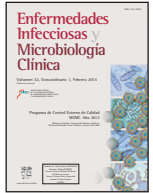




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Infección por citomegalovirus humano

Sara Sanbonmatsu Gámez, Mercedes Pérez Ruiz y José María Navarro Marí*

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España

RESUMEN

Palabras clave:
Citomegalovirus
Diagnóstico
Serología
PCR
ADNemia
Antigenemia
Cultivo

La infección por citomegalovirus humano (CMV) tiene una altísima prevalencia mundial. Tras la infección primaria, el virus pasa a un estado de latencia, pudiendo aparecer recurrencias por reinfección con una cepa nueva o por reactivación de la replicación del CMV latente. Los cuadros clínicos más graves se dan en infección congénita y en pacientes inmunodeprimidos, en los que se comporta como patógeno oportunista. Las técnicas serológicas son de elección en la infección primaria y para determinar el estado inmune frente a CMV en el donante y receptor de órganos. Aunque faltan estudios estandarizados, la reciente comercialización de métodos de medida de la respuesta inmune celular ofrece buenas perspectivas para predecir el riesgo de enfermedad por CMV en inmunodeprimidos. Las técnicas moleculares, que han ido sustituyendo al cultivo y/o detección de antígeno, son actualmente los procedimientos más utilizados en el diagnóstico de rutina y control de la infección por CMV.

© 2014 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Infection by human cytomegalovirus

ABSTRACT

Keywords:
Cytomegalovirus
Laboratory diagnosis
Serology, PCR
DNAemia
Antigenemia
Culture

Prevalence of human cytomegalovirus infection is very high worldwide. Following primary infection, the virus remains latent, being able to cause recurrences either by reinfection with a new strain or by reactivation of the replication of the latent virus. The most severe disease is seen in congenital infection and in immunosuppressed patients, in whom the virus act as an opportunistic pathogen. Serological techniques are the methods of choice in primary infection and to determine the immune status against CMV in organ donor and receptor. Although well-standardized studies are lacking, the recent commercial availability of methods that measure cellular immune response are promising to predict the risk of CMV disease in immunosuppressed individuals. Molecular assays, that have gradually been substituting viral culture and/or antigen detection, are the most widely used methods for the diagnosis and control of CMV infection.

© 2014 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Citomegalovirus (CMV) es un parásito humano muy bien adaptado, por lo que la prevalencia de infección por CMV es muy elevada en la población general. En individuos inmunocompetentes, la infección suele cursar de manera asintomática o con sintomatología leve. Tras la primoinfección, el virus pasa a un estado de latencia de por vida, pudiendo aparecer infecciones recurrentes (reactivaciones y reinfecciones)

) en determinadas situaciones. En inmunodeprimidos, pacientes trasplantados, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o en infección congénita se comporta como un patógeno oportunista, causando enfermedad y secuelas graves e incluso la muerte.

Las técnicas serológicas son útiles para el diagnóstico de infección primaria, fundamentalmente en niños, y para conocer el estatus inmunológico del donante y del receptor de órganos para un correcto manejo del último. Las técnicas moleculares cuantitativas están sustituyendo a la antigenemia y al cultivo celular para el seguimiento del paciente trasplantado y, además, han permitido determinar la resistencia a antivirales de una forma eficiente.

Este documento es un resumen de los aspectos más relevantes de la infección por CMV y de las técnicas actuales empleadas en el diag-

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: josem.navarro.sspa@juntadeandalucia.es (J.M. Navarro Marí).

nóstico, así como la utilidad y aplicación de estas en los diferentes contextos clínicos.

Aspectos virológicos

Generalidades

CMV se aisló por primera vez en 1956, aunque la infección se había descrito anteriormente, a finales del siglo XIX, en tejidos fetales con inclusiones citomegálicas, que fueron atribuidas inicialmente a un protozoo¹.

Taxonómicamente CMV pertenece a la familia Herpesviridae, subfamilia Betaherpesvirinae, género *Cytomegalovirus*, especie *herpesvirus humano 5* (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>).

La estructura del virión se compone de dentro a fuera de: la nucleocápside con el ADN de doble cadena lineal contenido dentro una cápside proteica compuesta por 162 capsómeros dispuestos en una matriz típica icosaédrica, otra capa proteica denominada tegumento, que contiene fosfoproteínas y una envoltura lipídica en la que se insertan glucoproteínas virales que actúan como mediadores de la entrada del virus a la célula hospedadora^{2,3}.

Es un virus sensible a los solventes orgánicos, pH ácido y luz UV. Se debe conservar a temperaturas inferiores a -70 °C y preferentemente en nitrógeno líquido para preservar su viabilidad. Cuando se congela durante períodos prolongados a -20 °C, el virus pierde completamente su infectividad³.

Genoma

El ADN de la cepa AD169 contiene unas 235 kb. La secuenciación de la cepa AD169 ha permitido predecir 204 posibles marcos de lectura abierta (ORF, del inglés "open reading frames") y codifica para unas 178 proteínas⁴. Estudios recientes usando técnicas de secuenciación masiva muestran una gran variabilidad genética de las cepas salvajes de CMV, incluso en un mismo individuo, tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos, casi comparable a la variabilidad observada en virus ARN, aunque estas diferencias no permiten la caracterización del virus en diferentes serotipos^{3,5,6}.

El genoma se divide en 2 regiones únicas denominadas "unique long" (UL) y "unique short" (US), cada una de las cuales está flanqueada por una secuencia repetida terminal, TRL y TRS, y por una secuencia repetida interna, IRL e IRS, respectivamente⁷. Estas regiones contienen prácticamente todos los genes de CMV⁸.

Expresión genómica y proteínas virales

Una vez que el virus entra en la célula por fusión de membranas, se liberan la nucleocápside y las proteínas del tegumento y tiene lugar el transporte de la nucleocápside hacia el núcleo, donde se produce la liberación del ADN viral.

La expresión genómica de CMV se lleva a cabo en una cascada de 3 fases. En primer lugar se expresan los genes α o IE ("immediate early"), se originan los primeros ARNm en cuya síntesis parecen intervenir ARN polimerasas celulares. En esta primera fase se sintetizan las proteínas α , que conducen al virus al ciclo lítico, con actividad fundamentalmente reguladora de la replicación y transcripción de los genes "early" de la segunda fase, que codifican para las proteínas β , con función enzimática reguladora de la replicación del ADN y expresión final de los genes de la tercera fase que codifican para las proteínas γ . Estas son las proteínas estructurales del virión, entre las cuales se encuentran las glucoproteínas de envoltura (gp), principales implicadas en la producción de anticuerpos neutralizantes, las proteínas de la cápside y las proteínas del tegumento, fosfoproteínas (pp), entre las que destaca la pp65 (ppUL83), principal diana para la producción de anticuerpos monoclonales usados en las pruebas diagnósticas de antigenemia^{3,8} (fig. 1).

