ Sordelli N., Sapia E., Delgado M. Infección sintomática por citomegalovirus a través de la lactancia materna en un niño de 45 días. *Arch Argent Pediatr* 2015; 113(3): 145-148 p
- ²⁰ Swanson E, Schleiss M. New prospects for prevention and Therapy. *Pediatr Clin N Am* 60 (2013) 335–349
- ²¹ Tookey PA, Ades AE, Peckham CS. Cytomegalovirus prevalence in pregnant women: the influence of parity. *Arch Dis Child*. 1992 Jul;67(7 Spec No):779-83.
- ²² Barbi M¹, Binda S, Primache V, Caroppo S, Didò P, Guidotti P, Corbetta C, Melotti D. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. *J Clin Virol*. 2000 Sep 1;17(3):159-65.
- ²³ Capretti MG, Lanari M, Lazzarotto T, et al. Very low birth weight infants born to cytomegalovirus-seropositive mothers fed with their mother's milk: a prospective study. *J Pediatr* 2009; 154:842–8
- ²⁴ Arellano-Galindo J¹, Villanueva-García D, Cruz-Ramírez JL, Yalaupari-Mejía JP, Uribe-Gutiérrez G et al. Detection and gB genotyping of CMV in mexican preterm infants in the context of maternal seropositivity. *J Infect Dev Ctries*. 2014 Jun 11;8(6):758-67
- ²⁵ Chiavarini M¹, Bragetti P, Sensini A, Cenci E, Castronari R, Rossi MJ, Fantauzzi A, Minelli L. Breastfeeding and transmission of cytomegalovirus to preterm infants. Case report and kinetic of CMV-DNA in breast milk. *Ital J Pediatr*. 2011 Jan 19;37:6
- ²⁶ Wagner J, Hanson C, Berry A. Donor Human Milk for Premature Infants A Review of Current Evidence. *ICAN Nutr* 2013 5:71.

ANEXOS

Diagrama 1. Distribución de la población de estudio.



RN: recién nacido LM: Leche materna
Revisar resultados de 1ª y 2ª. eliminación

Tabla 1. Características demográficas de la población de estudio.

Variable	Media/rango
Edad materna	24 años (14-42)
Escolaridad	Primaria
Nivel socioeconómico	1
No. De gestas	2 (1-6)
SDG por FUM	34.3 (25-40)
APGAR	8
Peso al nacimiento	1997 g (860 - 4130g),
Perímetro cefálico	30.7cm (20-35cm)
Edad al egreso	25 días (1-106 días)

SDG: Semanas de gestación; FUM: Fecha de última menstruación

Tabla 2. Peso para la edad de recién nacidos estudiados.

Clasificación	Número de pacientes	Porcentaje
PEBEG (<1000g)	1	3%
PMBEG (1001g- 1500g)	10	23%
PBEG (1501g- 2499g)	25	56%
PAEG (2500- 4000g)	7	16%
PGEG (>4000g)	1	2%

