



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO
GÓMEZ

TÍTULO:
MONITORIZACIÓN MOLECULAR DE
LA INFECCIÓN POR ADENOVIRUS Y VIRUS BK
EN PACIENTES POST TRASPLANTE
DE CÉLULAS PROGENITORAS
HEMATOPOYÉTICAS

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:
INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA

DRA. AURORA TERESA GADSDEN HEVIA

DIF DIRECTOR DE TESIS: MARTHA AVILÉS ROBLES

Ciudad de México, Febrero 2017



A handwritten signature in black ink, likely belonging to the director of the thesis, Martha Avilés Robles.





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.

HOJA DE FIRMAS

**DRA. REBECA GÓMEZ CHICO VELASCO
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'MA', is centered on the page. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke at the bottom.

**TUTORA: DRA. MARTHA AVILÉS ROBLES
MÉDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO INFECTOLOGÍA
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

DEDICATORIA:

“Cada pensamiento que producimos, cualquier cosa que decimos, cualquier acción que hacemos, lleva nuestra firma.

Nuestra propia vida tiene que ser nuestro mensaje”.

Thich Nhat Hanh

A mis padres, a mis abuelos, a mi hermano y a TODA mi hermosa familia, por su apoyo incondicional, su comprensión y su paciencia infinita.

A mi roomie Emma por las largas pláticas y porque gracias a ella xomo verduras. A mis hermanos de batalla (Carlos, Denny y Vianey) a mi querida María y a mis maestros, especialmente a la Dra. Martha Avilés, por estar siempre, por guiarnos con paciencia, dedicación y cariño, hasta que logramos perder el miedo y caminar solos.

A Claudia, por estar siempre y por iluminar mi camino.

A cada uno de los pequeños, que con su vida y su muerte, inspiraron en mí el deseo, a veces desesperado, de conocer a fondo al enemigo invisible y fugaz. Me armaron con la fuerza, la energía, la paciencia y la entereza necesaria para aprender sin descanso y no darme nunca por vencida.

A MSF, que me dio la oportunidad de tocar la realidad. Al primer chiquillo que murió en mis brazos en Níger, al que me enseñó que la vida era dura y salvaje, en el Congo y finalmente el que se fue sonriendo y saludable, en Haití. A todas las personas maravillosas con las que trabajé en esos tres países, que me enseñaron a luchar por defender la dignidad humana. Por ellos, que llenan mi corazón, estoy aquí.

Descubrí que hay un mundo fantástico de seres inimaginables, salidos de novelas de ciencia ficción, que nos superan en número y estrategias de sobrevivencia. Son seres poderosos y a la vez silenciosos, dignos de admiración y profunda humildad. Definitivamente no estamos solos, ni somos los más fuerte en el ciclo de la vida. Si existe un creador, tiene una imaginación infinita y es mucho más interesante de lo que pensé.... las maravillas no se acaban nunca.



ÍNDICE

1. Resumen.....	5
2. Introducción.....	7
3. Marco teórico.....	8
4. Antecedentes.....	21
5. Planteamiento del problema.....	27
6. Pregunta de investigación.....	29
7. Justificación.....	30
8. Objetivos	32
9. Hipótesis.....	33
10.Métodos	34
11.Consideraciones éticas.....	37
12.Plan de análisis estadístico.....	38
13.Descripción de variables	39
14.Resultados finales	42
15.Discusión.....	54
16.Conclusión.....	57
17.Limitación del estudio.....	58
18.Cronograma de actividades.....	59
19.Referencias bibliográficas.....	60
20.Anexos	65

1. RESUMEN

Las infecciones por adenovirus (Adv) y virus BK (VBK) han sido reconocidas en los últimos años como causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH). El riesgo de infección por Adv es mayor en niños. En pacientes post TCPH las infección grave por Adv causa enfermedad respiratoria grave, hepatitis, colitis, cistitis hemorrágica, enfermedad diseminada y muerte. La excreción de VBK en orina (BK viruria) se ha asociado a enfermedad: hematuria asintomática, cistitis hemorrágica, estenosis ureteral y nefritis intersticial. La cistitis hemorrágica ocurre en un 10 a 25% de los pacientes post TCPH.

Planteamiento del problema. Conforme han incrementado las alternativas de TPH, se ha necesitado mayor y más profunda depleción de células T; esto conlleva a que las infecciones virales se vuelvan causas importantes de morbilidad y mortalidad en los receptores de trasplante de células hematopoyéticas, tal es el caso de las infecciones por adenovirus y virus BK.

Justificación. Los datos de población pediátrica son escasos, no encontramos información pediátrica de México. Se requiere estudiar el comportamiento de la infección por adenovirus y virus BK, así como la monitorización las cargas virales por PCR-TR. El poder generar esta información ayudará a correlacionar los niveles en sangre y otros líquidos corporales (orina en pacientes con infección por virus BK y heces en pacientes con infección por adenovirus), con el desarrollo de enfermedad.

Objetivo general. Describir el comportamiento de la carga viral de adenovirus y virus BK en pacientes post trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

Metodología. Estudio prospectivo, longitudinal, descriptivo, seguimiento de una cohorte de marzo de 2015 a marzo de 2017. Se medirán de manera semanal carga virales en sangre, heces y orina para adenovirus y virus BK. Se realizara estadística descriptiva, expresando los datos como promedio y desviaciones estándar para variables con distribución normal y como medianas con rangos para variables con distribución no paramétrica.

Resultados. Se analizaron 20 pacientes. El tiempo promedio de permanencia en el protocolo fue de 118.7 días. La mayor cantidad de pacientes presentaron carga viral positiva para adenovirus en suero en la semana 8, encontrándose positiva en 30% de los pacientes. En ningún paciente menor de 11 años se detecto la presencia de adenovirus en sangre. En heces, se encontró en un 90% de los paciente. Su pico máximas a las 8 y 13 semanas. Solo 1 paciente presentó manifestaciones clínicas de enfermedad por Adenoviurs. Para el virus BK desde el día -7 se observaron cargas virales positivas en plasma. Las cargas virales se mantienen estables, con un máximo de pacientes positivos de 37%. En orina se observa desde la semana 0, incluso en niños de 1 año (50%), siendo más frecuente a partir de la semana 4, incrementando progresivamente hasta presentarse en el 100% de los pacientes tienen el virus en orina. 3 pacientes (15%) desarrollaron cistitis hemorrágica.

Conclusión. Los hallazgos fueron muy similares a los descritos en la literatura. La presencia tanto de adenovirus como virus BK es frecuente en pacientes pediátricos, encontrándose en plasma y heces y plasma y orina respectivamente. Ambos se encuentran desde la etapa pretrasplante y van incrementando conforme se ve afectado el sistema inmune del paciente. A mayor inmunosupresión se encuentra mayor carga viral y coinfecciones. Para poder llegar a conclusiones estadísticamente significativas se necesita continuar el protocolo para tener una mayor población de estudio.

2. INTRODUCCIÓN

Las infecciones por adenovirus y virus BK han sido reconocidas en los últimos años como causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes adultos con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH).

La información acerca del comportamiento de las cargas virales de estos virus en la población pediátrica es escasa y se desconocen el punto de corte en el que se presentan manifestaciones de enfermedad. Además no existe información pediátrica de México. Por lo que se decidió describir el comportamiento de la carga viral de adenovirus y virus BK en pacientes post trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

3. MARCO TEÓRICO

GENERALIDADES

El trasplante hematopoyético, también denominado trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH), es una terapia relativamente nueva, útil en el tratamiento de diferentes enfermedades hematológicas y no hematológicas propias de la infancia. Los avances que han ocurrido en los últimos años han permitido lograr una tasa de respuesta de la enfermedad en 50-90% de los casos según la patología; sin embargo, hoy en día aún observamos complicaciones que pueden poner en peligro la vida del paciente o deteriorar su calidad de vida.

Desde los años 60 se empezó a utilizar el TCPH para tratar leucemias avanzadas, Inmunodeficiencia severa, y Síndrome Wiskott Aldrich. En la actualidad ha incrementado la aceptación del TCPH para el tratamiento de enfermedades genéticas como aquellas que afectan la función del eritrocito (talasemia, enfermedad de células falciformes), la función de los granulocitos (agranulocitosis y enfermedad granulomatosa crónica), la función plaquetaria (Síndrome de Wiskott Aldrich, megacariocitosis congénita) y errores innatos del metabolismo.

FUNDAMENTOS DEL TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS (TCPH)

OBJETIVO DEL TCPH:

1. Sustituir la hematopoyesis del paciente, por ser insuficiente, total o parcialmente defectuosa o neoplásica.
2. Permitir la administración de un tratamiento antineoplásico intenso con dosis muy elevadas de quimioterapia o radioterapia. En este caso, es un recurso de rescate que contrarresta la mielosupresión grave y potencialmente mortal del

tratamiento antineoplásico. Además, en el TCPH procedentes de un donador sano, las células inmunocompetentes derivadas del injerto son capaces de establecer una potente respuesta inmune en contra de las células neoplásicas residuales, fundamento que se conoce como enfermedad injerto contra tumor. (Gaytán-Morales F, 2013)

TIPOS DE TRASPLANTES:

Dependiendo del origen de las CPH, los trasplantes pueden ser autólogos o alogénicos.

Autólogo: los pacientes reciben sus propias CPH, las cuales deben ser cosechadas antes del acondicionamiento. Este tipo de trasplante se realiza preferentemente en tumores sólidos.

Alogénico: los pacientes reciben las células progenitoras de un individuo de la misma especie. Puede tratarse de un hermano, otro donador relacionado o un donador no relacionado. (Gaytán-Morales F, 2013)

Para que un trasplante alogénico sea exitoso, la clave es que la compatibilidad de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) del donador y el receptor sea cercana al 100%. Los genes que codifican a las cadenas pesadas de las moléculas HLA clase I (A, B y C) y de los que codifican para las cadenas alfa y beta de los antígenos DR y DQ de la clase II, son muy cercanos entre si y se heredan de manera conjunta, como haplotipos (constitución alélica de múltiples loci para un mismo cromosoma). La distribución de los alelos y de los haplotipos específicos con diferentes en cada población o grupo étnico. (Hooi Sian Eng, 2011)

Por lo tanto, se busca la compatibilidad de los alelos para HLA de clase I (A, B y C) y HLA de clase II (DRB1 y DQB1). En general se miden 10 alelos.

Por cada alelo de HLA que no sea compatible existe una reducción progresiva de la probabilidad de supervivencia a 5 años en los pacientes Post TCPH, de aproximadamente 10%. (Lee SJ, et al, 2007).

Se ha visto que los hermanos heredan generalmente los mismos genes HLA en el cromosoma 6, es por esto que son los donadores ideales para un trasplante alogénico. Como segunda opción se encuentran otros donadores relacionados, como los padres, y por último los donadores no relacionados, en esta clasificación entra también el trasplante de sangre de cordón umbilical. (Alousi A, et al, 2013).

Existen los siguientes tipos de trasplante alogénicos:

- Singénico: cuando el donador es un hermano gemelo idéntico, con HLA 100% compatible. Estos pacientes no requieren inmunosupresores posteriores al trasplante y no presentan enfermedad injerto contra hospedero (EICH), aunque tampoco presentan el fenómeno injerto contra tumor, por lo que el riesgo de recaída es más elevado.
- HLA compatible: los alelos son compatibles en una relación 10 de 10. (Lee SJ, 2007).
- Mismatched: alelos compatibles en una relación 9 de 10 o menor, siendo de mayor riesgo los compatibles en una relación 7 de 10 o menor. En estos pacientes se ha visto menor supervivencia, menor tiempo libre de enfermedad, mayor mortalidad asociada a tratamiento y a EICH. (Lee SJ, 2007).
- Haploidéntico: Cuando el donador es compatible a 3 de 6 alelos (50%).

FUENTES DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS:

Médula ósea: Ya no se realiza, por que tiene desventajas sobre la recolección de sangre periférica.

Sangre periférica: Las células progenitoras hematopoyéticas residen en la fracción mononuclear de la sangre periférica, en una concentración de sólo 1% a 10% de las encontradas en médula ósea. La colección de gran número de células mononucleares es posible gracias al desarrollo de procedimientos de aféresis y al uso de factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos. (McCredie KB, 1971; Socinski MA, 1988).

Cordón umbilical: existe un mayor número de células progenitoras en la sangre proveniente de cordón. Dentro de las ventajas se encuentran que estas células pueden ser criopreservadas, siendo posible contar con un banco de donadores inmediato, con tipos de HLA ya determinados. Es de fácil transporte y fácil administración. Hay menor riesgo de enfermedad injerto contra hospedero, pero mayor riesgo de falla del injerto, una reconstitución inmune más lenta y que los donadores no estarán disponibles en caso de requerirse mayor cantidad de células o una segunda donación. (Gluckman E, 2001).

RÉGIMEN DE ACONDICIONAMIENTO

El paciente es sometido a un régimen de acondicionamiento con radiación corporal total y/o quimioterapia. El propósito de este tratamiento es eliminar las células malignas residuales, dar una inmunosupresión adecuada para permitir que el paciente acepte la nueva médula trasplantada, y hacer un espacio en la médula para permitir el injerto del trasplante.