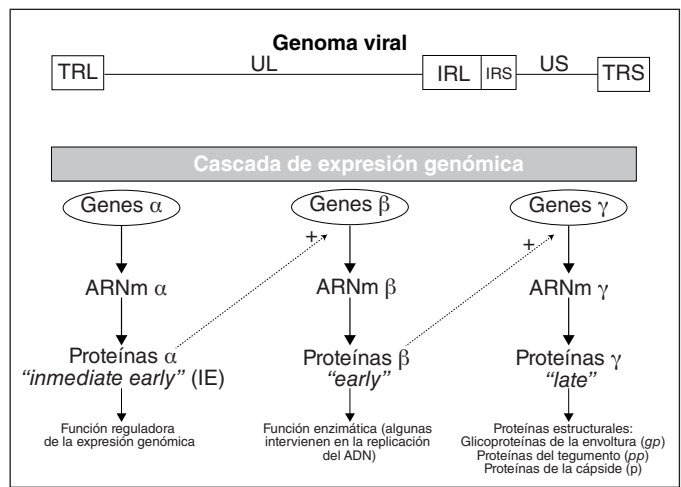


Figura 1. Esquema del genoma de citomegalovirus (CMV) y cascada de expresión genómica. IRL: "internal repeat-long"; IRS: "internal repeat-short"; p: proteínas; pp: fosfoproteínas; TRL: "terminal repeat-long"; TRS: "terminal repeat-short"; UL: "unique long"; US: "unique short".

En la infección latente no se produce una nueva progenie de virus, ya que algunos genes IE están reprimidos probablemente para evadir la respuesta inmune. Periódicamente, CMV puede reactivarse y producir un nuevo ciclo lítico².

Crecimiento in vitro

Los fibroblastos humanos son las únicas células capaces de replicar CMV a títulos elevados. Este hecho contrasta con la preferencia de CMV por órganos de origen epitelial in vivo. Para que el virus se propague eficientemente en fibroblastos ha de perder un fragmento de ADN de 13-15 kb que contiene genes que codifican factores de patogenicidad y proteínas necesarias para la entrada de CMV en células epiteliales. Este fragmento está delecionado en la cepa de laboratorio AD169, por lo que esta replica mucho más rápidamente en fibroblastos que las cepas salvajes^{8,9}.

In vitro, la encapsidación ocurre en el núcleo. Los productos de los genes UL50 y UL53 digieren la membrana nuclear interna y el virus adquiere su envoltura por gemación a través de esta¹⁰. Los viriones envueltos pasan al citoplasma en forma de vesículas y se fusionan con la membrana celular para liberar viriones maduros. Otras formas incompletas del virus, como los cuerpos densos (virión sin nucleocápside) y las partículas envueltas no infecciosas (cápside y envoltura sin ADN), también se liberan de la misma manera⁸.

La replicación de CMV in vivo es rápida, con un tiempo de generación de 1 día, mientras que in vitro las cepas salvajes crecen lentamente, ya que necesitan adaptarse. El tiempo medio para crecer en cultivo, para la mayoría de las cepas, es de 8 días (rango: 2-21 días)³.

Epidemiología

La infección por CMV tiene una altísima prevalencia mundial, especialmente en países subdesarrollados, en los que el 90% de la población está infectada, frente al 60% estimado en los países desarrollados¹¹. En zonas con malas condiciones socioeconómicas, la mayoría de los niños se ha infectado antes de la pubertad. El hacinamiento y la falta de higiene favorecen la transmisión de CMV. En los países desarrollados, el 40% de los adolescentes son seropositivos, aumentando la prevalencia aproximadamente un 1% por año de vida.

En individuos inmunocompetentes, la infección primaria suele ser asintomática, leve o causar un síndrome mononucleósico. Tras esta, el virus queda latente de por vida en monocitos y posiblemente también en otros órganos y tejidos. Se pueden producir infecciones

recurrentes bien por reinfección con otra cepa o por reactivación de la cepa latente.

CMV se excreta de múltiples sitios: orina, saliva, secreciones vaginales, semen y leche materna. La infección primaria se produce comúnmente por contacto directo con estos fluidos de una persona infectada. La transmisión puede ser vertical, de la madre al hijo en el embarazo o periparto, y horizontal, en el período perinatal o posnatal. En adultos inmunocompetentes, la excreción viral es intermitente e indefinida mientras que en inmunodeprimidos e infección congénita, perinatal o posnatal temprana es prolongada (incluso años) y constante^{8,11,12}.

Vías de transmisión

Infección congénita. La infección congénita es sinónimo de transmisión intrauterina o transplacentaria. La transmisión intrauterina ocurre solo en un tercio de las embarazadas con primoinfección. Además, gestantes seropositivas pueden sufrir reinfecciones y reactivaciones; en ambos casos, la infección puede transmitirse al feto¹³.

En zonas con nivel socioeconómico bajo, debido a la alta seroprevalencia en las madres, es más probable que un feto se infecte de una madre con infección recurrente que con infección primaria. Sin embargo, esta última presenta un riesgo para el feto mucho mayor, por lo que la infección congénita por CMV es más frecuente en países ricos con un porcentaje mayor de madres seronegativas.

Infección perinatal. La transmisión ocurre por contacto con secreciones genitales de la madre durante el parto o a través de la lactancia materna. La presencia de CMV en la leche materna constituye una ruta de transmisión por sí sola, ya que no se ha demostrado transmisión en niños de madres infectadas alimentados con leche de fórmula¹⁴.

Infección posnatal. Se ha recuperado CMV de saliva en juguetes de guarderías, por lo que se postula que la saliva puede ser una vía de transmisión en niños¹⁵.

No se sabe con certeza si CMV se transmite por vía sexual, ya que se ha encontrado CMV en semen y secreciones vaginales, pero, generalmente, antes del contacto sexual hay contacto oral, pudiendo producirse la transmisión a través de la saliva. Los varones homosexuales tienen una prevalencia más alta de infección por CMV, quizás debido a que la mucosa rectal proporciona una barrera menos eficiente que la mucosa vaginal⁸.

