

Optimización del Tratamiento Anticipado de la Infección por Citomegalovirus en el Receptor de Trasplante de Órgano Sólido.

Cecilia Martín Gandul

Departamento de Medicina

Universidad de Sevilla

Junio 2014.



La Dra. Elisa Cordero Matía, Facultativo Especialista de Área de la Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío y Virgen Macarena, la Dra. Pilar Pérez Romero, Investigadora del programa Nicolás Monardes adscrita a la Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío y Virgen Macarena, y el Prof. Jerónimo Pachón Díaz, Catedrático de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN

Que el trabajo de investigación que lleva por título “Optimización del tratamiento anticipado de la infección por citomegalovirus en el receptor de trasplante de órgano sólido” ha sido realizado bajo su dirección por la Licenciada Doña Cecilia Martín Gandul, y reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Para que conste a los efectos oportunos, expiden la presente certificación en Sevilla, a 27 de Junio de 2014.

M^a Elisa Cordero Matía

Directora

M^a Pilar Pérez Romero

Co-Directora

Jerónimo Pachón Díaz

Tutor

Me gustaría agradecer, en primer lugar, a quienes han compartido conmigo este trabajo, a mi tutor, el Dr. Jerónimo Pachón, y a mis directoras de tesis, la Dra. Pilar Pérez y, muy especialmente, a la Dra. Elisa Cordero que ha viajado conmigo de la mano en este apasionante camino, por su esfuerzo y dedicación.

Quisiera mencionar a personas que me ayudan cada día a ser mejor profesional, de quienes tanto he aprendido y a quienes tengo un especial afecto, el Dr. Manuel Enrique Jiménez-Mejías y el Dr. José Miguel Cisneros, y a otros que me ayudaron en mis inicios compartiendo mis inquietudes e ilusiones, D. Rafael Círrera Guiraum.

A mi familia. A mis padres, Isabel y Fernando, que me han dado siempre la oportunidad de poder elegir, y a mis hermanos, a los que adoro, Nacho, Fernando, Marina y Santiago.

A mis compañeros del despacho y del laboratorio. A mis amigas, por apoyarme incondicionalmente en todas mis decisiones y, en definitiva, a todos los que sienten mis éxitos como suyos, pues la amistad es más necesaria en el infortunio pero más noble en la prosperidad.

Gracias a todos.

La sabiduría suprema es tener sueños bastante grandes
para no perderlos de vista mientras se persiguen.

William Faulkner

A mis padres,
Isabel y Fernando.

Financiación

Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD06/0008 y REIPI RD12/0015)- cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional “Una manera de hacer Europa” FEDER.

Difusión de resultados

REVISTAS INTERNACIONALES

- Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection.

Martín-Gandul C*, Pérez-Romero P*, Sánchez M, Bernal G, Suárez G, Sobrino M, Merino L, Cisneros JM, Cordero E; The Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).

* Both authors contributed equally to this work.

Journal of Clinical Virology 2013 Jan; 56 (1):13-8.

- Viral load, CMV-specific T cell immune response and cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients at higher risk for cytomegalovirus infection during preemptive therapy.

Cecilia Martín-Gandul*, Pilar Pérez-Romero*, Pilar Blanco-Lobo, Omar J. Benmarzouk-Hidalgo, Magdalena Sánchez, Miguel A. Gentil, Carmen Bernal, José M. Sobrino, María J. Rodríguez-Hernández, Elisa Cordero and The Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).

*Both authors have contributed equally to the manuscript.

Transplant International. *Aceptado para publicación.*

- Clinical impact of neutropenia related with the preemptive therapy of CMV infection in solid organ transplant recipients.

Cecilia Martín-Gandul, Pilar Pérez-Romero, Francisco M González-Roncero, Soledad Berdaguer, Miguel A Gómez, Ernesto Lage, Magdalena Sánchez, José M Cisneros, Elisa Cordero and The Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).

Journal of Infection. *Enviado a la revista.*

CAPÍTULO DE LIBRO

- El tratamiento anticipado de la infección por cmv en el receptor de trasplante hepático.

Pilar Blanco-Lobo*, Cecilia Martín-Gandul*, Damian Mena-Romo* José Miguel Cisneros, Elisa Cordero, Pilar Pérez-Romero.

*Estos autores han contribuido igualmente en la redacción del documento.

En: 1000 TRASPLANTES HEPÁTICOS. Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Sevilla, 2014. ISBN: 978-84-695-9555-8

Índice

I. Marco Conceptual	14
1. Características del citomegalovirus.....	15
2. Infección causada por CMV.....	17
3. Infección por CMV en pacientes trasplantados.....	20
3.1. Riesgo de infección por CMV en el receptor de trasplante de órgano sólido.....	23
3.2. Diagnóstico de la infección por CMV.....	25
3.2.1. Histopatología.....	26
3.2.2. Cultivo del virus.....	27
3.2.3. Pruebas serológicas: detección de anticuerpos frente a CMV.....	27
3.2.4. Antigenemia.....	28
3.2.5. Métodos moleculares.....	29
3.3. Prevención de la Infección por CMV.....	31
3.3.1. La profilaxis universal de la infección por CMV.....	32
3.3.2. El tratamiento anticipado de la infección por CMV.....	34
3.4. Tratamiento de la infección por CMV.....	35
3.4.1. Resistencia a fármacos anti-CMV.....	39
3.5. Respuesta inmune frente a CMV.....	41
4. Optimización del tratamiento anticipado de la infección por CMV en el receptor de trasplante de órgano sólido.....	43
4.1. Definición de un umbral de replicación viral para el inicio del tratamiento anticipado.....	43

4.2. Tratamiento anticipado en pacientes de alto riesgo. Carga viral y enfermedad por CMV. Profilaxis secundaria, inmunidad celular específica frente a CMV y riesgo de infección recurrente.....	46
4.3. Impacto clínico de la neutropenia relacionada con el tratamiento anticipado con valganciclovir.....	50
II. Hipótesis y Objetivos.....	52
HIPÓTESIS.....	53
OBJETIVOS.....	54
III. Materiales y Métodos.....	56
DISEÑO, PERIODO DE INCLUSIÓN, SUJETOS DE ESTUDIO Y DEFINICIONES.....	57
Diseño del estudio.....	57
Periodo de inclusión.....	57
Sujetos de estudio, criterios de inclusión y exclusión.....	57
Definiciones.....	59
VARIABLES, RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS.....	62
Monitorización y seguimiento de los pacientes.....	62
Variables, recogida y análisis estadístico de los datos.....	64
IV. Resultados.....	69
Objetivos 1-4. Determinación, validación y estandarización de un punto de corte determinado en plasma para el inicio del tratamiento anticipado en el receptor de trasplante de órgano sólido de bajo riesgo de infección por CMV.....	70
Objetivos 5-8. Tratamiento anticipado en pacientes de alto riesgo. Carga viral y enfermedad por CMV. Profilaxis secundaria, inmunidad celular específica frente a CMV y riesgo de infección recurrente.....	80

Objetivos 9-11. Impacto clínico de la neutropenia relacionada con el tratamiento anticipado con valganciclovir en los receptores de trasplante de órgano sólido.....	92
V. Discusión de los resultados y Conclusiones.....	101
DISCUSIÓN.....	102
Determinación, validación y estandarización de un punto de corte determinado en plasma para el inicio del tratamiento anticipado en el receptor de trasplante de órgano sólido de bajo riesgo de infección por CMV.....	103
Tratamiento anticipado en pacientes de alto riesgo. Carga viral y enfermedad por CMV. Profilaxis secundaria, inmunidad celular específica frente a CMV y riesgo de infección recurrente.....	106
Impacto clínico de la neutropenia relacionada con el tratamiento anticipado con valganciclovir en los receptores de trasplante de órgano sólido.....	111
CONCLUSIONES.....	119
VI. Bibliografía.....	121
VII. Anexos y publicaciones.....	134

Índice de figuras y tablas.

FIGURAS

Figura 1. Estructura del virión de CMV.....	15
Figura 2. Modelo de entrada de CMV en la células hospedadora.....	17
Figura 3. Curva ROC en la cohorte de determinación.....	75
Figura 4. Curva ROC en la cohorte de validación.....	79
Figura 5. Cinética de citoquinas, replicación por CMV y adquisición de la respuesta inmune celular específica frente a CMV.....	89

TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la profilaxis universal y del tratamiento anticipado.....	32
Tabla 2. Fármacos antivíricos para la prevención y el tratamiento de la infección por CMV.	37
Tabla 3. Guías del Instituto Nacional de Cáncer de USA (Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE); version 4.0).	61
Tabla 4. Cálculo del factor de conversión para expresar la carga viral de CMV en unidades internacionales/ml (UI/ml).	71
Tabla 5. Características demográficas de los pacientes e infección por CMV en ambas cohortes.	72

Tabla 6. Determinaciones realizadas con PCR a tiempo real en ambas cohortes.....	73
Tabla 7. Episodios de enfermedad por CMV. Carga viral pico y tiempo postrasplante. Cohorte de derivación.	74
Tabla 8. Valores umbrales (UI/ml).....	76
Tabla 9. Episodios de enfermedad por CMV. Carga viral pico y tiempo postrasplante. Cohorte de validación.	78
Tabla 10. Características basales de los pacientes incluidos.	81
Tabla 11. Análisis bivalente de los episodios de infección primaria e infección recurrente por CMV.	83
Tabla 12. Análisis bivalente en los receptores de trasplante renal que reciben profilaxis secundaria.	84
Tabla 13. Modelo multivariante de los factores de riesgo para el desarrollo de infección recurrente por CMV.	86
Tabla 14. Datos clínicos, virológicos e inmunológicos y evolución en los pacientes con enfermedad por CMV.	91
Tabla 15. Características basales de los pacientes incluidos en el estudio.	93
Tabla 16. Descripción de los episodios de replicación.	94
Tabla 17. Parámetros hematológicos: valor basal vs. valor <i>nadir</i>	96
Tabla 18. Etiología de las infecciones bacterianas relacionadas o no con la neutropenia.	98
Tabla 19. Factores de riesgo para el desarrollo de neutropenia grave (≤ 1000 células/ μ l). Regresión logística multivariante.	100

Resumen

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es definir acciones que nos permitan optimizar el tratamiento anticipado como estrategia preventiva de la infección por citomegalovirus utilizando los nuevos avances tecnológicos y del conocimiento, de los que ahora disponemos, que facilitan y mejoran el diagnóstico y la monitorización virológica e inmunológica de la infección. Para ello en primer lugar, se plantea como objetivo determinar un umbral estándar de replicación para el inicio del tratamiento anticipado según el riesgo del paciente de desarrollar infección por citomegalovirus. En segundo lugar, determinar las diferencias entre infección primaria y recurrente y, analizar el impacto de la adquisición de la respuesta inmune específica de células T frente a CMV y el uso de la profilaxis secundaria en la ocurrencia de infección recurrente en el paciente con serología negativa para citomegalovirus previa al trasplante. En tercer lugar, analizar el impacto clínico de la neutropenia relacionada con el tratamiento anticipado con valganciclovir, determinando los factores de riesgo que la producen y aquellos que pueden minimizarla.

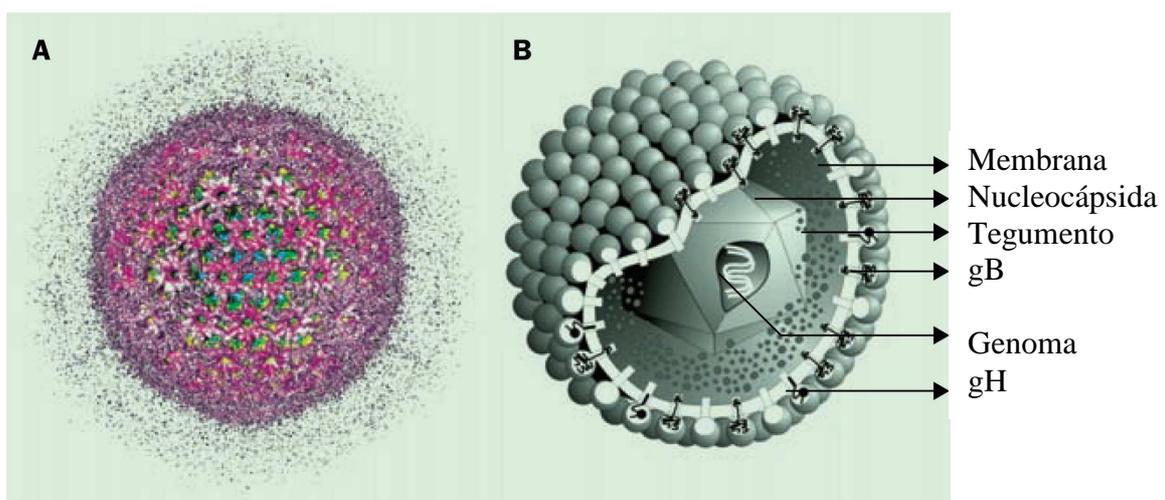
Apoyándonos sobre estos tres pilares, podremos individualizar el tratamiento anticipado, mejorar su manejo y su aplicabilidad clínica en el receptor de trasplante de órgano sólido infectado por citomegalovirus.

PARTE I. MARCO CONCEPTUAL

1. Características del citomegalovirus.

Citomegalovirus o herpesvirus 5 humano pertenece a la subfamilia beta-herpesviridae de la familia Herpesviridae. Citomegalovirus (CMV) es un virus envuelto por una doble membrana lipídica que proviene de la célula que infecta y adquiere durante el proceso de salida de la célula infectada, que porta tanto proteínas virales como celulares, y que engloba el tegumento proteico donde se encuentra la nucleocápsida icosaédrica que rodea al genoma. El citomegalovirus humano es la especie de mayor tamaño dentro de la familia Herpesviridae, con un tamaño de hasta 260 nm de diámetro, siendo también el virus de mayor tamaño que es capaz de infectar al ser humano.

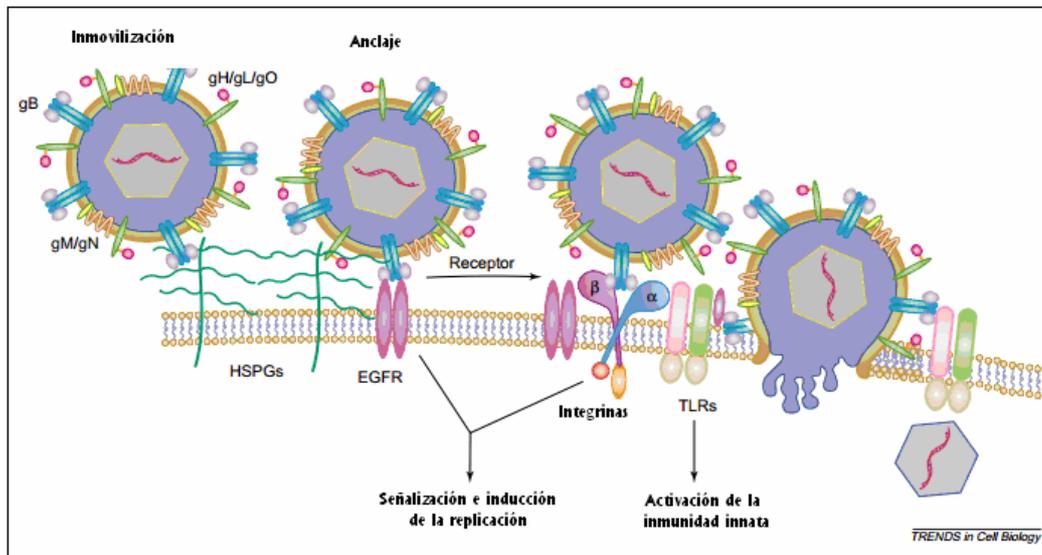
Figura 1. Estructura del virión de CMV. A. Representación tridimensional de la superficie del virus obtenida por microscopía electrónica con una resolución de 18 Å. B. Modelo tridimensional virtual de la estructura básica de CMV. (Adaptado de Gandhi MK y Khanna R 2004 (1)).



El CMV presenta un genoma formado por ADN lineal de doble cadena de gran tamaño (230 kb) con un único origen de replicación que codifica unas 230 proteínas diferentes (2), aunque no se han identificado todas y muchas de ellas no se han caracterizado y se desconoce su función. El genoma de CMV se encuentra dividido en secuencias internas repetidas (IRS) y secuencias únicas clasificadas en función de su tamaño en UL y US, además de secuencias terminales también repetidas (TRS), dado que cada segmento UL y US puede orientarse en cualquier dirección al ser transcrito. Como todos los herpesvirus humanos el genoma de CMV posee un gen que codifica la DNA polimerasa que realiza la replicación de su propio DNA y constituye la diana principal de los tratamientos antivíricos actuales.

La infección de la célula hospedadora se inicia con la unión de las glicoproteínas gM y gB de la envuelta viral con los proteoglicanos heparánulfato (HSPGs) de la membrana plasmática (3,4). Tras esta unión inicial inestable, el virus pasa a un estado de unión más estable al interactuar con uno o más receptores celulares (5). Una de estas interacciones más destacadas es la que lleva a cabo la gB con heterodímeros de integrina específicos, al igual que sucede con la interacción de gB con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (6,7). Durante la fase final de la entrada del virus, las envueltas celulares y virales se fusionan, liberando la nucleocápsida y las proteínas integrantes del tegumento al citoplasma celular de la célula hospedadora. Se piensa que en este proceso de fusión resultan fundamentales tanto la gB como el complejo formado por gH/gL (8–11) (Figura 2).

Figura 2. Modelo de entrada de CMV en la célula hospedadora. (Adaptado de Compton T 2004 (12)).



En el núcleo de la célula tras la síntesis de la DNA polimerasa se produce la replicación viral y las grandes inclusiones nucleares citomegálicas, característica distintiva de la infección por CMV en cultivos de tejidos y cuyo reconocimiento es útil en el diagnóstico de la infección.

2. Infección causada por CMV.

El CMV puede transmitirse vertical u horizontalmente. La transmisión vertical entre la madre y el feto con una incidencia de hasta el 56% (13), puede ser intrauterina o a través de la leche materna. La infección intrauterina se da en un tercio de las mujeres embarazadas que sufren una infección primaria, aunque se desconoce el modo por el que el feto evade la infección, existen estudios que apuntan a los macrófagos de la placenta como responsables de dicha acción (14). La segunda ruta de transmisión vertical sería a través de la leche materna y secreciones vaginales. En la leche materna

la carga viral alcanzada es menor que en las secreciones vaginales, donde pueden darse altas concentraciones del virus, pero la exposición se produce durante períodos más prolongados de tiempo (15).

En cuanto a la transmisión horizontal, en la infancia la forma más frecuente es a través de secreciones respiratorias y, tras la pubertad y con especial importancia en la población con múltiples parejas sexuales, la transmisión por vía sexual representa una de las rutas más frecuentes de transmisión horizontal (16–18). Las primoinfecciones por transfusiones de hemoderivados, aunque llegaron a tener una incidencia entre el 30% y el 60% a principios de los años 90 (19), se han reducido significativamente al 1% con el mantenimiento a 4°C de los concentrados de hematíes antes de la transfusión, y el riesgo es prácticamente inexistente cuando los productos sanguíneos son desleucocitados por filtración (20). Otra vía de transmisión horizontal primaria ocurre en los trasplantados de progenitores hematopoyéticos aunque con una menor incidencia (21,22), siendo más importante tras el trasplante de órgano sólido de un donante seropositivo para CMV a un receptor seronegativo. Este tipo de pacientes presentan entre un 60-80% de probabilidades de desarrollar una enfermedad más grave y el virus replica por lo general en mayor grado (23,24). Tras la infección primaria en estos pacientes, el virus establece latencia en distintos tipos celulares como las células polimorfonucleares, los linfocitos T, el tejido endotelial vascular, las células epiteliales renales y las glándulas salivales. Aunque los mecanismos precisos que controlan la latencia no están claros, como consecuencia de la inmunosupresión, otra enfermedad o el empleo de agentes quimioterápicos se puede producir la reactivación del virus ocasionando una infección secundaria. La infección secundaria puede ocurrir también debida a una reinfección. Tanto lactantes como adultos pueden verse infectados con múltiples cepas (25).

La infección por CMV es frecuente a nivel mundial con una tasa de seroprevalencia en la población general entre el 30 y el 97%, que varía en función de la edad, el sexo, la raza y/o el estatus socioeconómico, alcanzando el 60-70% en poblaciones urbanas de grandes ciudades de Estados Unidos y casi el 100% en algunas partes de África. En España la seroprevalencia está entorno al 62,8%, variando en función del sexo: 58,4 en hombres y 66,7% mujeres (26), y en función de la edad: 43,7 vs. 79,1% en grupos de 6 a 10 años y de 31 a 40 años, respectivamente (27).

La sintomatología de la infección por CMV es variable, incluyendo entre otras, formas asintomáticas, frecuentes en el huésped inmunocompetente, enfermedad congénita por CMV en neonatos y el síndrome mononucleósico, común en adultos jóvenes. La prevalencia de la infección congénita por CMV en los recién nacidos oscila entre el 0,3 y el 2,4%. Las tasas son más altas en Estados Unidos y menores en Europa, donde se sitúan entre el 0,3 y el 0,6%. Debido a su alta prevalencia, el CMV congénito es una de las causas más frecuentes de retraso psicomotor y sordera neurosensorial de origen infeccioso. La gran mayoría de las infecciones congénitas por CMV se producen tras una primoinfección materna durante el embarazo, lo que ocurre entre el 1 y el 4% de las gestantes seronegativas. En este caso, la infección ocurre en el 40% de los fetos y un 10% presenta síntomas al nacimiento, resultando en una mortalidad asociada del 4% y secuelas permanentes en alrededor del 50% (28). La infección primaria por CMV en un adulto joven puede producir un síndrome mononucleósico con fiebre, linfadenopatías y linfocitosis relativa. Se estima que el 79% de los casos de mononucleosis infecciosa son causados por el virus de Epstein-Barr y que el 21% restante corresponden a infección primaria por CMV. El síndrome de mononucleosis infecciosa inducido por CMV ha sido denominado “tifoideo” debido a que los síntomas pueden revestir un carácter más sistémico, con predominio de la fiebre y con menos adenopatías o

esplenomegalia. Múltiples complicaciones pueden asociarse a la infección por CMV durante la mononucleosis incluso en el huésped inmunocompetente, como son la hepatitis, por lo general leve, el síndrome de Guillain-Barré, la meningoencefalitis, la miocarditis y/o la aparición de exantemas maculopapulares y rubeoliformes. La infección congénita por CMV se asocia habitualmente a trombocitopenia y anemia hemolítica y raras veces se presenta en adultos sanos como complicación de la infección por CMV. Aunque la neumonía intersticial por CMV, ocurre fundamentalmente en pacientes inmunodeprimidos, puede ocurrir ocasionalmente también en huéspedes inmunocompetentes.