Los regímenes básicos incluyen ciclofosfamida combinada con Busulfán o irradiación corporal total. Las dosis de quimioterapia o quimio-radioterapia administrada son intencionalmente ablativas o letales para la futura producción de células hematopoyéticas normales, por lo que no se deben administrar sin la garantía de tener el trasplante para la restauración de la función hematopoyética.

La mortalidad temprana puede ser tan alta como 20% dependiendo del acondicionamiento, la enfermedad y el estado del paciente. En el TCPH autólogo se eliminan los riesgos por EICH y el tratamiento inmunosupresor, sin embargo continúan los riesgos por el régimen de acondicionamiento, falla de injerto y aumenta la posibilidad de recaída.

El TCPH tiene un costo elevado y una morbimortalidad elevada, por esta razón se requiere la estimación del costo beneficio en comparación con otros tratamientos. Debe realizarse el TCPH sí sólo este ofrece la oportunidad de curación para una enfermedad mortal, cuando existe otro tratamiento que ofrece la misma oportunidad de curación, con menor riesgo se debe evitar el TCPH.

COMPLICACIONES INFECCIOSAS

Las infecciones, junto con la EICH, son la principal causa de morbilidad y mortalidad posterior al trasplante. La mayor incidencia y severidad se correlaciona con el mayor uso de inmunosupresores, mayor tiempo de recuperación de neutrófilos y la reconstitución inmune más lenta. El tipo de infección a la que están más expuestos los pacientes trasplantados varía en relación con el tiempo.

En los receptores de TCPH alogénico, el riesgo de infección no se limita al periodo de granulocitopenia previo al injerto, sino que persiste hasta que ocurre la reconstitución inmune, que se presenta 12-24 meses posteriores al trasplante. El EICH crónico y su tratamiento retardan la recuperación de la función inmune prolongando el periodo de riesgo.

Primera Etapa (Periodo pre-injerto) (0-30 Días). Los procesos infecciosos están en relación con dos factores principales:

1. La neutropenia prolongada
2. Las mucositis secundarias al uso de agentes quimioterapéuticos utilizados y a la necesidad frecuente de accesos vasculares.

En consecuencia, los gérmenes provenientes de la piel, cavidad oral y tracto gastrointestinal son los más prevalentes en esta etapa, en donde predominan las infecciones bacterianas y por *Candida sp.* Las infecciones por bacilos Gram negativos se incrementan cuando las barreras mucosas del tracto gastrointestinal se encuentran rotas. (Michaels MG, 2010).

Las infecciones virales también ocurren en este periodo. Los niños trasplantados que no tengan historia previa de infección por virus herpes simple deben recibir profilaxis para prevenir la reactivación. Los virus circulantes a nivel comunitario o nosocomial también pueden representar una potencial fuente de infección.

Cada vez existe mayor evidencia de que los virus adquiridos en la comunidad son causa creciente de morbilidad y mortalidad en los pacientes con TPH.

El adenovirus es particularmente importante como un agente viral, que puede presentarse en etapas tempranas aunque típicamente se presenta después del injerto (Hale GA, 1999).

Segunda Etapa (Periodo post-injerto) (31-100 Días). Se caracteriza por el deterioro de la inmunidad celular. Este deterioro inmune es observado tanto en receptores de trasplante autólogo como en alogénico. Este riesgo se acentúa principalmente entre los días 50 a 100 post-trasplante. De manera característica en esta etapa las infecciones bacterianas son menos comunes y predominan las infecciones oportunista por *Pneumocystis jirovecii* y *Aspergillus sp.*, que se constituyen como los principales patógenos.

Citomegalovirus es el agente viral más frecuentemente implicado en esta etapa, principalmente como una reactivación. El Adenovirus es el segundo agente viral mas importante en esta etapa y causa enfermedad en aproximadamente 30% de los receptos de TPH (Lujan-Zibermann L, 2005).

Tercera Etapa (Periodo Post-injerto tardío) (> 100 Días). Caracterizada por el deterioro persistente de la inmunidad celular y humoral, así como la alteración en el funcionamiento del sistema reticuloendotelial. La EICH crónica compromete significativamente la función del sistema inmune. Este deterioro es más grave en receptores de trasplante alogénico y condiciona un riesgo elevado de reactivaciones virales por CMV y varicela zoster e infecciones por virus respiratorios y organismos encapsulados (*S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*), entre los más frecuentes.

Actualmente y como consecuencia del mejor conocimiento de las complicaciones infecciosas del trasplante se utiliza de manera generalizada profilaxis con aciclovir, fluconazol y trimetoprim/sulfametoxazol, con lo cual ha disminuido la frecuencia y gravedad de infecciones por herpes simple, *Candida* y *P. jiroveci*; por otro lado, el uso de ganciclovir como profilaxis o tratamiento anticipado han tenido un efecto similar en la frecuencia de enfermedad por citomegalovirus en el periodo temprano después del trasplante. Pero a pesar de esto, existen múltiples infecciones virales para las que no se cuenta con un tratamiento profiláctico específico (Junghanss C. 2002).

ADENOVIRUS

Las infecciones por adenovirus son muy frecuentes y causan el 5-10% de todas las enfermedades febriles en lactantes y niños pequeños. Aunque las infecciones sintomáticas por adenovirus suelen ser leves y autolimitadas en pacientes inmunocompetentes, se han observado brotes de enfermedad respiratoria grave asociada con una morbilidad significativa y fallecimientos ocasionales en los recién nacidos y adultos sanos. Los adenovirus también se han convertido en serios patógenos oportunistas en pacientes inmunodeprimidos transplantados de células progenitoras hematopoyéticas o de órganos sólidos. (Echevarria M. 2008; Ison MG, 2006).

Los adenovirus son virus de ADN líticos y sin envoltura. Los viriones maduros tienen 70-90 micras de diámetro y contienen una molécula de ADN lineal bicatenaria de 36 kb en un complejo nuclear que está encapsulado dentro de una cápside icosaédrica de 240 capsómeros. Se han identificado 52 serotipos de adenovirus humanos. Pertenecen a la familia *Adenoviridae*, género Mastadenovirus y se dividen en siete subgrupos (A a la G) en función de las características de la hemaglutinación. (Berk AJ, 2007).

Los adenovirus pueden causar una amplia variedad de síndromes clínicos. El sitio de entrada del virus parece determinar con frecuencia el sitio primario de la enfermedad, como sucede en la propagación de la enfermedad respiratoria aguda por gotas respiratorias o de la diarrea infantil por transmisión fecal-oral, mientras que otras enfermedades limitadas a un órgano, como la cistitis hemorrágica probablemente se deben a una fase virémica de la infección. Puede persistir en células epiteliales y tejido linfático del tracto respiratorio inferior de individuos sanos. La detección de la misma cepa aislada previa a tratamiento inmunosupresor, sugiere la reactivación endógena.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes de la infección por adenovirus se definen a continuación en la tabla 1.

Tabla 1: Definiciones de procesos infecciosos que pueden ser atribuibles a infección por adenovirus:

Proceso infeccioso	Definición
Neumonía	Infección pulmonar aguda que se manifiesta por los siguientes síntomas y signos: Tos, fiebre, taquipnea, dificultad respiratoria, estertores bronquiales y broncoalveolares, saturación de oxígeno menor del 94%. Radiografía con infiltrado intersticial
Colitis	Enfermedad caracterizada por evacuaciones disminuidas de consistencia con o sin sangre mas la presencia de dolor adominal.
Hepatitis	Incremento en las enzimas hepáticas (transaminasas) más de 3 D.E. para la edad.
Nefritis	Incremento de creatinina y BUN por arriba de los límites para la edad
Encefalitis	Enfermedad caracterizada por alteraciones del estado de alerta, cefalea, crisis convulsivas, datos de focalización con un líquido cefalorraquídeo anormal.
Cistitis hemorrágica	Presencia de hematuria grado 2 o mayor.
Sepsis	Presencia de datos de respuesta inflamatoria sistémica más la sospecha clínica o probada de infección.

DIAGNOSTICO

Para el diagnóstico de infección por adenovirus se cuenta actualmente con las siguientes técnicas: cultivo viral, pruebas serológicas, inmuno-ensayo enzimático, inmunofluorescencia directa y técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tanto en tiempo real como convencionales (Ljungman P, 2010).

En pacientes gravemente inmunocomprometidos altos niveles de ADN de adenovirus en sangre periférica, correlacionan con una mortalidad asociada a adenovirus. Así mismo un incremento en la carga viral es predictivo de eventos mortales asociados a infección por este virus.

TRATAMIENTO

No existen estudios controlados para el tratamiento de infecciones por adenovirus. La disminución en la inmunosupresión parece ser efectiva en algunos casos y debe considerarse siempre que sea posible. Por otro lado, el cidofovir ha demostrado tener actividad *in vitro* contra adenovirus.

Existen varios reportes de casos y series de casos con el uso de cidofovir, el cual ha demostrado ser útil *in vitro* para disminuir la carga viral de adenovirus y otros virus. La dosis de inducción es de 5mg/kg/semana por 2 semanas, posteriormente 5mg/kg cada 2 semanas. La nefrotoxicidad es el mayor riesgo de usar cidofovir y se recomienda la administración de probenecid y vigilancia estrecha de la función renal (Lindemans CA, 2010).

VIRUS BK

El virus BK es un poliomavirus pequeño (45 nm), de doble cadena de ADN, sin envoltura, que pertenece a la familia *Papovaviridae*, dentro de la que también se encuentran los virus JC y el virus simiano SV-40. Su nombre proviene de las iniciales de un paciente con trasplante renal, en el que se documentó por primera vez una estenosis ureteral por virus BK. El virus BK es específico de la especie humana. (Randhawa 2006).

La fuente de transmisión del virus BK es incierta pero solo se transmite de persona a persona y no desde animales. El virus se ha aislado en muestras de orina,

sangre, semen, biopsias de piel, así como aspirados nasofaríngeos de niños con infecciones respiratorias.

La seroprevalencia de la infección por virus BK varía entre el 60% a 80% en población general. (Chatzidimitriou 2010). Un estudio de 400 donadores de sangre demostró que el 82% era portador de virus BK (Egli 2009).

La infección primaria se presenta en la infancia y persiste en las células epiteliales de los túbulos renales sin causar enfermedad. La manifestación más frecuente asociada a la primoinfección por virus BK es una infección de vías respiratorias altas. Después de esta primoinfección, el virus entra en una fase latente en varios tejidos (portador asintomático), particularmente del tracto genitourinario y tejido hematolinfoide. Periódicamente el virus BK se reactiva y se excreta en orina en un 5% a 10% de pacientes sanos, sin presentar síntomas (Rabi H, 2013).

DIAGNOSTICO

Cuando se sospecha de cistitis hemorrágica por infección por virus BK, el diagnóstico puede realizarse por métodos citológicos, como la búsqueda de células "en señuelo" en orina, o por métodos moleculares como PCR en sangre u orina. Las células "en señuelo" son células infectadas por el poliomavirus que tienen un núcleo alargado que contiene una única inclusión intranuclear basofílica. Estas células puede utilizarse como método de tamizaje para la infección por virus BK dado su menor costo y alta sensibilidad para identificar replicación viral, sin embargo, las limitantes incluyen la experiencia del observador y que resultado similares pueden presentarse con infecciones por otros virus como adenovirus y virus JC.

Los métodos moleculares que incluyen la detección del ADN del virus BK en sangre u orina, alcanzan mayores valores predictivos positivos de cistitis hemorrágica y son considerados la modalidad de elección para detectar al virus

BK. De cualquier forma hay que recordar que la detección del ADN de virus BK en orina no tiene una alta especificidad para enfermedad, ya que los pacientes sin cistitis hemorrágica también pueden excretar virus BK (Leung AYH, 2001).

La cuantificación del virus BK en plasma, especialmente cuando es superior a ciertos valores, permite obtener mayores valores predictivos positivos de enfermedad. Más aún, la cuantificación del virus BK o carga viral, permite monitorizar la evolución de los pacientes con nefropatía. Esta cuantificación se realiza por métodos de PCR en tiempo real que permiten asignar un valor absoluto en copias/ml. (Leung AYH, 2001, Laskin BL, 2013).

TRATAMIENTO

Actualmente, la piedra angular del tratamiento de las infecciones sintomáticas por virus BK consisten en la reducción del tratamiento inmunosupresor. Existen corrientes de investigación que asocian la cistitis hemorrágica por virus BK con el uso de inmunosupresores más potentes, como el tacrolimus o el micofenolato mofetilo (MMF). Los estudios no han demostrado ninguna relación entre el virus BK y un inmunosupresor en concreto, sino con la carga inmunosupresora en su conjunto. Actualmente no existen evidencias ni guías clínicas para pautas concretas sobre la modificación de la inmunosupresión en la nefropatía por BK. Los métodos más comunes son:

- Retirada o minimización del tacrolimus o el MMF.
- Sustitución del tacrolimus por ciclosporina.
- Reducción de la carga inmunosupresora en su conjunto.

Hasta la fecha no existe un medicamento que se haya probado en un ensayo clínico como efectivo contra la replicación del virus BK. El cidofovir ha sido reportado en casos y series de casos útil para disminuir la actividad del virus BK. El mecanismo por el cual tiene este efecto se desconoce.

Otros medicamentos que se han utilizado en algunos casos como profilaxis para el desarrollo de cistitis hemorrágica incluyen el ciprofloxacino y la leflunomida. (Dropulik LK, 2008).