Transfusiones sanguíneas. CMV puede estar presente en la sangre de donantes sanos, en estado latente en monocitos y reactivarse al transfundirse a otro paciente. La infección se puede transmitir, aunque no se ha podido identificar hasta la fecha los donantes de alto riesgo de transmisión.

En individuos inmunodeprimidos se puede detectar CMV en polimorfonucleares y macrófagos, probablemente procedente de la fagocitosis de residuos celulares infectados.

Actualmente, esta vía de transmisión está prácticamente eliminada gracias al uso rutinario de filtros para separar los leucocitos durante las transfusiones^{8,16}.

Trasplante de órganos. En trasplante de órgano sólido (TOS) se pueden presentar primoinfección (en receptor seronegativo) e infecciones recurrentes, bien por reinfección con otra cepa del donante o de otra persona infectada o por reactivación del virus latente en el receptor, siendo esta última la situación más frecuente y la primoinfección la de mayor riesgo de enfermedad por CMV (ECMV)¹⁷.

En trasplante de precursores hematopoyéticos (TPH) hay menor riesgo de infección en el receptor si el donante es seropositivo, ya que transfiere cierta inmunidad al receptor de médula ósea con depleción de células T⁸.

Patogénesis

Una carga viral elevada se ha relacionado con un mayor riesgo de ECMV en todo tipo de pacientes. Por el contrario, la infección primaria es factor de riesgo para el desarrollo de ECMV en el embarazo y el paciente TOS, pero no para VIH y TPH⁸.

Las vías de entrada de CMV suelen ser el epitelio genitourinario, el tracto digestivo superior y el tracto respiratorio, aunque en el feto el virus entra por vía hematogena. Los leucocitos y el endotelio vascular parecen jugar un papel importante en la diseminación de CMV en el sujeto infectado¹⁸.

CMV permanece en estado latente en individuos inmunocompetentes. Tanto la inmunidad humoral como la celular y las células *natural killer* están implicadas en el control de la infección. Mientras que la primera parece prevenir la progresión a ECMV, ya que reduce el grado de replicación viral, la mayor gravedad parece relacionarse más con afectación severa en la inmunidad celular^{3,8,18}.

La infección por CMV induce la formación de anticuerpos específicos IgM, IgA e IgG, que aparecen casi a la vez que la excreción del virus por saliva y orina. Los anticuerpos tipo IgM pueden persistir durante 2-8 meses en situaciones normales, mientras que los IgA pueden ser detectables hasta 1 año después. En pacientes inmunodeprimidos, la producción de IgM puede no darse a valores detectables. Los anticuerpos tipo IgG también aparecen pronto tras la primoinfección, durante la que incrementa su título, declinando después y, habitualmente, perdurando de por vida. Los anticuerpos IgG neutralizantes se dirigen fundamentalmente frente a las glucoproteínas de envoltura gB y gH. En la mujer gestante, la presencia de IgG previa al embarazo se correlaciona con un menor riesgo de transmisión al feto^{3,19}.

La inmunidad celular, por otro lado, es crucial en el control de la infección por CMV. Las principales dianas de los linfocitos T CD8+ y CD4+ son las proteínas virales pp65 (pUL83) y la proteína IE1. La adecuada respuesta inmune celular específica se ha asociado con un curso clínico favorable en TPH. En trasplantados esta fracción de linfocitos está prácticamente ausente hasta el sexto mes postrasplante, en función de la dosis y tipo de inmunosupresores. También está inhibida en niños con infección congénita o perinatal. La respuesta inmune celular específica se va recuperando con el tiempo coincidiendo con el cese de la viruria^{8,18}.

Los diferentes síndromes asociados a ECMV que se presentan principalmente en sujetos inmunodeprimidos no se deben de forma directa a la replicación del virus en el órgano afectado, sino a los factores solubles como citocinas producidas por el sistema inmune²⁰.

Principales síndromes clínicos asociados a la infección por citomegalovirus

Mononucleosis infecciosa

Aunque generalmente la infección primaria por CMV suele ser asintomática, sobre todo en el período perinatal, la mononucleosis es el principal síndrome asociado a esta, constituyendo el 50% de las mononucleosis con prueba negativa a anticuerpos heterófilos frente a virus de Epstein Barr (VEB) y el 8% del total de mononucleosis¹⁸. Característicamente, la mononucleosis por CMV cursa con menor grado de tonsilitis, linfadenopatía y faringitis que la producida por VEB¹. Los signos y síntomas que se dan en la mayoría de los pacientes son fiebre, elevación discreta de transaminasas y linfocitosis con linfocitos atípicos.

El síndrome postrasfusional por CMV es un caso especial de mononucleosis adquirida por transfusiones.

Infección congénita

CMV es la causa más frecuente de infección congénita en los países desarrollados, con una prevalencia en torno al 0,6%²¹. La inmuni-

dad natural materna proporciona una protección del 69% frente a infección congénita. De los niños infectados congénitamente, aproximadamente solo un 10% presentará una infección sintomática.

Las manifestaciones clínicas van desde crecimiento retardado intrauterino, hepatoesplenomegalia, coriorretinitis, trombocitopenia, encefalitis y microcefalia. La presencia de calcificaciones periventriculares es un hallazgo típico de las pruebas de imagen en los casos graves^{1,21}. Algunos están tan gravemente afectados al nacimiento que mueren durante la infancia (0,5%). Los supervivientes que presentan microcefalia o alteraciones del sistema nervioso central tienen un elevado riesgo de desarrollar graves secuelas neurológicas, déficits cognitivos y motores, y afectación visual y auditiva.

Los recién nacidos asintomáticos tienen mejor pronóstico, y la mortalidad es prácticamente nula, aunque también pueden desarrollar secuelas a largo plazo. Alrededor de un 13% tendrá afectación de la función auditiva, aunque esta fuese normal en el momento del nacimiento. Esta es la secuela más frecuente en infección congénita y se estima que es la causa principal de sordera no hereditaria²¹.

La infección perinatal suele ocurrir por reactivación o reinfección de la madre, por lo que el recién nacido tiene anticuerpos maternos y, por tanto, son generalmente asintomáticos. Sin embargo, los prematuros de muy bajo peso (< 1.500 g) tienen mayor riesgo de enfermedad, que suele cursar como hepatitis, neutropenia, trombocitopenia o un cuadro séptico con hemocultivos negativos²².