En el paciente inmunocomprometido, la infección por CMV produce los síndromes más graves e importantes. Los pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) 1 que tienen una disminución de las células CD4 inferior a 100 células/mm^3 presentan un riesgo significativamente aumentado de desarrollo de enfermedad grave por CMV. La retinitis por CMV es la forma más frecuente de enfermedad en estos pacientes. En este grupo de enfermos puede haber además afectación del sistema nervioso central (SNC) por CMV, siendo la forma más frecuente la polirradiculoneuritis (25).

3. Infección por CMV en pacientes trasplantados.

El tratamiento inmunosupresor empleado para controlar el rechazo tras el trasplante de órgano sólido y la enfermedad injerto contra huésped en el trasplante de progenitores hematopoyéticos, aumentan el riesgo de enfermedad por CMV.

En los receptores de progenitores hematopoyéticos, la neumonía por CMV es una complicación con una alta mortalidad asociada, con una incidencia de entre el 1% y el 6% en los trasplantes autólogos y de entre el 10% y el 30% en los receptores

aloténicos. Otras formas clínicas de enfermedad por CMV son la afectación del SNC, la afectación digestiva y la retinitis. Los receptores seropositivos (R+) que reciben un injerto de un donante seronegativo (D-) para CMV tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedad por CMV. Se estima que en pacientes no tratados, hasta el 80% de estos pacientes podrían desarrollar enfermedad por CMV (29).

En los receptores de trasplantes de órgano sólido (pulmonares, hepáticos, renales y cardíacos) el CMV es el patógeno detectado con mayor frecuencia causando una importante morbilidad y mortalidad tras el trasplante (30–32). En ausencia de profilaxis, la infección por CMV ocurre hasta en un 75% de los receptores de trasplante de órgano sólido con una incidencia que varía en función del tipo de órgano transplantado. Los receptores de trasplante con serología negativa (R-) para CMV que reciben un injerto de un donante con serología positiva (D+) tienen un mayor riesgo de desarrollar infección por CMV. Además, los receptores de pulmón e intestino tienen un riesgo mayor de desarrollar infección o enfermedad por CMV, los receptores de corazón e hígado un riesgo intermedio y los de riñón un riesgo menor (33). La frecuencia de enfermedad sintomática por CMV es variable según el tipo de órgano, el estado serológico del donante y del receptor, y el tipo de estrategia preventiva utilizada. En un estudio realizado en receptores de riñón e hígado que recibieron profilaxis con valganciclovir durante 100 días, la incidencia de enfermedad sintomática durante el primer año del trasplante fue del 19,2% y del 31,3% en el grupo D+R-, y del 2,5% y 3,2% en el grupo D-R-, en receptores de riñón e hígado respectivamente (34). En receptores de corazón que realizaron profilaxis universal el primer mes postrasplante y después tratamiento anticipado, la incidencia acumulada de infección y enfermedad por CMV durante el primer año fue del 47% y del 7,5% (3,6% en bajo riesgo y del 25% en alto riesgo) respectivamente (35). En un grupo de receptores de pulmón que recibieron

profilaxis universal entre 6 y 12 meses la incidencia de enfermedad fue del 14,9% y, en concreto en los pacientes D+R- del 26,6% (36).

La infección activa por CMV en el trasplantado puede ser asintomática o sintomática. En la infección asintomática, se detecta carga viral en ausencia de síntomas. La infección sintomática puede clasificarse como síndrome viral o enfermedad de órgano. El síndrome viral viene definido por la presencia de fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$) durante al menos dos días en un periodo de cuatro días, asociada a leucopenia, trombocitopenia o aumento de transaminasas durante el episodio de replicación viral. La enfermedad de órgano requiere un diagnóstico histológico para confirmar la presencia de CMV en el órgano afectado, salvo en la infección del SNC donde el diagnóstico se puede realizar por la presencia de clínica compatible asociada a la detección de replicación por CMV. La enfermedad digestiva por CMV, esofagitis, colitis, gastritis o tiflitis, asociada a diarrea y/o dolor abdominal es la más frecuentemente descrita. Se estima que hasta un 80% de los casos de enfermedad invasiva en el receptor de trasplante de órgano sólido corresponden a enfermedad gastrointestinal (37,38). Además, la recidiva es frecuente (39,40) y es posible que la enfermedad afecte el aparato digestivo siendo la viremia indetectable y requiriendo para su diagnóstico una prueba invasiva. Por otra parte, la infección parece asociarse al órgano transplantado de forma que, la neumonitis, la hepatitis, la nefritis, la miocarditis y la pancreatitis son más comúnmente observadas en los receptores de pulmón, hígado, riñón, corazón y páncreas, respectivamente. La retinitis, al contrario que en los pacientes con infección por VIH, es muy infrecuente en el receptor de trasplante de órgano sólido y ocurre generalmente de forma tardía y en el contexto de una enfermedad multiorgánica. Son menos frecuentes las enfermedades del SNC como la encefalitis.

Además de estos efectos por acción directa sobre el huésped, el CMV causa numerosos efectos indirectos en el receptor de trasplante como el aumento de infecciones oportunistas causadas por bacterias, hongos u otros virus. La infección por CMV se ha asociado también a una menor supervivencia del injerto y a un incremento de mortalidad tras el trasplante (38,41–43).

3.1 Riesgo de infección por CMV en el receptor de trasplante de órgano sólido.

Diferentes factores influyen en el riesgo de infección por CMV en el receptor de trasplante de órgano sólido:

a) El seroestatus de donante y receptor es el principal y más importante. Se estima que entorno al 20% de los pacientes con serología CMV negativa previa al trasplante reciben un órgano CMV seropositivo (D+R-). En estos pacientes, la infección latente del injerto puede reactivarse causando una infección primaria que en general es más grave debido a la falta de inmunidad específica frente a CMV medida por la presencia de anticuerpos de tipo IgG e IgM (44). Sin embargo, los pacientes considerados de bajo riesgo, receptores seropositivos que reciben un órgano seropositivo o seronegativo (D-R+, D+R+), también tienen una incidencia de enfermedad por CMV a lo largo de su evolución postrasplante que debe ser tomada en consideración. En un estudio realizado en nueve hospitales de Reino Unido, en los subgrupos de pacientes D+R+ y D-R+ se detectó una incidencia de enfermedad por CMV del 8,1% y del 9,0% respectivamente, no significativamente diferente al del subgrupo de D+R- (45). En los pacientes de bajo riesgo el desarrollo de infección por CMV puede deberse a una reactivación (virus latente en el receptor que se reactiva) o a una superinfección (virus latente en el donante que se reactiva). En general, aunque estas infecciones secundarias (reactivación y superinfección) presentan menor gravedad que las infecciones primarias, en algunas

series publicadas, la incidencia descrita de infección por CMV supera a la del paciente de alto riesgo. En un análisis retrospectivo de 211 receptores de trasplante hepático la incidencia de infección por CMV fue mayor en el subgrupo de pacientes R+ que en el subgrupo D+R-, si bien, el 67,3% de los pacientes que desarrolló infección no siguió ninguna estrategia profiláctica (46). Los receptores seronegativos que reciben un órgano seronegativo (D-R-) son los que tienen menor riesgo de infección por CMV, y aunque también se han descrito algunos casos de infección asociada a transfusiones sanguíneas como en el estudio anteriormente mencionado donde el 17,9% de los pacientes D-R- desarrolló infección por CMV (46), en la mayoría de las cohortes publicadas, la incidencia de enfermedad en este grupo de pacientes es prácticamente inexistente (45).

b) El tipo de órgano trasplantado. Los receptores de pulmón, intestino y páncreas son los que tienen mayor riesgo de infección, mientras que los receptores de hígado y riñón son los de menor riesgo (32). Esto se debe principalmente a la intensidad de la terapia inmunosupresora y a la cantidad de tejido linfoide que es trasplantado.

c) El tiempo postrasplante. El periodo de mayor riesgo de infección por CMV transcurre entre el primero y el sexto mes postrasplante, con una máxima incidencia entre el segundo y el tercer mes postrasplante, en relación a la intensidad del régimen inmunosupresor. Es por ello, que las estrategias preventivas se instauran en general en este periodo de tiempo.

d) El estado neto de inmunosupresión en el receptor. La dosis, duración y tipo de fármacos inmunosupresores, los defectos en la inmunidad innata y adaptativa, la edad y comorbilidades asociadas, conforman principalmente el estado inmunosupresor del paciente. El uso de inmunosupresores antilinfocitarios, como las globulinas antilinfocíticas o antitimocíticas, y los anticuerpos monoclonales OKT3, sobre todo si se usan como tratamiento para el rechazo, reducen el número de linfocitos T disminuyendo

su función que es fundamental para el control de la infección viral (47,48). Tras el tratamiento se produce la secreción de citoquinas, en particular del factor de necrosis tumoral, que desencadena la cascada inflamatoria y estimula de forma intensa la replicación de CMV. El micofenolato mofetilo a altas dosis también se ha asociado a un mayor riesgo de infección por CMV (49,50). Sin embargo, el uso de otros inmunosupresores como los inhibidores de la diana terapéutica de rapamicina en células de mamífero (everolimus, sirolimus), más conocidos como los inhibidores de m-TOR (mammalian target of rapamicyn), se han relacionado por el contrario con un menor riesgo de infección por CMV (51,52).

e) Otros. Otros factores asociados también a un mayor riesgo de infección por CMV son los eventos de rechazo y/o la incidencia de coinfecciones por otros herpesvirus como los herpesvirus humanos tipo 6 y 7 (53,54). Más recientemente, polimorfismos genéticos como mutaciones en los receptores “toll-like” TLR2 y 4 se han relacionado con una mayor incidencia de infección (55,56).

3.2 Diagnóstico de la infección por CMV.

Goodpasture y Talbert en 1921 fueron los primeros autores en sugerir que la “citomegalia” podía deberse a un agente viral. En 1960, Weller *et al.* propusieron el término “citomegalovirus” tras aislarlo en la orina de niños infectados (57). Históricamente, el diagnóstico de infección se establecía por criterios histopatológicos que requerían un procedimiento invasivo para la obtención de muestras. La primera prueba útil de laboratorio se basó en la detección de células con grandes inclusiones nucleares en el sedimento urinario y fue especialmente útil en el periodo neonatal. Posteriormente se han desarrollado varias pruebas de laboratorio que detectan anticuerpos anti-CMV en sangre para determinar si se ha producido una infección

previa. Además, el virus puede cultivarse a partir de muestras de orina u otros líquidos corporales para detectar infección activa.

En los últimos años el diagnóstico en el laboratorio de la infección por CMV ha experimentado importantes avances, especialmente con el desarrollo de técnicas moleculares. Las pruebas de laboratorio actualmente disponibles para confirmar la infección por CMV son: a) histopatología de tejidos biopsiados, b) cultivos, c) pruebas serológicas, d) antigenemia y d) pruebas moleculares que detectan y cuantifican ácidos nucleicos de CMV. La elección de la técnica a utilizar debe hacerse en base al objetivo diagnóstico. Actualmente, las pruebas serológicas que detectan anticuerpos frente a CMV son las más utilizadas previas al trasplante como marcador de infección previa tanto en el donante como en el receptor. Las pruebas cuantitativas como la antigenemia y la cuantificación del ADN viral por PCR en tiempo real son las más utilizadas para el diagnóstico y monitorización periódica de los pacientes en el periodo postrasplante para detectar de forma temprana la infección. Estas pruebas son útiles para conocer el pronóstico de la enfermedad por CMV, guiar el tratamiento anticipado, valorar la eficacia del tratamiento antivírico, determinar la respuesta del paciente al tratamiento y la duración apropiada del mismo y, preveer el riesgo de recurrencia o desarrollo de resistencias (58).

3.2.1 Histopatología.

La histopatología es la prueba de referencia para el diagnóstico de la enfermedad de órgano por CMV y, en general, la gravedad de los hallazgos se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. La histopatología requiere un proceso invasivo para obtener muestras mediante endoscopia oral y/o colonoscopia para confirmar la enfermedad gastroduodenal o la fibrobroncoscopia en el caso de neumonía. Dos limitaciones

importantes de esta aproximación son, en primer lugar, que no siempre es posible realizar una biopsia y, en segundo lugar, la discordancia entre los hallazgos en tejido y la determinación de la carga viral en muestras sanguíneas que se produce en algunos casos. Esto sobre todo se observa en casos de enfermedad gastrointestinal por CMV (59).

Los estudios inmunohistoquímicos utilizan sondas de ADNc específicas de CMV para la hibridación *in situ* uniéndose al ADN intracelular y pueden aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba. La detección de CMV en el tejido es necesaria para confirmar el diagnóstico de enfermedad de órgano excepto en el caso de retinitis o enfermedad del SNC (60).

3.2.2 Cultivo viral.

El cultivo viral es una prueba altamente específica aunque requiere un mayor tiempo de ejecución para la obtención de los resultados y posee una modesta sensibilidad. La prueba se puede realizar utilizando muestras de sangre, secreciones respiratorias, líquido cefalorraquídeo y muestras de tejidos. El cultivo de orina es muy utilizado en niños aunque su uso es controvertido en adultos (44). El cultivo viral es muy útil también en la detección fenotípica de resistencia a antivíricos, aunque los test genotípicos son actualmente la prueba de elección.

3.2.3. Pruebas serológicas: detección de anticuerpos frente a CMV.

De las diversas técnicas serológicas que detectan anticuerpos para CMV, las más utilizadas son las técnicas de inmunofluorescencia, la fijación de complemento, la aglutinación pasiva en látex y los métodos inmunoenzimáticos (ELISA). Las técnicas de ELISA detectan anticuerpos de clase IgG e IgM, son sensibles y pueden ser cuantitativas.

Son las utilizadas con más frecuencia. La determinación serológica de estos anticuerpos de tipo IgG e IgM frente a CMV es utilizada previa al trasplante para identificar si el paciente ha desarrollado previamente una infección por CMV y se utiliza como marcador subrogado de riesgo postrasplante de infección en función de la discordancia serológica existente entre donante y receptor. Los estudios serológicos tienen importantes limitaciones en la práctica clínica y actualmente no se utilizan como herramienta diagnóstica y monitorización de la infección por CMV. La detección de anticuerpos IgM, como marcador de infección aguda, puede tener falsos positivos por la persistencia de anticuerpos de este tipo de infecciones pasadas y por reacción cruzada con otros herpesvirus. Además, la detección de anticuerpos IgG a títulos elevados pueden influir en falsos negativos para la IgM (61). Sin embargo, la respuesta humoral y en particular los anticuerpos neutralizantes específicos frente al virus, aunque no son importantes en la resolución de la infección primaria, han demostrado ser esenciales para la prevención de la diseminación del virus en episodios posteriores de recurrencia o reinfección (62). Diversos estudios han demostrado que los anticuerpos antivirales tienen un efecto modulador sobre la infección y la evolución clínica de la enfermedad por CMV (63,64).

3.2.4. Antigenemia.

La nueva era en el diagnóstico de la infección por CMV comenzó con la introducción de pruebas cuantitativas para detectar tanto antígenos como DNA viral. La antigenemia es un ensayo de inmunofluorescencia que ha demostrado gran utilidad y consiste en la detección directa de antígenos en los neutrófilos empleando un anticuerpo monoclonal frente a la proteína pp65 de la matriz de CMV. Los resultados son expresados en número de células positivas por cada 200000 leucocitos. Algunos

estudios en receptores de trasplante de diferentes grupos de riesgo sugieren que valores de antigenemia en un rango de 1 a 400 células positivas/ 200000 leucocitos pueden ser predictivos del desarrollo de enfermedad, mientras que un recuento celular más bajo estaría asociado a una infección asintomática (65,66). Sin embargo, la ausencia de estandarización en el procesamiento de las muestras, la laboriosidad de la técnica y el hecho de que en pacientes con leucopenia aguda puedan obtenerse falsos negativos son limitaciones de esta técnica (44). Esto ha hecho que en la actualidad está siendo sustituida por nuevos métodos moleculares de detección que han demostrado su superioridad en cuanto a reproducibilidad y sensibilidad en numerosos estudios (31,66–68).

3.2.5. Métodos moleculares.

La incorporación de nuevos métodos moleculares para el diagnóstico de la infección por CMV, especialmente la amplificación de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han supuesto nuevas ventajas como una mayor rapidez, reproducibilidad y sensibilidad, y actualmente constituyen la principal alternativa a la antigenemia para el diagnóstico y monitorización del tratamiento de la infección por CMV en el paciente trasplantado. Las técnicas de PCR emplean cebadores específicos del genoma de CMV. Además, pueden utilizarse distintas muestras de fluidos corporales para realizar la extracción del genoma viral utilizado posteriormente como molde para la amplificación. Así, la detección del genoma de CMV ha revolucionado el abordaje terapéutico de la enfermedad por CMV en el receptor de trasplante y más concretamente la estrategia de tratamiento anticipado permitiendo detectar DNA viral en plasma o sangre completa de forma precoz y comenzar el tratamiento antivírico previo al desarrollo de enfermedad de órgano.

Sin embargo, aún siendo la DNAemia una técnica muy robusta, la variabilidad de las distintas técnicas disponibles en el mercado utilizadas en los distintos laboratorios, tanto por el tipo de muestra utilizada (plasma o sangre entera) como por los métodos de extracción del genoma viral o por las características de la propia técnica, hacen difícil extrapolar los resultados obtenidos en las diferentes instituciones y más complicada su aplicabilidad (69,70). En un estudio prospectivo de 82 receptores de trasplante renal se obtuvo una diferencia de 1 logaritmo en las cargas virales de CMV determinadas en sangre completa respecto a plasma (71).

Además, debido a esta variabilidad interlaboratorios, no era posible establecer un umbral de replicación viral estandarizado para el inicio del tratamiento en pacientes con tratamiento anticipado. Las guías de práctica clínica recomendaban que cada centro estableciera su propio umbral de replicación para iniciar el tratamiento en función del método que se utilizara, de la experiencia previa y del riesgo de infección individualizado de cada paciente (61,72). En un estudio multicéntrico en el que participaron 33 laboratorios de Europa y Norte América demostraron una variabilidad de entre 2 y 4,3 logaritmo (copias/ml) en las muestras analizadas (73). Para resolver este problema, en noviembre de 2010, la Organización Mundial de la Salud (OMS) comercializó el primer estándar internacional para la cuantificación de CMV humano en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NIBSC código 09/162). El estándar internacional, con una concentración de 5×10^6 unidades internacionales/mililitro (UI/ml), permite obtener un factor de conversión para los resultados de carga viral en copias/ml y los transforma en unidades internacionales/ml (UI/ml). De esta forma, aplicando el estándar a todos los métodos comercializados, los resultados pueden ser extrapolables y comparables entre los distintos centros pudiendo establecerse recomendaciones de manejo en función de los resultados estandarizados y un umbral de

replicación a partir del cuál iniciar el tratamiento anticipado. Esta acción fue establecida como objetivo prioritario en el último consenso internacional para el manejo de la infección por CMV en pacientes receptores de trasplante de órgano sólido (60).

3.3 Prevención de la infección por CMV.

Entre 1991 y 1995, cuatro estudios independientes publicados demostraron que la neumonía por CMV u otras enfermedades asociadas a CMV en receptores de trasplante, podían prevenirse mediante la administración de ganciclovir (45–48). Desde entonces, la prevención de la infección por CMV ha demostrado reducir de forma significativa los efectos directos e indirectos de la infección y las estrategias preventivas de tratamiento frente a CMV han sido recomendadas en todas las guías de práctica clínica (78–80).

Estrategias terapéuticas.

Dos estrategias de tratamiento, la profilaxis universal y el tratamiento anticipado, o un híbrido de ambas (81), son utilizadas en la prevención de la enfermedad por CMV. Ambas estrategias han demostrado ser efectivas para prevenir la infección por CMV (82,83). Sin embargo, tanto el tratamiento anticipado como la profilaxis universal tienen ventajas y desventajas (Tabla 1), y hay pocos ensayos clínicos aleatorizados que comparen directamente estas estrategias de prevención. Además, la mayoría de los estudios publicados incluyen sólo receptores de trasplante renal y demuestran una efectividad equiparable de ambas estrategias (84–87).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la profilaxis universal y el tratamiento anticipado.

	Profilaxis universal	Tratamiento anticipado
Eficacia	Previene la enfermedad por CMV mientras se administra pero riesgo de enfermedad tardía CMV.	Previene la enfermedad pero no la infección CMV.
Logística	Requiere monitorizar los efectos adversos como la neutropenia.	Requiere monitorización virológica semanal. Umbral de replicación no estandarizado.
Enfermedad tardía	Frecuente (sobre todo en R-/D+)	Poco frecuente
Coste	Alto en fármacos	Alto en pruebas de laboratorio
Toxicidad farmacológica	Mayor	Menor
Efectos indirectos	Reduce los efectos indirectos	Puede no reducir (pocos datos)
Resistencia a fármacos	Puede existir	Puede existir

3.3.1 La profilaxis universal de la infección por CMV.

La profilaxis universal consiste en la administración de tratamiento antivírico durante el periodo de mayor riesgo de enfermedad, habitualmente los primeros 90-100 días tras el trasplante. La profilaxis universal ha demostrado ser efectiva y se recomienda principalmente en pacientes con mayor riesgo de infección por CMV. El principal inconveniente asociado a esta estrategia es la incidencia de enfermedad tardía que ocurre aproximadamente en 18-31% de los pacientes y puede asociarse a un riesgo más elevado de mortalidad. Con el fin de solventar este problema se han propuesto varias recomendaciones (32). Por una parte, extender la profilaxis a 200 días en lugar

de los 100 días de tratamiento recomendados actualmente. En un estudio aleatorizado que incluyó 326 pacientes D+R- receptores de trasplante renal y comparó 200 días de tratamiento respecto a 100 días, la incidencia de enfermedad tardía fue significativamente menor en el grupo que recibió 200 días (16,1% vs. 36,8%; $P < 0,001$) (88). Sin embargo, el estudio muestra debilidades en la ejecución y el análisis estadístico y no se ha determinado claramente su efectividad (89,90). En otros tipos de trasplante como ocurre en el receptor de pulmón, la propuesta de extender la profilaxis ha sido fundamentada adecuadamente (91,92), y constituye la recomendación actual en estos pacientes. Otra opción potencial para prevenir la enfermedad tardía es continuar la monitorización virológica del paciente tras concluir la profilaxis universal. Sin embargo, esta estrategia denominada *prevención híbrida*, no ha demostrado ser de mucha utilidad, al menos en el receptor con serología pretrasplante positiva (R+). En un estudio en el que se evaluó un total de 86 receptores de trasplante renal (81), 30 pacientes R-D+ y 56 pacientes R+, en 13 pacientes (43%) R-D+ se detectó viremia al sexto mes postrasplante y de ellos 7 (54%) requirieron tratamiento con el diagnóstico de enfermedad tardía. Sin embargo, en 18 pacientes R+ (32%) se detectó viremia pero ninguno requirió tratamiento para aclarar la infección.

La toxicidad y el coste asociado a fármacos junto a la elevada incidencia de enfermedad tardía son factores a tener en cuenta cuando esta estrategia es instaurada. Por otro lado, la profilaxis universal aporta ventajas en cuanto a que se ha asociado a una reducción de los efectos indirectos que provoca la infección por CMV como son la ocurrencia de infecciones oportunistas o el rechazo del injerto (83,93), aunque en la mayoría de los estudios no se encontró una relación estadísticamente significativa en la incidencia de estas variables (94).