4. ANTECEDENTES

ADENOVIRUS:

El adenovirus es una infección reconocida cada vez con más frecuencia como una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos; especialmente en pacientes con supresión severa de la función de las células T, como son los pacientes con TCPH. Los niños se ven más afectados por este virus que los adultos (Legrand F, 2001, Lion T, 2003, Matthes-Martin S, 2012).

La infección por adenovirus en pacientes con TCPH puede ser adquirida, o el resultado de la reactivación de infecciones latentes (portador asintomático) o persistentes que, en pacientes inmunocompetentes, serían controladas por el sistema inmune. Su incidencia varía entre 5% a 47% y de estos un 50 a 80% desarrolla enfermedad invasiva severa (Robin M, 2007).

El principal factor de riesgo tanto para infección como para enfermedad diseminada o letal por adenovirus es la depleción de células T in vivo o ex vivo y también los regímenes de acondicionamiento que contienen Alemtuzumab.

El EICH grave requiere tratamiento inmunosupresor intenso y prolongado y se ha asociado en algunos estudios a un mayor riesgo de infección o enfermedad por adenovirus. Un recuento absoluto de linfocitos <200/mcL en sangre periférica, se ha asociado a un mayor riesgo de infección y enfermedad por adenovirus.

Otros estudios han demostrado que la ausencia de células T específicas contra Adenovirus tiene un impacto negativo en la incidencia y el curso de la infección por adenovirus en términos de duración y mortalidad.

Los pacientes con trasplante de cordón umbilical también se han asociado a un mayor riesgo de infección y enfermedad por adenovirus.(Matthes-Martin S, 2012).

Otros factores asociados a infecciones graves por Adenovirus incluyen: el uso de radiación corporal total como parte del régimen acondicionamiento y aislamiento de adenovirus en más de un sitio anatómico como heces, orina o secreciones respiratorias.

En resumen, el riesgo de desarrollar infección por adenovirus depende de varios factores relacionados al trasplante:

Riesgo bajo: trasplante autólogo.

Riesgo intermedio: trasplante alogénico sin EICH.

Riesgo alto: trasplante alogénico con depleción de células T, relacionado o no relacionado, HLA “mismatched”, pacientes con EICH recibiendo corticoides.

Riesgo muy alto: EICH refractaria, trasplante con sangre de cordón, depleción intensa de células T y uso de anticuerpos anti-células T.

La infección por adenovirus se puede presentar de forma asintomática, local o diseminada. La enfermedad diseminada se acompaña de una alta mortalidad (Legrand F, 2001, Matthes-Martin S, 2012).

Los primeros síntomas de la enfermedad por adenovirus en pacientes con TCPH frecuentemente son fiebre, enteritis, elevación de las enzimas hepáticas y pancitopenia secundaria.

El espectro de enfermedad asociada a adenovirus en TCPH varía entre síntomas gastrointestinales menores o síntomas respiratorios hasta colitis hemorrágica grave, cistitis hemorrágica, nefritis, hepatitis, neumonía, encefalitis, miocarditis e involucro de múltiples órganos, frecuentemente asociados a falla hepática.

La enfermedad fatal por adenovirus se ha reportado en un 13% a 50% de los pacientes infectados, siendo la enfermedad por adenovirus la causa de mortalidad relacionada al trasplante en 2% a 6% de los pacientes de alto riesgo (Matthes-Martin S, 2012).

En población pediátrica solo existen 12 estudios epidemiológicos, con un total de 1370 pacientes trasplantados, de donde se obtiene una incidencia promedio de viremia por adenovirus entre el 6% y el 28%. La incidencia incrementa significativamente en el contexto de la depleción de células T. En adultos se reporta una incidencia entre 0% y 6% en 3 estudios. En general, la población pediátrica tiene un mayor riesgo de infección y enfermedad por adenovirus después del TCPH. (Howard M, 1999, Jeulin 2011, Matthes-Martin S, 2012).

La búsqueda en heces de ADN de adenovirus y su monitorización seriada puede facilitar la detección temprana de una inminente viremia y guiar el uso de tratamiento anticipado en pacientes con riesgo elevado.

Estudios han demostrado que la detección de ADN viral en muestras de heces se asocia en un 30% a 46% a síntomas entéricos (Lion T, 2003). En el caso de documentarse viremia posterior a un TCPH entre el 50% y el 82% de los pacientes permanecerán asintomáticos con o sin tratamiento anticipado.

La detección en heces de ADN de adenovirus se ha reportado entre un 43% y 50% de los pacientes post TCPH (Bil-Lula I, 2010, Mynarek M, 2014). Se ha reportado que la excreción de ADN de adenovirus en heces puede preceder a la presencia de ADN en sangre periférica y en menor frecuencia puede presentarse de manera simultánea en heces y sangre. En pacientes con cargas virales en heces $>10^6$ copias/ml de heces se han documentado cargas virales en sangre periférica $>10,000$ copias/ml (Mynarek M, 2014).

Un estudio reportó que la carga viral en heces precede a la aparición de ADN en sangre en un promedio de 42 días (rango 3 a 199 días) en los pacientes con infección sistémica (Jeulin H, 2011).

La enfermedad por adenovirus generalmente ocurre entre el mes 2 a 3 post-trasplante y los estudios de monitorización de carga viral han demostrado que el tiempo medio para la primera detección de ADN viral en heces, orina o sangre periférica varía entre el día +12 y el día +44 (Lion T, 2003, van Tol MJ, 2005). Aunque algunos pacientes con viremia pueden permanecer asintomáticos y aclarar la infección espontáneamente, otras infecciones por adenovirus pueden progresar, con un rápido incremento de la carga viral y llegar hasta la falla orgánica múltiple.

Actualmente no existen valores de corte internacionales estandarizados bien definidos. Algunos centros utilizan un incremento en la carga viral $\leq 4 \log_{10}$ copias/ml en sangre y $>6 \log_{10}$ copias/ml en heces, para identificar a los pacientes con riesgo incrementado de enfermedad por adenovirus (Matthes-Martin S, 2012). En pacientes de alto riesgo, especialmente aquellos con niveles bajos de células T y con EICH grave, la viremia frecuentemente se asocia a progresión y diseminación de la enfermedad (Ljungman P, 2010).

Por todo lo anterior, los estudios basados en PCR se han establecido como la herramienta diagnóstica estándar para una rápida, específica, cuantitativa y altamente sensible identificación de adenovirus en diferentes tipos de muestras.

Debido a que la viremia y un incremento en la carga viral son predictores de enfermedad por adenovirus, la monitorización seriada con PCR puede ser una herramienta útil para identificar a los sujetos en mayor riesgo y que podrían beneficiarse de recibir tratamiento anticipado.

VIRUS BK

La infección por virus BK se presenta comúnmente en el periodo post-injerto temprano, es decir, del primero al sexto mes post trasplante.

Aproximadamente el 50% de los pacientes con TCPH presentarán BK viruria (infección asintomática) en los primeros 2 meses post trasplante (Dropulik LK, 2008).

La incidencia de BK viruria es similar en los pacientes con trasplante alogénico (46% a 53%) y en autólogo (39% a 54%).

Debido al tropismo que tiene el virus BK por el epitelio genitourinario, la manifestación más frecuente de la infección por virus BK es la afección del tracto genitourinario.

En pacientes inmunocomprometidos, como lo es el paciente con TCPH, el virus BK puede causar un variedad de manifestaciones clínicas, incluyendo la hematuria asintomática, cistitis hemorrágica, estenosis ureteral y nefritis tubulointersticial (Petrogiannis-Haliotis 2002, Rabi H, 2013).

La cistitis hemorrágica es la complicación más frecuente en los pacientes post TCPH, con una incidencia del 10% al 25% y se asocia con una morbilidad y mortalidad significativa (Cesaro S, 2008, Dropulik LK, 2008, Rabi H, 2013, Gargiulo G, 2014).

Actualmente se cree que la infección por virus BK durante el TCPH se debe a una reactivación del virus latente aunque una nueva infección o reinfección también se ha postulado (Laskin BL, 2013).

Múltiples estudios han evidenciado que la BK viruria (presencia de virus BK en la orina) precede o coincide con el inicio de la cistitis hemorrágica, aunque también 40% a 50% de los pacientes con BK viruria persistente permanecen libre de enfermedad (Dropulik LK, 2008). Esto indica que otros factores como la intensidad del régimen de acondicionamiento, EICH agudo, inmunosupresión grave, donador no relacionado y la presencia de anticuerpos anti IgG contra virus BK antes del trasplante, se asocian al desarrollo de cistitis hemorrágica.

Se ha documentado la asociación entre la cistitis hemorrágica y el virus BK, en donde los pacientes con cistitis hemorrágica tenían picos mayores de BK viruria y excretaban al virus en orina por mucho más tiempo. En un estudio se documentó que los pacientes con cargas virales en plasma mayores a 10^4 copias/ml tienen un riesgo significativamente mayor para desarrollar cistitis hemorrágica (Erard V, 2005).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) en pacientes pediátricos, es una terapia relativamente nueva, estándar para el tratamiento de diferentes enfermedades hematológicas benignas, hemato-oncológicas, genéticas, errores innatos del metabolismo y algunas inmunodeficiencias, siendo en algunas de ellas la única terapia curativa.

Los avances que han ocurrido en los últimos años han permitido lograr una tasa de respuesta de la enfermedad en 50-90% de los casos según la patología; sin embargo, hoy en día es aún una terapia de alto riesgo, presentando complicaciones que pueden poner en peligro la vida del paciente o deteriorar su calidad de vida. Conforme han incrementado las alternativas de trasplantes de progenitores hematopoyéticos, se ha necesitado mayor y más profunda depleción de células T.

Las infecciones, junto con la enfermedad injerto contra huésped (EICH), son la principal causa de morbilidad y mortalidad posterior al trasplante. En los receptores de TCPH alogénico, el riesgo de infección persiste hasta que ocurre la reconstitución inmune, que se presenta 12-24 meses posteriores al trasplante.

Cada vez existe mayor evidencia de que los virus adquiridos en la comunidad son causa creciente de morbilidad y mortalidad en estos pacientes, y por lo tanto también causa de fracaso del trasplante.

Con el advenimiento de nuevas técnicas diagnósticas, principalmente por técnicas moleculares se ha reconocido al virus BK y adenovirus como virus causantes de infección en pacientes post TPH. La excreción en heces de Adv precede a su presencia en sangre. Un incremento rápido y sostenido de la carga viral en sangre se asocia con la ocurrencia de enfermedad grave en niños. La BK viruria $>10^4$

copias/ml se ha asociado significativamente al riesgo de desarrollar cistitis hemorrágica, aunque actualmente algunos estudios han empezado a documentar que la viremia por virus BK puede ser de mayor utilidad para la identificación de paciente en riesgo de cistitis hemorrágica.

La mayoría de la información sobre estas infecciones viene de población adulta. En niños con TPH es poco lo que se conoce acerca del comportamiento de la carga viral en diferentes líquidos corporales y las manifestaciones clínicas de estas infecciones. Más aún no encontramos información científica generada en América Latina, por lo que consideramos fundamental la realización de este estudio inicialmente de tipo descriptivo, para tratar de determinar el papel de estos virus en el campo del TPH en nuestra población pediátrica. Posteriormente se podrá seguir su estudio enfocado esfuerzos hacia factores de riesgo y mortalidad.

Por lo mencionado anteriormente se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el comportamiento de la carga viral de adenovirus y virus BK en pacientes post trasplante de células progenitoras hematopoyéticas?

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el comportamiento molecular y clínico de la infección por adenovirus y virus BK en pacientes post trasplante de células progenitoras hematopoyéticas?

7. JUSTIFICACIÓN

El trasplante de progenitores hematopoyéticos se utiliza cada vez con mayor frecuencia como parte del tratamiento de enfermedades hematológicas malignas y no malignas. Los desarrollos más recientes en regímenes de preparación y manipulación del injerto, principalmente con depleción de células T, así como el control de las infecciones post TCPH, han influido en el momento de aparición y epidemiología de las infecciones virales.

En los últimos años se ha empezado a reconocer que las infecciones por Adenovirus y virus BK son causas importante de complicaciones infecciosas con una considerable morbilidad y mortalidad asociada en pacientes pediátricos con TCPH.

La mayoría de la información sobre la infección por virus BK y adenovirus viene de población adulta. En niños con TCPH es poco lo que se conoce acerca del comportamiento de la carga viral en diferentes líquidos corporales y las manifestaciones clínicas de estas infecciones. Más aún no encontramos información científica generada en América Latina, por lo que consideramos fundamental la realización de este estudio inicialmente de tipo descriptivo, para tratar de determinar el papel de estos virus en el campo del TCPH en nuestra población pediátrica.

Es importante señalar que esta terapia requiere de una infraestructura compleja con personal altamente capacitado y medicamentos muy costosos. Involucra mucho esfuerzo y paciencia de parte del personal de salud, pacientes y familiares. Requiere un tiempo prolongado de hospitalización en aislamiento lo que pone en riesgo la calidad de vida del paciente.

Por lo tanto, para que este tratamiento pueda ser más accesible es necesario disminuir la morbi-mortalidad. Al conocer mejor el comportamiento de virus como

el BK y el adenovirus, que son causas frecuentes de infecciones en estos pacientes, podremos hacer diagnósticos más precisos e iniciar tratamiento oportunos, disminuyendo la posibilidad del fracaso del trasplante.

8. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Describir el comportamiento de la carga viral de adenovirus y virus BK y sus manifestaciones clínicas, en pacientes post trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Determinar la carga viral en diferentes líquidos corporales (sangre y heces) de adenovirus en pacientes post TCPH.

Determinar la carga viral en diferentes líquidos corporales (sangre y orina) de virus BK en paciente post TCPH.

Correlacionar las cargas virales con las manifestaciones clínicas de la infección por adenovirus y virus BK en pacientes post TCPH.

9. HIPÓTESIS

Hipótesis: La monitorización molecular semanal de adenovirus y virus BK en pacientes post TCPH, permitirá identificar la infección y describir el comportamiento de la carga viral de estos virus.

10. MÉTODOS

DISEÑO DE ESTUDIO:

Tipo de estudio: Prospectivo, descriptivo, longitudinal, seguimiento de una cohorte

Periodo de estudio: marzo de 2015 a marzo de 2017.

Lugar de estudio: Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG)

TAMAÑO MUESTRAL:

Dada la naturaleza descriptiva del estudio, se incluirán a todos los pacientes que cumplan los criterios de inclusión durante el periodo de estudio.

Basados en que en 2014 se realizaron 17 trasplantes de CPH, se planea completar una muestra de 20 pacientes (18 meses de inclusión de pacientes) para el estudio.

POBLACIÓN DEL ESTUDIO:

Criterios de inclusión:

Pacientes de 1 a 18 años, de ambos sexos, que se ingresen a la unidad de trasplantes para realizarles un trasplante de células progenitoras hematopoyéticas

Criterios de exclusión:

Pacientes cuyo cuidador primario no acepte participar en el estudio.

Criterios de eliminación:

Pacientes que en algún momento deseen salir del protocolo.

Pacientes de los que no se cuente con el 90% de las muestras.

Pacientes que presenten pérdida del injerto o recaída de la enfermedad.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

A todos los pacientes que ingresen a la unidad de trasplantes del HIMFG para la realización de TCPH se les invitará a participar en el protocolo. Se realizará el proceso de obtención del consentimiento informado por escrito y asentimiento del menor (cuando sea el caso).

Se obtendrán del expediente clínico datos epidemiológicos y demográficos durante el tiempo que el paciente permanezca en el estudio.

Desde el día -7 y hasta el día +180, se tomará de manera semanal una muestra de sangre (2ml) y una muestra de heces para la realización de PCR en tiempo real (PCR-TR) para adenovirus. En la misma muestra de sangre y en una muestra de orina se realizará con los mismos intervalos de tiempo la detección de PCR-TR para virus BK.

Las muestras serán tomadas los días lunes por la mañana en la unidad de trasplantes (junto con las muestras que se toman de manera rutinaria cada semana a estos pacientes). Si el paciente fue egresado de la unidad de trasplante, la muestra se tomará en la quimioterapia ambulatoria (lugar donde se toman las muestras de estos pacientes para su seguimiento semanal en la consulta externa de trasplantes).

Los sujetos de investigación terminarán su participación en el protocolo el día +180 post trasplante.

DETECCIÓN CUANTITATIVA DE ADENOVIRUS

Se realizará la detección cuantitativa de la carga viral de Adenovirus, mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) utilizando el kit comercial Light Mix[®]

y el equipo LightCycler® Roche Diagnostics. Se preparará una curva estándar previo a la cuantificación de las muestras (Ver en Anexo 4) .

DETECCIÓN DE VIRUS BK

Se realizará la detección de virus BK a través de la cuantificación de ADN por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) mediante el kit comercial Light Mix®, utilizando el termociclador LightCycler®. Las características específicas de la prueba pueden verse en el anexo 5.

11. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Con base en las disposiciones del reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (DOF 02-04-2014), esta investigación se clasifica como una categoría III con riesgo mayor que el mínimo. El volumen total de sangre a extraer durante todo el estudio no será mayor al 10% del volumen circulante.

Este estudio se apega a los principios de buena práctica clínica basados en la declaración de Helsinki. Dado que este estudio involucra población vulnerable, se toman las siguientes medidas:

Se solicitará la firma de la carta de consentimiento informado por escrito al cuidador primario (anexo 1) y carta de asentimiento del menor en aquellos pacientes mayores de 8 años de edad (anexo 2). Se brindará información acerca de los objetivos, métodos, beneficios e incomodidades del proyecto, respetando la decisión de salir del protocolo en el momento que lo decidiera, y fomentando en todo momento la seguridad del sujeto y su familia.

12. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizara estadística descriptiva, expresando los datos como promedio y desviaciones estándar para variables con distribución normal y como medianas con rangos para variables con distribución no paramétrica. Se realizarán tablas de 2x2 para comparar las variables presentes en los pacientes con enfermedad por virus BK (cistitis hemorrágica). Se generarán gráficos de los promedios de carga viral en logaritmo 10 con su desviación estándar.

13. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

En la siguiente tabla se realiza la definición operativa de variables de resultado

Tabla 2: Definición operativa de variables de resultados por adenovirus

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERATIVA	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
POR ADENOVIRUS			
Viremia por adenovirus	Presencia de ADN de adenovirus en una muestra de sangre con la prueba PCT-TR	Cuantitativa discontinua	Copias/ml
Infección por adenovirus	Presencia de ADN de adenovirus en una muestra de sangre o heces con la prueba PCT-TR	Cuantitativa discontinua	Copias/ml
Excreción de adenovirus en heces	Presencia de ADN de adenovirus heces con la prueba PCT-TR	Cuantitativa discontinua	Copias/ml
infección en sitio blanco por adenovirus	Signos y síntomas compatibles con infección en un sitio blanco* MAS PCR-TR positiva para adenovirus	Categórica binomial	Si/no
Infección diseminada poro adenovirus	La presencia de fiebre, datos de respuesta inflamatoria sistémica y afección de 2 o más aparatos y sistemas más PCR-TR positiva par adenovirus	Categórica binomial	Si/no

Tabla 3: Definición operativa de variables de resultados por virus BK

POR VIRUS BK			
Viremia por virus BK	Detección en sangre de ADN de virus BK con la prueba PCR-TR	Cuantitativa discontinua	Copias/ml
Viruria por virus BK	Detección en orina de ADN de virus BK con la prueba PCR-TR	Cuantitativa discontinua	Copias/ml
Hematuria grado 2	Presencia macroscópica de sangre en orina. Evidenciada por coloración rojiza de la orina.	Categórica binomial	Si/no
Hematuria grado 3	Presencia macroscópica de sangre en orina. Evidenciada por franca coloración rojiza de la orina con pequeños coágulos.	Categórica binomial	Si/no
Hematuria grado 4	Presencia macroscópica de sangre en orina. Evidenciada por franca coloración rojiza de la orina, con coágulos que causan obstrucción urinaria que requiere instrumentación para remover el coágulo	Categórica binomial	Si/no
Cistitis hemorrágica	Presencia de hematuria grado 2 o mayor	Categórica binomial	Si/no

* Los signos y síntomas de infección en sitio blanco dependerán del tipo de infección que se sospeche. Las definiciones de los procesos infecciosos que pueden ser atribuibles a adenovirus se encuentran en el anexo 3.

VARIABLES CONFUSORAS

Infección concomitante de adenovirus/virus BK con otro microorganismo:
Documentada por su estándar de oro: cultivos en el caso de bacterias y hongos y por biología molecular en el caso de virus, durante el mismo periodo de tiempo.

Variable categórica nominal. Escala de medición: Si/no.

14. RESULTADOS FINALES

Se analizaron 20 pacientes, de los cuales el 70% (14) fueron del sexo masculino. La edad promedio fue de 10.1 años (desviación estándar (DE) 5.9, edad mínima 1 año, edad máximo 18 años).

El tiempo promedio de permanencia en el protocolo fue de 118.7 días (16.9 semanas), con un tiempo mínimo de 21 días y un máximo de 190 días. Dado el promedio de estancia en el protocolo, se decidió que el análisis de las cargas virales, tanto de Adenovirus como de BK se realizara de los días -7 hasta el día +100, para homogeneizar los resultados.

Dentro de los desenlaces finales encontramos que el 25% de los pacientes terminó con buen apego el protocolo. 15% se dio de baja por pérdida del injerto, 10% por recaída y 5% por falla primaria al injerto. Solo un paciente (5%) dejó el protocolo por falta de apego. Hasta el momento han muerto 9 pacientes (45%), 6 (30%) fallecieron durante el protocolo y 3 (15%) en el periodo post trasplante tardío, habiendo ya terminado este protocolo. Estas últimas defunciones estuvieron todas asociadas a EICH. 2 pacientes (10%) aún se encuentran activos y en seguimiento.

Las indicaciones para la realización del trasplante fueron variadas. Los principales diagnósticos se observan en el Gráfico 1.

Gráfico 1: Principales patologías de base de los pacientes trasplantados de CPH (N= 20)

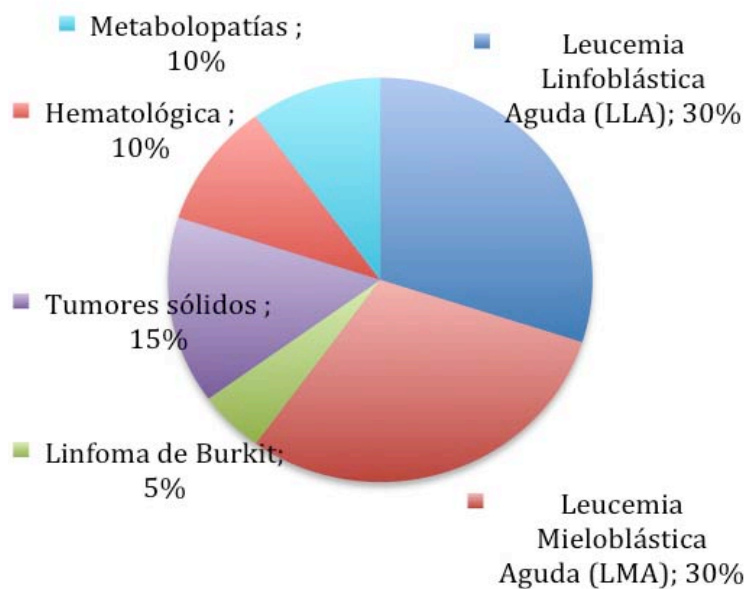


Tabla 4: descripción de las patologías de base de los pacientes a los que se les realizó TCPH.

Patologías	N	%
Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)	6	30
Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA)	6	30
Linfoma de Burkitt	1	5
Tumores sólidos		
- Neuroblastoma		
- Sarcoma de Ewing	3	15
- Tumor neuroectodérmico primitivo		
Hematológica		
- Anemia aplásica grave	2	10
- Síndrome mielodisplásico		
Metabolopatías		
- Adrenoleucodistrofia	2	10
- Mucopolisacaridosis I		

CARACTERÍSTICAS DEL TRASPLANTE

En la siguiente tabla se describen las características de los trasplantes realizados, los regímenes de acondicionamiento utilizados y si se realizó depleción de células T.

Tabla 5: Características de los trasplantes realizados

Tipo de TCPH	Tipo de donador	Producto utilizado	Régimen de acondicionamiento	Depleción de células T
Alogénico (16) 80% Haploidéntico (9) 56%	Relacionado (10) 50% Padre o Madre (8) 80% Hermano (2) 20%	Sangre periférica (17) 85%	Mieloablativo (12) 60%	Si (3) 15%
Autólogo (4) 20%	No relacionado (6) 30%	Cordón umbilical (3) 15%	Intensidad reducida (8) 40%	No (17) 85%
			Con radiación corporal total (8) 40%	

ADENOVIRUS

En la siguiente tabla se realiza una descripción de algunas características de los pacientes, sus patologías y su tipo de trasplante con la finalidad de comparar la presencia o ausencia de adenovirus en plasma, con algunos factores de riesgo previamente descritos. También se desglosan las cargas virales tomando como punto de corte > de 100 copias y > de 1000 copias en un intento de observar si existen diferencias importantes.