Infección en inmunodeprimidos

En este grupo de pacientes se pueden dar tanto infecciones primarias como recurrencias. La gravedad de la infección por CMV en inmunodeprimidos está directamente relacionada con el grado de inmunosupresión. Los pacientes con recuento muy bajo de linfocitos CD4+ presentarán cuadros más graves. Lo más frecuente es que se presente solo con fiebre, que se resolverá en pocos días. Cuando esta va acompañada de leucopenia y viremia se le conoce como síndrome por CMV.

El espectro de patologías graves por CMV varía en función del tipo de paciente. Así, la neumonitis se da principalmente en TPH, la retinitis y encefalopatía en pacientes VIH y la fiebre con o sin hepatitis en TOS^{8,18}.

Infección en trasplante de órgano sólido. El estatus serológico antes del trasplante permite identificar a la población con mayor riesgo de desarrollar enfermedad por CMV.

La situación de mayor riesgo se produce en los receptores de TOS seronegativos (R-) en los que se trasplanta un órgano de un donante seropositivo (D+) para CMV (R-/D+). En un receptor seropositivo (R+) para CMV se puede reactivar la infección previa o bien reinfectarse con CMV del donante seropositivo (D+), aunque el riesgo de desarrollo de enfermedad es menor que en el R-^{8,18,23}.

CMV es la causa más frecuente de enfermedad viral en TOS durante los 6 primeros meses postrasplante, período en el que se alcanza la máxima incidencia. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son fiebre, malestar, artralgias, leucopenia y exantema macular. Algunos pacientes desarrollan enfermedades graves como neumonitis, úlceras gastrointestinales e insuficiencia hepática^{8,18}.

Infección en trasplantados de precursores hematopoyéticos. Tanto en TOS como en TPH, la infección suele darse por reactivación del virus del propio receptor. Si el donante es D+ hay menor riesgo de desarrollo de enfermedad, ya que este transfiere inmunidad al receptor de médula ósea con depleción de células T. Posiblemente, en el proceso de depleción se eliminen las células específicas frente a CMV y se dejen intactas otras células del sistema inmune, siendo capaces de funcionar en el receptor y confiriéndole inmunidad frente a CMV.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes son la neumonitis, seguida de la enfermedad gastrointestinal y, en mucha menor medida, se han descrito casos de hepatitis, encefalitis y retinitis⁸.

Infección en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana. CMV puede estimular la replicación del VIH cuando este está en forma de provirus y CMV no se está replicando. Ambos virus frecuentemente infectan el mismo órgano e incluso la misma célula. La clínica más frecuente en este grupo de pacientes es la retinitis, seguida de esofagitis, colitis y un cuadro conjunto de retinitis y esofagitis.

Cargas virales elevadas de CMV se correlacionan con una progresión más rápida de infección VIH a sida o de sida a muerte. La viremia CMV positiva ha demostrado ser un factor predictor del riesgo de retinitis, y una viremia positiva con recuentos bajos de linfocitos CD4+ se asocia a mayor mortalidad, independientemente de la carga viral de VIH^{8,18,24,25}.

Prevención y tratamiento de la enfermedad por citomegalovirus

Revisiones recientes se han centrado en el manejo de la infección por CMV en cuanto a profilaxis y tratamiento²⁶⁻²⁹.

Con respecto a la infección congénita, la terapia antiviral con ganciclovir se ha visto que es efectiva en niños con infección sintomática para reducir el riesgo de secuelas a largo plazo²¹.

No hay suficiente evidencia para recomendar una medida particular en la mujer embarazada para prevenir la transmisión de CMV al feto ni las secuelas de la infección congénita. La educación y el cambio de hábitos (mayor higiene de manos) pueden reducir el número de mujeres con infección por CMV durante el embarazo³⁰. Los estudios recientes se centran en la inmunización pasiva de la embarazada con inmunoglobulinas³¹ y el tratamiento antiviral con valaciclovir³² para reducir el riesgo de infección congénita.

Hay 2 estrategias básicas para prevenir la enfermedad por CMV en el paciente trasplantado: la profilaxis universal y la terapia anticipada con monitorización de la viremia de CMV en el receptor. La profilaxis universal con ganciclovir, valganciclovir o aciclovir en TOS reduce el riesgo de enfermedad y mortalidad por CMV³³. La terapia anticipada reduce significativamente el riesgo de ECMV cuando se compara con placebo o tratamiento de la enfermedad sintomática. Sin embargo, no hay diferencias significativas en cuanto al riesgo de enfermedad por CMV ni mortalidad global cuando se comparan las estrategias de profilaxis universal y terapia anticipada. Solo se han observado diferencias en la leucopenia, que es mucho menos frecuente con la terapia anticipada³⁴.

Recientemente se han publicado ensayos clínicos con vacunas de subunidades proteicas del virus así como vacunas de ADN (que expresan diferentes péptidos virales) frente a CMV, con eficacia variable y parcial, en diferentes grupos de población, sujetos sanos seronegativos, candidatos a TOS, receptores de TPH y mujeres jóvenes en edad gestacional³⁵.

Diagnóstico de laboratorio de la infección por citomegalovirus

Consideraciones generales

Las muestras clínicas habituales para el estudio de CMV son: suero para detección de anticuerpos, sangre completa para estudio de la inmunidad celular y para técnicas de detección directa, y orina, saliva, sangre completa, plasma, suero, lavado broncoalveolar (LBA), líquido cefalorraquídeo y tejido para el estudio de CMV por técnicas de detección directa.

Dada la labilidad de CMV, las muestras que se envíen para diagnóstico directo deben mantenerse refrigeradas (4-10 °C) hasta su procesamiento. Si este se demora más de 72 h se conservarán a temperaturas de -80 °C o menores, nunca a -20 o -40 °C (congeladores normales).

Diagnóstico serológico

Detección de respuesta inmune humoral. Las técnicas serológicas para detección de anticuerpos específicos IgG e IgM frente a CMV son

útiles fundamentalmente para: diagnóstico de infección primaria sintomática (mononucleosis, hepatitis) y determinación del estatus serológico de donantes y receptores de órganos.

La demostración de anticuerpos tipo IgM específicos o de seroconversión de anticuerpos IgG es el método tradicional para detectar infección primaria^{8,12,36}. Sin embargo, la determinación de IgM en muchas ocasiones da lugar a falsos resultados positivos, no permite demostrar infección recurrente y sus valores permanecen detectables durante meses. Por ello puede ser útil para diagnóstico de infección primaria sintomática en niños, pero se desaconseja en la mujer embarazada, en la cual la mejor opción es determinar la seroconversión de anticuerpos IgG¹².