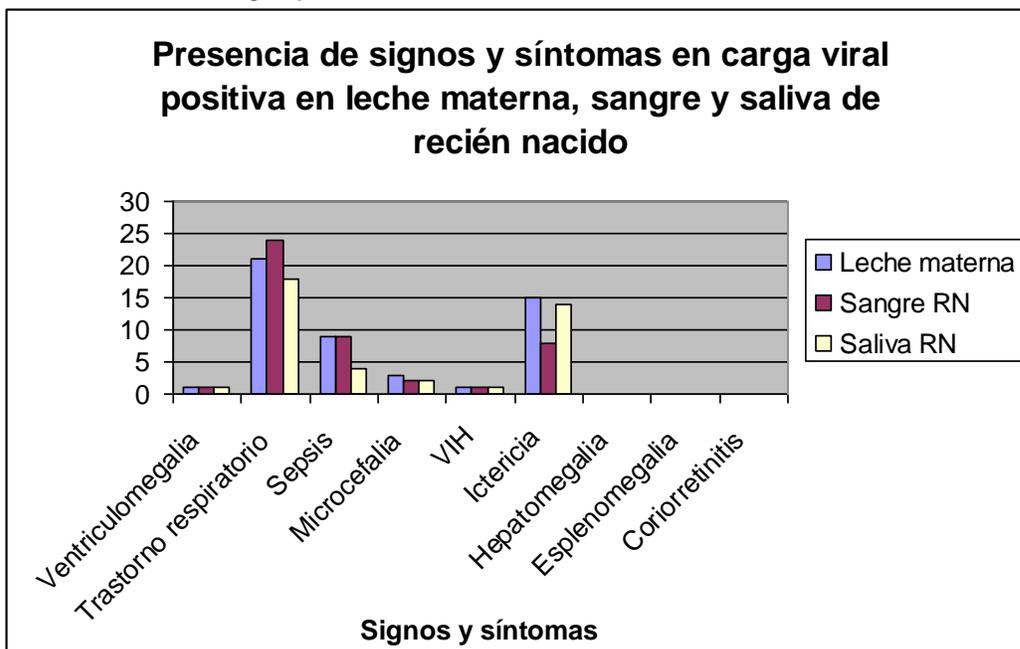
PEBEG: Peso extremadamente bajo para la edad de gestación; PMBEG: peso muy bajo para la edad de gestación; PBEG: peso bajo para la edad de gestación; PAEG: peso adecuado para la edad de gestación; PGEG: peso grande para la edad de gestación.

Tabla 3. Distribución de recién nacidos estudiados por edad de gestación.

Clasificación	Número de pacientes	Porcentaje
Recién nacido pretérmino extremo (<28.6SDG)	3	6.7%
Recién nacido pretérmino (28-33.6SDG)	15	33.3%
Recién nacido pretérmino tardío (34-36.6 SDG)	9	20%
Recién nacido de término (37-41.6 SDG)	14	31%
Recién nacido postérmino (>42 SDG)	4	9%

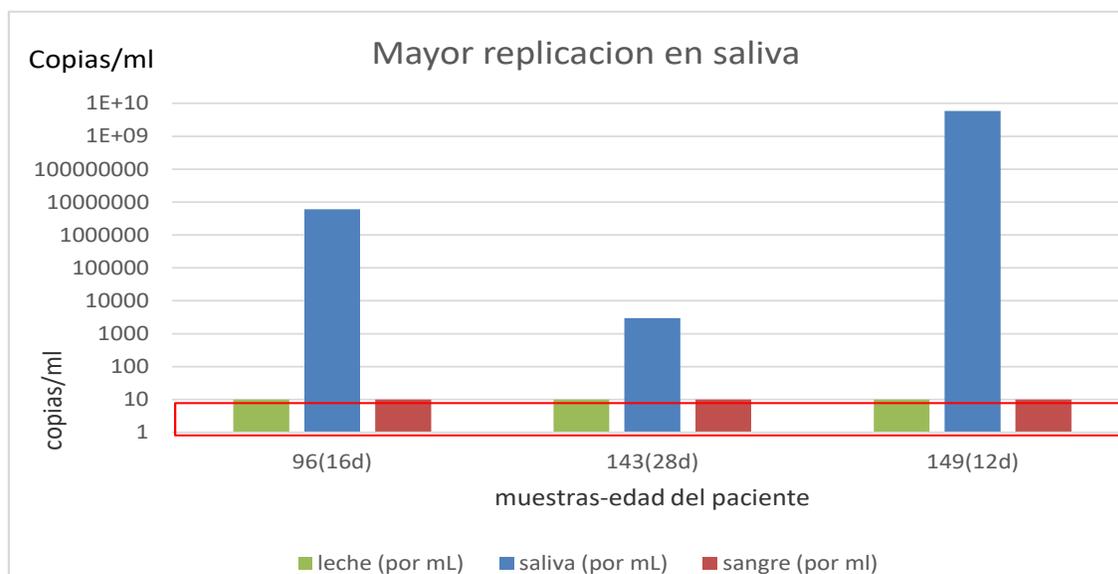
RNPE: recién nacido pretérmino extremo; RNP: recién nacido pretérmino; RNPT: recién nacido pretérmino; RNT: recién nacido de término; RNP: recién nacido postérmino.