3.3.2 El tratamiento anticipado de la infección por CMV.

El tratamiento anticipado es administrado sólo cuando se detecta replicación viral por encima de un umbral y es instaurado durante un periodo de dos o tres semanas o hasta la resolución de la viremia. Para ello, se realiza una monitorización periódica de la replicación viral con pruebas de laboratorio, como la antigenemia pp65 o la PCR cuantitativa para CMV, con el objetivo de detectar infecciones virales asintomáticas e indicar el inicio del tratamiento para prevenir la progresión a enfermedad sintomática.

El tratamiento anticipado ha demostrado ser efectivo reduciendo la incidencia de enfermedad por CMV y disminuyendo el riesgo de enfermedad tardía (95,96). Es la estrategia más recomendada en los pacientes de bajo riesgo, fundamentalmente receptores de hígado, corazón y riñón con serología positiva frente a CMV (97–101). Aunque en menor proporción, es también utilizada en pacientes de alto riesgo de infección por CMV en los que se establece una monitorización más estrecha.

La disponibilidad logística del centro y los costes asociados a pruebas de laboratorio deben ser tenidos en cuenta cuando se adopta esta estrategia preventiva. Como ventajas del tratamiento anticipado destacan la disminución de los costes y toxicidad asociada a fármacos (60). El riesgo de enfermedad tardía es prácticamente inexistente (54,72,73).

Algunas sociedades científicas recomiendan en los pacientes donde concurren varios factores de riesgo para desarrollar recurrencia por CMV instaurar la *profilaxis secundaria* tras finalizar el tratamiento anticipado. Esta estrategia consiste en continuar el tratamiento con valganciclovir a dosis profilácticas de 900 mg/24h de dos a cuatro semanas tras finalizar el tratamiento anticipado a dosis completas de 900 mg/12h. Se consideran factores de riesgo de recurrencia la infección primaria por CMV, la carga viral elevada, la viremia persistente al inicio de la profilaxis secundaria, la enfermedad

de varios órganos, los órganos trasplantados de mayor riesgo y/o en casos de aumento de inmunosupresión por rechazo. Durante la profilaxis secundaria se recomienda también la monitorización de la carga viral (60). Sin embargo, la efectividad de esta estrategia no ha sido claramente demostrada y no hay suficiente evidencia que apoye su utilidad (104).

En una revisión sistemática realizada el año 2005 se evaluó la estrategia de tratamiento anticipado para la prevención de la enfermedad por CMV en el receptor de trasplante de órgano sólido (105). Recientemente esta revisión se ha actualizado e incluye un total de 15 ensayos clínicos aleatorizados de tratamiento anticipado (106). En 6 de ellos el tratamiento anticipado se comparó con placebo, en 8 con profilaxis universal y en uno el tratamiento oral y el intravenoso. Los resultados principales de esta revisión mostraron que el riesgo de enfermedad se redujo de manera significativa con el tratamiento anticipado respecto al placebo o al tratamiento no preventivo (RR 0,29; IC 95% 0,11-0,80) y que la leucopenia fue menos frecuente con la estrategia de tratamiento anticipado que con la profilaxis universal (RR 0,42; IC 95% 0,20-0,90). No se encontraron diferencias significativas en la efectividad de ambas estrategias (RR 1,00; IC 95% 0,36-4,30), probablemente debido a la elevada heterogenicidad en los estudios analizados.

3.4 Tratamiento de la infección por CMV.

El desarrollo de nuevos fármacos antivíricos ha permitido un mejor control de la infección por CMV. Ganciclovir, su prodroga valganciclovir, aciclovir, valaciclovir, foscarnet y cidofovir actúan como inhibidores de la DNA polimerasa viral. El fármaco más empleado frente a la infección por CMV es el ganciclovir [9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil)-guanina] que interacciona inicialmente con la proteína-quinasa viral

UL97 fosforilándola y pasando a la forma de ganciclovir-mono-fosfato. A continuación, continúa su fosforilación hasta ganciclovir-tri-fosfato, que es la formulación químicamente activa frente a su diana final, produciendo la inhibición de la síntesis de ADN por competición natural con su análogo original, la desoxi-guanosina-tri-fosfato (dGTP), y ralentizando la replicación viral.

Dada la baja biodisponibilidad de ganciclovir cuando es administrado por vía oral, se reformuló para facilitar su administración oral como valganciclovir. Valganciclovir es una prodroga L-valina éster del ganciclovir, que aumenta la biodisponibilidad ya que consigue superar la barrera gastrointestinal. Una vez absorbido, el valganciclovir es hidrolizado por hidrolasas de aminoácidos de éster, denominadas valaciclovirinas, dando lugar a ganciclovir que es incorporado al torrente sanguíneo. Las características farmacocinéticas de ganciclovir mejoran con la administración oral de éste en forma de valganciclovir, ya que la biodisponibilidad de éste asciende al $66\% \pm 10\%$.

Tanto el ganciclovir intravenoso como el valganciclovir oral son actualmente los antivíricos recomendados como primera línea de tratamiento en la infección por CMV (60,72). En los últimos años, se ha aumentado la experiencia del uso de valganciclovir y varios estudios han demostrado una eficacia equivalente con ambos fármacos (107,108). La seguridad y eficacia del tratamiento para la prevención de la infección por CMV con valganciclovir ha sido estudiada y comparada con ganciclovir intravenoso, aciclovir, valaciclovir y ganciclovir oral utilizado tanto como profilaxis universal (109–113) como tratamiento anticipado (114–116). Los beneficios de la administración oral de valganciclovir respecto a la intravenosa de ganciclovir, en lo referido a la disminución de la estancia hospitalaria, al riesgo de la terapia parenteral, y biodisponibilidad de valganciclovir, han promovido que actualmente sea el fármaco más utilizado en el

tratamiento de la infección por CMV. En el tratamiento preventivo de la infección por CMV valganciclovir es el fármaco de elección, aunque se ha asociado a una mayor incidencia de neutropenia que otros tratamientos, principalmente en el caso de los pacientes que hacen profilaxis universal extendida a 200 días (88,112).

Foscarnet y cidfovir aunque no son fármacos recomendados como primera línea de tratamiento sí son utilizados como segunda y tercera línea de tratamiento de la enfermedad por CMV, respectivamente. En la Tabla 2 se describen las fortalezas y limitaciones de estos fármacos.

Tabla 2. Fármacos antivíricos para la prevención y el tratamiento de la infección por CMV.

Fármaco	Tratamiento de la infección por CMV	Profilaxis universal	Uso, limitaciones y toxicidad
Valganciclovir	900 mg/12h	900 mg/24h	Vía oral. Leucopenia
Ganciclovir oral	No recomendado	1g/8h	Baja biodisponibilidad oral. Incómoda posología. Riesgo de resistencia. Leucopenia
Ganciclovir iv	5mg/Kg/12h	5mg/Kg/24h	Vía intravenosa. Leucopenia
Valaciclovir	No recomendado	2g/6h	Sólo recomendado en trasplante renal. Incómoda posología. Efectos adversos neurológicos.
Foscarnet	60mg/Kg/8h ó 90mg/Kg/12h No recomendado en tto. anticipado	No recomendado	Segunda línea de tratamiento. Altamente nefrotóxico. Tto. en CMV resistente (UL97).
Cidofovir	5mg/Kg/semana No recomendado en tto. anticipado	No recomendado	Tercera línea de tratamiento. Altamente nefrotóxico. Tto. en CMV resistente (UL97).

Nota. Estas dosis son referidas a pacientes adultos con función renal normal.

Recientemente, ha sido publicada una revisión del tratamiento antivírico de la infección por CMV en el receptor de trasplante de órgano sólido con el objetivo de determinar los beneficios y perjuicios de estos fármacos. En esta revisión se incluyen un total de 37 estudios (4342 participantes), ensayos clínicos randomizados y quasi-randomizados comparando los antivíricos con placebo o no tratamiento. Esta revisión concluye que el uso preventivo de antivirales reduce el riesgo de enfermedad respecto al placebo o no tratamiento, recomendándolo de forma rutinaria tanto en los R+ como en los R- que reciben un órgano de D+. Sin embargo, en este estudio no se hicieron recomendaciones a cerca de la duración y la dosis óptima del tratamiento (117). La profilaxis universal suele administrarse durante los primeros 100 días del trasplante, sin, aunque hay autores que han propuesto extenderla hasta 200 días en los pacientes de mayor riesgo (88). La duración del tratamiento anticipado es de al menos un mínimo de 14 días y debiendo extenderse hasta una semana tras la obtención de un resultado de carga viral negativo (118). La duración del tratamiento de la enfermedad por CMV es 14-21 días, aunque en un estudio aleatorizado que evaluó a 321 receptores de trasplante de órgano sólido, los tratamientos de 21 días de duración resultaron ser insuficientes para erradicar la infección (107).

Un aspecto a tener en cuenta en la duración del tratamiento son los efectos adversos de estos fármacos sobre el receptor. El efecto adverso más frecuentemente asociado al tratamiento con valganciclovir es la toxicidad hematológica, principalmente la neutropenia. Ésta debe ser tenida en cuenta especialmente en tratamientos largos, y puede determinar incluso la interrupción del tratamiento antivírico (119). Actualmente no hay datos concluyentes al respecto y, la duración y posología óptimas del tratamiento de la infección por CMV siguen pendientes de esclarecer.

En pacientes con riesgo de leucopenia, enfermedad aguda, altas cargas virales o no respondedores al tratamiento puede indicarse reducir la inmunosupresión (principalmente mofetil micofenolato) durante el tratamiento con valganciclovir (32). En el caso de infección recurrente, el tratamiento con inmunoglobulinas puede ser considerado como adyuvante a la terapia en pacientes con hipogammaglobulinemia (120).

3.4.1 Resistencia a fármacos anti-CMV.

En el año 2000, la revista *Lancet* publicó un artículo que describía la emergencia de resistencias en el 7% de pacientes D+R- receptores de trasplante de órgano sólido tras recibir tratamiento profiláctico con ganciclovir oral, con un 20% enfermedad por CMV (121). Desde entonces, la resistencia ha sido descrita también en pacientes con serología de riesgo intermedio y se ha detectado tanto durante el tratamiento anticipado como con la profilaxis universal (122,123).

La resistencia vírica está asociada a la selección de mutaciones en los genes que codifican las proteínas dianas de los fármacos antivíricos. El principal factor de riesgo que favorece el desarrollo de resistencia es la ausencia de inmunidad previa a CMV, siendo los pacientes D+R- los que tienen mayor riesgo de desarrollar resistencias. La exposición prolongada a tratamiento antivírico, especialmente a concentraciones subóptimas, la presencia de altas cargas virales o la intensa inmunosupresión son factores que contribuyen también al desarrollo de resistencias. Aunque no es muy frecuente, en receptores de trasplante de órgano sólido se ha detectado una incidencia de resistencias en torno al 5-20% (124). La presencia de cepas resistentes ha sido asociada a enfermedad invasiva, rechazo de órgano y a una elevada mortalidad. Aunque muchos

estudios han descrito la resistencia a ganciclovir, se ha demostrado también la resistencia de CMV a otros antivíricos.

Las guías de práctica clínica recomiendan tener sospecha de resistencia cuando se produce persistencia de síntomas clínicos tras una semana o más de tratamiento apropiado a dosis completas (resistencia clínica) o persistencia de carga viral estable o aumento progresivo tras dos semanas de tratamiento (resistencia virológica) (72). Ante la sospecha de resistencia, se recomienda instaurar tratamiento con ganciclovir iv a altas dosis (hasta 10mg/Kg/12h). Si tras una semana de tratamiento de reinducción la carga viral permanece estable o incrementa, se recomienda añadir o sustituir por foscarnet. En caso de ausencia de mejoría tras el tratamiento con foscarnet, se recomienda cidofovir como alternativa.

La selección de resistencias debe ser confirmada por métodos fenotípicos o genotípicos. Los métodos fenotípicos cuantifican la concentración necesaria de antivírico para inhibir el crecimiento del virus al 50% (CI50). Su limitación es el tiempo requerido para la obtención de resultados, ya que requiere previamente el aislamiento del virus de muestras clínicas. Además, la variabilidad en los resultados es amplia ya que las condiciones de los ensayos no han sido estandarizadas. Estos métodos pueden ser usados también para describir mutaciones que no han sido caracterizadas previamente. Los métodos genotípicos son usados más frecuentemente y consisten en la detección de mutaciones a través de la amplificación y secuenciación de los genes que codifican las proteínas dianas de los fármacos antivíricos. Los resultados se pueden obtener en 2-3 días, sin embargo, es necesaria una carga viral de al menos 1000 copias/ml para obtener los resultados. La principal limitación de estos métodos es la detección de mutaciones de las que no se conoce aún la relevancia clínica y que no ofrecen resistencia a ganciclovir. Las principales mutaciones descritas que confieren

resistencia a ganciclovir se encuentran localizadas en los genes UL97 que codifica la proteína-quinasa y UL54 que codifica la ADN-polimerasa. Si la mutación es detectada en UL54 puede conferir resistencia también a cidofovir y foscarnet. Actualmente, hay fármacos que están siendo ensayados como es letermovir, que responde a un mecanismo de acción diferente a los actuales. Su diana terapéutica es la terminasa viral, una enzima que desempeña un papel clave en la escisión y embalaje del ADN de CMV al final del ciclo de replicación. Los estudios iniciales sugieren su eficacia para cepas de CMV resistentes a ganciclovir, foscarnet y cidofovir (125).

3.5 Respuesta inmune frente a CMV.

El control inmunológico de la infección por CMV es un proceso complejo en el que intervienen la inmunidad innata del paciente y la inmunidad adquirida (humoral y celular). En la inmunidad innata intervienen citoquinas inflamatorias, receptores “toll-like” (TLR) y células “natural killer” (NK) que constituyen la primera línea de defensa frente a CMV. La respuesta inmune adquirida, mediada por los linfocitos B y T, es crítica en el control de la infección (126). La infección primaria por CMV induce una respuesta transitoria mediada por IgM durante las 3 primeras semanas, tras la cual se produce la secreción de anticuerpos IgG persistentes. La respuesta humoral y en concreto, los anticuerpos neutralizantes IgG, aunque no parecen estar implicados en el control de la replicación del virus, participan en el control de la diseminación del mismo y actúan como marcador subrogado en el caso de una reinfección o reactivación de una infección latente. La respuesta celular frente a CMV mediada por los linfocitos T CD4+ y CD8+, representa el mecanismo de defensa más importante frente a la infección por CMV. La función de los linfocitos T CD8+ o células citotóxicas es la eliminación de células infectadas por un mecanismo similar al que emplean las células “natural killer”

(NK). Varios estudios han sugerido que la respuesta mediada por los linfocitos T CD8⁺ pueden limitar los niveles de viremia de CMV y, en consecuencia la incidencia de enfermedad (127,128). Los linfocitos T CD4⁺ también ejercen un papel importante en el control de la infección por CMV, siendo los encargados de la estimulación de las células B, linfocitos T CD8⁺, macrófagos y resto de células del sistema inmune a través de la secreción de citoquinas específicas.

Actualmente, la monitorización de la inmunidad celular específica frente a CMV ha sido propuesta como herramienta para predecir la infección y enfermedad por CMV tras el trasplante, y se han desarrollado distintos métodos para cuantificar y analizar la respuesta inmune celular específica frente a CMV de células T. Los métodos que emplean tetrameros de HLA pueden determinar el número de linfocitos T que reconoce un determinado epítipo aunque no aportan información acerca de su capacidad funcional, siendo además necesario conocer el tipo de HLA de cada individuo. El marcaje de citoquinas intracelulares tras la estimulación de los linfocitos T con péptidos de CMV o lisado viral sí permite cuantificar la capacidad funcional mediante citometría de flujo (129). Este método permite el reconocimiento de los diferentes subtipos linfocitarios y permite la medida de la respuesta a antígenos de CMV, sin embargo, requiere una alta especialización del personal y es un método muy laborioso. En cuanto a las técnicas de ELISA, destacan dos técnicas comerciales basadas en la detección de citoquinas producidas por las células tras la estimulación antigénica. La técnica de ELISpot, que cuantifica el número de células T que liberan citoquinas específicas (interferón- γ o el factor de necrosis tumoral- α) tras la estimulación, aunque no distingue entre subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ (130). Y la técnica de QuantiFERON-CMV, que estima el número de linfocitos CD8⁺ comparado con el número de epítipos inmunogénicos de CMV a través de la cuantificación de interferón- γ (131,132).

Actualmente, el tratamiento inmunoguiado está adquiriendo cada vez más relevancia y ha sido recomendado en la última guía de práctica clínica internacional para el manejo de la infección por CMV como herramienta complementaria a la monitorización virológica de la infección por CMV (60).

4. Optimización del tratamiento anticipado de la infección por CMV en el receptor de trasplante de órgano sólido.

Diferentes aspectos pueden ser evaluados para optimizar el tratamiento anticipado, mejorar su manejo y aplicabilidad clínica. Los aspectos que se detallan a continuación constituyen los fundamentos de esta tesis doctoral.

4.1 Definición de un umbral de replicación viral para el inicio del tratamiento anticipado.

El tratamiento anticipado de la infección por CMV requiere una monitorización periódica de la carga viral del paciente que, en general, se realiza durante el primer año postrasplante. La mayoría de guías de práctica clínica recomiendan que durante el período de mayor riesgo, primer trimestre postrasplante, y durante el tratamiento antivírico, se realice una monitorización semanal de la carga viral. De cualquier forma, el esquema de seguimiento debe establecerse según el riesgo y situación clínica del paciente.

Aunque los esquemas de monitorización utilizados en los diferentes centros y propuestos en las distintas guías son muy homogéneos, las pautas de tratamiento son muy variables y aún no se ha establecido la duración óptima del tratamiento. En general, las guías de práctica clínica recomiendan un mínimo de dos semanas con dosis completas y retirar el tratamiento tras la obtención de valores indetectables de la carga

viral (o inferior al límite de detección de la técnica) (133). En el paciente R-D+ se recomienda esperar a obtener un segundo resultado negativo antes de retirar el tratamiento (60,72). Cuándo iniciar el tratamiento anticipado es igualmente controvertido y sigue sin estar establecido. Algunos autores recomiendan el inicio del tratamiento en el momento de detectar una carga viral positiva, principalmente en el paciente R-D+, y otros postulan distintos umbrales de replicación para el inicio de la terapia antivírica, generalmente en los pacientes de bajo riesgo (66,134). Sin embargo, y ante la falta de una referencia estándar, las guías recomiendan que cada centro desarrolle su propio protocolo de acuerdo a la técnica disponible en el laboratorio e individualizado según el riesgo del paciente (72). En base a esto algunos autores han propuesto puntos de corte para el inicio del tratamiento basados en su experiencia previa y los resultados obtenidos en los estudios realizados. En la mayoría de los casos, se definió este valor teniendo en cuenta la correlación entre los resultados obtenidos con la antigenemia pp65 y la PCR cuantitativa a tiempo real incorporada “de novo” al laboratorio (66,134–136). En algunos casos este valor umbral se diferenció en función del tipo de trasplante, órgano sólido o de progenitores hematopoyéticos, y tipo de órgano trasplantado. Hay estudios que correlacionaron un umbral de replicación con el desarrollo de síntomas y otros que establecieron distintos umbrales según el riesgo de infección (66,135,136). Los resultados obtenidos en función de la muestra utilizada para la determinación de la carga viral (sangre completa o plasma), y la técnica utilizada, PCR o antigenemia generalmente, eran también diferentes según el estudio (73).

Esta elevada heterogeneidad en los resultados publicados, hacía muy complicado deducir un punto de corte universalmente aceptado útil como referente estándar. En la última guía del consenso internacional para el manejo de la infección por CMV, se consideró un objetivo prioritario definir un punto de corte universal para el inicio del

tratamiento anticipado (80). A finales de 2010, la Organización Mundial de la Salud comercializó el primer estándar internacional que permite estandarizar la técnica de cuantificación de ácidos nucleicos de CMV en cada laboratorio y disponer de resultados normalizados y comparables a otros centros.

Hasta ahora, los umbrales de replicación han sido definidos en base a la experiencia propia o a publicaciones en la literatura. Sin embargo, el umbral de replicación para el inicio del tratamiento anticipado puede ser determinado mediante el uso de curvas ROC (Receiver Operating Characteristics, características operativas del receptor). Tradicionalmente, la exactitud de una prueba diagnóstica se ha evaluado en función de dos características: la sensibilidad y la especificidad. Sin embargo, éstas varían en función del criterio elegido como punto de corte entre la población sana y la enferma. Una forma más global de conocer la calidad de la prueba diagnóstica en el espectro completo de puntos de corte es mediante el uso de curvas ROC. Las curvas ROC se desarrollaron en los años cincuenta como herramientas para el estudio de detección e interpretación de señales de radar. El objetivo de los operadores de radar era distinguir las verdaderas señales de radar del ruido de fondo. De la misma forma, al realizar pruebas diagnósticas existe un solapamiento entre los resultados de los pacientes con una condición particular y los de aquellos que no la tienen. Por este motivo, las aplicaciones de las curvas ROC se extendieron a múltiples sistemas diagnósticos, incluidas las técnicas radiológicas y las pruebas de laboratorio. La curva ROC es un gráfico en el que se observan todos los pares sensibilidad (S) /especificidad (E) resultantes de la variación continua de los puntos de corte en todo el rango de resultados observados. Cada punto de la curva representa un par S/1-E correspondiente a un nivel de decisión determinado. Cualitativamente, cuanto más próxima es una curva ROC al ángulo superior izquierdo, más alta es la exactitud global de la prueba. El área

bajo la curva (ABC) ROC es una medida global de la exactitud de una prueba diagnóstica. Se define como la probabilidad de clasificar correctamente un par de individuos, sano y enfermo, seleccionados al azar de la población, mediante los resultados obtenidos al aplicarles la prueba diagnóstica. Así, el umbral determinado mediante curvas ROC podrá establecer un punto que asociado a un alto valor predictivo negativo, nos asegure que estando la carga viral por debajo de ese valor umbral la ocurrencia de enfermedad por CMV sea prácticamente inexistente, siendo seleccionado como el valor óptimo para el inicio del tratamiento.

Disponer de un umbral de replicación viral estandarizado que defina el inicio del tratamiento anticipado es crucial para mejorar el uso del tratamiento anticipado como estrategia preventiva de la infección por CMV.

4.2 Tratamiento anticipado en pacientes de alto riesgo. Carga viral y enfermedad por CMV. Profilaxis secundaria, inmunidad celular específica frente a CMV y riesgo de infección recurrente.

Carga viral y enfermedad. Infección primaria y recurrente.