Ante un resultado positivo de IgM e IgG en el suero de una mujer embarazada sería necesario llevar a cabo pruebas de avidéz para diagnosticar infección primaria. Durante las primeras semanas de la infección primaria, los anticuerpos IgG muestran muy baja avidéz por el antígeno, pero conforme van madurando, la avidéz aumenta progresivamente³⁷. El menor o mayor grado de avidéz de los anticuerpos IgG se determina con la muestra de suero tratada y no tratada con urea entre 5-8M, desnaturizante que es capaz de disociar los complejos antígeno-anticuerpo. El porcentaje del cociente entre la medida de la muestra tratada y la de la muestra no tratada determina la avidéz de los anticuerpos. Un porcentaje de avidéz bajo (< 35%) indica infección reciente y porcentajes > 65% son indicativos de infección pasada o de meses¹².

En España no está recomendado el cribado serológico de CMV en la embarazada por varias razones: ausencia de vacuna, imposibilidad de realizar una terapia o profilaxis antiviral y dificultad para detectar infección recurrente³⁸.

Hay diversas técnicas serológicas para CMV: reacción de fijación de complemento, aglutinación con partículas de látex (AL), ELISA, inmunofluorescencia indirecta, inmunocromatografía (IC), fluorescencia anticomplemento, quimioluminiscencia (CLIA) e inmunoblot⁸. Como técnicas manuales, las más sencillas son la AL y la IC. Son técnicas muy empleadas en la cartera de servicios de urgencias en el laboratorio de hospitales de tercer nivel para serología del donante de órganos. Por otra parte, la automatización de muchas de estas técnicas, como ELISA y CLIA, permite trabajar con gran volumen de muestras, ya que requieren un tiempo de procesamiento mínimo.

Determinación de la respuesta inmune celular. La medida de la respuesta inmune celular frente a CMV permite determinar la capacidad del paciente trasplantado de responder a la reactivación de CMV en el período postrasplante. Sin embargo, la falta de evaluaciones de estos métodos hace difícil su estandarización. Hay diferentes métodos de medida y cuantificación de linfocitos CD8+ y CD4+ que reconocen epítomos específicos de CMV: tinción de tetrámeros o citocinas intracelulares, citometría de flujo, ELISPOT y QuantiFERON®-CMV. De todos ellos, probablemente el último sea el método recomendado frente a los demás por diversos motivos: aprobado en Europa, sencillez, mínima manipulación, estandarización, disponibilidad comercial^{28,39-41}.

El ensayo QuantiFERON®-CMV mide los valores de IFN- γ producidos por los linfocitos T CD8+ cuando se estimulan in vitro con antígenos de CMV⁴¹.

QuantiFERON®-CMV presenta la desventaja de que solo evalúa la inmunidad mediada por linfocitos T CD8+ y no CD4+. Según los resultados publicados recientemente de un estudio de cohortes prospectivo en pacientes TOS de alto riesgo para el desarrollo de ECMV tardía (D+/R-), el ensayo QuantiFERON®-CMV permitiría identificar a los que tienen bajo (QuantiFERON®-CMV positivos), medio (QuantiFERON®-CMV negativos) o alto (QuantiFERON®-CMV indeterminados) riesgo de desarrollar EMCV. Podría plantearse retirar el antiviral profiláctico en los pacientes con resultado positivo de QuantiFERON®-CMV. Los pacientes con resultados negativos e indeterminados se podrían beneficiar de una profilaxis más prolongada o

una vigilancia más estrecha⁴². Se necesitan más estudios para determinar su utilidad en TPH⁴¹.

Cultivo

CMV replica eficientemente en fibroblastos humanos. Las líneas celulares más frecuentemente usadas son fibroblastos de pulmón embrionario como MRC-5. El tiempo que tarda en aparecer el efecto citopático en fibroblastos se correlaciona con la carga viral en la muestra. En cualquier caso, el crecimiento en cultivo tradicional en tubo es lento y se requieren al menos 21 días para dar un resultado negativo³.

La mejor alternativa para la propagación del virus en cultivo celular es el empleo de la técnica de *shell-vial* (SV), que permite un diagnóstico en 18-48 h. La muestra se inocula por centrifugación sobre una monocapa de línea celular MRC-5 crecida en un cubreobjetos circular que se deposita en un tubo de fondo plano. Tras incubación durante 18-48 h se extrae el cubreobjetos y se realiza una inmunofluorescencia sobre la monocapa con anticuerpos monoclonales frente al antígeno de fase inmediata precoz *p72*⁴³.

La línea celular MRC-5 es una línea diploide; por tanto, no se puede mantener mediante pases de forma indefinida. Comercialmente se presenta en suspensión, habitualmente la forma adquirida por los laboratorios de virología clínica con experiencia en cultivos celulares, ya que obliga a realizar estudios de viabilidad celular y concentración para su propagación en monocapa. Otra forma comercial, más comúnmente distribuida a todo tipo de laboratorio, aunque más cara, son los tubos preparados de SV para inoculación directa de la muestra.

La detección de antígeno precoz de CMV mediante SV se aplica a todo tipo de muestras. La detección en orina del recién nacido, en las primeras 2 semanas de vida, es útil para el diagnóstico de infección congénita. Un cultivo de orina positivo para CMV tomado después de los 21 días de vida no se puede asegurar que sea infección congénita, ya que la adquisición ha podido ser perinatal.

Por otra parte, un resultado positivo de SV en sangre de pacientes trasplantados tiene un elevado valor predictivo positivo de ECMV^{43,44}; asimismo se considera el mejor procedimiento para el diagnóstico de ECMV con afectación orgánica en pacientes inmunodeprimidos utilizando la muestra adecuada (lavado broncoalveolar en neumonitis, biopsia de colon en colitis, etc.).

Prueba de antigenemia

La prueba de antigenemia se basa en el empleo de anticuerpos monoclonales para detectar la proteína viral del tegumento *pp65*, producto del gen *UL83*, que es el antígeno viral mayoritario presente en leucocitos de sangre periférica durante la infección por CMV^{43,45}. En esta técnica se separa la capa leucocitaria de sangre completa anticoagulada. Un número determinado de leucocitos (habitualmente 100.000) se deposita sobre un portaobjetos con ayuda de citocentrífuga y se tiñen con anticuerpos monoclonales murinos frente a la proteína *pp65*. Se han utilizado técnicas inmunoenzimáticas o de inmunofluorescencia para detectar antígeno *pp65* en leucocitos de sangre periférica.