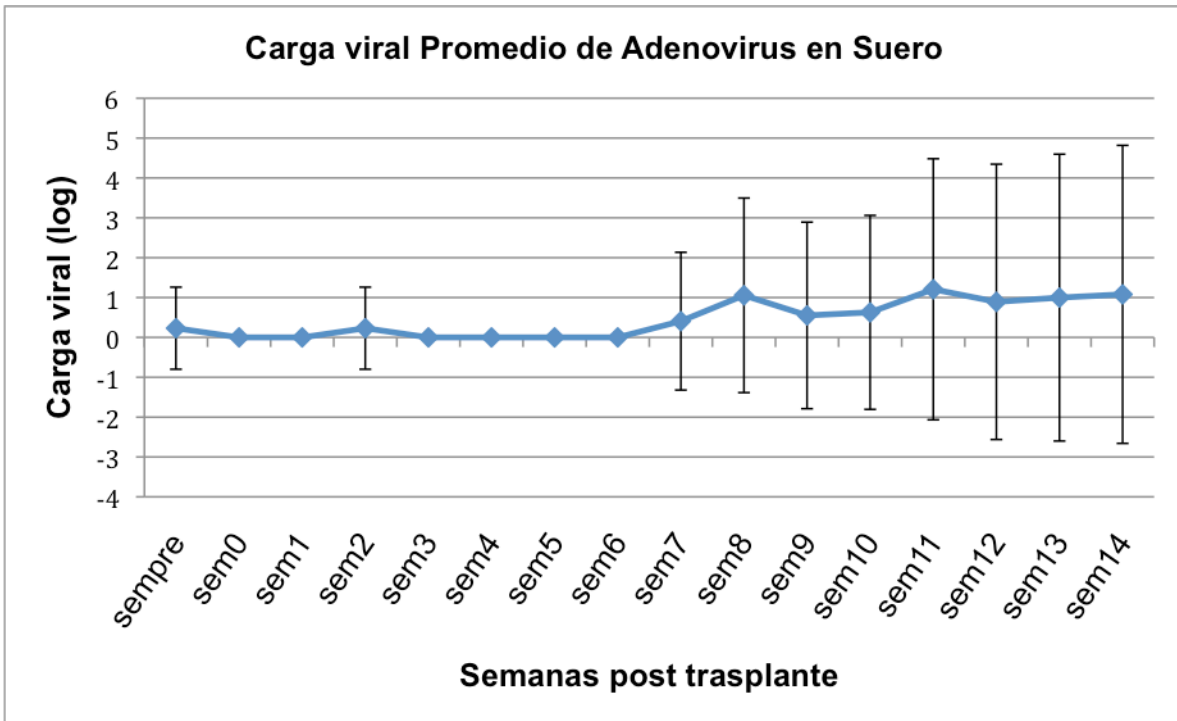
Tabla 6: Características de los pacientes y cargas virales pico de adenovirus en plasma:

Característica	N	%	Negativa N (%)	Positivas (>100c) N (%)	Positivas (>1000c) N (%)
Edad < 5 años	8	40	7 (87.5)	1 (12.5)	0 (0%)
Edad > 5 años	12	60	7 (58)	5 (41.6)	4 (33.3)
Acondicionamiento mieloablatoivo	12	60	9 (75)	3 (25)	3 (25)
Acondicionamiento no mieloablatoivo	8	40	5 (62.5)	3 (37.5)	1 (12.5)
Depleción de Células T	3	15	2 (66.6)	1 (33.3)	1 (33.3)
Trasplante alogenico	16	80	10 (62.5)	6 (37.5)	4 (25)
Donador relacionado	10	62.5	4 (40)	4 (40)	2 (20)
Donador no relacionado	6	37.5	2 (33.3)	4 (66.6)	2 (33.3)
Trasplante autólogo	4	20	4 (100)	0 (0)	0 (0)
EICH	8	40	6 (75)	2 (25)	1 (12.5)
Patología hemato- oncológica	13	65	8 (61.5)	5 (38%)	3 (23)
Patología no hematológica	7	35	6 (85.7)	1 (14.2)	1 (14.2)

En el periodo pre trasplante, solo un paciente de 3 años (5%), presentó una carga viral en suero de 100 copias al día -7, posteriormente este mismo paciente ya no volvió a tener cargas virales detectables.

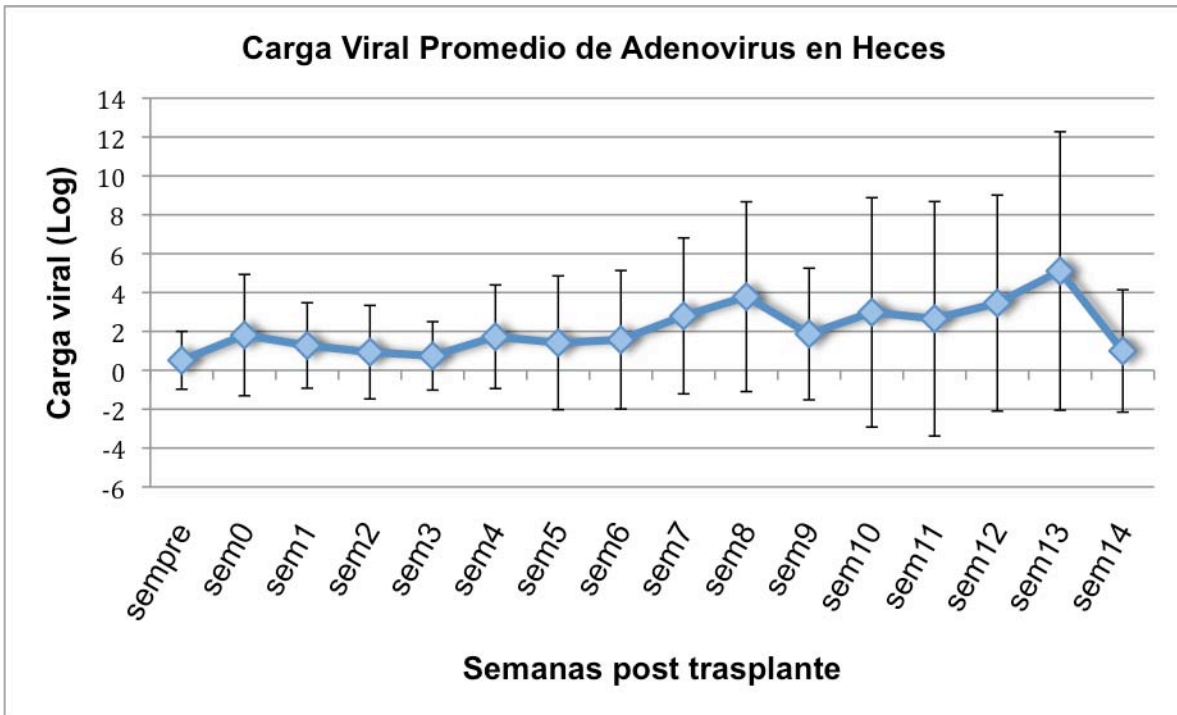
En el periodo post TCPH se encontró por lo menos una carga viral positiva de al menos 100 copias en 30% de los pacientes. Si tomáramos como punto de corte una carga viral mayor a 1000, como se encuentra reportado en algunos artículos (Mynarek M, 2014) tendríamos una incidencia del 20%, sin embargo no existen puntos de corte específicos, por lo que en este trabajo se describirán como positivas todas las pruebas en las que se detecte ADN de adenovirus, lo mínimo detectable son 100 copias.

El día en el que la mayor cantidad de pacientes presentaron carga viral positiva en suero fue el +56 (semana 8), encontrándose positiva en 16.7% de los pacientes. Se presentaron otros dos picos al día +77 (semana 11) (13.3% de los pacientes) y al día +147 (semana 21) (14.3%). Los pacientes que presentaron cargas virales en suero positivas en el periodo post trasplante, tenían entre 11 y 16 años. En ningún paciente menor de 11 años se detectó la presencia de adenovirus en sangre.



En heces, se encontró por lo menos una carga viral positiva de al menos 100 copias en 90% de los pacientes. Se encontraron pruebas positivas desde la semana -1 y 0 en 10.5% y 30% respectivamente. Posterior al trasplante se observa un incremento paulatino de pacientes con cargas virales positivas, presentando sus picos máximas a las 8 (día +56) y 13 semanas (día +91), encontrándose en ambos momentos, cargas virales positivas en heces en el 50% de los pacientes.

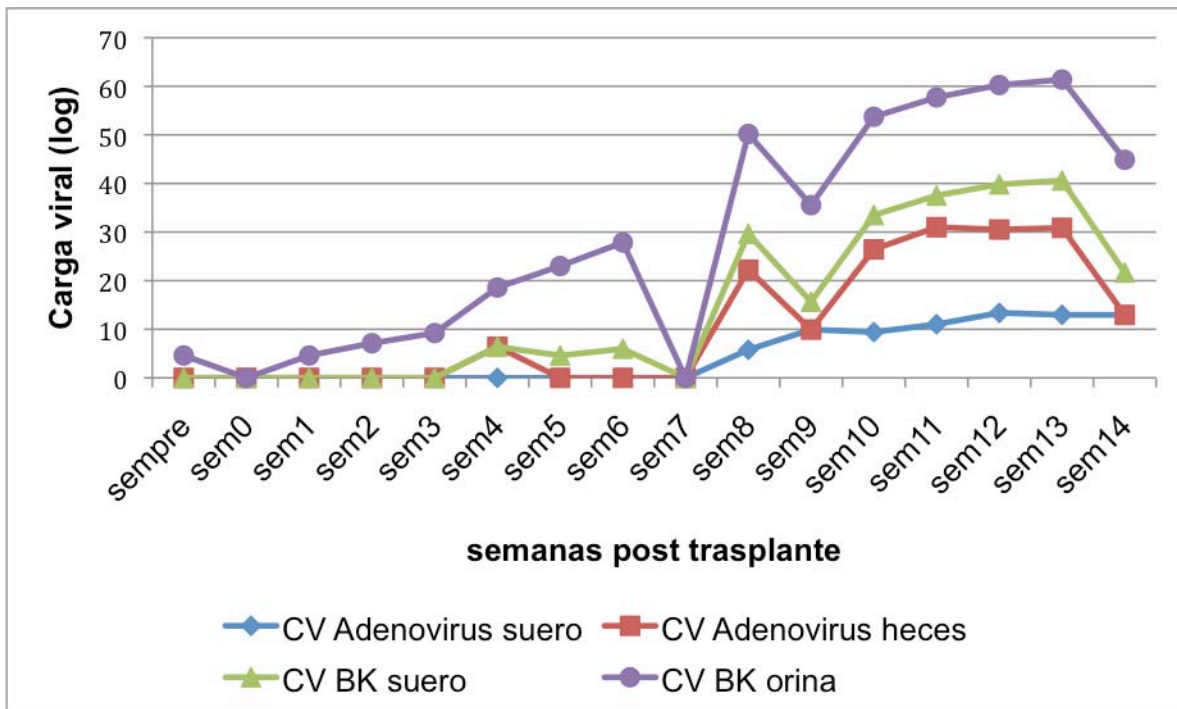
En las siguientes gráficas podemos observar el comportamiento de las cargas virales para adenovirus en suero y en heces. Se observan en el eje de las Y los promedios en logaritmo base 10 de las cargas virales de todos los pacientes que se encontraban en seguimiento en ese momento, en el eje de las X se observan las semanas post trasplante. Podemos observar las desviaciones estándar positivas y negativas de las cargas virales, reportándose por semana, hasta la semana 14 o día +100.



MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE ADENOVIRUS

Solo 1 paciente presentó manifestaciones clínicas de enfermedad por Adenovirus. Se trata de un masculino de 15 años, con diagnóstico de base de LMA, quien recibió un régimen de acondicionamiento no mieloablativo con radiación corporal total. No se le hizo depleción de células T. Se le realizó un trasplante alogénico, haploidénito, de donador relacionado (madre) que injerta adecuadamente. Al día +63 (semana 9) presentó evacuaciones diarreicas persistentes. Al día +98 (semana 14) presenta datos de colitis hemorrágica y fallece posterior a esto. En la gráfica 2 se puede observar la evolución del paciente.

Gráfico 2: Comportamiento de cargas virales de Adenovirus y BK en paciente 1



Evolución clínica:

Semana 8: Inicia con leucopenia y neutropenia que persisten hasta la semana 14.

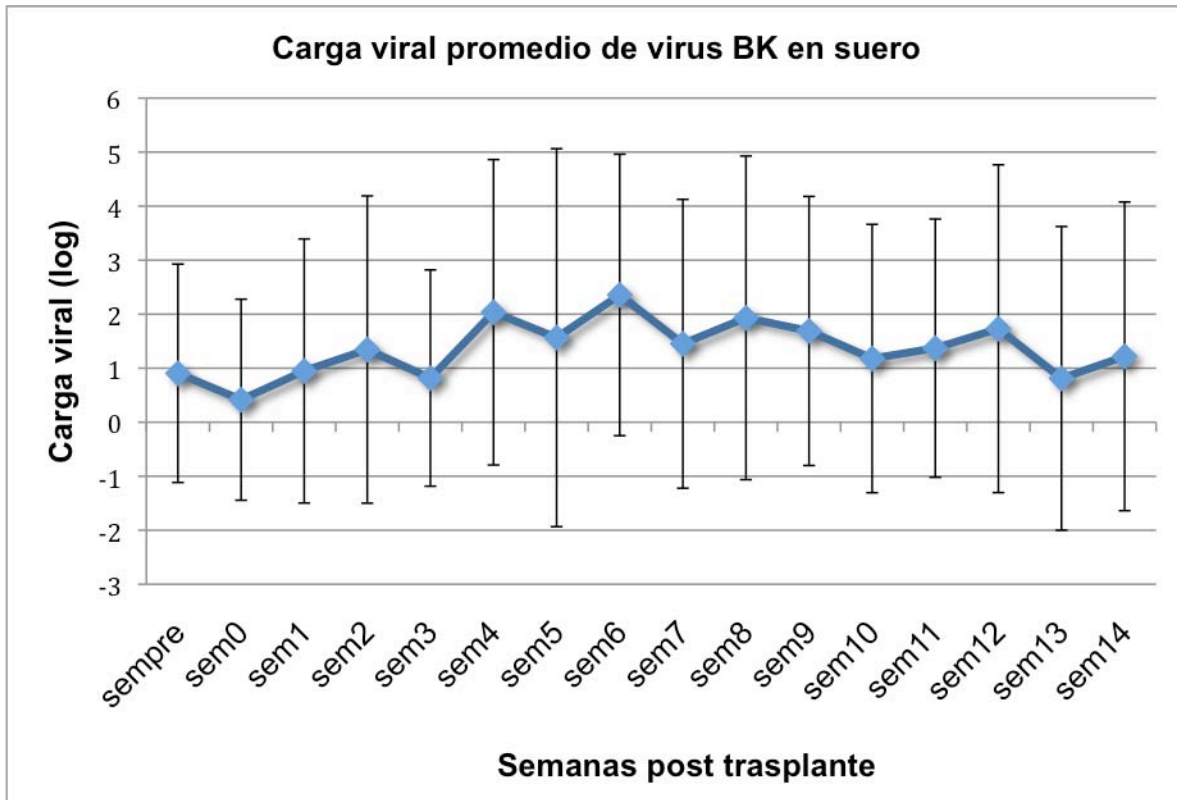
Semana 9: Presenta evacuaciones diarreicas que se mantienen hasta la semana 14, así como cistitis hemorrágica que se observa hasta la semana 14.