La relación entre la carga viral de CMV en sangre y la clínica que presentan los pacientes suele ser directa y proporcional y parece estar relacionada con los factores de riesgo y el pronóstico (137). Generalmente, las cargas virales altas están asociadas con frecuencia a enfermedad de órgano, en rango intermedio a síndrome viral y a infección asintomática (38). La infección primaria en pacientes R-D+ se asocia a cargas virales más elevadas y a una mayor incidencia de viremia que la infección secundaria o recurrente. En un estudio aleatorizado comparando la profilaxis universal y el tratamiento anticipado en 118 receptores de trasplante renal, la mediana de la carga viral

pico fue significativamente mayor en pacientes R-D+ y R+D+ con cargas virales de 151762 y 7675 copias/ml, respectivamente (84). Además los pacientes R-D+ han demostrado tener mayor riesgo de desarrollar viremia en relación a otros grupos serológicos (hazard ratio ajustada 3,56; IC 95% 2,49-5,10; $P < 0.0001$) con una razón de incremento de la carga viral de CMV en sangre de 1,54 días (0,55-5,50) y de 2,67 días (0,27-26,70) en los pacientes R-D+ y R+D+, respectivamente (138).

Sin embargo, aunque parece claro que la infección es más grave en estos pacientes, disponemos de poca información ya que la mayoría de las cohortes publicadas de pacientes de alto riesgo que evalúan la enfermedad por CMV en pacientes con tratamiento anticipado son pequeñas, y la mayoría de los estudios son retrospectivos.

Hasta ahora, no ha sido establecido un umbral de replicación para el inicio del tratamiento anticipado en estos pacientes. Algunos autores han descrito puntos de corte inflexivos para enfermedad sintomática y asintomática en el paciente de bajo riesgo (139), pero en el receptor de trasplante de órgano sólido con alto riesgo de infección por CMV no se ha determinado aún un punto de corte “libre de síntomas”. El inicio del tratamiento en estos pacientes se establece tras detectar un resultado positivo de carga viral. Algunos autores han utilizado 1000 copias/ml como valor umbral para el inicio del tratamiento anticipado (68,134). Sin embargo, este valor umbral no está basado en ningún cálculo estadístico, ni ha sido validado ni estandarizado.

El riesgo de recurrencia se ha relacionado con cargas virales más elevadas y con la existencia de viremia persistente (140). En pacientes de alto riesgo que no han adquirido aún respuesta inmune celular específica frente a CMV, la gravedad de la recurrencia puede ser comparable a la infección primaria (138,141). Sin embargo, en un estudio prospectivo en receptores de hígado de bajo riesgo de infección, la mayoría de

las recidivas fueron asintomáticas y autolimitadas, asociadas a bajo nivel de viremia (142). Así, la infección recurrente parece ser diferente en el paciente de alto y bajo riesgo de infección, aunque la asociación entre la adquisición de la respuesta inmune y la ocurrencia de recurrencia no es bien conocida.

Hay cuestiones claves pendientes de aclarar en el tratamiento anticipado de la infección por CMV del receptor de trasplante de órgano sólido de alto riesgo como son si es posible determinar un valor umbral o una carga viral “libre de síntomas” para iniciar el tratamiento anticipado, conociendo la elevada especificidad de los métodos cuantitativos disponibles actualmente, y si el manejo de la infección primaria y recurrente debería ser el mismo.

Respuesta inmune celular específica frente a CMV.

La respuesta inmune celular específica frente a CMV desempeña un papel fundamental en el control de la infección y podría ayudar a esclarecer algunas de las cuestiones anteriormente planteadas. Hay autores que han relacionado la adquisición de la respuesta celular inmune específica con un aclaramiento espontáneo de la viremia. En un estudio prospectivo de 21 pacientes con serología negativa previa al trasplante, un 97,8% de los pacientes aclaraban la infección tras adquirir respuesta celular específica frente a CMV sin necesidad de tratamiento antivírico (128). Otros autores han determinado mediante la cuantificación de interferón- γ la respuesta inmune antes y después del trasplante, y han analizado su posible efecto predictor del riesgo de infección. En un estudio multicéntrico en el que se evaluaron 127 receptores de trasplante de órgano sólido la incidencia de enfermedad fue de 6,4% vs. 22,2% en los pacientes con resultado positivo y negativo en la prueba de quantiferon, respectivamente (143). En otro estudio prospectivo en el que se evaluaron 55 receptores de trasplante

pulmonar y renal, los pacientes con prueba pretrasplante “no reactiva” ($\text{IFN}\gamma < 0,2$ UI/ml) tenían mayor riesgo de replicación viral en el postrasplante respecto a los pacientes “reactivos” ($\text{IFN}\gamma \geq 0,2$ UI/ml) (144). Otros autores han publicado resultados contrarios. Eid *et al.* analizaron la respuesta específica de células T frente a CMV midiendo el interferón- γ producido por las células T CD4+ y CD8+ mediante citometría de flujo en un total de 44 receptores de trasplante renal y no encontraron una asociación significativa entre respuesta específica y la ocurrencia de replicación viral (145). Así, el papel de la respuesta inmune específica pudiera no ser el único determinante en el control de la infección.

En pacientes donde concurren varios factores de riesgo para el desarrollo de recurrencia como son la infección primaria, altas cargas virales antes de iniciar el tratamiento, viremia persistente tras el inicio del tratamiento, enfermedad multiórgano, órganos de mayor riesgo o incremento de la terapia inmunosupresora debida a rechazo, la profilaxis secundaria ha sido recomendada (72,146).

Profilaxis secundaria.

La profilaxis secundaria se ha recomendado en los pacientes con mayor riesgo de recurrencia en algunas guías clínicas (118,146), aunque su efectividad no ha sido claramente demostrada y no hay suficiente evidencia que apoye su utilidad (104). En un estudio retrospectivo en el que se analizaron los factores de riesgo para el desarrollo de recurrencia en 62 pacientes receptores de trasplante renal, de los que 34 pacientes (55%) recibieron profilaxis secundaria a criterio del personal clínico durante un periodo de dos a cuatro semanas tras haber recibido 6 meses de profilaxis universal con valganciclovir, 12 (67%) pacientes tuvieron recurrencia comparado con 22 (55%) que no recurrieron, con una diferencia no significativa (PNS) (104). La profilaxis secundaria ha sido

también utilizada tras la administración de tratamiento anticipado (85,87), sin embargo no se ha determinado su relación con la ocurrencia de recurrencia. Además, no hay estudios aleatorizados que apoyen el uso de esta estrategia.

En esta tesis será evaluado el impacto de la adquisición de la respuesta inmune celular específica frente a CMV y el uso de la profilaxis secundaria en la incidencia de infección recurrente.

4.3 Impacto clínico de la neutropenia relacionada con el tratamiento anticipado con valganciclovir en los receptores de trasplante de órgano sólido.

Un aspecto importante en la optimización del tratamiento anticipado es la seguridad del mismo en relación a la toxicidad de los fármacos empleados.

Valganciclovir es el antivírico más ampliamente usado en la prevención de la infección por CMV. Los efectos adversos más comunes asociados a la administración de valganciclovir son las alteraciones hematológicas como la neutropenia, la anemia y la trombocitopenia, que determinan en ocasiones un ajuste de dosis e incluso la interrupción del tratamiento (119,147). Una mayor incidencia de neutropenia se ha correlacionado con una mayor exposición a ganciclovir (111).

Algunos estudios han evaluado la relación entre la toxicidad hematológica y la duración de la profilaxis con valganciclovir. En el estudio “IMPACT”, 200 días de profilaxis universal no aumentaron el riesgo de toxicidad, siendo la incidencia de neutropenia, anemia y trombocitopenia similar a la del grupo control tratado durante 100 días (88,148). Sin embargo, en un subestudio farmacocinético que evaluó 120 pacientes del estudio “IMPACT”, se observó una tendencia hacia una mayor probabilidad de desarrollar leucopenia o linfopenia cuando la exposición a ganciclovir era incrementada, aunque no fue una asociación estadísticamente significativa (149).

El uso de bajas dosis de valganciclovir como tratamiento preventivo de la infección por CMV se ha relacionado con una disminución de los eventos hematológicos sin comprometer la eficacia del tratamiento (150–152). Con el tratamiento anticipado aunque los pacientes reciben menos tiempo de tratamiento antivírico, las dosis utilizadas son más elevadas (900mg/12h) que con la profilaxis universal (450mg/12h). Hay pocos estudios que hayan evaluado la toxicidad hematológica durante el tratamiento anticipado (115,153). En una revisión publicada por Strippoli *et al.* que incluyó 2 ensayos clínicos aleatorizados y 117 pacientes, el riesgo de leucopenia era menor en los pacientes que recibían tratamiento anticipado frente a los que recibían profilaxis universal (RR 0,12; IC 95% 0,01-0,96) (153).

En el receptor de trasplante de órgano sólido la neutropenia es frecuente. Estos pacientes reciben medicaciones concomitantes potencialmente mielotóxicas, como el micofenolato mofetilo, que asociado a la comorbilidad existente, como el hiperesplenismo o la anemia en procesos crónicos, pueden contribuir a una toxicidad hematológica aumentada (154). Además, se han descrito efectos mielotóxicos como consecuencia de la propia acción del virus.

En los pacientes con enfermedad oncohematológica, la neutropenia se ha asociado a una mayor incidencia de infecciones bacterianas y fúngicas (155). Sin embargo, en el receptor de trasplante de órgano sólido, aunque la neutropenia relacionada con valganciclovir/ganciclovir no es infrecuente, su relevancia clínica no ha sido previamente analizada.

Conocer el impacto clínico de la neutropenia relacionada con el tratamiento con valganciclovir/ganciclovir es importante para poder establecer un mejor manejo del tratamiento y mejorar el pronóstico en el paciente infectado por CMV.

PARTE II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Las hipótesis del estudio son:

1. Es posible establecer un punto de corte de replicación de CMV capaz de identificar los receptores de trasplante de órgano sólido de bajo riesgo de desarrollar infección por CMV que requieren tratamiento anticipado.
2. La estandarización de la técnica de PCR a tiempo real LightCycler® permite disponer de resultados de carga viral en unidades internacionales comparables entre distintos centros.
3. En el paciente de alto riesgo de infección por CMV es posible determinar un umbral de replicación relacionado con la no existencia de síntomas.
4. La infección primaria que ocurre en el paciente de alto riesgo no difiere de la infección secundaria o recurrente en parámetros de gravedad y evolución.
5. La profilaxis secundaria no es un factor protector en el desarrollo de recurrencia.
6. Los pacientes que desarrollan neutropenia debido al tratamiento con valganciclovir tienen un mayor riesgo de padecer infecciones fúngicas, víricas y/o bacterianas.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis doctoral es optimizar la estrategia del tratamiento anticipado de la infección por citomegalovirus, definiendo el inicio y la duración óptima del mismo en función de su eficacia y toxicidad.

Objetivos específicos

1. Estudiar la asociación entre la carga viral en sangre y la clínica presentada por los pacientes receptores de trasplante de órgano sólido de bajo riesgo para enfermedad por CMV.

2. Determinar un punto de corte para el inicio del tratamiento anticipado de la infección por CMV en el receptor de trasplante de órgano sólido de bajo riesgo para enfermedad por CMV.

3. Validar el punto de corte anteriormente determinado en una cohorte externa de receptores de trasplante de órgano sólido.

4. Determinar un factor de conversión en el laboratorio que permita estandarizar los resultados en UI/ml.

5. Determinar un umbral de replicación no asociado al desarrollo de síntomas en el paciente de alto riesgo de infección por CMV.

6. Analizar las características diferenciales de la infección primaria y de la infección recurrente por CMV en el paciente de alto riesgo durante el primer año postrasplante.

7. Analizar el impacto de la adquisición de respuesta inmune celular específica frente a CMV en el desarrollo de recurrencia.

8. Determinar si el uso de la profilaxis secundaria está asociado a menores índices de infección sintomática y/o enfermedad recurrente.

9. Estudiar la frecuencia de toxicidad hematológica durante el tratamiento anticipado con valganciclovir.

10. Definir los factores de riesgo para el desarrollo de toxicidad hematológica durante el tratamiento anticipado con valganciclovir:

10.1. Determinar la relación entre el tiempo de tratamiento y el desarrollo de toxicidad hematológica.

10.2. Conocer si existe diferencia de toxicidad hematológica en los pacientes receptores de hígado, corazón y riñón.

10.3. Conocer si existe diferencia de toxicidad hematológica en el paciente receptor de trasplante de órgano sólido de alto y bajo riesgo para infección por CMV.

11. Determinar el impacto clínico de la neutropenia durante el tratamiento con valganciclovir en relación al desarrollo de infecciones fúngicas, víricas y/o bacterianas.

PARTE III. MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO, PERIODO DE INCLUSIÓN, SUJETOS DE ESTUDIO Y DEFINICIONES.

Diseño del estudio.

Se diseñó un estudio de cohortes prospectivo en pacientes receptores de trasplante de órgano sólido, de acuerdo al programa de trasplante del Hospital Universitario Virgen del Rocío que incluye riñón, hígado y corazón.

Este estudio fue llevado a cabo de acuerdo a la Declaración de Helsinki y a las Guías de Buena Práctica Clínica.

Periodo de inclusión.

El periodo de inclusión se estructuró en base a los objetivos de la siguiente forma:

Objetivos 1-4:

Cohorte de derivación: octubre 2008- mayo 2009.

Cohorte de validación: Junio 2009- agosto 2010.

Objetivos 5-8:

Octubre 2008- mayo 2012.

Objetivos 9-11:

Octubre 2008- agosto 2010.

Sujetos de estudio, criterios de inclusión y exclusión.

Los sujetos del estudio fueron receptores de trasplante de órgano sólido de edad mayor o igual a 16 años que cumplieran los criterios detallados a continuación según objetivos:

Objetivos 1-4:

Criterios de inclusión:

La cohorte se constituyó por casos consecutivos de receptores de trasplante de órgano sólido con serología pretrasplante CMV positiva en los que se realizó determinación de carga viral de CMV mediante PCR a tiempo real.

Criterios de exclusión:

Fueron excluidos del estudio los pacientes que recibieron anticuerpos antilinfocitarios como terapia de inducción.

Objetivos 5-8:

Criterios de inclusión:

La cohorte se constituyó por casos consecutivos de receptores de trasplante de órgano sólido con serología pretrasplante negativa para CMV que firmaron el consentimiento informado y realizaron una monitorización virológica e inmunológica durante el primer año postrasplante.

Criterios de exclusión:

Fueron excluidos del estudio los pacientes que recibieron anticuerpos antilinfocitarios como terapia de inducción así como aquellos que no podían asegurar la monitorización por lejanía del domicilio.

Objetivos 9-11:

Criterios de inclusión:

La cohorte se constituyó por casos consecutivos de receptores de trasplante de órgano sólido que recibieron tratamiento anticipado con valganciclovir o ganciclovir frente a la infección por CMV.

Criterios de exclusión:

Fueron excluidos del estudio los pacientes con infección sintomática por CMV y /o con resistencia confirmada a ganciclovir.

Definiciones.

La infección y enfermedad por CMV fueron definidas de acuerdo al documento de consenso GESITRA-SEIMC/REIPI para el manejo de la infección por CMV en pacientes trasplantados de órgano sólido (siendo revisadas las definiciones publicadas por Ljungman *et al.* y la Guía del Consenso Internacional para el manejo de la infección por CMV) (60,72,156).

La *infección por CMV* se definió como la detección de citomegalovirus, de sus proteínas virales (antigenemia) o de DNA (métodos moleculares) en algún fluido corporal o tejido.

La *infección primaria* se definió como la detección de infección por CMV en un individuo previamente seronegativo para CMV.

La *infección secundaria o recurrente* se definió como la nueva detección de infección por CMV en un individuo donde previamente se ha documentado una infección por CMV.

Se consideró que existía *enfermedad por citomegalovirus* cuando el paciente infectado presentaba signos o síntomas de infección. La enfermedad por CMV puede clasificarse como: a) *Síndrome viral*, considerando éste como la presencia de fiebre >38°C, durante al menos dos días en un periodo de cuatro días, acompañado de leucopenia, trombocitopenia o incremento de transaminasas; b) *Enfermedad de órgano o invasiva*, considerando ésta cuando existe evidencia documentada de invasión de órgano. Las formas de enfermedad invasiva más frecuentes son la neumonitis, la enfermedad digestiva, la hepatitis, encefalitis, retinitis, nefritis, cistitis, miocarditis y

pancreatitis. Salvo en el caso de retinitis o de infección del SNC, es necesario la confirmación histológica mediante inmunohistoquímica o hibridación *in situ* para considerar como cierta una enfermedad por CMV.

La *enfermedad tardía* se define como la enfermedad por CMV que ocurre una vez concluido el periodo de mayor riesgo de infección en el que se administra la profilaxis antiviral, generalmente a partir de los 90 días tras el trasplante.

La *profilaxis universal* consiste en la administración de tratamiento antivírico a dosis profilácticas (900 mg/24h) durante el periodo de mayor riesgo de infección, generalmente los 100 primeros días tras el trasplante.

El *tratamiento anticipado* consiste en realizar una monitorización periódica del paciente e iniciar el tratamiento antivírico a dosis terapéuticas (900mg/12h) en el momento de detectar carga viral.

La *prevención híbrida* es la estrategia preventiva que consiste en realizar tratamiento anticipado tras finalizar el periodo de profilaxis universal.

La *profilaxis secundaria* consiste en mantener el tratamiento antivírico a dosis profilácticas tras concluir el tratamiento anticipado.

La toxicidad se define de acuerdo a las Guías del Instituto Nacional de Cáncer de USA (Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE); version 4.0) (Tabla 3) (157). La *toxicidad hematológica* se define como el decremento en al menos dos grados en la escala CTCAE en el valor *nadir* con respecto al valor basal. Se considera neutropenia grado 3 (grave) y neuropenia grado 4 a un número absoluto de neutrófilos igual o menor a 1000 células/microlitro y 500 células/microlitro, respectivamente. El valor *nadir* es definido como el valor más bajo detectado durante el tratamiento. El *periodo de latencia* es definido como el tiempo que transcurre desde el inicio del tratamiento antivírico hasta la ocurrencia del evento hematológico.

Tabla 3. Guías del Instituto Nacional de Cáncer de USA (Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE); version 4.0).

Efectos adversos	Recuento celular (unidades)	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
Anemia	Hemoglobina (g/L)	<LIN* -100	<100-80	<80-65	<65	Muerte
Linfopenia	Linfocitos (x10 ⁹ /L)	<LIN-0.8	<0.8-0.5	<0.5-0.2	<0.2	Muerte
Neutropenia	Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	<LIN-1.5	<1.5-1.0	<1.0-0.5	<0.5	Muerte
Trombocitopenia	Plaquetas (x10 ⁹ /L)	<LIN-75	<75-50	<50-25	<25	Muerte

* LIN: Límite inferior normal.

VARIABLES, RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS.

Monitorización y seguimiento de los pacientes.

El esquema de monitorización se estableció en función del riesgo de infección por CMV del paciente de la siguiente forma:

- a) En el paciente de alto riesgo serológico de infección (R-D+) el seguimiento fue semanal durante el primer trimestre postrasplante, quincenal desde el cuarto al sexto mes y mensual desde el séptimo mes hasta el 12 mes tras el trasplante.
- b) En el paciente de bajo riesgo (R+D-, R+D+), se realizó un seguimiento quincenal los seis primeros meses y mensual del séptimo al 12 mes del trasplante.
- c) Los pacientes R-D- se consideraron que no tenían riesgo de infección y no necesitaban ser monitorizados a no ser que alguna causa externa modificara este riesgo, como una transfusión sanguínea.
- d) Todos los pacientes, independientemente del riesgo, fueron monitorizados semanalmente durante el tratamiento anticipado y durante un mes después de la finalización del mismo. En los casos de rechazo que requiriera tratamiento con bolos de corticoides y/o timoglobulina también se monitorizaron semanalmente durante las 6 semanas desde el inicio del tratamiento.

La carga viral se determinó en cada visita para la consecución de los objetivos 1-4 y 9-11. La carga viral y la respuesta inmune específica de células T frente a CMV se determinaron en cada visita para la consecución de los objetivos 5-8. En todos los pacientes se analizaron la creatininemia y el hemograma al inicio del tratamiento antivírico, semanalmente durante el periodo de tratamiento y/ o hasta la resolución de los efectos adversos hematológicos una vez concluido el mismo.

La serología de CMV pretrasplante, se determinó en muestras de suero mediante la prueba de Elecsys CMV IgG (Roche Diagnostics; Mannheim, Germany).

La determinación de la carga viral se realizó en muestras de plasma usando la PCR a tiempo real LyghtCycler® 2.0 (Roche Applied Science) desde Octubre de 2008 hasta Abril 2012 y la PCR a tiempo real Cobas Ampliprep/Cobas taqman CMV® (Roche Applied Science) desde Abril de 2012 hasta Junio de 2013.

Para la determinación de la respuesta inmune celular específica se utilizó el marcaje intracelular de citoquinas. Primero, para la estimulación se partió de una muestra de sangre periférica extraída en heparina de litio que fue estimulada con 1 µg/ml de los péptidos PepMix HCMV pp65 y PepMix HCMV IE-1 (JPT Peptides Technologies GmbH, Berlin, Germany). Como control negativo se incluyó un tubo de sangre sin estimular, y como control positivo un tubo de sangre estimulada con 1,5 µg/ml ionomicina de *Streptomyces conglobatus* y 25 ng/ml PMA (*4-alpha-phorbol 12-myristate 13-acetate*; Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland). Todas las muestras fueron coestimuladas con 1 µg/ml de CD28/CD49d (Beckton Dickinson, San José, CA) y, para evitar la secreción de las citoquinas al entorno extracelular, se añadieron 10 µg/ml de brefeldina A (Beckton Dickinson). A continuación, las muestras se incubaron 4 horas a 37°C y 5% de CO₂, tras lo cual, se añadió 5 ml de la solución lisante FACS Lysis (Beckton Dickinson), para lisar los eritrocitos, y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 500 g durante 5 minutos a 4°C y se lavaron añadiendo 7 ml de solución salina PBS. Para el marcaje de los receptores de membrana se añadieron a cada tubo los anticuerpos monoclonales: 0,04 µg/µl PE anti-human CD69, 0,1 µg/µl PerCP/Cy5.5 anti-human CD4, 0,1 µg/µl APC/Cy7 anti-human CD8, 0,5 µg/µl Alexa Fluor® 700 anti-human CD3 (Biolegend). Se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Para fijar las células se

añadió a cada tubo 50 µl de IntraPrep reagent 1 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) y se incubaron durante 15 minutos, tras lo cual se lavaron con PBS. A continuación se llevó a cabo la permeabilización celular añadiendo 50 µl de IntraPrep reagent 2 e incubando 1 minuto. Seguidamente, se llevó a cabo el marcaje intracelular de las citoquinas, añadiendo los siguientes anticuerpos monoclonales: 0,025 µg/µl APC anti-human IL-2 y 0,05 µg/µl FITC anti-human IFN- γ . Se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se procedió a lavar con PBS el exceso de anticuerpos y se resuspendió el pellet en 250 µl de PBS. Las muestras se analizaron en el citómetro y se cuantificaron treinta mil eventos de células marcadas con anti-human CD3+ (antígeno específico para linfocitos T) del total de linfocitos, de las cuales se separaron las poblaciones CD4+ y CD8+, marcadas con sus respectivos anticuerpos. Los resultados fueron normalizados respecto al control negativo. Se consideró inmunidad celular específica frente a CMV positiva cuando el porcentaje de células T CD8+ que expresan CD69+ (antígeno de activación específico frente a antígenos de los linfocitos T) fue superior a 1% y el porcentaje de células T CD8+ secretoras de IFN- γ mayor a 0,25%, normalizados al control negativo.