Gráfica 1. Presencia de signos y síntomas en recién nacido con carga viral presente en leche materna, sangre y saliva de recién nacidos.



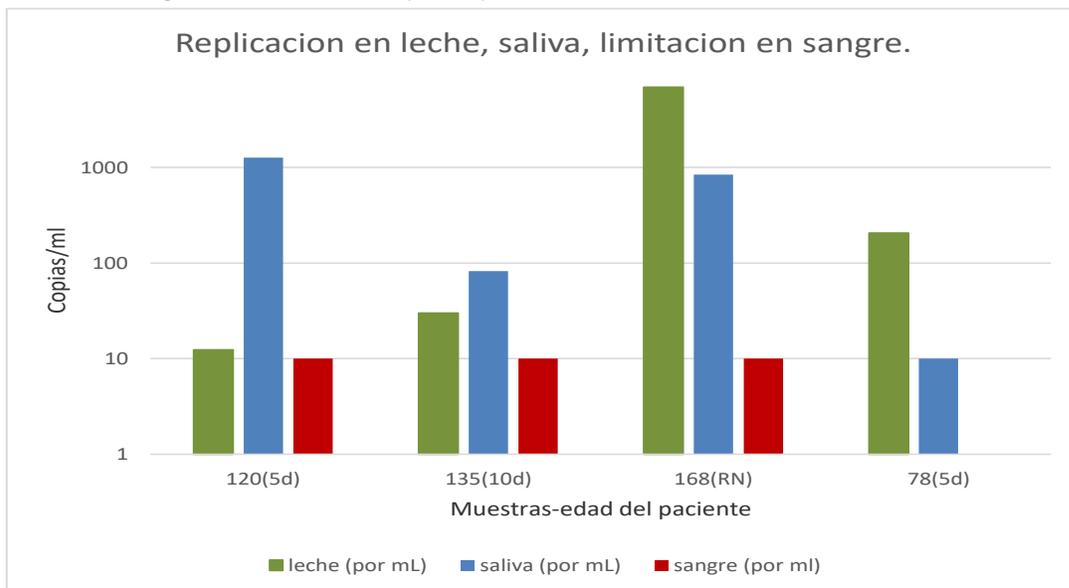
VIH: Virus de inmunodeficiencia adquirida; RN: recién nacido.

Gráfica 2. Carga viral en muestras por copia/ml, se muestra la comparación de leche, saliva y sangre. Entre paréntesis junto al número de folio del paciente se encuentra la edad del mismo en días.



RN: recién nacido.

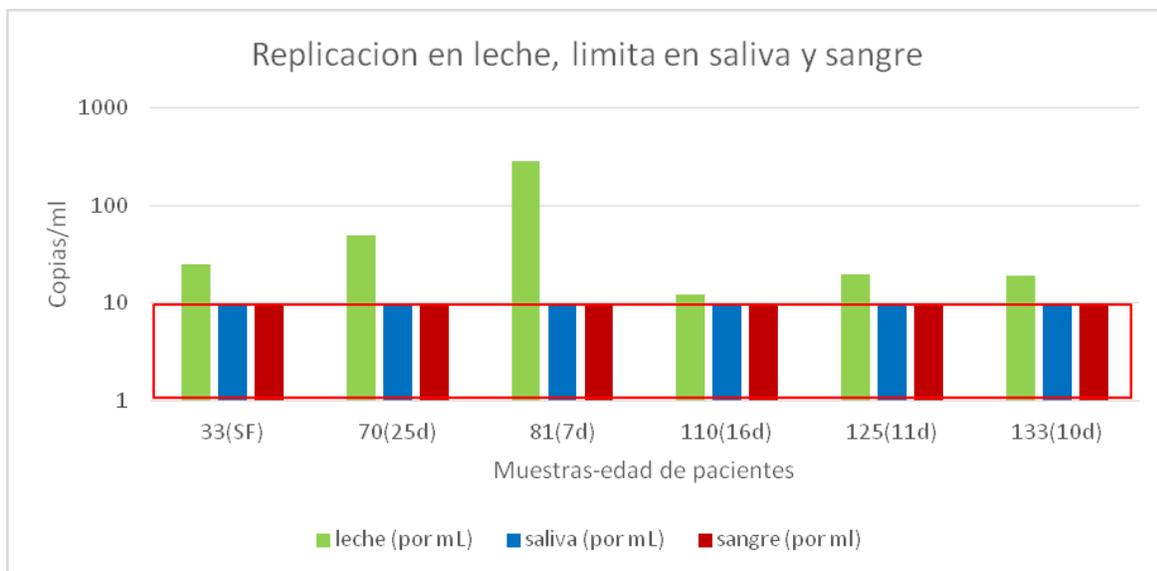
Grafica 3: Carga viral en muestras por copia/ml.