La presencia de al menos un núcleo positivo en la prueba de antigenemia es indicativa de infección. Para la sospecha de ECMV, en el TOS de R+ se toma el recuento umbral de 10 células positivas/100.000 leucocitos, y en TPH y TOS de R- se considera un riesgo elevado de ECMV a partir de 1 célula/100.000⁴⁶. Estos criterios son la base para el control de la infección mediante terapia anticipada.

A pesar de ser una técnica relativamente sencilla y muy estandarizada para el seguimiento y manejo de la infección por CMV en trasplantados, la labilidad de la muestra de sangre, que debe ser procesada en pocas horas, la deficiente interpretación de esta en pacientes neutropénicos, y la mayor sencillez y grado de automatización de las

técnicas moleculares cuantitativas recientes, que además no están sujetas a los inconvenientes de la antigenemia, han obligado a muchos laboratorios a sustituir las clásicas pruebas de antigenemia por la ADNemia para el control de la infección por CMV en el paciente trasplantado.

Diagnóstico molecular

El ADN de CMV tiene algunas regiones homólogas al ADN humano que hay que tener en cuenta a la hora de diseñar técnicas diagnósticas de laboratorio como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o sondas de hibridación⁸. Hoy día, la PCR es la técnica molecular más empleada para la cuantificación de ADN de CMV en muestras clínicas. Concretamente, la PCR en tiempo real es el método de elección para llevar a cabo este propósito⁴⁷. Actualmente hay métodos moleculares completamente automatizados para determinación de carga viral de CMV.

El empleo de plasma en lugar de sangre completa ha sido recomendado por su mayor correlación con replicación activa de CMV, ya que la detección de ADN de CMV en sangre completa puede reflejar solamente la presencia del virus en los linfocitos donde CMV permanece en estado de latencia tras la infección primaria⁴⁸. Igualmente, como reflejo de replicación activa y diseminación del virus, algunos trabajos han planteado la controversia entre detección de ADN o detección de ARNm, que supone un paso más en la expresión genómica del virus y solo está presente cuando el virus se está replicando^{49,50}.

Para el diagnóstico prenatal de infección congénita, el método de elección es la PCR cuantitativa en líquido amniótico. La amniocentesis no debe practicarse antes de la semana 21 de gestación, por riesgo de falsos negativos. Está recomendada su realización si se ha producido primoinfección durante el embarazo (seroconversión, IgM, IgG, baja avidéz) o si se observan anomalías ecográficas, independientemente de si la madre ha tenido o no una infección primaria durante el embarazo, ya que CMV puede transmitirse congénitamente durante reactivación o reinfección. La presencia de ADN de CMV en líquido amniótico confirma la infección intraútero, mientras que una carga viral elevada, > 10⁵ copias/ml en líquido amniótico, indica alto riesgo de desarrollar infección sintomática. La SEIP recomienda considerar tratamiento con inmunoglobulina frente a CMV en estas gestantes de alto riesgo para mejorar el pronóstico de la infección en el niño^{8,37}.

En el recién nacido, la presencia de ADN de CMV en muestras de orina, tomadas en las 2 primeras semanas de vida, confirma el diagnóstico de infección congénita. La detección de ADN de CMV en sangre, saliva o líquido cefalorraquídeo también es diagnóstica de infección congénita, pero la sensibilidad es menor que en la orina. También es útil para el diagnóstico retrospectivo de infección congénita a partir de la sangre seca obtenida para la detección precoz de metabolopatías (prueba del talón) que se realiza a todos los neonatos^{37,51}.

A pesar de que son muchos los trabajos que han intentado establecer un punto de corte de la carga viral que sea pronóstico del riesgo de ECMV en el período postrasplante para instaurar terapia anticipada, hay gran variabilidad de resultados entre técnicas y/o laboratorios. En muchos casos se recomienda, más que un valor absoluto, determinar la variación durante la monitorización²⁹. La experiencia y observación clínica junto con un adecuado algoritmo de seguimiento acordado entre virólogos y médicos han permitido, en muchos hospitales, establecer puntos de corte de ADNemia para la instauración de terapia antiviral anticipada. En nuestro hospital, el cambio de antigenemia a ADNemia para monitorizar el trasplante renal, dada la enorme sensibilidad de las técnicas moleculares, demostró que con un punto de corte de 5.000 copias/ml, como recomendaba GESITRA-SEIMC y RESITRA en su documento de 2005⁵², más del 50% de los pacientes eran candidatos a terapia anticipada. La intensificación de la monitorización de la ADNemia y de la observación clínica ha permitido subir este punto de corte a 10.000 copias/

ml, y cambios significativos en pacientes con cargas virales de 5.000-10.000 copias/ml se vigilan más estrechamente.

Recientemente se ha sugerido que la cuantificación de ADN CMV en LBA puede predecir la neumonía por CMV. Aunque se ha visto que pacientes con carga viral elevada en LBA se correlacionan con enfermedad respiratoria, no hay resultados concluyentes^{47,53,54}. Por la posibilidad de contaminación con la saliva, vía de excreción principal de CMV, la carga viral en LBA debe ser mayor que la determinada en lavados faríngeos para demostrar replicación local del CMV en el tracto respiratorio inferior que permita adscribirle un papel etiológico en la neumonía⁵⁴.

En pacientes VIH que inician tratamiento con TARGA (terapia antirretroviral de gran actividad) y linfocitos CD4 < 50/μl, la detección, tanto cualitativa como cuantitativa, de ADN CMV ha demostrado ser uno de los mejores predictores de riesgo de retinitis²⁵, recomendándose su determinación cada 2 meses con esta finalidad.

Detección de resistencias a antivirales

Clásicamente, las pruebas de determinación de resistencia a antivirales se realizaban mediante técnicas fenotípicas sobre cultivos celulares, lo cual tenía el inconveniente, entre otros, de su lentitud⁴⁷.

Dado que se han identificado las mutaciones responsables de la resistencia a los antivirales más comúnmente usados en la infección por CMV, los métodos genotípicos de secuenciación para la identificación de estas mutaciones se consideran de elección por su mayor simplicidad y facilidad⁴⁷. Esto se ha demostrado para la detección de la resistencia a ganciclovir, que se debe a mutación del gen *UL97*, que codifica para la ADN polimerasa viral⁵⁵.