Variables, recogida y análisis estadístico de los datos.

Objetivos 1-4.

Variables.

Todas las cargas virales de los pacientes que cumplían los criterios de inclusión y exclusión anteriormente detallados fueron determinadas en el departamento de microbiología y recogidas diariamente en una base de datos. Los resultados eran informados al clínico responsable que evaluaba al paciente para determinar la existencia

de posibles signos o síntomas de enfermedad. En la base de datos se recogieron la información demográfica y características basales del paciente, la información referente al trasplante, fecha, tipo de órgano, el tratamiento inmunosupresor, y la información referente a el/los episodio/s de replicación viral, fechas de inicio y fin de la detección de carga viral positiva, tratamiento antivírico y síntomas, en el caso de que existieran.

Estandarización de los resultados.

Todos los valores de carga viral de CMV se expresaron en unidades estandarizadas (unidades internacionales, UI/ml). Para ello, la técnica de PCR en tiempo real Quant CMV LightCycler® 2.0 disponible en el laboratorio fue estandarizada. El experimento se realizó utilizando el primer estándar internacional comercializado por la OMS para pruebas que cuantifican ácidos nucleicos de CMV (NIBSC code 09/162). En el laboratorio, el estándar fue reconstituido en 1 mililitro (ml) de agua libre de nucleasa para obtener una concentración de 5×10^6 unidades internacionales por ml (UI/ml). Esta preparación se dividió en cuatro alícuotas de 250 microlitros cada una. Cada alícuota fue diluida en plasma a concentración 1:10. El DNA viral se aisló en el MagnaPure utilizando 300 microlitros de cada preparación de 1:10 y se cuantificó utilizando la PCR en tiempo real LyghtCycler en experimentos realizados cuatro días consecutivos; cada día los experimentos se realizaron por triplicado obteniendo un total de 12 determinaciones. El valor medio obtenido y su correspondencia con la escala logarítmica proporcionaron de manera matemática el factor de conversión (que no posee unidades de medida). Los valores obtenidos en copias/ml fueron multiplicados por el factor de conversión para obtener el valor de la carga viral en unidades internacionales por mililitro (UI/mL).

Análisis estadístico.

Las variables se recogieron en una base de datos según objetivos y los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico SPSS (versión 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL). Se realizó un análisis descriptivo de todas las variables recogidas en cada uno de los estudios. Las variables cualitativas se expresaron como porcentajes de pacientes en el conjunto de los datos. Las variables cuantitativas como mediana y rango. Para las variables categóricas se utilizó el test de chi-cuadrado o el test de Fisher, cuando la frecuencia esperada era menor de 5. Las variables continuas se analizaron con la T de Student o el test de U-Matt Whitney si la muestra no cumplía criterios de normalidad. La asociación entre variables se expresó como odds ratio (OR) e intervalo de confianza del 95%. La significación estadística se estableció con un valor de $p < 0,05$ de dos colas.

Para la determinación y validación de un umbral de replicación se utilizaron las curvas ROC. El área bajo la curva (ABC) fue utilizado como medida global de la exactitud de la prueba diagnóstica. En nuestro análisis, cada par S/I-E representó una carga viral determinada, que a su vez estaba asociada a un estado de salud, asintomático/ enfermedad por CMV. El punto de corte o nivel de decisión elegido fue aquel que mejor discriminaba entre el estado asintomático y el de enfermedad, y fue definido en base a sus características de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo. El umbral óptimo de replicación para el inicio del tratamiento anticipado se definió en la cohorte de determinación y fue validado en la cohorte denominada de validación, constituida de manera consecutiva a la de determinación.

Las curvas ROC fueron determinadas usando el paquete estadístico SPSS, y la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (PPV) y valor predictivo negativo (NPV) se obtuvieron con el paquete estadístico G-Stat (versión 2.0). Se realizó

una regresión lineal para definir el incremento de la carga viral en plasma entre la primera detección positiva y el diagnóstico de enfermedad.

Objetivos 5-8.

Variables.

En cada muestra recogida según el esquema a) detallado en el apartado de monitorización, se determinó la carga viral (UI/ml) y la respuesta inmune celular específica frente a CMV. En una base de datos se recogieron los datos demográficos y epidemiológicos de los pacientes y de los donantes, régimen inmunosupresor y datos relacionados con los episodios de replicación viral tras el trasplante, carga viral al inicio del tratamiento, carga viral pico, duración de la viremia, duración del tratamiento, toxicidad asociada a fármacos y resolución de la infección.

Análisis estadístico.

Se realizó un análisis descriptivo y bivariante de acuerdo a lo señalado en el apartado anterior para determinar las diferencias entre infección primaria e infección recurrente y la probabilidad de recidiva en función del uso de profilaxis secundaria. Para estudiar la asociación entre el aclaramiento de la viremia y el pico de carga viral se realizó un análisis de regresión lineal. Además se realizó un análisis multivariante mediante regresión logística para determinar posibles factores confusores del uso de profilaxis secundaria en la recidiva de la infección por CMV.

Objetivos 9-11.

Variables.

Se recogieron datos demográficos, clínicos, tipo y fecha del trasplante, serología CMV pretrasplante, función renal y datos en relación al episodio de replicación,

duración de la viremia, fármaco y dosis utilizada, medicación concomitante y resolución de la infección. En relación al desarrollo de toxicidad, los valores de neutrófilos, linfocitos, plaquetas y hemoglobina se recogieron al inicio (valor basal) y durante el tratamiento (valor *nadir*). El uso de factor estimulante de colonias, el período de latencia y la resolución del evento hematotóxico fueron también recogidos. Se evaluaron la frecuencia, tipo y evolución de enfermedades infecciosas diferentes a CMV desde el inicio del tratamiento hasta 15 días tras la finalización del mismo o hasta la resolución de la neutropenia, en caso de que ésta se prolongara más allá de este plazo.

Análisis estadístico.

Se realizó un análisis descriptivo y bivariante de acuerdo a lo señalado en los apartados previos. Los parámetros hematológicos se compararon antes y después del tratamiento anticipado usando la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas. Se realizó un análisis multivariante para determinar los factores de riesgo asociados al desarrollo de neutropenia.

PARTE IV. RESULTADOS

OBJETIVOS 1- 4.

Determinación, validación y estandarización de un punto de corte determinado en plasma para el inicio del tratamiento anticipado en el receptor de trasplante de órgano sólido de bajo riesgo de infección por CMV.

Estandarización de la carga viral de CMV.

La técnica de PCR en tiempo real Quant CMV LightCycler® 2.0 fue estandarizada utilizando el estándar internacional comercializado por la OMS para pruebas que cuantifican ácidos nucleicos de CMV (NIBSC code 09/162). Los resultados obtenidos de los experimentos realizados en cuatro días consecutivos por triplicado se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Cálculo del factor de conversión para expresar la carga viral de CMV en unidades internacionales/ml (UI/ml).

	LightCycler® CMV (copias/ml) en plasma	logaritmo
Día 1	3,38x10 ⁵	5,52
	3,17x10 ⁵	5,50
	3,43x10 ⁵	5,53
Día 2	2,15x10 ⁵	5,33
	2,39x10 ⁵	5,37
	2,73x10 ⁵	5,43
Día 3	4,40x10 ⁵	5,64
	4,20x10 ⁵	5,62
	4,66x10 ⁵	5,66
Día 4	2,75x10 ⁵	5,43
	3,24x10 ⁵	5,51
	2,66x10 ⁵	5,42
Valor medio	3,26x10 ⁵	5,49
Factor de conversión	Concentración estándar internacional/ valor medio carga viral	1,53

El valor medio correspondiente a las mismas fue de $3,26 \times 10^5$ copias/ml, en relación a la concentración del estándar (5×10^5 UI/ml) proporcionaron de manera matemática un factor de conversión de 1,53. El factor de conversión sólo puede ser aceptado si cada una de las doce determinaciones difiere en $<0,5$ logaritmo respecto al valor medio. Para expresar los resultados en UI/ml se multiplica el número de copias/ml por el factor de conversión.

Determinación de un punto de corte para el inicio del tratamiento anticipado en la infección por CMV.

En la cohorte de derivación se incluyeron un total de 141 receptores de trasplante de órgano sólido CMV seropositivos. Las características clínicas de los pacientes se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Características demográficas de los pacientes e infección por CMV en ambas cohortes.

	Cohorte de derivación	Cohorte de validación
Pacientes incluidos, N	141	252
Edad, mediana (rango), años	53 (19-73)	55 (19-75)
Sexo, varones, N (%)	92 (65,2)	164 (65,1)
Órgano Trasplantado, N (%)		
Riñón	79 (56)	135 (53,6)
Hígado	49 (34,8)	87 (34,5)
Corazón	13 (9,2)	30 (11,9)
Episodios de replicación, N	84	119
Tratamiento anticipado, N (%)	29 (34,5)	60 (50,4)
Enfermedad por CMV, N (%)	9 (10,7)	9 (7,6)

Se realizaron un total de 982 determinaciones de PCR en tiempo real (Tabla 6). En 80 pacientes (56,7%) se obtuvieron resultados positivos de PCR y se recogieron un total de 84 episodios de replicación de CMV.

Tabla 6. Determinaciones realizadas con PCR a tiempo real en ambas cohortes.

RT-PCR rango (UI/ml)	Cohorte de derivación	Cohorte de validación
	Muestras, N (%)	Muestras, N (%)
Positivas	267 (27,2)	288 (14,2)
≤ 1000	112 (11,4)	48 (2,4)
1001-3000	114 (11,6)	166 (8,2)
3000-10000	26 (2,6)	59 (2,9)
10001-200000	13 (1,3)	15 (0,7)
≥ 200001	2 (0,2)	0 (0)
Negativas	715 (72,8)	1734 (85,8)
Total	982 (100)	2022 (100)

Veintinueve pacientes (34,5%) recibieron tratamiento con valganciclovir y nueve (10,7%) fueron diagnosticados de enfermedad por CMV, cinco con enfermedad digestiva y cuatro con síndrome viral. La carga viral media de los episodios de la enfermedad por CMV fue de 6620 copias/ml (RIQ 2755-115500) que corresponden a 10142 UI/ ml (RIQ 4221-176946) (Tabla 7).

Tabla 7. Episodios de enfermedad por CMV. Carga viral pico y tiempo postrasplante. Cohorte de derivación.

Órgano Trasplantado	Régimen Inmunosupresor	Rechazo (si/no)	Carga viral pico UI/ml (copias/ml)	Tiempo postrasplante (días)	Enfermedad CMV	Exitus
Riñón	PDN+TAC+MMF	no	3324 (2170)	106	Gastritis	no
Hígado	PDN+TAC+MMF	no	10142 (6620)	81	Gastritis	no
Hígado	PDN+TAC+MMF	si	18997 (12400)	44	Hepatitis	si
Hígado	PDN+CYA+MMF	no	5638 (3680)	34	Síndrome viral	no
Corazón	PDN+CYA+MMF	si	329380 (215000)	59	Síndrome viral	no
Riñón	PDN+TAC+MMF	no	698592 (456000)	67	Duodenitis	no
Riñón	PDN+TAC+MMF	no	4412 (2880)	47	Síndrome viral	no
Riñón	PDN+TAC+MMF	no	4029 (2630)	42	Gastritis	no
Riñón	PDN+TAC+MMF	no	24512 (16000)	37	Síndrome viral	no

PDN: Prednisona; TAC: Tacrolimus; CYA: Ciclosporina; MMF: mofetil micofenolato.

Dos pacientes fallecieron, uno con hepatitis debido a un hemotórax iatrogénico y el segundo con viremia asintomática debido a un fallo multiorgánico en relación con una disfunción primaria del injerto. Ninguna de las muertes estuvo relacionada con la infección por CMV. En el resto de los pacientes la infección se resolvió en una mediana de 23 días (RIQ 19-28) tras el inicio del tratamiento anticipado.

El área bajo la curva ROC en la cohorte de derivación (Figura 3) fue de 94,7% (IC 91,2-98,2). El valor predictivo positivo, el valor predictivo negativo, la especificidad y la sensibilidad para algunos de los umbrales seleccionados se detallan en la Tabla 8.

Figura 3. Curva ROC en la cohorte de determinación.

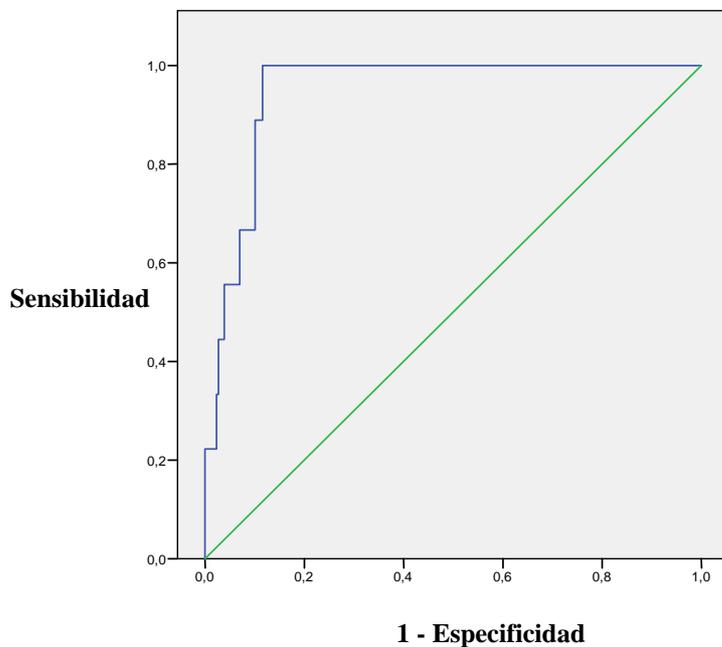


Tabla 8. Valores umbrales (UI/ml).

Valor umbral (UI/ml)	Especificidad % (IC95%)	Sensibilidad % (IC95%)	VPP % (IC95%)	VPN% (IC95%)
6319	93 (89,2-95,5)	55,6 (26,7-81,1)	21,7 (9,7-41,9)	98,4 (95,9-99,4)
4220	89,9 (85,6-93)	77,8 (45,3-93,7)	21,2 (10,7-37,8)	99,1 (96,9-99,8)
3983	89,9 (85,6-93)	88,9 (56,5-98)	23,5 (12,4-40)	99,6 (97,6-99,9)
3194	100 (70,1-100)	88,4 (83,9-91,7)	23,1 (12,6-38,3)	100 (98,9-100)

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó el valor de 3983 UI/ml (2600 copias/ml) como umbral óptimo para iniciar el tratamiento anticipado. Este punto de corte se asoció a un valor predictivo negativo de 99,6% (IC 97,6-99,9), un valor predictivo positivo de 23,5% (IC 12,4-40,0), una especificidad de 89,9 % (IC 85,6-93,0) y una sensibilidad de 88,9% (IC 56,5-98,0; Tabla 8).

Validación del punto de corte.

Para validar el punto de corte anteriormente definido se constituyó la cohorte de validación en la que se incluyeron 252 receptores de trasplante de órgano sólido CMV seropositivos (Tabla 5). Se realizaron 2022 determinaciones de PCR en tiempo real, de las cuales 288 fueron positivas en 107 pacientes (42,5%) (Tabla 6). Se recogieron un total de 119 episodios de replicación de CMV. Sesenta pacientes (50,4%) requirieron tratamiento antivírico y nueve (7,6%) fueron diagnosticados de enfermedad por CMV, ocho con enfermedad digestiva y un paciente con encefalitis diagnosticado mediante PCR en el líquido cefalorraquídeo (Tabla 9). La mediana de la carga viral en los

episodios de enfermedad por CMV fue de 3620 copias/ml (RIQ 1950-24700) correspondientes a 5546 UI/ml (RIQ 2987-37840). Un paciente presentó una gastritis, confirmada histológicamente, con carga viral negativa. En dos pacientes se diagnosticó enfermedad por CMV con cargas virales por debajo del valor umbral definido en la cohorte de derivación. Sólo el 33,3% de los pacientes con enfermedad por CMV realizó de manera correcta el protocolo de monitorización previamente establecido.

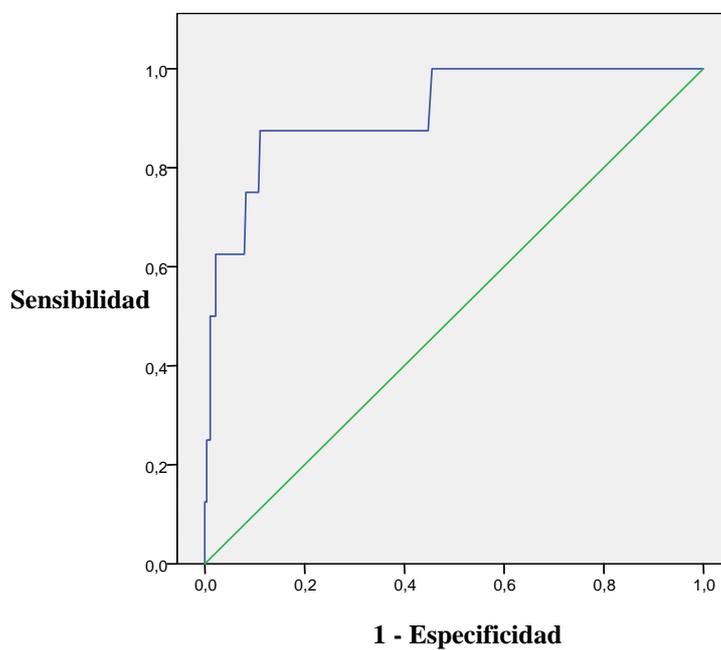
Tabla 9. Episodios de enfermedad por CMV. Carga viral pico y tiempo postrasplante. Cohorte de validación.

Órgano Trasplantado	Régimen Inmunosupresor	Rechazo (si/no)	Carga viral pico UI/ml (copias/ml)	Tiempo postrasplante (días)	Enfermedad CMV	Exitus
Riñón	PDN+TAC+MMF	no	5546 (3620)	172	Gastritis	no
Hígado	PDN+TAC+MMF	no	17832 (11640)	69	Encefalitis	no
Hígado	PDN+CYA+MMF	no	1930 (1260)	93	Gastritis	no
Hígado	PDN+TAC+MMF	no	Negativa	139	Gastritis	no
Hígado	PDN+TAC+MMF	no	81809 (53400)	28	Colitis	no
Riñón	PDN+TAC+MMF	no	52701 (34400)	46	Colitis	no
Hígado	PDN+TAC+MMF	no	22980 (15000)	47	Colitis	no
Hígado	PDN+CYA+MMF	no	5408 (3530)	37	Gastritis	no
Riñón	PDN+TAC+MMF	no	4044 (2640)	53	Duodenitis	no

PDN: Prednisona; TAC: Tacrolimus; CYA: Ciclosporina; MMF: mofetil micofenolato.

En la curva ROC se obtuvieron los siguientes parámetros para el valor de 3983 UI/ml: valor predictivo negativo: 99,2% (IC 97,2-99,8), valor predictivo positivo: 20,7% (IC 9,8-38,4), especificidad: 91,8% (IC 87,9-94,4) y sensibilidad: 75,0% (IC 40,9-92,9) (Figura 4).

Figura 4. Curva ROC en la cohorte de validación.



No se observó relación entre el incremento de la carga viral y el diagnóstico de enfermedad ($r^2=1,627$; IC 95% -5,13-8,39; $p=0,627$).

OBJETIVOS 5-8.

Tratamiento anticipado en pacientes de alto riesgo. Carga viral y enfermedad por CMV. Profilaxis secundaria, inmunidad celular específica frente a CMV y riesgo de infección recurrente.

Características de los pacientes.

Un total de 39 receptores de trasplante de órgano sólido fueron incluidos en el estudio. Las características basales de los pacientes se detallan a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10. Características basales de los pacientes incluidos.

Variables	Pacientes, N=39
Sexo, varón, N (%)	28 (71,8)
Edad, mediana (RIQ), años	50 (42-58)
Órgano Sólido Trasplantado, N (%)	
Riñón	23 (59,0)
Hígado	15 (38,5)
Corazón	1 (2,6)
Régimen Inmunosupresor, N (%)	
Terapia de inducción	
Basilixumab	10 (25,6)
Daclizumab	2 (5,1)
Terapia de mantenimiento	
Esteroides	39 (100)
Mofetil micofenolato/Ácido micofenólico	38 (97,4)
Tacrolimus	32 (82,1)
Ciclosporina	6 (15,4)
Inhibidores de mTOR	1 (2,6)
Otros	1 (2,6)

Infección primaria y recurrente.

Noventa y cuatro episodios de replicación viral fueron analizados. Todos los casos de infección primaria y 40 casos de infección recurrente por CMV (69%) requirieron tratamiento antivírico ($P < 0,001$).

En un modelo de regresión lineal cargas virales elevadas se correlacionaron con una resolución más lenta de la infección sin alcanzar la significación estadística (coeficiente $\beta = 0,206$; $P = 0,075$).

Tanto la infección primaria como la infección recurrente fueron más frecuentes en el trasplante renal respecto al de hígado y corazón. En los episodios de infección

primaria, la carga viral pico fue más elevada y la duración de la viremia algo más larga. Todos los episodios de infección primaria recibieron tratamiento antivírico, siendo la duración del mismo mayor que en los episodios de infección recurrente, 39 días (25-48) y 27 días (22-34), $P=0,083$, respectivamente. Valganciclovir fue el fármaco más ampliamente usado en ambos tipos de infección. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables analizadas (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis bivariante de los episodios de infección primaria e infección recurrente por CMV.

	Infección CMV primaria, N=36	Infección CMV recurrente, N=58	<i>p</i> -value
Órgano Trasplantado, N (%)			0,335
Riñón	20 (55,6)	38 (65,5)	
Otros	16 (44,4)	20 (34,5)	
Duración de la viremia, días, mediana (rango)	23 (21-32)	21 (11-30)	0,597
Carga viral pico, UI/ml, mediana (RIQ)	4536 (1981-15946)	3267 (1576-8484)	0,354
Tratamiento anticipado, N (%)	36 (100)	40 (69)	<0,001
Duración del tratamiento, días, mediana (RIQ)	39 (25-48)	27 (22-34)	0,083
Fármacos, N (%)			0,856
Valganciclovir	30 (83,3)	35 (87,5)	
Ganciclovir iv/valganciclovir	5 (13,9)	4 (10,0)	
Ganciclovir iv	1 (2,8)	0 (0)	
Foscarnet	0 (0)	1 (2,5)	
Clínica de la infección, N (%)			0,320
Asintomática	33 (91,7)	56 (96,6)	
Sintomática	3 (8,3)	2 (3,4)	
Síndrome viral	1 (2,8)	1 (1,7)	
Enfermedad de órgano	2 (5,6)	1 (1,7)	
Evolución, N (%)			0,999
Cura	36 (100)	56 (96,6)	
Exitus	0 (0)	2 (3,4)	

Profilaxis secundaria.