RN:

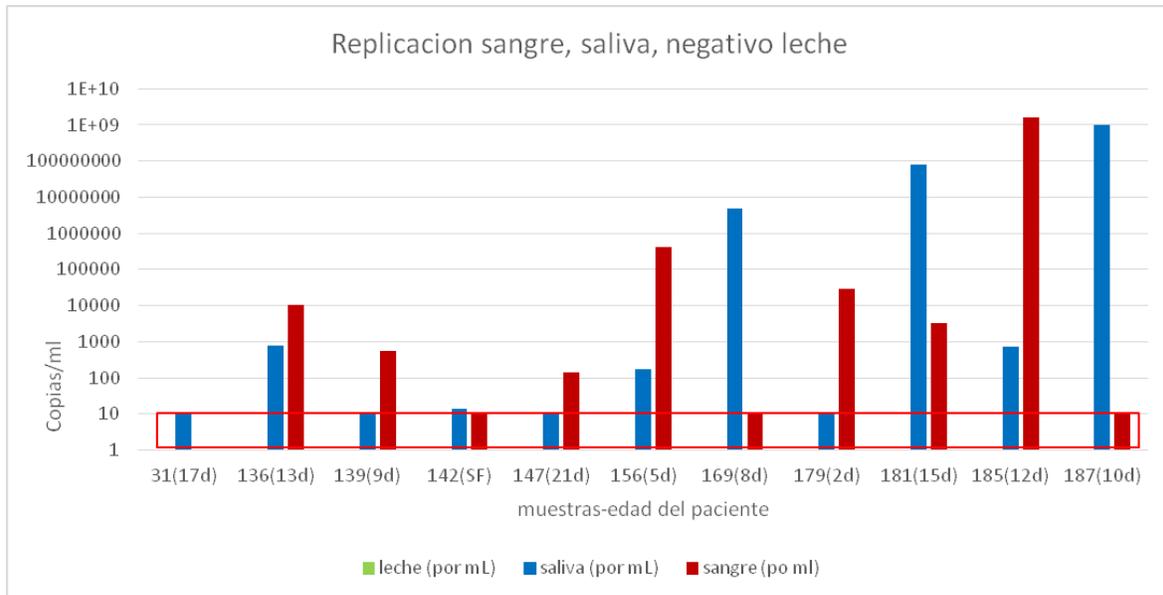
recién nacido

Gráfica 4: Carga viral en muestras por copia/ml. Replicación en leche, limita saliva y sangre.