Semana 14: Evoluciona a colitis hemorrágica, persistiendo con cistitis hemorrágica. Cursa con anemia, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, transaminasemia y elevación de GGT. Sepsis relacionada a catéter por *E. Faecium* y mucormicosis. Cursó con EICH cutáneo, hepático e intestinal grado III y recibió tratamiento inmunosupresor con Ciclosporina A, Mofetilmicofenolato, Infliximab y Ciclofosfamida.

VIRUS BK

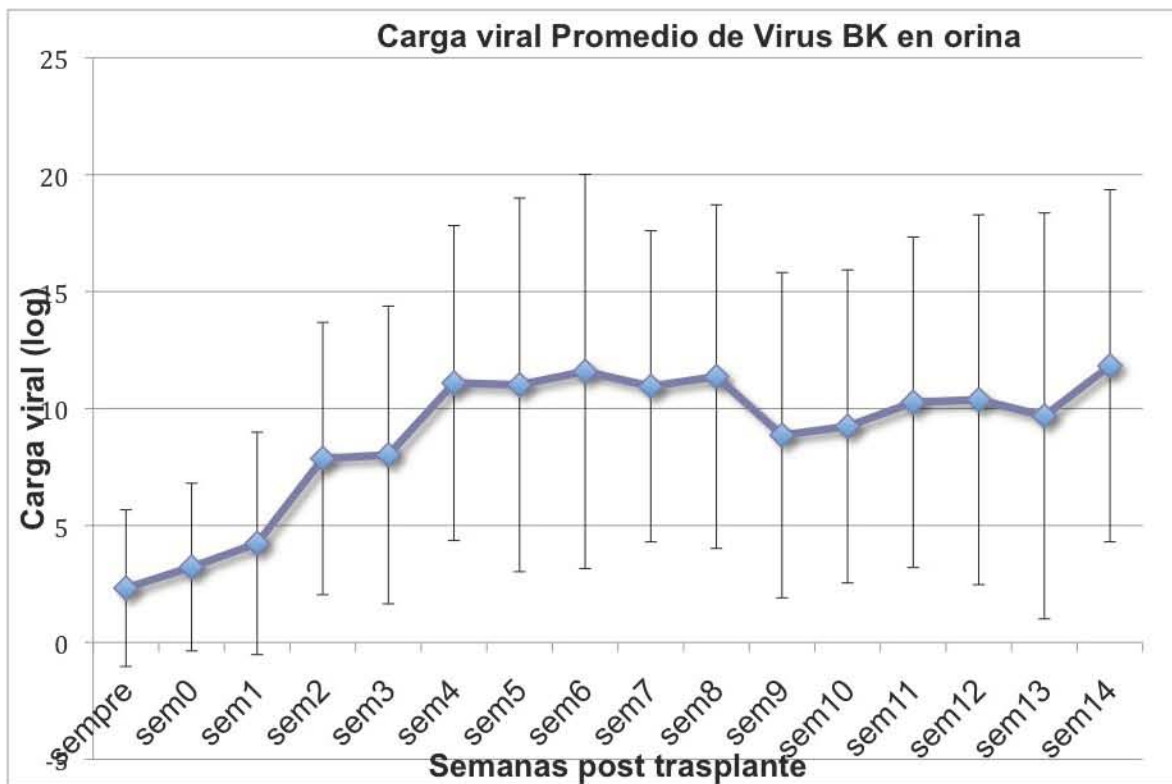
Desde el día -7 pretrasplante se pudieron observar cargas virales positivas en plasma. Se encontró positiva en el 17.6% de los pacientes evaluados.

Pudimos observar que las cargas virales se comportan de manera variable, pero en general se mantienen estables, con un máximo de pacientes positivos de 37%, siendo más frecuente encontrarlas positivas a partir de la semana 4, (36.8% positivos). Observamos los picos más altos en las semanas 4 (36.8%), 8 y 9 (33.3%), 19 y 20 (37.5%) y 26 (33.3%). Lo que demuestra que el virus BK se mantiene en sangre durante todo el periodo post trasplante.



En contraste con estos datos, se observó que las cargas virales de virus BK en orina se encuentran positivas en el 37.5% de los pacientes en la semana -1 y 0, inclusive en los niños de un año (50%). Los pacientes positivos van incrementando progresivamente y al final el 100% de los pacientes tienen el virus en orina. En las

primeras 2 semanas las cargas se encuentran valores bajos de carga viral, incrementándose paulatinamente posterior a la segunda semana, alcanzando en algunos pacientes cifras elevadas.



CISTITIS HEMORRÁGICA

3 pacientes (15%) desarrollaron cistitis hemorrágica, todos del sexo masculino. Las características del trasplante y las presencia de EICH se resumen en la siguiente tabla:

Tabla: Características de los pacientes con y sin cistitis hemorrágica

	Sin Cistitis Hemorrágica (n=17) (85%)	Con Cistitis Hemorrágica (n= 3) (15%)	P
Trasplante alogénico			0.34
No	4 (23.5)		
Si	13 (76.4)		
Régimen Mieloablativo			0.30
No	6 (35.2)	2 (66.6)	
Si	11 (64.7)	1 (33.3)	
Depleción de células T			0.33
No	15 (88.2)	2 (66.6)	
Si	2 (11.7)	1 (33.3)	
Edad < 5 años			0.21
No	11 (64.7)	3 (100)	
Si	6 (35.2)	0 (0)	
EICH			0.02
No	12 (79.5)	0 (0)	
Si	5 (29.4)	3 (100)	
Edad (promedio)	9 años	16 años	0.05

Se realizó un análisis multivariado preliminar para detectar factores de riesgo (a sabiendas del pequeño tamaño de muestra) en donde el régimen de acondicionamiento y la depleción de células T, podrían sugerir un mayor riesgo de cistitis hemorrágica, sin lograr una significancia estadística.

15. DISCUSIÓN

Dentro de los objetivos específicos de este trabajo se encuentra el describir el comportamiento de la carga viral de adenovirus en plasma y heces en los pacientes post TCPH.

Encontramos que la presencia de adenovirus en plasma y heces es frecuente. Se encontró por lo menos una carga viral positiva de al menos 100 copias en 30% de los pacientes. En heces se encontró al menos una carga viral positiva de más de 100 copias en el 90% de los pacientes. Esto correlaciona con lo reportado en la literatura. Por ser una muestra muy pequeña de pacientes no es posible hacer un análisis multivariado para detectar factores de riesgo para la infección. Cabe mencionar que nuestro punto de corte para reportar una prueba como positiva es muy pequeño y es probable que por esto encontremos una incidencia tan alta. Igualmente

A diferencia de lo que menciona la literatura que reporta detección de en heces entre un 43 y 50% de los pacientes (Bil-Lula I, 2010, Mynarek M, 2014).

En cuanto a la edad, los mayores de 5 años fueron los que presentaron cargas virales positivas en suero con mayor frecuencia.

Otro factor de riesgo descrito en otras series de casos es el tipo de acondicionamiento administrado, siendo el mieloablativo el que confiere mayor riesgo. En este estudio el 60% de los pacientes recibieron este tipo de acondicionamiento y de estos el 25% presentó cargas virales positivas, en comparación con los que recibieron regimenes no ablativos que presentaron cargas virales positivas en un 37%. Por la toxicidad medular que confiere y la inmunosupresión secundaria se esperaría una mayor incidencia de positividad en el primer grupo de pacientes, sin embargo se encontró lo contrario. En otros estudios realizados por Mynarek en 2014 y Bil-Lula en 2010, se encontró que el método de acondicionamiento no confería un riesgo significativo.

Se ha observado que la depleción de células T es uno de los principales factores que conllevan a presentar infección por Adenovirus en plasma. En este caso, de los 3 pacientes a los que se les realizó este procedimiento, 1 (33.3%) presentó infección, igualmente en otros estudios se ha referido a este factor como no significativo.

En cuanto al tipo de trasplante se observó mayor incidencia en los que fueron de donador no relacionado, con un 66.6% de positividad vs los trasplantes de donador relacionado con una incidencia del 40%, como se esperaba, de acuerdo a la literatura.

Los trasplantes autólogos parecen un factor protector, ya que en este caso, ningún paciente presentó infección por adenovirus en plasma, sin embargo requerimos de una N mayor para poder llegar a esta conclusión.

De los niños que presentaron EICH el 75% presentaron infección por adenovirus. Se ha descrito en otras series que esta complicación conlleva a sobreinfecciones, por la misma fisiopatología de la enfermedad, pero también porque se requiere de un manejo inmunosupresor intenso, lo que conlleva a una supresión de células T, que favorece las infecciones virales. En estos pacientes es frecuente encontrar coinfecciones, como el caso de nuestro paciente que presentó infección diseminada por adenovirus, clínicamente significativa, que también presentaba coinfección con virus BK. En estos pacientes con EICH y coinfecciones virales la mortalidad es muy elevada.

Como era de esperarse se encontraron cargas virales positivas con más frecuencia en heces y también cargas virales más altas. La infección se empezó a detectar más tempranamente en heces que en plasma. Por ejemplo, las cargas virales mayores de 1000 en plasma, se empezaron a detectar a partir de la semana 7, en un paciente únicamente, siendo este el único infectado de los 20. En cambio en heces se encontraron cargas virales mayores de 1000 desde la primera

semana, en 1 paciente y para la semana 7 ya había 9 pacientes infectados, 3 de ellos con cargas virales mayores a 1000, manteniéndose consistentemente altas durante todo el periodo evaluado.

En cuanto al virus BK encontramos que las cargas virales en orina se pueden encontrar positivas desde la primera semana pretrasplante y que estas van incrementado progresiva y rápidamente hasta que el 100% de los pacientes se encuentran infectados. Llama la atención que hasta los pacientes de un año presentan cargas virales positivas en orina, describiéndose como poco frecuente, aunque posible, en la literatura.

Los pacientes que presentar cistitis hemorrágica presentaban cargas virales en orina muy elevadas, con logaritmos base 10 entre 15 y 23. En 2 de estos 3 pacientes se encontraron cargas virales pequeñas (entre 100 y 1600 copias) positivas en sangre en la semana previa, en el tercer paciente no se detectaron copias en sangre hasta la 7ª semana de haberse iniciado la cistitis. Sin embargo hubo pacientes con cargas virales en orina tan altas como las observadas en pacientes con cistitis activa, que se mantuvieron asintomáticos. Nuestro número de pacientes no es suficiente como para hacer una correlación clínica con la presencia o no de virus en sangre u orina y para fijar un punto de corte para decir que un paciente tiene riesgo o no de presentar una complicación urinaria.

Al igual que con adenovirus, se observó claramente que en los pacientes con EICH las coinfecciones virales son frecuentes y casi siempre presentan manifestaciones clínicas importantes.

Se realizó un análisis multivariado preliminar para detectar factores de riesgo (a sabiendas del pequeño tamaño de muestra) en donde el régimen de acondicionamiento y la depleción de células T, podrían sugerir un mayor riesgo de cistitis hemorrágica, sin lograr una significancia estadística.

16. CONCLUSIÓN

En este trabajo se cumplió el objetivo de describir de manera amplia el comportamiento de las cargas virales de virus BK y adenovirus en pacientes trasplantados de células progenitoras hematopoyéticas. Los hallazgos fueron muy similares a los descritos en la literatura, con algunas excepciones en cuanto a los factores de riesgo descritos. Pudimos observar que la presencia tanto de adenovirus como virus BK es frecuente en pacientes pediátricos, encontrándose en plasma y heces y plasma y orina respectivamente. Ambos se encuentran desde la etapa pretrasplante y van incrementando conforme se ve afectado el sistema inmune del paciente. Esto depende de la patología de base, el tipo de trasplante, la terapia de acondicionamiento recibida y el éxito del trasplante. Un factor muy importante para la reactivación de estos virus es la presencia de la enfermedad injerto contra hospedero. A mayor inmunosupresión se encuentra mayor carga viral y coinfecciones.

De nuestros resultados se pueden hacer hipótesis interesantes acerca de los factores de riesgo que conllevan a infecciones clínicamente significativas y a un mayor riesgo de mortalidad en los pacientes, sin embargo para que estas aseveraciones puedan ser estadísticamente significativas necesitamos continuar el protocolo para tener una mayor población de estudio.

17. LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

Dentro de las limitaciones del estudio podemos encontrar que la muestra es pequeña y no suficiente para hacer relaciones entre las cargas virales y las manifestaciones clínicas que sean significativas.