En 19 episodios de replicación los pacientes recibieron profilaxis secundaria a continuación del tratamiento anticipado durante una mediana de 16 días (14-24). Sólo los receptores de trasplante renal recibieron profilaxis secundaria que se instauró a criterio clínico.

En estos pacientes se realizó un análisis bivariante para determinar las características diferenciales en los episodios de replicación conforme al uso o no de profilaxis secundaria, y no se encontraron diferencias en cuanto al tiempo postrasplante, al uso de inducción o a la incidencia de neutropenia grave. El tipo de infección (recurrente o primaria) tampoco fue diferente en los pacientes que recibieron profilaxis respecto a los que no la recibieron, siendo la frecuencia de infección recurrente: 57,9% vs. 53,6%; $P=0,770$, respectivamente (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis bivariante en los receptores de trasplante renal que reciben profilaxis secundaria.

	Profilaxis secundaria vs. no profilaxis (19 vs. 28)		<i>p</i> -value
Tiempo postrasplante, días, mediana (RIQ)	76 (42-108)	106 (47-140)	0,574
Terapia de inducción, N (%)	8 (42,1)	10 (35,7)	0,659
Neutropenia (≤ 1000 cél/ μ l), N (%)	3 (15,8)	8 (28,6)	0,310
Carga viral pico, IU/ml, mediana (RIQ)	8645 (2708-16524)	5447 (2873-26469)	0,271
Duración de la viremia, días, mediana (RIQ)	30 (23-35)	25 (13-34)	0,655
Episodio recurrente, N (%)	11 (57,9)	15 (53,6)	0,770

Ningún paciente desarrolló infección durante la profilaxis secundaria y ninguno tuvo que abandonar el tratamiento debido a efectos hematotóxicos.

Como factor pronóstico, la incidencia de recurrencia no fue diferente en los que recibieron profilaxis secundaria respecto a los que no la recibieron, 19/14 (73,7%) vs. 28/21 (75%), respectivamente.

Se realizó un análisis multivariante para valorar el impacto de la profilaxis secundaria en la incidencia recurrencia y la existencia de posibles variables confusoras. Según este modelo (Tabla 13), la profilaxis secundaria no se relacionó con la recurrencia posterior. El único factor asociado a una reducción del riesgo de recurrencia fue la adquisición de respuesta inmune celular específica para CMV (OR=0,151; IC 95%: 0,028-0,815; P=0,028). El resto de factores incluidos en el modelo (tiempo tras el trasplante, el trasplante renal frente a hígado y corazón, la carga viral pico, la duración de la viremia y del tratamiento) tampoco se asociaron a la ocurrencia de infección recurrente.

Un curso previo de tratamiento antivírico más largo se asoció estadísticamente a la infección recurrente en el análisis bivariante (OR: 1,062; IC95% 1,014-1,114); P=0,012) pero no en el análisis multivariante (OR: 1,029; IC95% 0,993-1,067); P=0,118).

Tabla 13. Modelo multivariante de los factores de riesgo para el desarrollo de infección recurrente por CMV.

	Recurrencia vs. No recurrencia (58 vs. 36)		Odds ratio (IC 95%)	<i>p</i> -value
Tiempo postrasplante, días, mediana (RIQ)	59 (31-107)	150 (97-188)	0,993 (0,982-1,004)	0,208
Trasplante renal, N (%)	38 (65,5)	20 (55,6)	4,662 (0,988-21,997)	0,052
Respuesta inmune celular positiva, N (%)	12 (20,7)	25 (69,4)	0,151 (0,028-0,815)	0,028
Carga viral pico, IU/ml, mediana (RIQ)	5386 (1951-16409)	2861 (1622-6162)	1	0,401
Duración de la viremia, días, mediana (RIQ)	25 (17-32)	20 (8-30)	1,006 (0,978-1,035)	0,692
Duración del tratamiento, días, mediana (RIQ)	32 (22-44)	21 (0-27)	1,029 (0,993-1,067)	0,118
Uso de profilaxis secundaria, N (%)	14 (24,1)	5 (13,9)	0,532 (0,103-2,745)	0,451

Respuesta inmune celular específica frente a CMV.

En los 39 pacientes incluidos se determinó la adquisición de la respuesta inmune celular específica frente a CMV en cada visita según el esquema de seguimiento establecido. Dos pacientes (5,1%) no adquirieron respuesta inmune y ambos fallecieron durante el seguimiento en la semana 22 y 30 tras el trasplante, respectivamente. El resto de los 37 (94,9%) pacientes adquirieron respuesta inmune en una mediana de 14,7 semanas (rango 7-26) después del trasplante con una mediana de células T CD8+ expresando IFN- γ de 0.75% (rango 0.3-3.5), porcentaje significativamente mayor que el obtenido dos semanas tras el trasplante (mediana 0%, rango 0-0.5, $P < 0.001$) y al final del seguimiento (mediana de 0.46%, rango 0.01-2.24, $P < 0.001$; Fig. 5A). La subpoblación de células T CD4+ mostró una cinética similar, con un porcentaje de células T CD4+ que secreta IFN- γ en el momento de la adquisición de la respuesta inmune más elevado (mediana 0.3%, rango 0-5.4, $P < 0.001$; Fig. 5B) que el cuantificado a las dos semanas tras el trasplante (mediana 0%, rango 0-0.8). No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de células T CD4+ vs. CD8+ que expresaron IFN- γ tras la estimulación a las dos semanas del trasplante ni en el momento de la adquisición de la respuesta inmune, mientras que al final del seguimiento, el porcentaje de células T CD4+ expresando IFN- γ fue significativamente menor respecto al de células T CD8+ (mediana 0.46 % vs. 0.048 %, respectivamente; $P = 0.007$).

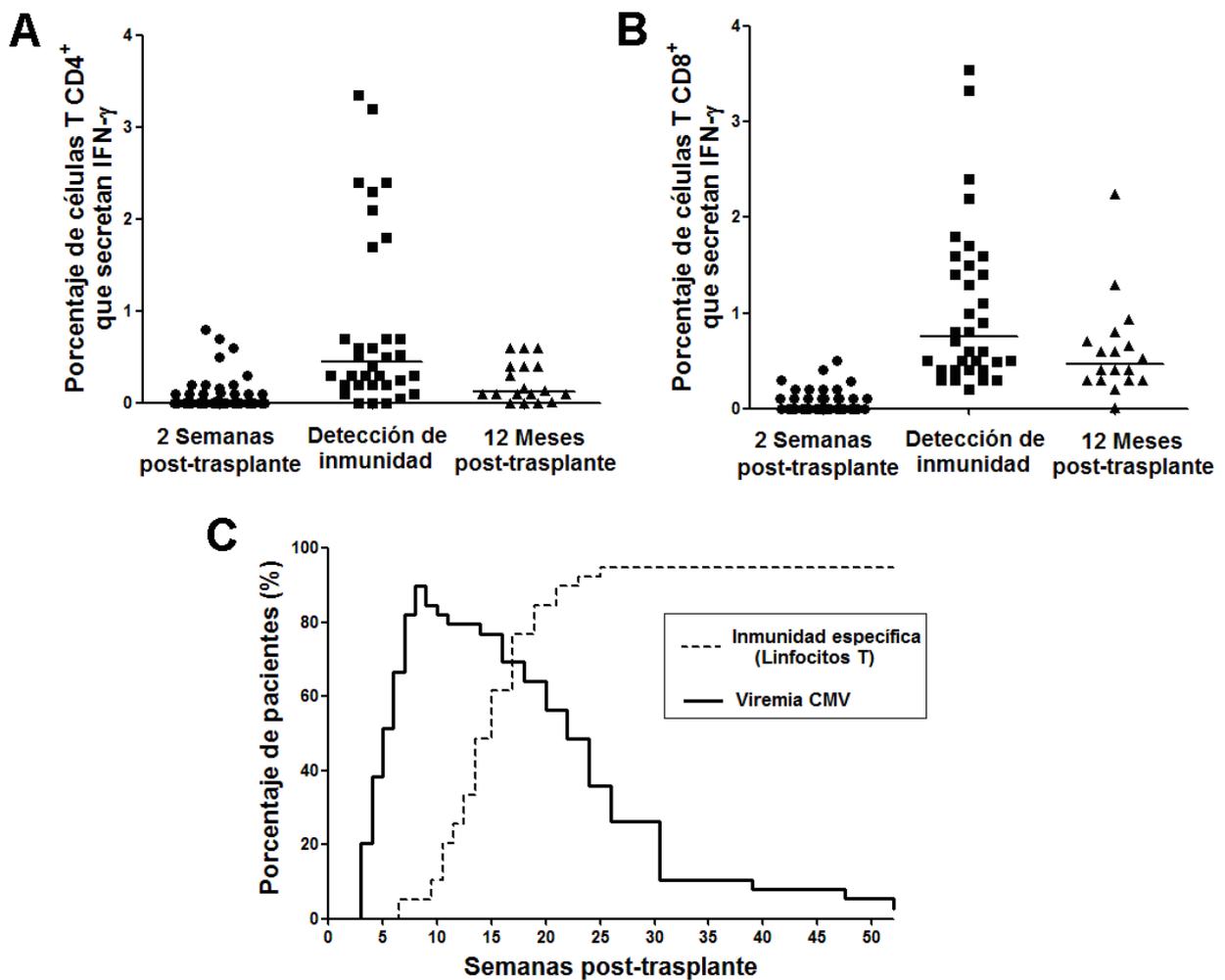
A continuación se analizó la relación entre la incidencia de viremia y la adquisición de la respuesta inmune celular específica frente a CMV. Desde la tercera semana tras el trasplante hubo un aumento de pacientes que desarrolló episodios de replicación viral llegando al máximo en la semana ocho donde la incidencia de replicación viral alcanzó el 89,7% (Fig. 5C). Tres de los pacientes nunca desarrollaron replicación viral durante el seguimiento, y en un paciente el primer episodio de

replicación se detectó de forma tardía en la semana 34 tras el trasplante. Después de la semana 8 tras el trasplante, la incidencia de replicación viral disminuyó de manera progresiva hasta el final del seguimiento. El descenso en la incidencia de replicación se relacionó de forma inversa con la adquisición de la respuesta inmune (regresión lineal $r^2 = 0.775$, Correlación de Pearson=0.88; $P < 0.001$; Fig. 5C).

Los pacientes que habían adquirido una respuesta inmune celular específica frente a CMV recibieron tratamiento una mediana de 27 días (22-34) vs. 31 días (22-41) de tratamiento en los pacientes que no habían adquirido respuesta inmune ($P = 0,528$).

La duración de ciclos previos de tratamiento antivírico recibido se relacionó con la recurrencia en el análisis bivariado (OR: 1.062, IC95%: 1.014-1.114; $P = 0.012$) pero no en el análisis multivariado (OR: 1.029, IC 95%: 0.993-1.067; $P = 0.118$).

Figura 5. Cinética de citoquina, replicación por CMV y adquisición de la respuesta inmune celular específica frente a CMV. A. la respuesta inmune específica frente a CMV fue evaluada mediante la secreción de interferon ($\text{IFN-}\gamma$) en células CD4^+ y CD8^+ mediante citometría de flujo. (A) Secreción de $\text{IFN-}\gamma$ en células T CD4^+ ; (B) Secreción de $\text{IFN-}\gamma$ en células T CD8^+ . Los porcentajes fueron calculados respecto al número total de células CD3^+ positivas analizadas. (C) Evolución de la infección por CMV según la replicación viral, medida por PCR a tiempo real, en relación a la respuesta inmune celular específica frente a CMV mediante la detección de citoquinas intracelulares cuantificadas por citometría de flujo.



Evolución.

Cinco pacientes fueron diagnosticados con infección sintomática por CMV (dos síndromes virales y tres enfermedades digestivas). En tres casos éstas fueron infecciones primarias y en dos infecciones recurrentes. El rango de carga viral al diagnóstico de enfermedad fue de 1556-118728 UI/ml (Tabla 14). En todos los casos de enfermedad se incumplieron las pautas de seguimiento establecidas, siendo la mediana entre la determinación negativa previa y la determinación al diagnóstico de 12 días (10-21) en lugar de los 7 días establecidos.

Dos pacientes fallecieron antes de finalizar el seguimiento, uno con carga viral detectable pero por causas no relacionadas con la infección (shock séptico de origen biliar), y otro con carga viral indetectable debido a una isquemia intestinal. En el resto de los pacientes, la viremia se resolvió en todos los episodios al final del tratamiento antivírico.

Tabla 14. Datos clínicos, virológicos e inmunológicos y evolución en los pacientes con enfermedad por CMV.

Enfermedad por CMV	Órgano trasplantado	Días postrasplante	Infección CMV primaria/ recurrente	Carga viral CMV al diagnóstico de infección (UI/ml)	Aclaramiento de la viremia tras el inicio del tratamiento (días)	Respuesta inmune específica frente a CMV	Evolución
Síndrome viral	Hígado	103	Recurrencia	118728	5	Positiva	Cura
Síndrome viral	Hígado	38	Infección primaria	2601	24	Negativa	Cura
Tiflitis	Riñón	252	Infección primaria	12179	23	Positiva	Cura
Gastritis	Hígado	99	Recurrencia	1556	25	Negativa	Cura
Gastritis	Riñón	45	Infección primaria	10588	30	Negativa	Cura

OBJETIVOS 9-11.

Impacto clínico de la neutropenia relacionada con el tratamiento anticipado con valganciclovir en los receptores de trasplante de órgano sólido.

Características de los pacientes.

Un total de 67 receptores de trasplante de órgano sólido (32 renal, 26 hepático, 9 cardíaco) fueron incluidos en este estudio. La mediana de edad fue de 58 años (47-62) y 49 (73,1%) eran varones. De acuerdo a la serología pretrasplante, 58 pacientes (86,6%) fueron de bajo riesgo (R+) y 9 (13,4%) de alto riesgo (R-D+) de infección para CMV.

El régimen general de inmunosupresión consistió en un inhibidor de la calcineurina, prednisona y mofetil micofenolato. Los pacientes de riesgo inmunológico intermedio-alto recibieron terapia de inducción con basilixumab (26,9%) o daclizumab (7,5%). Ningún paciente recibió timoglobulina como tratamiento de inducción (Tabla 15).

Tabla 15. Características basales de los pacientes incluidos en el estudio.

Características basales	Pacientes, N=67
Edad, años, mediana (rango)	58 (47-62)
Sexo, varón, N (%)	49 (73,1)
Órgano Trasplantado, N (%)	
Riñón	32 (47,8)
Hígado	26 (38,8)
Corazón	9 (13,4)
CMV <i>serostatus</i> , N (%)	
CMV bajo riesgo (D+/R+; D-/R+)	58 (86,6)
CMV alto riesgo (D+/R-)	9 (13,4)
Régimen inmunosupresor, N (%)	
Terapia de inducción	
Basilixumab	20 (29,9)
Daclizumab	5 (7,5)
Terapia de mantenimiento	
Prednisona	66 (98,5)
Ácido micofenólico	2 (3,0)
Mofetil micofenolato	65 (97,0)
<1000mg/24h	10 (15,2)
≥1000mg/24h	55 (83,3)
Tacrolimus	52 (77,6)
Ciclosporina	13 (19,4)
Everolimus	2 (3,0)

La mediana de los valores basales de los parámetros hematológicos fueron: hemoglobina: 113 g/L (rango 98-127); neutrófilos: $3,8 \times 10^9/L$ (2,6-5,3); linfocitos: $1,1 \times 10^9/L$ (0,7-1,5) y plaquetas $177 \times 10^9/L$ (136-247).

Eficacia clínica del tratamiento anticipado.

Se evaluaron un total de 87 episodios de infección CMV asintomática. El tiempo postrasplante al diagnóstico de infección fue de 61 días (36-100) y el pico de carga viral al inicio del tratamiento de 6434 UI/ml (3861-10020). La viremia tuvo una mediana de duración de 18 días (8-26) y el tratamiento antivírico de 24 días (17-36) (Tabla 16).

Tabla 16. Descripción de los episodios de replicación.

	Episodios, N=87
Duración de la viremia tras el inicio del tratamiento, días, mediana (rango)	18 (8-26)
Carga viral pico, UI/ml, mediana (rango)	6434 (3861-10020)
Duración del tratamiento, días, mediana (rango)	24 (17-36)
CMV bajo riesgo (D+/R+; D-/R+), N (%)	17 (19,5)
CMV infección primaria	9 (10,3)
CMV infección recurrente	8 (9,2)
CMV alto riesgo (D+/R-), N (%)	70 (80,5)
CMV primer episodio	24 (27,6)
CMV infección recurrente	46 (52,9)
Fármacos, N (%)	
Valganciclovir	77 (88,5)
Ganciclovir iv	6 (6,9)
Ganciclovir iv- valganciclovir	4 (4,6)
Administración de Factor Estimulante de Colonias, N (%)	16 (18,4)
Prolonga Hospitalización, N (%)	11 (12,6)

Tras la resolución del primer episodio, en 17 pacientes (25,4%) el CMV recurrió. La incidencia de infección recurrente fue del 17,2% (10/58) en los pacientes de bajo riesgo y del 77,8% (7/9) en los pacientes de alto riesgo.

En el 98,9% de los episodios de infección el tratamiento con mofetil micofenolato fue concomitante a la administración de valganciclovir. Las dosis de mofetil micofenolato fueron de 2g/24h en el 34,5% de los episodios, de 1,5g/24h en el 20,7% y menores a 1g/24h en el 43,6%. Al inicio del tratamiento el mofetil micofenolato se retiró en tres episodios y en cinco se redujo la dosis. Durante el tratamiento anticipado se retiró en 15 episodios (17,4%) y la dosis se redujo en 13 episodios (15,1%). Nueve pacientes (60%) en los que se retiró experimentaron toxicidad hematológica y tres de ellos (20%) desarrollaron neutropenia grave, aunque en ningún caso fue necesario retirar el tratamiento debido a la toxicidad de valganciclovir.

Todos los episodios aclararon la viremia al final del tratamiento. Dos pacientes fallecieron tras finalizar el tratamiento con valganciclovir, un paciente un día después debido a fallo multiorgánico y otro paciente cuatro meses después debido a una colangitis bacteriana.

Toxicidad hematológica.

Todos los parámetros analizados en el hemograma, hemoglobina, neutrófilos, linfocitos y plaquetas, decrecieron durante el tratamiento de manera significativa ($P < 0,001$) (Tabla 17), aunque ningún paciente tuvo que interrumpir el tratamiento debido a la toxicidad.

Tabla 17. Parámetros hematológicos: valor basal vs. valor *nadir*.

	Valor basal mediana (rango)	Valor <i>nadir</i> mediana (rango)	<i>p</i> -value
Hemoglobina (g/L)	113 (98-127)	111 (96-121)	<0,001
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	3,8 (2,6-5,3)	2,0 (1,2-3,4)	<0,001
Linfocitos (x10 ⁹ /L)	1,1 (0,7-1,5)	0,9 (0,6-1,3)	<0,001
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	177 (136-247)	154 (115-231)	<0,001

Durante el tratamiento, ocurrió una disminución de al menos dos grados en la escala CTCAE (Tabla 3) en 27 episodios (31,0%): en 25 episodios (28,7%) se detectó neutropenia, en 2 (2,3%) linfopenia, en 1 (1,1%) anemia y en 1 (1,1%) trombocitopenia. El valor *nadir* fue detectado en una mediana de tiempo de 22 días (15-31) para la neutropenia, 17 días para la anemia y la trombopenia y 5 días (2-7) para la linfopenia. La mediana de tiempo de recuperación de los valores fue de 48 días para anemia, 11 días (7-23) para neutropenia, seis días (1-11) para linfopenia y 4 días para trombocitopenia.

Infección y neutropenia grave.

En 19 episodios de tratamiento (21,8%) ocurrió neutropenia grave (≤ 1000 células/ μ l) asociada al tratamiento con valganciclovir. No hubo diferencias significativas en la carga viral pico entre los pacientes que desarrollaron neutropenia grave y los que no, 6618 UI/ml (4948-14294) vs. 6427 UI/ml (3340-10020), $P=0,51$; respectivamente. Los pacientes que desarrollaron neutropenia grave recibieron tratamiento durante una mediana de 6 días más respecto a los que no tuvieron neutropenia grave, 28 días (21-39) vs. 22 días (16-36), $P=0,457$; respectivamente. La

duración de la neutropenia grave fue de 3 días o menos en 7 casos (36,8%), entre 4 y 7 días en 6 casos (31,5%) y de más de 7 días en el resto de los episodios (31,5%). En siete episodios (8%) la cifra de neutrófilos fue inferior o igual a 500 células/ μ l. En un 18,4% de los casos los pacientes requirieron factor estimulante de colonias granulocíticas y en un 12,6% la infección por CMV prolongó la hospitalización (Tabla 16).

La incidencia de infecciones diferentes a CMV hasta la resolución de neutropenia o hasta 15 días tras finalizar el tratamiento fue de 2 casos (10,5%) en los 19 pacientes con neutropenia grave y de 10 (14,7%) en los 68 que no desarrollaron neutropenia grave, $P=0,93$. Se diagnosticaron un total de cuatro pielonefritis, tres infecciones de tracto urinario, dos infecciones de herida quirúrgica, una infección de piel y partes blandas, una bacteriemia y una bronquitis. En todos los casos fueron de etiología bacteriana. En la mitad de los pacientes (6/12) la infección fue concomitante al diagnóstico de la infección por CMV. Un paciente tuvo una infección de herida quirúrgica en el día 12 de tratamiento, el resto, cinco enfermos, fueron diagnosticados de una infección a partir de los 20 días de tratamiento (mediana 25, rango 20-60) (Tabla 18).

Tabla 18. Etiología de las infecciones bacterianas en función de la presencia de neutropenia.

	Tipo de Infección	Días tras inicio de tratamiento	Duración tratamiento	Evolución
PMN (≤ 1000 cél/ μ l)				
<i>Escherichia coli</i>	Herida quirúrgica	12	15	Cura
<i>Escherichia coli</i>	Pielonefritis	20	19	Cura
PMN (> 1000 cél/ μ l)				
<i>E. coli/ Klebsiella pneumoniae</i>	Pielonefritis	25	31	Cura
<i>Escherichia coli</i>	Herida quirúrgica	1	10	Exitus
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pielonefritis	1	15	Cura
<i>Haemophilus influenzae</i>	Bronquitis	60	60	Cura
<i>Enterococcus faecium</i>	Cistitis	24	27	Cura
<i>Escherichia coli</i>	Pielonefritis	2	28	Cura
<i>Proteus mirabilis</i>	Cistitis	1	9	Cura
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cistitis	33	33	Cura
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteriemia	3	52	Cura
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Piel/ Partes blandas	2	7	Cura

PMN: polimorfonucleares.

La duración del tratamiento anticipado no fue diferente en los pacientes que desarrollaron infección respecto a los que no tuvieron infección: 23 días (11-32) vs. 24 días (18-36), P=0,576; respectivamente.