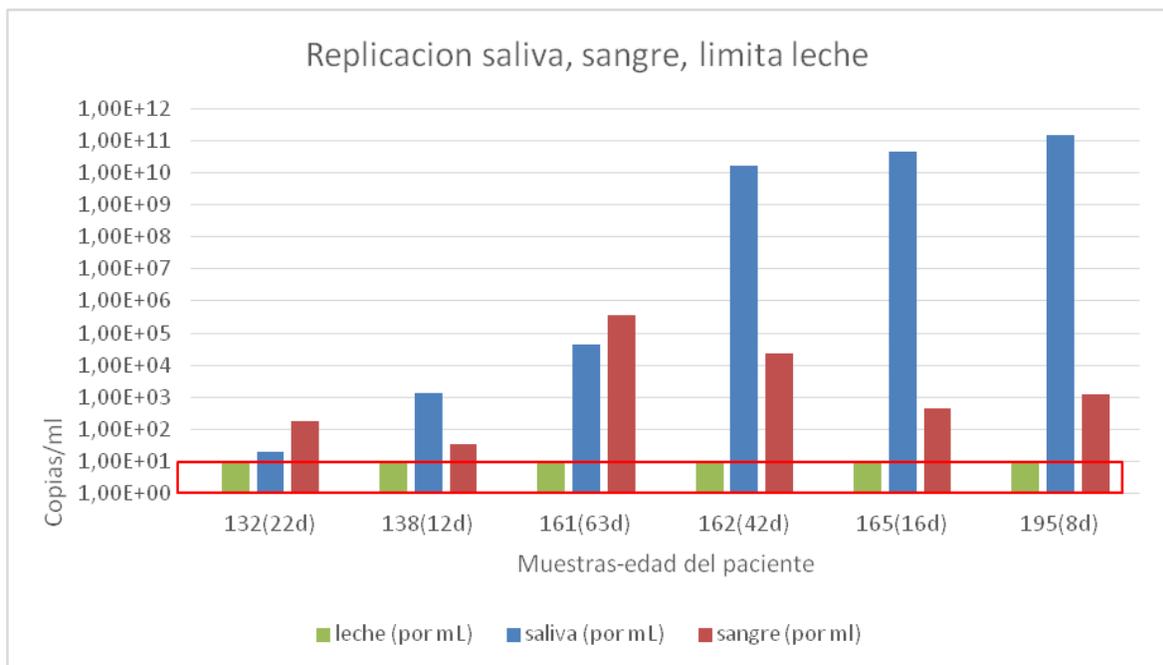
RN: recién nacido.

Gráfica 5: Alta replicación en saliva y sangre, negativo en leche.



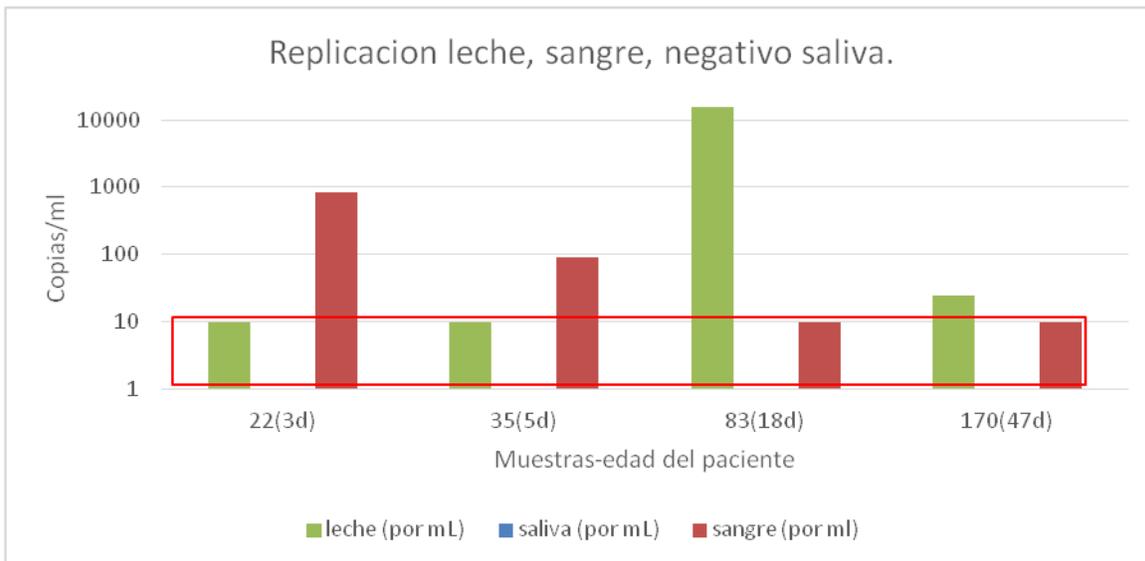
RN: recién nacido.