La mayoría de los pacientes presentó complicaciones que los obligó a salir del estudio, por lo que no se lograron los mismo intervalos de tiempo de duración del protocolo para todos los pacientes. Además hubo falta de apego al llevar las muestras completas al laboratorio, por lo que no contamos con todos los valores correspondientes.

18. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tiempo de estudio Total: Marzo 2015 a marzo 2017.

Basados en que en 2014 se realizaron 17 trasplantes de CPH, se planea completar una muestra de 20 pacientes.

Para esta tesis se tomarán los datos obtenidos de Marzo 2015 a Julio 2016.

Realización del marco teórico: Marzo – Abril 2015.

Análisis estadístico parcial: Marzo 2016

Análisis estadístico final: Julio 2016

Presentación de Tesis: Julio 2016

19. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alousi A, et al. Who is the better donor for older hematopoietic transplant recipients: an older-aged sibling or a young, matched unrelated volunteer?. *Blood*, 2013;121(13): 2567-2573.

Berk AJ. Adenoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007:2355-2394.

Bil-Lula I, Ussowicz M, Rybka B, Wendycz-Domalewska W, Ryczan R, et al. PCR diagnostics and monitoring of adenoviral infections in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Arch Virol*;2010(155):2007–15

Cesaro S, Facchin C, Tridello G, et al. A prospective study of BK-virus associated haemorrhagic cystitis in paediatric patients undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41:363-370.

Chatzidimitriou D, Gavriilaki E, Sakellari I, Diza E. Hematopoietic Cell Transplantation and Emerging Viral Infections. *J Med Virol*. 2010 Mar;82(3):528-38.

Dropulik LK, Jones RJ. Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation*. 2008;41:11–18.

Echavarria M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21:704-715.

Egli A, Infanti L, Dumoulin A, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* 2009; 199 (6): 837–46.

Erard V, KimHW, Corey L, Limaye A, Huang M-L, Myerson D et al. BK DNA viral load in plasma: evidence for an association with hemorrhagic cystitis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 2005;106:1130–32.

Gaytán-Morales F. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH) en Pediatría *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2013;12(3):174-181

Gaziev J, Paba P, Miano R, et al. Late-onset hemorrhagic cystitis in children after hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia and sickle cell anemia: a prospective evaluation of polyoma (BK) virus infection and treatment with cidofovir. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16:662-671.

Gluckman E, Rocha V, Chevret S. Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplant. *Transfus Clin Biol* 2001; 8:146 – 154.

Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005; 6:2-8.

Hale GA, Helsop HE, Krance RA, et al. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999;23:277–82.

Howard D, Phillips GL, Reece DE, Munn RK, Henslee-Downey J, et al. Adenovirus Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*.1999;29:1494–501.

H.S. Eng, M.S. Leffell. Histocompatibility testing after fifty years of transplantation, *Journal of Immunological Methods*. 2011; 369 1–21.

Ison MG. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2006;43:331-339.

Jeulin H, Salmon A, Bordigoni P, Venard V. Diagnostic value of quantitative PCR for adenovirus detection in stool samples as compared with antigen detection and cell culture in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Microbiol Infect* 2011;(17):1674–80.

Junghanss C, Marr KA, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, et al. Incidence and outcome of bacterial and fungal infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a matched control study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8(9): 512-20.

Laskin BL, Denburg M, Furth S, Diorio D, Goebel J, et al. BK Viremia Precedes Hemorrhagic Cystitis in Children Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(8):1175–82.

Lee SJ, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*, 2007; 110 (13): 4576-4583.

Legrand F, Berrebi D, Houhou N, et al. Early diagnosis of adenovirus infection and treatment with cidofovir after bone marrow transplantation in children. *Bone Marrow Transplantation* 2001; 27: 621-6.

Leung AYH, Seun CKM, Lie AKW, Liang RHS, Yuen KY, Kwong YL. Quantification of polyoma BK viruria in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. *Blood* 2001; 98: 1971–1978.

Lindemans CA, Leen AM, Boelens JJ. How I treat adenovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Blood*. 20010;116(25):5476-85.

Lion T, Baumgartinger R, Watzinger F, et al. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood* 2003;102(3):1114-20.

Ljungman P. Molecular monitoring of viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2010;91:596–601

Lujan-Zibermann L. Infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. In: Long SS, Prober CG, Pickering LK, editors. *Principles & practice of pediatric infectious diseases*. 3rd edition. New York: Churchill Livingstone. 2008:558–62.

McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 1971; 171:293-294.

Matthes-Martin S, Feuchtinger T, Shaw PJ, Engelhard D, Hirsch HH, et al. European guidelines for diagnosis and treatment of adenovirus infection in leukemia and stem cell transplantation: summary of ECIL-4 (2011). *Transpl Infect Dis* 2012;14:555–63.

Michaels MG, Green M. Infections in Pediatric Transplant Recipients: Not Just Small Adults *Infect Dis Clin N Am.* 2010;(24):307–18.

Munoz F. Flomenberg P. Diagnosis, treatment and prevention of adenovirus infection. Up to Date. <http://www.uptodate.com/contents/diagnosis-treatment-and-prevention-of-adenovirus-infection>. Último acceso 18 de enero de 2015.

NORMA Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, Para la atención a la salud del niño.

Petrogiannis-Haliotis T, Sakoulas G, Kirby J, et al. BK-related polyomavirus vasculopathy in a renal-transplant recipient. *N Engl J Med* 2001;345:1250-5.

Rabi H. Can we predict hemorrhagic cystitis based on BK viremia? *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;13:1137-39.

Randhawa P, Brennan DC. BK virus infection in transplant recipients: an overview and update. *Am J Transplant.* 2006; 69:2000-5.

Robin M, Marque-Juillet S, Scieux C, et al. Disseminated adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors and outcome. *Haematologica.* 2007;92(9):1254-57.

Socinski MA, Cannistra SA, Elias A, et al. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1988; 1 (8596):1194-1198.

Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:1143-1238.

Van Tol MJ, Kroes AC, Schinkel J, et al. Adenovirus infection in paediatric stem cell transplant recipients: increased risk in young children with a delayed immune recovery. *Bone Marrow Transplant* 2005;36(1):39–50.

Villasis-Keever A, Mosqueda LJ. Infecciones en trasplante de médula ósea. *Revista de Investigación clínica.* 2005;57(2):381-386.

20. ANEXOS

ANEXO 1 UTILIDAD Y APLICABILIDAD DE ESTA TESIS

La población beneficiada será la población pediátrica aquejada de enfermedades hematológicas benignas, hemato-oncológicas, genéticas, errores innatos del metabolismo y algunas inmunodeficiencias, que puedan mejorar su pronóstico o incluso resolverse con un TCPH. El estudio tendrá una gran utilidad dado que permitirá describir el comportamiento de dos virus que provocan una alta morbi-mortalidad en estos pacientes. Es algo que nunca se ha hecho en población latinoamericana y solo en cohortes pequeñas en el mundo, por lo que no se encuentra claro como se comportan, cuales son sus puntos de corte para determinar enfermedad y como se manifiestan. Es fácilmente aplicable a otros centros, ya que la medición se realiza con kits estandarizados y las manifestaciones clínicas están claramente definidas.

VALOR SOCIAL Y VALOR EN SALUD PÚBLICA:

El TCPH es un tratamiento que puede usarse para el manejo, e incluso la resolución, de muchas enfermedades pediátricas, generalmente graves, que llevan a la muerte o a un deterioro importante en la calidad de vida de estos pacientes. Al lograr determinar el comportamiento de estos virus en el periodo post TCPH, logramos un paso en la comprensión de como se presentan y manifiestan infecciones virales que causan una alta morbi-mortalidad. Al lograr la detección oportuna y el manejo adecuado de estas infecciones, disminuye el riesgo en estos pacientes y se vuelve un procedimiento menos costoso y accesible. Además al poder detectar estos virus, podemos descartar las etiologías bacterianas y micóticas, optimizando el uso coherente de antibióticos y antimicóticos, disminuyendo las resistencias a estos agentes.

ANEXO 2. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

I



“Correlación De Las Manifestaciones Clínicas Con La Carga Viral En La Infección Por Adenovirus Y Virus Bk En Pacientes Post Trasplante De Células Progenitoras Hematopoyéticas”

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Propósito del estudio

Se invita a su hijo(a) _____ para que participe en el estudio de investigación titulado “**Correlación De Las Manifestaciones Clínicas Con La Carga Viral En La Infección Por Adenovirus Y Virus BK En Pacientes Post Trasplante De Células Progenitoras Hematopoyéticas**” que se lleva a cabo en la unidad de trasplante de este hospital. El propósito del estudio es evaluar partículas en sangre, orina y heces de su hijo, que nos ayuden a identificar la presencia de 2 virus en el cuerpo de su hijo. Queremos conocer como se comportan estos virus en los pacientes que como su hijo están trasplantados de médula ósea.

Su hijo(a) ha sido invitado a participar en este estudio porque es trasplantado de médula ósea y existe la posibilidad de que después del trasplante de adquieran este tipo de infecciones por virus, por lo que pensamos que puede ser un buen candidato para este estudio.

Al igual que a su hijo(a), todos los pacientes que se trasplantan de médula ósea durante 2 años, serán invitados a participar en este estudio.

Procedimientos

Si usted acepta que su hijo(a) participe en este estudio, los procedimientos que ocurrirán consisten en:

1. De manera semanal desde el día -7 al día +100 después del trasplante de médula se tomará una muestra extra de sangre de 2ml (aproximadamente una cucharadita), de la que le toman de manera rutinaria para su seguimiento. De manera extra le solicitaremos también cada semana una muestra de orina y de heces.
2. Desde el día +101 hasta el día +180, la muestra de sangre de 2ml, de orina de heces se tomará cada 2 semanas o cuando su hijo presente síntomas que a consideración de los médicos puedan ser causado por alguno de los 2 virus que estamos estudiando.
3. Después del día +180 su hijo terminará la participación en el estudio.

Posibles riesgos y molestias

Los riesgos para su hijo(a) en este estudio consisten en un pequeño dolor al momento de sacar la muestra de sangre, sin embargo esto se hará con equipo especial para minimizar el posible malestar. También es posible que le quede un pequeño moretón.

Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio

Los beneficios de este estudio no serán directamente para su niño(a) y no recibirá un pago por la participación de su hijo(a) en este estudio.

Si bien los beneficios directos para su hijo(a) pudieran no existir, los resultados del presente estudio ayudarán a ampliar el conocimiento sobre la infección por estos 2 virus en los niños con trasplante de médula y en un futuro ayudar a buscar opciones terapéuticas.

Participación en el estudio

La participación de su hijo(a) en este estudio es completamente voluntaria. Usted está en completa libertad de retirar a su hijo(a) de esta investigación en el momento que lo desee. Si usted decide que su hijo(a) no participe en este estudio o si cambia de opinión y desea retirarlo estando ya dentro del estudio, esto no afectará o no se le negará la atención necesaria para su tratamiento en este hospital.

Privacidad y confidencialidad

La información de su hijo(a) que pueda ser utilizada para identificarlo(a) (por ejemplo: nombre,



“Correlación De Las Manifestaciones Clínicas Con La Carga Viral En La Infección Por Adenovirus Y Virus Bk En Pacientes Post Trasplante De Células Progenitoras Hematopoyéticas”

dirección y teléfono) será guardada de manera confidencial y por separado del expediente del hospital de su hijo(a). La información de su hijo(a) y de los cuestionarios que usted nos conteste solamente será identificada a través de un número único que asignaremos a su hijo(a) al inicio del estudio. Los códigos que identifiquen el número del estudio con el nombre de su hijo(a) serán resguardados confidencialmente y solo los investigadores tendrán acceso a ellos.

Personal de contacto para dudas

Los participantes de este estudio le explicarán de forma detallada toda la participación de su hijo(a) en este estudio. Si usted tiene dudas puede preguntarlas con confianza y los investigadores se la explicarán las veces que sean necesarias.

Si durante la participación de su hijo(a) en el estudio le surge alguna duda, puede contactar a las siguientes personas:

Dr. Félix Gaytán Morales (Pediatra oncólogo). Celular: 04455 3517-8718

Dra. Martha Avilés Robles (Pediatra Infectóloga). Celular: 04455 3939-1946

Declaración de consentimiento informado

Yo _____ declaro que se me ha explicado en qué consiste este estudio, además he leído y comprendido la información anterior. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis dudas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y he entiendo que los resultados obtenidos en este estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en que mi hijo(a) participe en este estudio de investigación. Se me dará una copia fechada y firmada de esta carta de consentimiento informado.

Nombre de la madre o tutor: _____ Firma _____

Fecha: _____

Nombre del padre o tutor: _____ Firma _____

Fecha: _____

Nombre del niño(a): _____

1. Testigo: _____ Firma _____

Fecha: _____ Dirección _____

Relación con el paciente _____

2. Testigo: _____ Firma _____

Fecha: _____ Dirección _____

Relación con el paciente _____

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Considero que comprendió la información descrita en este documento y que libremente da su consentimiento para que su hijo(a) participe en este estudio. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación en seres humanos y me apegó a ella.

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado: _____

Firma _____ Fecha _____ Teléfono: _____

Dirección: _____

ANEXO 3. CARTA ASENTIMIENTO DEL MENOR



“Correlación De Las Manifestaciones Clínicas Con La Carga Viral En La Infección Por Adenovirus Y Virus Bk En Pacientes Post Trasplante De Células Progenitoras Hematopoyéticas”

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ CARTA DE ASENTIMIENTO DEL MENOR

Te estamos pidiendo que participes en un estudio de investigación que se llama: **“Correlación De Las Manifestaciones Clínicas Con La Carga Viral En La Infección Por Adenovirus Y Virus Bk En Pacientes Post Trasplante De Células Progenitoras Hematopoyéticas”**.