Los factores de riesgo independientemente asociados al desarrollo de neutropenia grave fueron el trasplante hepático, tomando como comparador el trasplante renal (OR: 6,721; IC95%: 1,531-29,517), el tiempo desde el trasplante (OR: 1,016; IC95%: 1,001-1,031). La duración del tratamiento se asoció a la presencia de neutropenia con una P=0,07 (OR: 1,039; IC95%: 0,996-1,084) (Tabla 19). Haber recibido altas dosis de mofetil micofenolato (≥ 1000 mg/día), la carga viral pico o la serología CMV discordante no se asociaron con la aparición de neutropenia grave en relación al tratamiento con valganciclovir.

Tabla 19. Factores de riesgo para el desarrollo de neutropenia grave (≤ 1000 células/ μ l). Regresión logística multivariante.

	Toxicidad vs. no toxicidad 19 vs. 68	Odds ratio (IC95%)	<i>p</i> -value
<i>Serostatus</i> CMV-negativo, N (%)	2 (10,5) vs. 15 (22,1)	0,338 (0,065-1,756)	0,197
Órgano Trasplantado, N (%)			0,032
Riñón	7 (36,8) vs. 37 (54,4)	1	
Hígado	11 (57,9) vs. 22 (32,4)	6,721 (1,531-29,517)	0,012
Corazón	1 (5,3) vs. 9 (13,2)	1,558 (0,133-18,198)	0,724
Tiempo postrasplante, días, media (\pm DS)	84,8 (\pm 58,2) vs. 69,0 (\pm 38,8)	1,016 (1,001-1,031)	0,032
Duración tratamiento, días, mediana (rango)	28 (21-39) vs. 22 (16-36)	1,039 (0,996-1,084)	0,079
Mofetil micofenolato (≥ 1000 mg/24h), N (%)	15 (78,9) vs. 58 (85,3)	0,933 (0,191-4,560)	0,932

DS: Desviación estándar.

PARTE V. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN

La infección por CMV continúa siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad tras el trasplante. La estrategia de tratamiento anticipado de la infección por CMV presenta varias ventajas sobre la profilaxis universal destacando la administración de tratamiento antivírico exclusivamente tras la detección de carga viral, evitando así tratamientos innecesarios y la toxicidad asociada a estos fármacos. Además, se ha propuesto que la estrategia de tratamiento anticipado podría facilitar la adquisición de respuesta inmune específica de células T frente a CMV (84,128). A pesar de ello, las guías de tratamiento actuales recomiendan una estrategia más conservadora para la infección por CMV en receptores de trasplante de órgano sólido de alto riesgo de infección por CMV como la administración de profilaxis universal durante los 100 primeros días tras el trasplante (60), proponiendo en algunos estudios la extensión del periodo profiláctico a 6 meses tras el trasplante (88).

En la presente tesis hemos comprobado que el tratamiento anticipado es seguro y eficaz en el receptor de trasplante de órgano sólido de alto y bajo riesgo de infección por CMV. Además, ha sido posible establecer un umbral estandarizado para el inicio del tratamiento anticipado en el paciente de bajo riesgo de infección por CMV de 3983 UI/ml. Los pacientes de alto riesgo no desarrollaron enfermedad por CMV con cargas virales inferiores a 1500 UI/ml. No obstante, para que esta estrategia sea exitosa, es necesario un cumplimiento estricto de las pautas de monitorización establecidas, especialmente en el paciente con alto riesgo en el que un control virológico semanal es imprescindible para evitar de forma segura la enfermedad por CMV. Además, la infección recurrente en estos pacientes es frecuente, y en base a nuestros resultados, la adquisición de una respuesta inmune de células T específica de CMV es el único factor

que se asocia a una disminución de la incidencia de enfermedad recurrente por CMV y en consecuencia, a una menor gravedad de la infección.

Según los datos de esta tesis, el tratamiento con valganciclovir se asocia al desarrollo de toxicidad hematológica, principalmente de neutropenia, que se presenta de forma tardía, y cuya frecuencia se incrementa a medida que se alarga la duración del tratamiento. Sin embargo, la neutropenia que ocurre durante el tratamiento anticipado siguiendo el esquema utilizado en esta tesis con monitorización estrecha de la toxicidad, ajuste de otros posibles fármacos mielotóxicos y el uso, cuando está indicado, de factor estimulante de colonias granulocíticas, tiene un impacto clínico limitado puesto que no se asocia a un mayor riesgo de infecciones bacterianas, al contrario de lo que ocurre en la neutropenia en pacientes oncohematológicos.

A continuación, se discutirán por partes los resultados obtenidos en esta tesis doctoral y las limitaciones que deberían ser tenidas en cuenta.

Determinación, validación y estandarización de un punto de corte determinado en plasma para el inicio del tratamiento anticipado en el receptor de trasplante de órgano sólido de bajo riesgo de infección por CMV.

La infección por CMV en el receptor de trasplante de órgano sólido de bajo riesgo, definido como pacientes con serología pretrasplante CMV seropositiva (R+), ha sido descrita por algunos autores como menos grave y asociada a cargas virales menos elevadas respecto a la infección que ocurre en el paciente de alto riesgo (142). Sin embargo, aunque estos pacientes requieren, de manera general, tratamiento antivírico en menor porcentaje, la incidencia de enfermedad por CMV no es para nada despreciable y en algunas cohortes es incluso mayor que en el receptor de trasplante de órgano sólido de alto riesgo de infección (45,101). De hecho, recientemente, algunos autores han

propuesto estratificar el riesgo de infección por CMV antes del trasplante según el paciente tenga o no respuesta inmune celular específica frente a CMV detectable y se ha analizado su posible función predictiva de riesgo de infección que podría complementar a la determinación serológica de IgG pretrasplante (144). Sin embargo, la cronología de la respuesta inmune celular específica frente a CMV en los pacientes de bajo riesgo no ha sido establecida y la monitorización de la respuesta inmune no está aún consensuada. Si existe consenso por el contrario acerca de la monitorización virológica a través de pruebas cuantitativas de laboratorio que es necesaria en estos pacientes.

A finales de 2010 la Organización Mundial de la Salud comercializó el primer estándar internacional para pruebas cuantitativas de amplificación de ácidos nucleicos para CMV. Hasta entonces habían sido propuestos diferentes umbrales no estandarizados. Algunos autores, extrapolando resultados obtenidos con la técnica de detección de antigenemia, con la que había mayor experiencia clínica, propusieron valores de 1000, 4000 y 10000 copias/ml como umbrales para iniciar tratamiento anticipado en pacientes de alto, intermedio y bajo riesgo de infección por CMV como valores correspondientes a 1-2, 10 y 50 células/ 2×10^5 en la prueba de antigenemia, respectivamente (134). Otros autores definieron un umbral de 6300 copias/ml para receptores de trasplante de órgano sólido y de 10000 copias/ml para receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos basado en su experiencia clínica (66). Sin embargo, en ninguno de estos estudios se relacionaron los valores de laboratorio con la clínica que presentaban los pacientes. Además, en el primer estudio se utilizó sangre completa para la determinación de la carga viral y en el segundo plasma. En una cohorte de 23 receptores de trasplante de órgano sólido, los autores identificaron una mediana de carga viral de 4703 copias/ml en aquellos pacientes que requerían tratamiento y una carga viral de 5000 copias/ml en pacientes con complicaciones asociadas a CMV frente

a 1160 copias/ml en pacientes asintomáticos (136). Humar *et al.* propusieron una carga viral por debajo de 3615 copias/ml como “libre” de síntomas y propusieron un rango entre 2000 y 5000 copias/ml para el inicio del tratamiento anticipado (135). Sin embargo, en ninguno de estos estudios los resultados fueron validados en una cohorte externa.

Según nuestros resultados, gracias a la disponibilidad del estándar internacional establecimos como umbral para el inicio de tratamiento anticipado una carga viral de 3983 UI/ml, con un valor predictivo negativo de 99,2%. Este umbral fue validado en una cohorte de 252 pacientes y puede ser extrapolable a otros centros que hayan estandarizado su técnica en el laboratorio.

Hay algunas limitaciones que merece la pena subrayar. En primer lugar, este umbral ha sido determinado en receptores de trasplante de órgano sólido, con bajo riesgo de infección por CMV y en muestras de plasma, por lo que no podemos afirmar que sea útil en otras condiciones. Sin embargo, la novedad de estos resultados nos impide compararlos con otros puntos de corte propuestos en la literatura debido a que no están disponibles en unidades internacionales. De hecho, Razonable y Hayden recomiendan la realización de estudios de estas características en éstos y otro tipo de pacientes, como los pacientes con mayor riesgo de infección, en una revisión publicada recientemente sobre los diferentes métodos diagnósticos de la infección por CMV en el que hacen un especial énfasis en los métodos moleculares (58). En esta revisión en la que se evalúa la utilidad clínica de cuantificar la carga viral en el pronóstico, prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección por CMV, se enfatiza también que aunque existe una evidencia sólida sobre la correlación de la viremia de CMV y los síntomas del paciente, no es una prueba de diagnóstico discriminativa. Hay casos descritos, principalmente de enfermedad digestiva por CMV, en los que el paciente

presenta carga viral indetectable al diagnóstico de enfermedad (59,158,159). De hecho, en el presente estudio un paciente de la cohorte de validación fue diagnosticado de gastritis con confirmación histológica siendo la PCR de CMV negativa. Sin embargo, aunque estos casos parecen minoritarios con el uso de la PCR en lugar de la antigenemia, en pacientes con síntomas gastrointestinales y sospecha clínica debe realizarse un estudio histológico a pesar de que la PCR de CMV sea negativa, ya que se han descrito casos de enfermedad localizada en la que el virus puede ser aclarado en sangre y permanecer aún en tejido. Algunos autores han descrito un aumento de la incidencia de enfermedad gastrointestinal por CMV en los pacientes que reciben mofetil micofenolato y formulan como hipótesis una mayor concentración de ácido micofenólico en el sistema digestivo, donde es degradado proveniente de circulación enterohepática, facilitando la activación de CMV (50,160). En la presente cohorte, la incidencia de esta eventualidad es menor que en otras cohortes publicadas (161,162).

Por otro lado, los pacientes con respuesta inmune celular específica frente a CMV podrían ser capaces de aclarar la infección según se ha determinado en algunos estudios (144), siendo la enfermedad improbable en estos pacientes. La ausencia de datos de respuesta inmune en esta cohorte de pacientes nos impide analizar si el punto de corte podría ser diferente en pacientes con estas características.

Tratamiento anticipado en pacientes de alto riesgo. Carga viral y enfermedad por CMV. Profilaxis secundaria, inmunidad celular específica frente a CMV y riesgo de infección recurrente.

Establecer un punto de corte para el inicio del tratamiento anticipado en el receptor de trasplante de órgano sólido de alto riesgo para la infección por CMV es complicado ya que la cinética viral es muy rápida. Los avances tecnológicos y del

conocimiento que se están produciendo actualmente, y el impacto de la respuesta inmune celular específica en el control de la infección por CMV, probablemente permitan en un futuro próximo hacer guías de tratamiento basadas en criterios inmunológicos y virológicos que mejoren esta estrategia preventiva.

En el presente estudio, todas las infecciones sintomáticas que ocurrieron en los pacientes estudiados fueron diagnosticadas con cargas virales superiores a 1500 UI/ml, tres fueron infecciones primarias y dos recurrentes. La adquisición de respuesta inmune celular específica frente a CMV fue el único factor protector para la ocurrencia de recurrencia, mientras que el uso de profilaxis secundaria no evitó la infección secundaria.

Hasta el momento no se ha establecido un punto de corte para el inicio del tratamiento anticipado en el paciente de alto riesgo. La mayoría de los estudios realizados en receptores de trasplante de órgano sólido que han analizado este aspecto han propuesto valores no estandarizados en un rango entre 1000 a 3000 copias/ml que se basan en la mayoría de los casos en la experiencia propia, o en estudios publicados que no establecen diferencias según el tipo de trasplante, el riesgo del paciente o el órgano trasplantado (84,136,138). En un estudio publicado que evaluó una nueva técnica de PCR en tiempo real frente a la antigenemia en 45 pacientes, entre los que sólo tres eran de alto riesgo (D+R-), una carga viral superior a 2275 UI/ml fue discriminativo entre los pacientes que requirieron tratamiento y aquellos que aclararon la infección sin tratamiento (163). Según nuestros resultados, una carga viral inferior a 1500 UI/ml se asocia a una infección “libre de síntomas” siendo imprescindible una estrecha monitorización del paciente para el control de la misma.

La cinética de replicación de CMV, según los resultados obtenidos por Atabani *et al.* en una cohorte de pacientes receptores de trasplante de órgano sólido (hígado y

riñón) que recibieron tratamiento anticipado, fue más rápida en el paciente de alto riesgo respecto al de bajo riesgo (1,54 vs. 2,67 días, $P < 0,001$; respectivamente). Esto mismo se observó en la primoinfección respecto a replicaciones posteriores (1,45 vs. 2,10 días, $P = 0,017$; respectivamente), y en pacientes de bajo riesgo en el primer episodio de replicación respecto a episodios posteriores (2,17 vs. 2,82 días, $P = 0,023$; respectivamente) (138). En la presente cohorte no hubo diferencia en cuanto a la carga viral, la duración de la viremia o el aclaramiento de misma comparando episodios de infección primaria vs. recurrente. En el análisis bivariante de los factores de riesgo para el desarrollo de recurrencia encontramos que el pico máximo de carga viral no se relacionó estadísticamente con la recidiva. Otros autores encontraron resultados similares (40). Tampoco hubo asociación estadísticamente significativa entre la duración de la viremia y la ocurrencia de recurrencia. En el análisis bivariante, la duración del tratamiento sí fue mayor en los pacientes con episodios de recurrencia respecto a los pacientes sin recurrencia. Sin embargo, en el análisis multivariante, la única variable que se asoció estadísticamente de manera significativa como factor protector del riesgo de recurrencia fue la adquisición de la respuesta inmune.

Según los resultados de esta tesis, la inmunidad celular específica de células T fue protectora de la recidiva de la infección por CMV. El 80% de los pacientes que tuvieron una infección recurrente carecían de respuesta inmune celular específica frente a CMV, respecto al 20% de aquellos que recurren teniendo respuesta positiva. En un estudio de cohortes de 21 pacientes, la incidencia de infección por CMV se asoció de forma inversa con la adquisición de la respuesta inmune (regresión lineal $r^2 = 0,781$ correlación Pearson = $-0,883$; $P = 0,001$) y ésta se relacionó con un aclaramiento espontáneo de la infección (128). Algunos autores han determinado la respuesta inmune específica frente a CMV mediante la cuantificación de interferón- γ antes y/o después

del trasplante, y han analizado su posible función predictiva del riesgo de infección postrasplante. En un estudio de 124 pacientes, un resultado positivo de la inmunidad medida por quantiferon se asoció a una menor incidencia de infección por CMV respecto a los que obtuvieron un resultado negativo o indeterminado (6,4% vs. 22,2% vs. 58,3%; $P < 0.001$, respectivamente) (143). Hallazgos similares han sido publicados por otros autores (127,144). Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en 44 pacientes que recibieron profilaxis universal, la producción de interferon- γ por células CD4+ y CD8+ específica tras la estimulación por CMV no se relacionó con la posterior ocurrencia de viremia. Otros estudios observaron que la producción de interferón era una consecuencia posterior a la viremia, por lo que postulan que no podría ser utilizado como “predicador” de algo que ocurre después (145,164–166). En nuestra cohorte, en los 18 episodios de replicación viral ocurridos después de los primeros 90 días tras el trasplante, en los que los pacientes ya habían adquirido la inmunidad celular, la infección fue aclarada sin necesidad de tratamiento antivírico.

Tan sólo los pacientes con trasplante renal realizaron profilaxis secundaria en nuestro estudio, por lo que el análisis de la misma se ha circunscrito a este grupo de pacientes. La profilaxis secundaria tras el tratamiento anticipado se recomienda en los documentos de consenso en determinados pacientes con el fin de evitar la infección recurrente (118,146). Sin embargo, la evidencia en que se basa esta recomendación es pobre (CII). En un estudio retrospectivo en el que se evaluaron 62 receptores de riñón, de los que 34 pacientes recibieron profilaxis secundaria a criterio del personal clínico entre dos y cuatro semanas tras recibir seis meses de profilaxis universal con valganciclovir, la incidencia de recurrencia no fue diferente en los que recibieron la profilaxis secundaria y los que no la recibieron (PNS) (104). En otro estudio en el que se evaluaron los factores del riesgo de recurrencia en 26 receptores de trasplante de

órgano sólido con enfermedad gastrointestinal por CMV, de los que 10 (38%) recibieron profilaxis secundaria, ésta tampoco fue protectora de recidiva (59). En la presente tesis, la profilaxis secundaria no aportó beneficios en el pronóstico de estos pacientes. Ni la incidencia ni la duración de los episodios de recurrencia fueron menores en los receptores de trasplante renal que recibieron profilaxis secundaria respecto a los que no.

Aunque no hubo diferencias en cuanto a las características basales, ni en los episodios de infección por CMV en aquellos pacientes que recibían profilaxis secundaria y los que no, se realizó un estudio multivariante para descartar el efecto en esta relación por otras variables confusoras. Sin embargo, ajustando el modelo multivariante con todas las variables relacionadas con la recidiva y aquellas que se consideraron clínicamente relevantes, la profilaxis secundaria tampoco se relacionó con la presencia de recidiva. La duración de la profilaxis no se asoció ni con el riesgo de recurrencia ($P=0,400$) ni con el tiempo hasta la misma ($P=0,229$), aunque ningún paciente desarrolló infección durante el tratamiento profiláctico. Tampoco ningún paciente tuvo que interrumpir la profilaxis debido a toxicidad hematológica, ni ningún otro efecto adverso en relación al tratamiento antivírico. En un estudio aleatorizado que incluyó 321 receptores de trasplante de órgano sólido, el único factor independiente protector de recurrencia fue la erradicación viral al día 21 postratamiento (167). En esta tesis, el único factor independiente relacionado con la recurrencia fue la ausencia de inmunidad celular específica frente a CMV.

Las limitaciones de estos resultados son las siguientes. En primer lugar, estos resultados no pueden ser extrapolables a pacientes con regímenes diferentes de inmunosupresión o a pacientes que reciben timoglobulina como tratamiento de inducción, ya que estos pacientes no fueron incluidos y no disponemos de datos en estas

circunstancias. En segundo lugar, la ausencia de diferencias entre las características descriptivas de los episodios de infección primaria y recurrente podría modificarse si se aumentase el tamaño de la muestra, y por último, el carácter no aleatorizado de la muestra, siendo el personal clínico responsable de tomar la decisión de instaurar o no la profilaxis secundaria, hace que pudiese haber diferencias entre los pacientes a los que se les indica o no la profilaxis secundaria, si bien, el análisis multivariante descarta el papel que éstas diferencias podrían tener sobre la aparición de recidiva. Así pues, la profilaxis secundaria no redujo el riesgo de recidiva en pacientes con trasplante de órgano sólido de alto riesgo. No obstante, son necesarios estudios con mayor tamaño muestral y ensayos clínicos aleatorizados, que confirmen estos resultados.

Impacto clínico de la neutropenia relacionada con el tratamiento anticipado con valganciclovir en los receptores de trasplante de órgano sólido.

Según los resultados obtenidos en este estudio, durante el tratamiento con valganciclovir hubo un descenso significativo en todos los parámetros del hemograma, siendo la neutropenia la alteración hematológica más frecuente. Su aparición fue tardía y la incidencia fue mayor en los pacientes que recibieron ciclos de tratamiento más largos. Sin embargo, la neutropenia no fue un factor de riesgo para el desarrollo de otras infecciones diferentes a CMV, y ningún paciente tuvo que abandonar el tratamiento debido a toxicidad hematológica.

La toxicidad hematológica producida durante la profilaxis universal con valganciclovir se ha relacionado con la dosis utilizada en algunos estudios (151,168). En un estudio realizado en 70 pacientes (53 de bajo riesgo y 17 de alto riesgo) que recibían profilaxis universal, una dosis de 450 mg al día resultó ser eficaz y segura, siendo la incidencia de neutropenia menor que en otras series publicadas (112), y los

costes más reducidos que con las dosis estándares (151). En un metanálisis que comparaba la efectividad de la profilaxis con dosis de 900mg vs. 450 mg al día, encontraron un descenso de 3 puntos en el riesgo de leucopenia cuando se utilizaban dosis de 450 mg al día (168). Sin embargo, en el tratamiento anticipado de la infección por CMV, según la ficha técnica del producto, la dosis recomendada es de 900 mg dos veces al día, no existiendo evidencias que apoyen la eficacia de dosis menores que podrían además promover el desarrollo de resistencias (169), o dosis mayores que podrían dar lugar a efectos tóxicos (170), siendo ésta la dosis recomendada en las guías de consenso para el tratamiento de la infección por CMV (60,118).

La relación entre la duración del tratamiento y el desarrollo de toxicidad hematológica ha sido también analizada durante la profilaxis universal (88,148). En el estudio IMPACT en el que 320 pacientes receptores de trasplante renal de alto riesgo de infección (R-D+) fueron aleatorizados a recibir 200 vs. 100 días de profilaxis universal, la incidencia de leucopenia fue del 38% y del 26%, respectivamente (88). En un subgrupo de estos pacientes (N=120), se realizó un subestudio farmacocinético, y la exposición a ganciclovir durante la profilaxis se correlacionó con una tendencia al aumento de leucopenia, aunque no fue una asociación estadísticamente significativa (149). Wiltshire *et al.* en un estudio farmacodinámico aleatorizado donde comparaban valganciclovir y ganciclovir oral encontraron un incremento de neutropenia y leucopenia ante una mayor exposición sistémica a ganciclovir (111).

Algunos autores han comparado la ocurrencia de eventos hematológicos según la estrategia preventiva utilizada. En una revisión sistemática que comparaba el tratamiento anticipado con la profilaxis universal, la leucopenia fue menos frecuente durante el tratamiento anticipado (6 estudios, 729 participantes: RR 0,42, IC 95% 0,20-0,90) (106). En un metanálisis publicado recientemente, en el que se evaluaron 20

estudios (2744 pacientes) para el análisis directo y 20 estudios (2544) para el análisis indirecto de la eficacia y seguridad de ambas estrategias, la leucopenia (OR: 1,97; IC95%: 1,39-2,79; P=0,001) y la neutropenia (OR: 2,07; IC95%: 1,13-3,78; P=0,018) fueron más frecuentes durante la profilaxis universal que durante el tratamiento anticipado. En este metanálisis determinaron también la ocurrencia de infecciones diferentes a CMV según la estrategia utilizada y no encontraron diferencias significativas en la incidencia según esta variable (54).