Uso racional de los procedimientos diagnósticos en función del síndrome clínico y/o paciente

El diagnóstico de laboratorio de CMV puede abordarse con diferentes técnicas en función del tipo de paciente o población, cuadro o categoría clínica, área sanitaria que abarca el laboratorio de cada hospital y/o equipamiento y recursos disponibles en cada área en función de la población de estudio.

En la tabla 1 se resumen las principales técnicas para el diagnóstico de laboratorio de CMV en función del contexto clínico en estudio.

Conclusiones

La variabilidad en la presentación clínica, la alta prevalencia en población sana asintomática, y las controversias existentes para la utilización de numerosos procedimientos diagnósticos y sobre las indicaciones de tratamiento y/o profilaxis según las múltiples situaciones clínicas, convierten a la infección humana por CMV en uno de los mayores retos sanitarios a los que nos enfrentamos los microbiólogos clínicos en la actualidad.

Mientras que las técnicas serológicas para detectar anticuerpos tipo IgG e IgM constituirían la base para definir la infección primaria, principalmente en niños, y/o el estatus inmunológico en donantes y receptores de órganos, las técnicas moleculares en muestras de sangre constituyen hoy día la mejor alternativa para diagnóstico, pronóstico, seguimiento, tratamiento y estudio de resistencia a antivirales en pacientes trasplantados. La reciente introducción de las técnicas de detección de la respuesta inmune celular en candidatos a trasplante parece permitir una mejor discriminación que la serología basada en medición de anticuerpos IgG entre pacientes de alto, medio y bajo riesgo de infección postrasplante por CMV.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Tabla 1
Utilidad de los métodos diagnósticos para citomegalovirus (CMV) en función de la situación clínica

Técnica	Infección congénita		Infección primaria sintomática	Trasplante de órganos		ECMV (ID)
	Madre	RN		Donante	Receptor	
Indirecta						
IgM	+	++ ^a	+	nr/na	nr/na	nr/na
IgG (seroconversión)	+++	nr/na	++	nr/na	nr/na	nr/na
IgG (estatus serológico)	± ^b	nr/na	nr/na	+++ ^f	+++ ^f	nr/na
IgG (avidez)	+++	nr/na	+	nr/na	nr/na	nr/na
Citocinas (Quantiferon®-CMV)	nr/na	nr/na	nr/na	nr/na	++ ^g	++ ^g
Directa						
Antigenemia pp65	nr/na	+	nr/na	nr/na	++ ^h	+
Cultivo celular SV (antígeno precoz p72)	+++ ^c	+++ ^d	nr/na	nr/na	++ ^h	+++ ⁱ
ADN (o ARNm) cuantificado	+++ ^c	+++ ^e	nr/na	nr/na	+++ ^h	+++ ^h

ECMV (ID): enfermedad por CMV en inmunodeprimido; nr/na: no recomendado/no aplicable; RN: recién nacido; SV: *shell-vial*; ±, +, ++ y +++: controvertida, opcional, aceptable y alta recomendación, respectivamente.

^aLa determinación es diagnóstica en sangre de cordón o en las 2 primeras semanas de vida, aunque con baja sensibilidad.

^bNo recomendada actualmente en España.

^cEn líquido amniótico.

^dEn orina (2 primeras semanas).

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

^fEn pretrasplante.

^gPermite detectar riesgo alto, medio y bajo de ECMV, especialmente en trasplante de órgano sólido (escasez de estudios y/o estandarización).

^hEn sangre y/o plasma para seguimiento postrasplante y/o ID.

ⁱEspecialmente útil en ECMV con afectación orgánica con muestras del órgano afectado.