Gráfica 6: Replicación en saliva y sangre, replicación muy baja en leche.



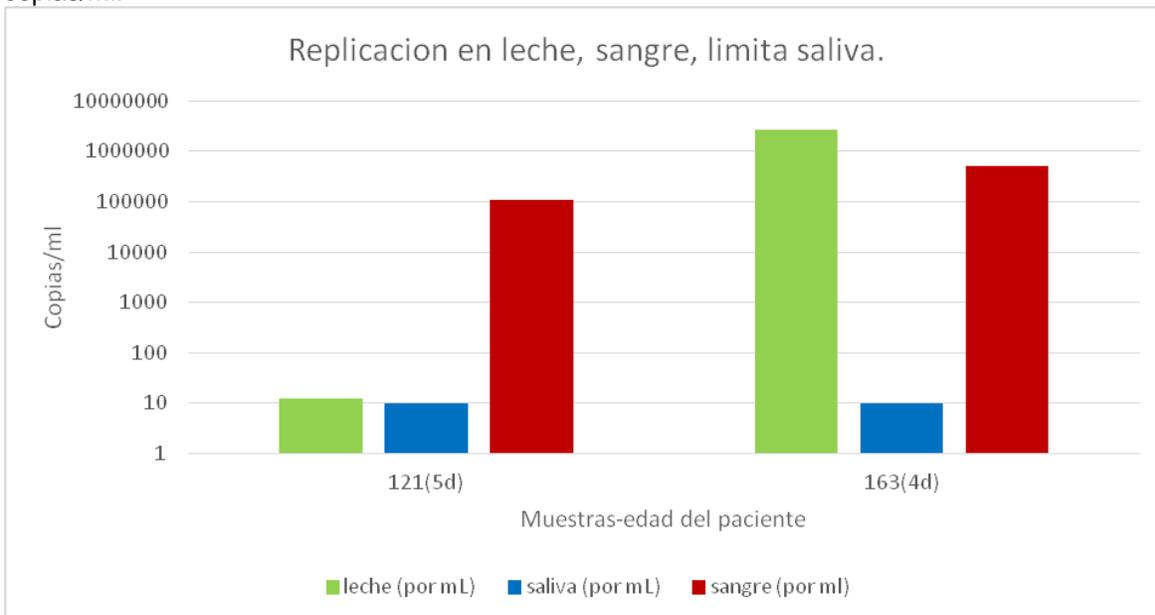
RN: recién nacido.

Gráfica 7: Alta replicación en leche y sangre, negativo en saliva.