Te hemos invitado porque queremos identificar en tu sangre, orina y heces partículas para vigilar el que puedas tener una infección por virus llamados adenovirus y virus BK.

Queremos que participes para saber si el encontrar estas partículas en tu sangre, orina y heces nos puede ayudar a reconocer más tempranamente datos de infección por estos virus.

Si decides participar en este estudio, es posible que puedas tener molestias o dolor cuando te den el piquete para tomarte las muestras de sangre. El piquete que te darán es el que rutinariamente se hace par el seguimiento después del trasplante de médula osea y nosotros solo solicitaremos una cantidad de sangre extra de 2ml. También te pediremos una muestra semanas de orina y de heces.

Si tú decides que no quieres participar en el estudio, no hay problema, puedes decirselo al doctor. Si entras al estudio pero después ya no quieres seguir participando, lo puedes decir en cualquier momento y no habrá ningún problema. Tú recibirás el mismo tratamiento y atención médica que siempre has recibido y no se te tratará de manera diferente.

Si no entendiste algo de lo que dice esta hoja o si tienes cualquier duda, ten la confianza de preguntale al doctor o a tus papás.

Si tú firmas abajo con tu nombre, significa que entiendes la información que te dimos de este estudio, que se te contestaron las dudas que tuviste y que aceptas ser voluntario para participar en este estudio. Puedes hacer preguntas en cualquier momento y comunicarte con:

Dr. Félix Gaytán Morales (Pediatra oncólogo). Celular: 04455 3517-8718

Dra. Martha Avilés Robles (Pediatra Infectóloga). Celular: 04455 3939-1946

Te vamos a dar una copia de esta hoja para que la conserves.

Nombre del niño o niña: _____ Fecha: _____

Nombre del investigador: _____ Firma: _____

Fecha: _____

ANEXO 4. CURVA ESTÁNDAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ADENOVIRUS y BK

Curva estándar para la cuantificación de Adenovirus utilizando el kit comercial LightMix[®] y el equipo LightCycler[®] Roche Diagnostics. Se preparará una curva estándar previo a la cuantificación de las muestras :

Se utilizará el ADN estándar, el cual se encontrará a 6 diferentes concentraciones (10^1 a 10^6 moléculas/reacción). Se añadirán 40µl de agua grado PCR a cada vial que contiene las diferentes concentraciones de ADN estándar para la curva. Se resuspenderá la mezcla anterior con una pipeta con movimientos de arriba y hacia abajo por 10 veces.

Se preparará la mezcla de reacción de PCR de la siguiente forma:

	1X (µl)	7x (µl)
Agua grado PCR (kit)	7.4	51.8
Mg ²⁺ 25mM	1.6	12.6
Reactivo mix (sondas y primers)	4.0	28
FastStart mix	4.0	28
	Volumen final= 15 µl	

Se toman 15µl de la mezcla de reacción de PCR y se añaden 5 µl de ADN estándar, comenzando de la concentración más baja, hasta la más alta (1-6).

Las muestras de análisis serán obtenidas de la siguiente forma: Se obtendrá 1ml de sangre periférica se realizara la extracción de ADN utilizando para su preparación el kit de extracción de ácidos nucleicos *Magna Pure LC DNA isolation kit*[®], en combinación con el equipo Magna Pure[®].

Se preparará la mezcla de reacción de PCR para las muestras de análisis de la siguiente forma:

	1X (µl)	X (n+3) µl
Agua grado PCR (kit)	3.4	
Mg2+ 25mM	1.6	
Reactivo mix (sondas y primers)	4.0	
IPC mix	4.0	
FastStart mix	4.0	
	Volumen final= 15 µl	

*Se agregarán 15µl de mezcla de reacción en cada capilar y 5µl de muestra para obtener un volumen final de 20µl por muestra.

*Para el control negativo: se reemplazarán los 5µl de la muestra con 5µl de agua grado PCR.

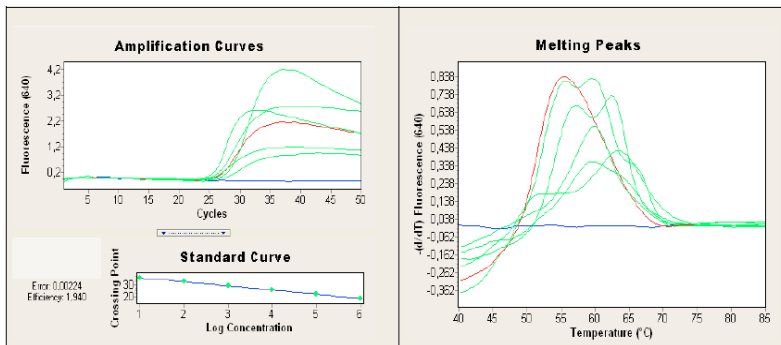
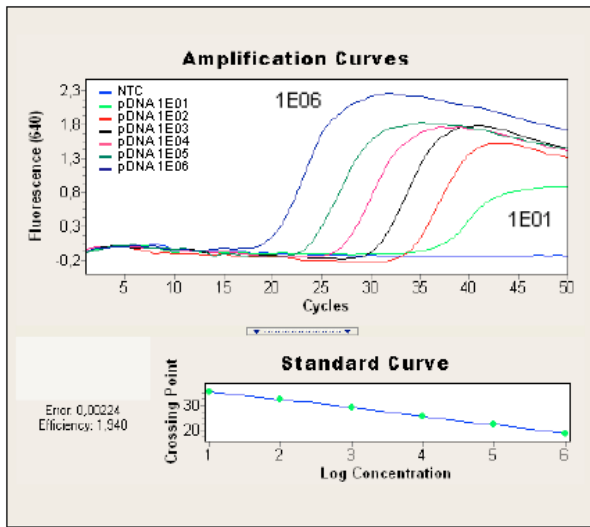
*Para el control positivo: se reemplazarán los 5µl de la muestra con 5µl de DNA estándar del kit comercial.

Condiciones para la reacción de PCR:

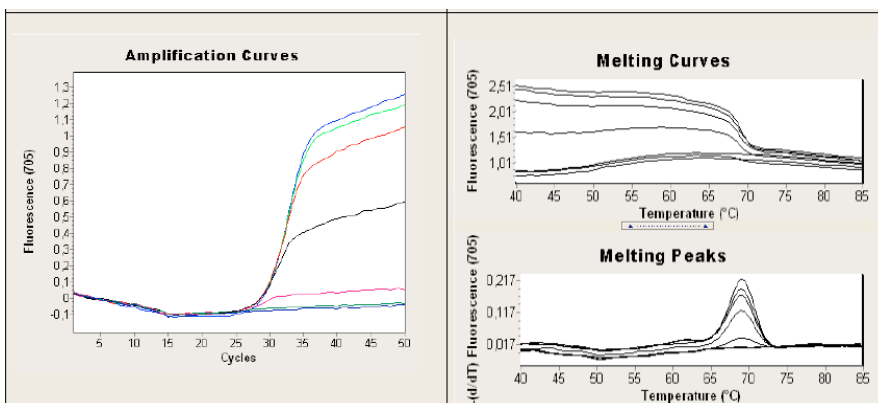
Program:	Denaturation	Cycling			Melting			Cooling
Parameter								
Analysis Mode	None	Quantification			Melting Curves			None
Cycles	1	45			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Target [°C]	95	95	58	72	95	40	85	40
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:08	00:00:10	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0.5	20
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Cont.	None

Análisis de los resultados

*Curvas esperadas para Adenovirus, canal 640.



*Curvas esperadas para Adenovirus del grupo A al F, la curva roja muestra el grupo B, canal 640.



*Curvas esperadas para el Control Interno (IPC), canal 740

PRUEBA PCR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE VIRUS BK

La cuantificación del Polyomavirus BK se analizará en el canal 640 del equipo, al igual que las curvas melting (TM), en la sección de Curvas Melting. El control negativo (NTC) no deberá dar señal. Para la amplificación del control interno, se

observará el IPC en el canal 705, en la modalidad Curvas Melting. El control negativo así como bajas concentraciones de Polyomavirus BK en las muestras (10 a 1,000 copias) podrá observarse a través de la curva melting de su IPC con un pico aproximadamente a los 50°C.

En cada corrida se utilizará un control negativo, el cual contendrá agua más la mezcla de reacción sin ADN. El control positivo para la corrida se realizará reemplazando la muestra de interés por al ADN control dado en el kit. Las muestras de análisis serán obtenidas de la siguiente forma: Se obtendrá 1ml de sangre periférica se realizara la extracción de ADN utilizando para su preparación el kit de extracción de ácidos nucleicos *Magna Pure LC DNA isolation kit*[®], en combinación con el equipo Magna Pure[®].

A) Preparación del mix de reacción: Se agregará 66µl de agua grado PCR al vial a utilizar, el cual contiene todos los primers y sondas para 16 reacciones. Se mezclará la solución con vórtex y se centrifugará. Se utilizarán 4µl de esta mezcla para una reacción de PCR con un volumen final de 20µl. La solución anterior será estable por 3 días si es almacenada a 4°C, sin exposición a la luz.

B) Se realizará una curva estándar con ADN clonado y purificado con concentraciones en un rango de 10⁶ copias/reacción a 10¹ copias/reacción. Se añadirán 40µl de agua gado PCR a cada vial de la curva. Se mezclará usando una pipeta con movimientos de arriba hacia abajo, 10 veces. Se utilizará 5µl de esta mezcla para una reacción de PCR con un volumen final de 20µl. La solución estándar no es estable a largo plazo.

C) La mezcla de reacción de PCR se realizará de la siguiente forma:

	1X (µl)	X (n+3)µl
Agua grado PCR (kit)	7.4	
Mg2+ 25mM	1.6	
Mix de reacción (sondas)	4.0	

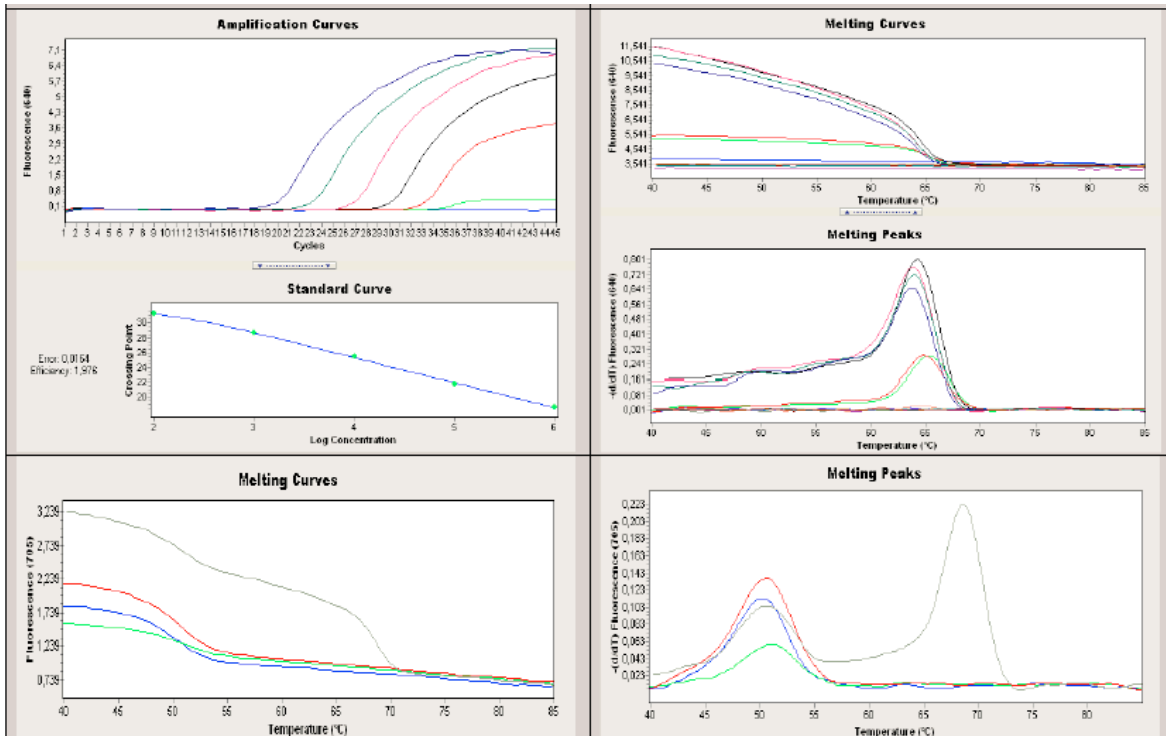
y primers)		
FastStart mix	2.0	
	Volumen final= 15 µl	

*Se homogenizará la mezcla de reacción y se le dará un spin antes de colocar los 15µl en lo capilares del equipo.

El programa del equipo será el siguiente:

Program:	Denaturation	Cycling			Melting			Cooling
Parameter								
Analysis Mode	None	Quantification			Melting Curves			None
Cycles	1	45			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Target [°C]	95	95	57	72	95	40	85	40
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:20	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0.2	20
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Continu.	None

Resultados esperados:



*Polyomavirus
BK
Canal 640

*IPC canal 705