Bibliografía

- Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol.* 2008;197:65-73.
- Kalejta RF. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008;72:249-65.
- Méndez JC, Sia IG. Human cytomegalovirus. En: Lennette EH, Smith TF, editors. *Laboratory Diagnosis of Viral Infections.* 3rd ed. New York-Basel: Marcel Dekker Inc.; 1999. p. 361-72.
- Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni R, Brown CM, Cerny R, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;154:125-69.
- Renzette N, Bhattacharjee B, Jensen JD, Gibson L, Kowalik TF. Extensive genome-wide variability of human cytomegalovirus in congenitally infected infants. *Plos Pathog.* 2011;7:e1001344.
- Dolan A. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol.* 2004;85:1301-12.
- Salahuddin SZ, Ablashi D V, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science.* 1986;234:596-601.
- Griffiths PD. Cytomegalovirus. En: Zuckerman AJ, Banatvala Jangu E, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P, editors. *Principles and practice of Clinical Virology.* 6th ed. Oxford: John Wiley and Sons, Ltd.; 2009. p. 161-97.
- Griffiths PD. Burden of disease associated with human cytomegalovirus and prospects for elimination by universal immunisation. *Lancet Infect Dis.* 2012;12:790-8.
- Muranyi W, Haas J, Wagner M, Krohne G, Koszinowski UH. Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science.* 2002;297:854-7.
- Gkrania-Klotsas E, Langenberg C, Sharp SJ, Luben R, Khaw K-T, Wareham NJ. Seropositivity and higher immunoglobulin G antibody levels against cytomegalovirus are associated with mortality in the population-based European prospective investigation of cancer-norfolk cohort. *Clin Infect Dis.* 2013;56:1421-7.
- Lazarotto T, Guerra B, Gabrielli L, Lanari M, Landini MP. Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1285-93.
- Stagno S, Reynolds DW, Huang ES, Thames SD, Smith RJ, Alford CA. Congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 1977;296:1254-8.
- Stagno S, Reynolds DW, Pass RF, Alford CA. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 1980;302:1073-6.
- Hutto C, Little EA, Ricks R, Lee JD, Pass RF. Isolation of cytomegalovirus from toys and hands in a day care center. *J Infect Dis.* 1986;154:527-30.
- Roback JD. CMV and blood transfusions. *Rev Med Virol.* 2002;12:211-9.
- Griffiths PD, Grundy JE, Ali A, Sweny P, Trompeter RS, Fernando ON, et al. Cytomegalovirus matching in renal transplantation. *Lancet.* 1988;2:971.
- Pass RF. Cytomegalovirus. En: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 2675-705.
- Britt WJ. Recent advances in the identification of significant human cytomegalovirus-encoded proteins. *Transplant Proc.* 1991;23 3 Suppl 3:64-9; discussion 69.
- Trilling M, Le VTK, Hengel H. Interplay between CMVs and interferon signaling: implications for pathogenesis and therapeutic intervention. *Future Microbiol.* 2012;7:1269-82.
- Swanson EC, Schleiss MR. Congenital cytomegalovirus infection: new prospects for prevention and therapy. *Pediatr Clin North Am.* 2013;60:335-49.
- Alarcón Allen A, Baquero-Artigao F. Revisión y recomendaciones sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección posnatal por citomegalovirus. *An Pediatr (Barc).* 2011;74:52.e1-13.
- Metselaar HJ, Weimar W. Cytomegalovirus infection and renal transplantation. *J Antimicrob Chem.* 1989;23 Suppl E:37-47.
- Gallant JE, Moore RD, Richman DD, Keruly J, Chaisson RE. Incidence and natural history of cytomegalovirus disease in patients with advanced human immunodeficiency virus disease treated with zidovudine. The Zidovudine Epidemiology Study Group. *J Infect Dis.* 1992;166:1223-7.
- Hodge WG, Boivin J-F, Shapiro SH, Lalonde RG, Shah KC, Murphy BD, et al. Laboratory-based risk factors for cytomegalovirus retinitis. *Can J Ophthalmol.* 2004;39:733-45.
- Cordero Matía E, Len O. Esquemas de prevención de la infección por citomegalovirus: terapia anticipada frente a profilaxis universal. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29 Supl 6:33-7.
- Aguado JM, Gil Vernet S. Profilaxis de la infección por citomegalovirus en el trasplante renal. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29 Supl 6:38-41.
- Cantisán Bohórquez S, Navarro Ortega D. Estrategias de monitorización inmunológica para la infección por citomegalovirus. Tratamientos de base inmunológica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29 Supl 6:28-32.
- De la Torre-Cisneros J, Fariñas MC, Castón JJ, Aguado JM, Cantisán S, Carratalá J, et al. GESITRA-SEIMC/REIP recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29:735-58.
- Mccarthy FP, Giles ML, Rowlands S, Purcell KJ, Jones CA. Antenatal interventions for preventing the transmission of cytomegalovirus (CMV) from the mother to fetus during pregnancy and adverse outcomes in the congenitally infected infant (Review). *Cochrane database of systematic reviews.* 2011;(3):Art No: CD008371.
- Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 2005;353:1350-62.
- Jacquemard F, Yamamoto M, Costa J-M, Romand S, Jaqz-Aigrain E, Dejean A, et al. Maternal administration of valaciclovir in symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection. *BJOG.* 2007;114:1113-21.
- Hodson E, Ladhani M, Webster A, Strippoli G, Craig J. Antiviral medications for preventing cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients (Review). *Cochrane database of systematic reviews.* 2013;(2):Art. No.: CD003774.
- Owers D, Webster A, Strippoli G, Kable K, Hodson E. Pre-emptive treatment for cytomegalovirus viraemia to prevent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients (Review). *Cochrane database of systematic reviews.* 2013;(2):Art No: CD005133.

35. Lilja AE, Mason PW. The next generation recombinant human cytomegalovirus vaccine candidates-beyond gB. *Vaccine.* 2012;**30**:6980-90.
36. Kadambari S, Williams EJ, Luck S, Griffiths PD, Sharland M. Evidence based management guidelines for the detection and treatment of congenital CMV. *Early Hum Dev.* 2011;**87**:723-8.
37. Baquero-Artigao F. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus. *An Pediatr (Barc).* 2009;**71**:535-47.
38. Baquero-Artigao F. Citomegalovirus congénito: ¿es necesario un cribado serológico durante el embarazo?. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;**28**:363-9.
39. Hebart H. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma -enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2002;**99**:3830-7.
40. Lisboa LF, Kumar D, Wilson LE, Humar A. Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation.* 2012;**93**:195-200.
41. Giulieri S, Manuel O. QuantiFERON®-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011;**11**:17-26.
42. Manuel O, Husain S, Kumar D, Zayas C, Mawhorter S, Levi ME, et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis.* 2013;**56**:817-24.
43. Griffiths PD, Emery VC. Cytomegalovirus. En: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical virology.* New York: Churchill Livingstone Inc.; 1997. p. 445-70.
44. Razonable RR, Paya C V, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2002;**40**:746-52.
45. Grefte JM, Van der Gun BT, Schmolke S, Van der Giessen M, Van Son WJ, Plachter B, et al. The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. *J Gen Virol.* 1992;**73** Pt 11:2923-32.
46. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Snyderman DR, et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation.* 2010;**89**:779-95.
47. Drew WL. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;**20**:408-11.
48. Kulkarni A, Westmoreland D, Fox JD. Molecular-based strategies for assessment of CMV infection and disease in immunosuppressed transplant recipients. *Clin Microbiol Infect.* 2001;**7**:179-86.
49. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev.* 2002;**15**:680-715.
50. Gerna G, Baldanti F, Lillieri D, Parea M, Alessandrino E, Pagani A, et al. Human cytomegalovirus immediate-early mRNA detection by nucleic acid sequence-based amplification as a new parameter for preemptive therapy in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2000;**38**:1845-53.
51. Tolan RW, Palmer A, Michaels MG. Dried blood spot polymerase chain reaction screening for congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr.* 2010;**157**:1045; author reply 1045-6.
52. Torre-Cisneros J, Fortún J, Aguado JM, De la Cámara R, Cisneros JM, Gavalda J, et al. Consensus document from GESITRA-SEIMC on the prevention and treatment of cytomegalovirus infection in transplanted patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;**23**:424-37.
53. Zedtwitz-Liebenstein K, Jaksch P, Bauer C, Popow T, Klepetko W, Hofmann H, et al. Association of cytomegalovirus DNA concentration in epithelial lining fluid and symptomatic cytomegalovirus infection in lung transplant recipients. *Transplantation.* 2004;**77**:1897-9.
54. Kerschner H, Jaksch P, Zwegtlick B, Puchhammer-Stöckl E. Detection of human cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage fluid of lung transplant recipients reflects local virus replication and not contamination from the throat. *J Clin Microbiol.* 2010;**48**:4273-4.
55. Jabs DA, Martin BK, Ricks MO, Forman MS. Detection of ganciclovir resistance in patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis: correlation of genotypic methods with viral phenotype and clinical outcome. *J Infect Dis.* 2006;**193**:1728-37.