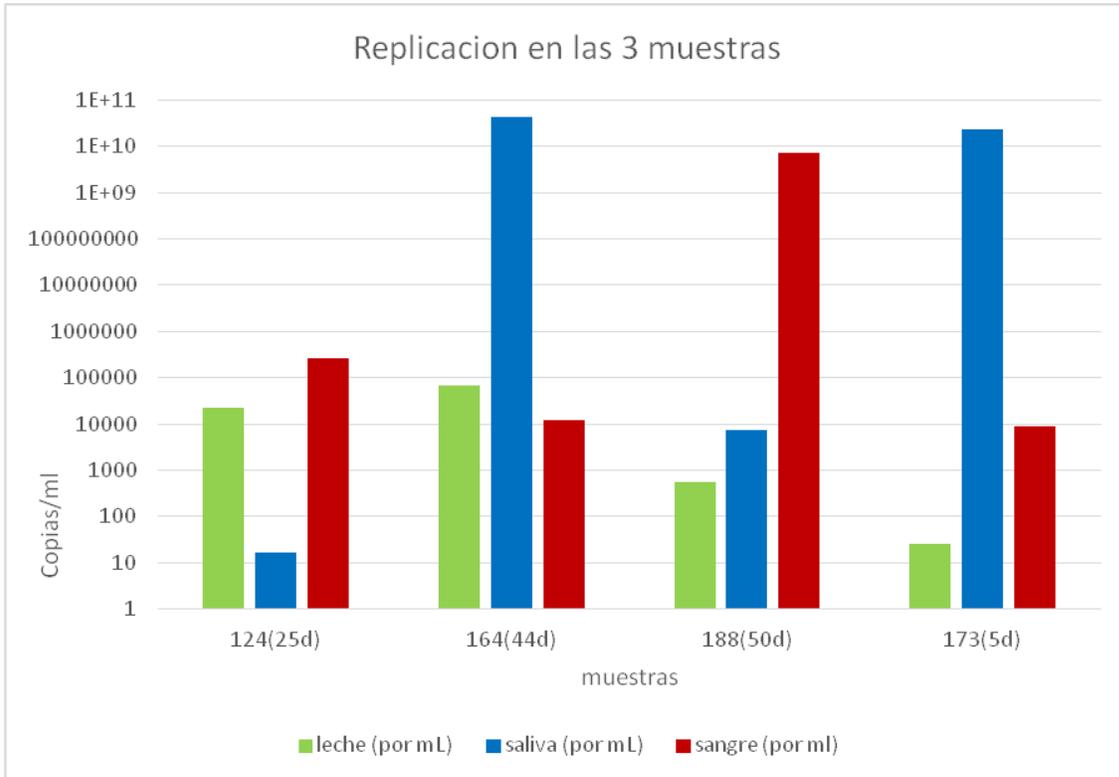
RN: recién nacido.

Gráfica 7: Alta replicación en leche y sangre, limitación de la replicación en saliva, con pocas copias/ml.



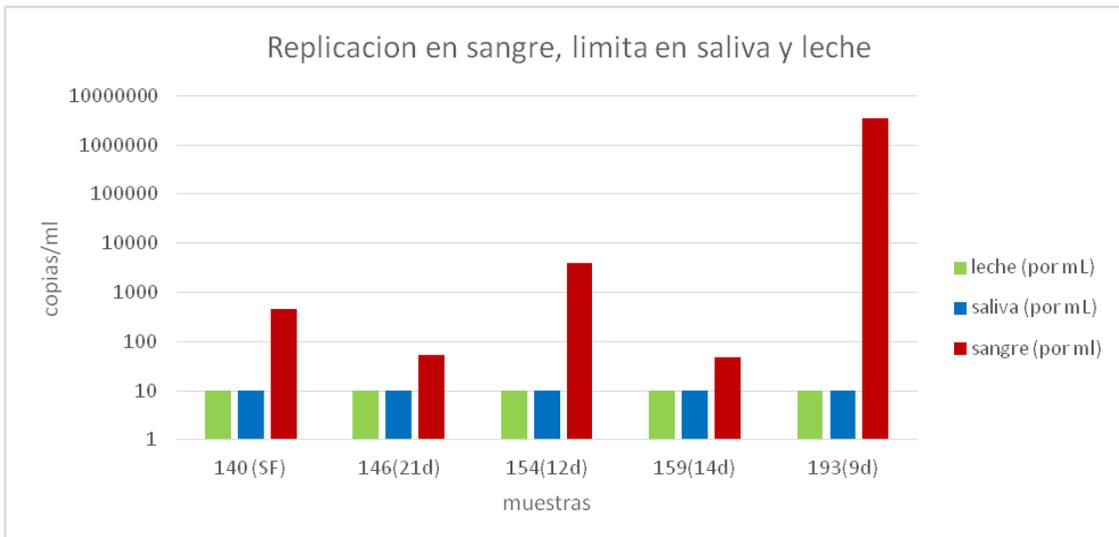
RN: recién nacido.

Gráfica 8: Replicación en leche materna, sangre y saliva de RN.



RN: recién nacido.

Gráfica 9: Alta replicación en sangre, baja replicación en leche y saliva.



RN: recién nacido. SF: sin fecha.