Con el tratamiento anticipado, la información es muy escasa en cuanto a la relación entre la duración del tratamiento y la toxicidad hematológica que ocasiona. Algunos estudios, aunque de tamaño muestral muy reducido, han analizado este aspecto. Díaz-Pedroche *et al.*, en una cohorte prospectiva de 24 pacientes seropositivos para CMV que recibieron una media de 17 días de tratamiento anticipado, encontraron que el 12,5% de los pacientes desarrollaron leucopenia en un promedio de 10 días tras el inicio del tratamiento con valganciclovir (171). En un ensayo clínico prospectivo de 21 receptores de trasplante de órgano sólido que recibieron ciclos de 21 días de tratamiento anticipado, cinco días con ganciclovir intravenoso y 16 días con valganciclovir, identificaron 38% episodios de anemia, 19% de leucopenia, 9,5% de neutropenia y 4,8% de pancitopenia. Sólo un paciente necesitó suspender el tratamiento el día 15 tras el inicio debido a pancitopenia (172). En nuestro estudio, en el que se evaluaron 67 pacientes y un total de 87 episodios, ningún paciente necesitó suspender tratamiento debido a toxicidad pese a que en casi en un tercio de los pacientes ocurrió toxicidad hematológica, siendo la neutropenia la más frecuente, que fue grave en uno de cada cinco episodios tratados.

En los pacientes con enfermedad oncohematológica, la neutropenia puede incrementar el riesgo de desarrollar otras infecciones víricas, bacterianas o fúngicas

(155). En un estudio retrospectivo en receptores de trasplante renal en el que la incidencia de neutropenia fue del 28%, no se relacionó con el tratamiento con valganciclovir/ ganciclovir. Sin embargo, observaron que los pacientes neutropénicos experimentaron más infecciones bacterianas que los no neutropénicos (43% vs. 32%; $p=0,04$), y el grado de neutropenia se relacionó con el riesgo global de infección (173). En un metanálisis en el que se estudió la incidencia de infecciones según la estrategia preventiva, profilaxis universal y tratamiento anticipado, no se encontraron diferencias significativas al comparar la incidencia de infecciones por: herpes simple (3 estudios, 191 pacientes; OR: 0,50 IC95% 0,18-1,34; $P=0,167$), varicela zoster (2 estudios, 117 pacientes; OR: 0,32 IC95% 0,03-3,21; $P=0,336$), otras infecciones virales (4 estudios, 370 pacientes; OR: 0,61 IC95% 0,31-1,22; $P=0,162$), infecciones bacterianas (5 estudios 468 pacientes; OR: 0,97 IC95% 0,60-1,59; $P=0,915$) o infecciones fúngicas (4 estudios, 370 pacientes; OR: 0,74 IC95% 0,14-3,90, $P=0,724$) (54).

Hasta el momento, a pesar de que la neutropenia se considera un factor limitante para el tratamiento con valganciclovir, no hay ningún estudio que haya determinado el impacto clínico de la neutropenia inducida por antivíricos en el receptor de trasplante de órgano sólido. En el presente estudio la incidencia de infecciones diferentes a CMV fue del 13,8%, y todas fueron de etiología bacteriana. En relación a la neutropenia, la incidencia de infección en los pacientes con neutropenia grave no fue diferente de la de pacientes no neutropénicos, resolviéndose en todos los casos favorablemente. No hubo tampoco relación significativa entre la duración del tratamiento anticipado y la incidencia de infección diferente a CMV ($P=0,576$). Sin embargo, es posible que el estrecho seguimiento de los pacientes o el uso de factor estimulante de colonias granulocíticas puedan haber contribuido a minimizar la incidencia de infecciones consecuentes a la neutropenia en esta cohorte.

Las alteraciones hematológicas en el receptor de trasplante pueden ser también secundarias al tratamiento inmunosupresor. En un estudio retrospectivo en receptores de trasplante renal realizado por Zafrani *et al.*, el único factor estadísticamente asociado al desarrollo de neutropenia fue el tratamiento inmunosupresor, concretamente la combinación tacrolimus y mofetil micofenolato (173). En el presente estudio, no hubo asociación entre el tratamiento inmunosupresor y la incidencia de neutropenia, si bien, la mayoría de los pacientes recibían tratamiento con mofetil micofenolato en el momento de ser instaurado el tratamiento antivírico, no pudiendo analizar el impacto que este factor tiene en el desarrollo de neutropenia en el paciente tratado con valganciclovir. Fortún *et al.* en una cohorte de 1398 receptores de trasplante renal, excluyendo el tratamiento usado para el rechazo, no encontraron relación entre el régimen inmunosupresor y el desarrollo de infecciones fúngicas, víricas o bacterianas, si bien, al igual que en nuestro estudio, la mayoría de los pacientes (83,2%) recibían mofetil micofenolato no siendo posible evaluar de forma correcta este factor (174).

En el análisis multivariante de los factores de riesgo asociados al desarrollo de neutropenia grave, el receptor de trasplante hepático resultó tener un riesgo 6,7 veces mayor de desarrollar neutropenia grave que el receptor de trasplante renal. Este efecto podría estar mediado por la presencia de hiperesplenismo, frecuente en este tipo de pacientes trasplantados. Otros factores asociados al desarrollo de neutropenia fueron el tiempo postrasplante y la duración del tratamiento.

Hasta la fecha, la duración óptima del tratamiento anticipado no ha sido establecida firmemente. Algunos autores han recomendado extender el tratamiento, al menos, durante una semana más tras obtener un resultado negativo en el test de la carga viral (78). Otros autores, han recomendado detener el tratamiento tras un resultado negativo en el paciente de bajo riesgo y prolongarlo en el paciente de alto riesgo hasta

obtener dos resultados negativos consecutivos (72). La duración del tratamiento se ha asociado en algunos estudios con la ocurrencia de recurrencia de infección por CMV. Algunos autores han sugerido que episodios más cortos de tratamiento se relacionan con una mayor frecuencia de recurrencia (175,176). Sin embargo, en un estudio recientemente publicado por Park *et al.* en pacientes receptores de riñón con bajo riesgo de infección por CMV en el que compararon suspender el tratamiento tras obtener una (38 pacientes) o dos (14 pacientes) cargas virales negativas observaron que la incidencia de recurrencia no fue diferente en los dos grupos de pacientes y que ésta no se relacionó con la duración del tratamiento, por lo que los autores recomendaron suspender el tratamiento antivírico tras una primera viremia negativa (177). Nuestros resultados apoyan esta recomendación, ya que la incidencia de recurrencia no se relacionó con la duración del tratamiento. Además, teniendo en cuenta que la neutropenia grave se alcanza de media en la tercera semana de tratamiento, y ante la ausencia de evidencias de que tratamientos más largos mejoren el pronóstico o reduzcan el riesgo de que la infección por CMV recurra, consideramos que podría recomendarse suspender el tratamiento tras un primer resultado negativo de carga viral, especialmente en pacientes donde concurren otros factores de riesgo para el desarrollo de toxicidad hematológica como es el caso de los receptores de trasplante hepático.

Varias limitaciones deben ser tenidas en cuenta. En primer lugar, la contribución al desarrollo de toxicidad de mofetil micofenolato no ha sido analizada ya que el 97% de los pacientes recibían este fármaco como tratamiento inmunosupresor. No obstante, la dosis de mofetil micofenolato y su relación con la toxicidad si se analizaron y no se encontraron evidencias de que se asociasen las dosis altas del fármaco con una mayor incidencia de neutropenia. Por último, la enfermedad invasiva por CMV *per se* puede

ocasionar también neutropenia, por lo tanto, las conclusiones de este estudio sólo serían aplicables a los pacientes con infección asintomática por CMV.

En resumen, en la presente tesis demostramos que el tratamiento anticipado es seguro y eficaz en el receptor de trasplante de órgano sólido de alto y bajo riesgo de infección por CMV. En el paciente de bajo riesgo iniciar el tratamiento anticipado a partir de cargas virales superiores a 3983 UI/ml es seguro mientras que en el paciente de alto riesgo sólo los pacientes con cargas virales inferiores a 1500 UI/ml estuvieron “libres” de enfermedad por CMV. No obstante, para que esta estrategia sea exitosa, es necesario un cumplimiento estricto de las pautas de monitorización establecidas, especialmente en el paciente de alto riesgo de infección por CMV en el que un control virológico semanal es imprescindible para evitar de una forma segura la enfermedad por CMV. En el paciente de alto riesgo, la adquisición de respuesta inmune celular específica frente a CMV fue el único factor que se asoció a una disminución de la incidencia de enfermedad recurrente por CMV.

Según los datos de esta tesis, el tratamiento con valganciclovir se asoció al desarrollo de toxicidad hematológica, principalmente de neutropenia, que se presentaba de forma tardía, y cuya frecuencia se incrementaba a medida que se alargaba la duración del tratamiento. Podríamos disminuir el riesgo de neutropenia sin comprometer la evolución clínica del paciente adaptando el tiempo de tratamiento a la duración de la viremia, especialmente en aquellos pacientes en los que concurren varios factores de riesgo que pueden agravar esta situación. Aunque la neutropenia fue frecuente no se asoció a un aumento de infecciones.

Los resultados de los estudios que componen esta tesis están limitados principalmente por ser unicéntrico y no aleatorizado, por lo que todos estos resultados sería necesario confirmarlos en ensayos clínicos aleatorizados y multicéntricos.

CONCLUSIONES

1. El punto corte óptimo definido para el inicio del tratamiento anticipado de la infección por CMV en el receptor de trasplante de órgano sólido de bajo riesgo de infección corresponde a 3983 UI/ml.
2. El tratamiento anticipado es seguro en el paciente de alto riesgo de infección por CMV, con desarrollo de síntomas de infección poco frecuente con cargas virales inferiores a 1500 UI/ml. El cumplimiento de las pautas de monitorización establecidas debe ser estricto para que la estrategia de tratamiento anticipado sea segura en estos pacientes.
3. La infección primaria que ocurre en el paciente de alto riesgo no muestra diferencias relevantes en cuanto a pronóstico y gravedad respecto a la infección recurrente, por lo que el manejo clínico de la infección debería ser el mismo.
4. La infección recurrente por CMV es frecuente a pesar del uso de profilaxis secundaria.
5. La adquisición de respuesta inmune específica de células T frente a CMV se asocia con una reducción de la incidencia de recurrencia.
6. La neutropenia es frecuente y tiene un desarrollo tardío durante el tratamiento anticipado con valganciclovir.

7. En las condiciones en que se realizó esta tesis, la neutropenia grave asociada al tratamiento anticipado con valganciclovir en el receptor de trasplante de órgano sólido no aumenta el riesgo de infecciones ni empeora la supervivencia del injerto o del paciente.

8. Tras la obtención de un resultado negativo de carga viral se podría recomendar la suspensión del tratamiento, especialmente en pacientes en los que concurren varios factores de riesgo para el desarrollo de neutropenia como en los receptores de trasplante hepático.

PARTE VI. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis.* diciembre de 2004;4(12):725-38.
2. Chee MS, Satchwell SC, Preddie E, Weston KM, Barrell BG. Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature.* 19 de abril de 1990;344(6268):774-7.
3. Compton T, Nowlin DM, Cooper NR. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology.* abril de 1993;193(2):834-41.
4. Kari B, Gehrz R. A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J Virol.* marzo de 1992;66(3):1761-4.
5. Lopper M, Compton T. Coiled-coil domains in glycoproteins B and H are involved in human cytomegalovirus membrane fusion. *J Virol.* agosto de 2004;78(15):8333-41.
6. Wang X, Huang S-M, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang E-S. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature.* 24 de julio de 2003;424(6947):456-61.
7. Wang X, Huang DY, Huang S-M, Huang E-S. Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat Med.* mayo de 2005;11(5):515-21.
8. Bold S, Ohlin M, Garten W, Radsak K. Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B-mediated cell-cell fusion. *J Gen Virol.* septiembre de 1996;77 (Pt 9):2297-302.
9. Keay S, Baldwin B. Anti-idiotypic antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment. *J Virol.* septiembre de 1991;65(9):5124-8.
10. Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology.* noviembre de 1993;197(1):143-58.
11. Tugizov S, Navarro D, Paz P, Wang Y, Qadri I, Pereira L. Function of human cytomegalovirus glycoprotein B: syncytium formation in cells constitutively expressing gB is blocked by virus-neutralizing antibodies. *Virology.* junio de 1994;201(2):263-76.
12. Compton T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol.* enero de 2004;14(1):5-8.
13. Stagno S, Dworsky ME, Torres J, Mesa T, Hirsh T. Prevalence and importance of congenital cytomegalovirus infection in three different populations. *J Pediatr.* diciembre de 1982;101(6):897-900.
14. Burton, Watson. The Structure of the Human Placenta: Implications for Initiating and Defending Against Virus Infections. *Rev Med Virol.* diciembre de 1997;7(4):219-28.
15. Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Alford CA Jr. Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. *Clin Obstet Gynecol.* septiembre de 1982;25(3):563-76.
16. Drew WL. Sexual transmission of CMV and its relationship to Kaposi sarcoma in homosexual men. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1984;20(1):121-9.
17. Coutinho RA, Wertheim-van Dillen P, Albrecht-van Lent P, Nagelkerke N, Kuipers H, van Bentum-van Haagen A, et al. Infection with cytomegalovirus in

homosexual men. *Br J Vener Dis.* agosto de 1984;60(4):249-52.

18. Collier AC, Meyers JD, Corey L, Murphy VL, Roberts PL, Handsfield HH. Cytomegalovirus infection in homosexual men. Relationship to sexual practices, antibody to human immunodeficiency virus, and cell-mediated immunity. *Am J Med.* 23 de marzo de 1987;82(3 Spec No):593-601.

19. Ho M. Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis.* octubre de 1990;12 Suppl 7:S701-710.

20. Bowden RA, Slichter SJ, Sayers M, Weisdorf D, Cays M, Schoch G, et al. A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV infection after marrow transplant. *Blood.* 1 de noviembre de 1995;86(9):3598-603.

21. Ruutu P, Ruutu T, Volin L, Tukiainen P, Ukkonen P, Hovi T. Cytomegalovirus is frequently isolated in bronchoalveolar lavage fluid of bone marrow transplant recipients without pneumonia. *Ann Intern Med.* 15 de junio de 1990;112(12):913-6.

22. Winston DJ. Prophylaxis and treatment of infection in the bone marrow transplant recipient. *Curr Clin Top Infect Dis.* 1993;13:293-321.

23. Pollard RB. Cytomegalovirus infections in renal, heart, heart-lung and liver transplantation. *Pediatr Infect Dis J.* mayo de 1988;7(5 Suppl):S97-102.

24. Akalin E, Sehgal V, Ames S, Hossain S, Daly L, Barbara M, et al. Cytomegalovirus disease in high-risk transplant recipients despite ganciclovir or valganciclovir prophylaxis. *Am J Transplant.* junio de 2003;3(6):731-5.

25. Clyde S. Crumpacker (2000). Cytomegalovirus. Mandell, Bennet and Dolin. *Principles and Practice of Infectious Diseases* (pp 1938-1954), 5th edition. Philadelphia: Churchill Livingstone.

26. De Ory Manchón F, Sanz Moreno JC, Castañeda López R, Ramírez Fernández R, León Rega P, Pachón del Amo I. [Cytomegalovirus seroepidemiology in the community of Madrid]. *Rev Esp Salud Publica.* febrero de 2001;75(1):55-62.

27. De Ory F, Ramírez R, García Comas L, León P, Sagües MJ, Sanz JC. Is there a change in cytomegalovirus seroepidemiology in Spain? *Eur J Epidemiol.* 2004;19(1):85-9.

28. Baquero-Artigao F, Grupo de estudio de la infección congénita por citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica. [Consensus document from the Spanish Society of Paediatric Infectious Diseases (SEIP) on the diagnosis and treatment of congenital cytomegalovirus infection]. *An Pediatr (Barc).* diciembre de 2009;71(6):535-47.

29. Ariza-Heredia EJ, Neshet L, Chemaly RF. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: a mini-review. *Cancer Lett.* 1 de enero de 2014;342(1):1-8.

30. Rowshani AT, Bemelman FJ, van Leeuwen EMM, van Lier RAW, ten Berge IJM. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation.* 27 de febrero de 2005;79(4):381-6.

31. Baldanti F, Lilleri D, Gerna G. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. *J Clin Virol.* marzo de 2008;41(3):237-41.

32. Razonable RR, Humar A, AST Infectious Diseases Community of Practice. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* marzo de 2013;13 Suppl 4:93-106.

33. Razonable RR. Management strategies for cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am.* junio de 2013;27(2):317-42.

34. Harvala H, Stewart C, Muller K, Burns S, Marson L, MacGilchrist A, et al. High

risk of cytomegalovirus infection following solid organ transplantation despite prophylactic therapy. *J Med Virol.* mayo de 2013;85(5):893-8.

35. Mendez-Eirin E, Paniagua-Martín MJ, Marzoa-Rivas R, Barge-Caballero E, Grille-Cancela Z, Cañizares A, et al. Cumulative incidence of cytomegalovirus infection and disease after heart transplantation in the last decade: effect of preemptive therapy. *Transplant Proc.* noviembre de 2012;44(9):2660-2.

36. Hammond SP, Martin ST, Roberts K, Gabardi S, Fuhlbrigge AL, Camp PC, et al. Cytomegalovirus disease in lung transplantation: impact of recipient seropositivity and duration of antiviral prophylaxis. *Transpl Infect Dis.* abril de 2013;15(2):163-70.

37. Kijpittayarit-Arthurs S, Eid AJ, Kremers WK, Pedersen RA, Dierkhising RA, Patel R, et al. Clinical features and outcomes of delayed-onset primary cytomegalovirus disease in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* octubre de 2007;26(10):1019-24.

38. Arthurs SK, Eid AJ, Pedersen RA, Kremers WK, Cosio FG, Patel R, et al. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clin Infect Dis.* 15 de marzo de 2008;46(6):840-6.

39. Sia IG, Wilson JA, Groettum CM, Espy MJ, Smith TF, Paya CV. Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation. *J Infect Dis.* febrero de 2000;181(2):717-20.

40. Humar A, Kumar D, Boivin G, Caliendo AM. Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with CMV disease. *J Infect Dis.* 15 de septiembre de 2002;186(6):829-33.

41. Evans PC, Soin A, Wreghitt TG, Taylor CJ, Wight DG, Alexander GJ. An association between cytomegalovirus infection and chronic rejection after liver transplantation. *Transplantation.* 15 de enero de 2000;69(1):30-5.

42. Limaye AP, Bakthavatsalam R, Kim HW, Kuhr CS, Halldorson JB, Healey PJ, et al. Late-onset cytomegalovirus disease in liver transplant recipients despite antiviral prophylaxis. *Transplantation.* 15 de noviembre de 2004;78(9):1390-6.

43. Bosch W, Heckman MG, Diehl NN, Shalev JA, Pungpapong S, Hellinger WC. Association of cytomegalovirus infection and disease with death and graft loss after liver transplant in high-risk recipients. *Am J Transplant.* octubre de 2011;11(10):2181-9.

44. Razonable RR, Paya CV, 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.* marzo de 2002;40(3):746-52.

45. Emery VC, Asher K, Sanjuan C de J. Importance of the cytomegalovirus seropositive recipient as a contributor to disease burden after solid organ transplantation. *J Clin Virol.* junio de 2012;54(2):125-9.

46. Weigand K, Schnitzler P, Schmidt J, Chahoud F, Gotthardt D, Schemmer P, et al. Cytomegalovirus infection after liver transplantation incidence, risks, and benefits of prophylaxis. *Transplant Proc.* septiembre de 2010;42(7):2634-41.

47. Lumberras C, Otero JR, Herrero JA, Gomez R, Lizasoain M, Aguado JM, et al. Ganciclovir prophylaxis decreases frequency and severity of cytomegalovirus disease in seropositive liver transplant recipients treated with OKT3 monoclonal antibodies. *Antimicrob Agents Chemother.* noviembre de 1993;37(11):2490-2.

48. Portela D, Patel R, Larson-Keller JJ, Ilstrup DM, Wiesner RH, Steers JL, et al. OKT3 treatment for allograft rejection is a risk factor for cytomegalovirus disease in liver transplantation. *J Infect Dis.* abril de 1995;171(4):1014-8.

49. Åsberg A, Jardine AG, Bignamini AA, Rollag H, Pescovitz MD, Gahlemann

- CC, et al. Effects of the Intensity of Immunosuppressive Therapy on Outcome of Treatment for CMV Disease in Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*. 10 de mayo de 2010;10:1881-8.
50. Bernabeu-Wittel M, Naranjo M, Cisneros JM, Cañas E, Gentil MA, Algarra G, et al. Infections in renal transplant recipients receiving mycophenolate versus azathioprine-based immunosuppression. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. marzo de 2002;21(3):173-80.
51. Brennan DC, Legendre C, Patel D, Mange K, Wiland A, McCague K, et al. Cytomegalovirus Incidence Between Everolimus Versus Mycophenolate in De Novo Renal Transplants: Pooled Analysis of Three Clinical Trials. *American Journal of Transplantation*. 2011;11(11):2453-62.
52. Hill JA, Hummel M, Starling RC, Kobashigawa JA, Perrone SV, Arizón JM, et al. A lower incidence of cytomegalovirus infection in de novo heart transplant recipients randomized to everolimus. *Transplantation*. 15 de diciembre de 2007;84(11):1436-42.
53. Fishman JA. Overview: cytomegalovirus and the herpesviruses in transplantation. *Am J Transplant*. febrero de 2013;13 Suppl 3:1-8; quiz 8.
54. Florescu DF, Qiu F, Schmidt CM, Kalil AC. A Direct and Indirect Comparison Meta-analysis on the Efficacy of Cytomegalovirus Preventive Strategies in Solid Organ Transplantation. *Clin Infect Dis*. 2 de enero de 2014;
55. Cervera C, Lozano F, Saval N, Gimferrer I, Ibañez A, Suárez B, et al. The influence of innate immunity gene receptors polymorphisms in renal transplant infections. *Transplantation*. 15 de junio de 2007;83(11):1493-500.
56. Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis*. 15 de mayo de 2007;44(10):1315-20.
57. Riley HD Jr. History of the cytomegalovirus. *South Med J*. febrero de 1997;90(2):184-90.
58. Razonable RR, Hayden RT. Clinical utility of viral load in management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Clin Microbiol Rev*. octubre de 2013;26(4):703-27.
59. Eid AJ, Arthurs SK, Deziel PJ, Wilhelm MP, Razonable RR. Clinical Predictors of Relapse after Treatment of Primary Gastrointestinal Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*. enero de 2010;10(1):157-61.
60. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 27 de agosto de 2013;96(4):333-60.
61. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Snydman DR, et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation*. 15 de abril de 2010;89(7):779-95.
62. Jonjić S, Pavić I, Polić B, Crnković I, Lucin P, Koszinowski UH. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med*. 1 de mayo de 1994;179(5):1713-7.
63. Adler SP, Starr SE, Plotkin SA, Hempfling SH, Buis J, Manning ML, et al. Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *J Infect Dis*. enero de 1995;171(1):26-32.
64. Siadak MF, Kopecky K, Sullivan KM. Reduction in transplant-related

complications in patients given intravenous immuno globulin after allogeneic marrow transplantation. *Clin Exp Immunol.* julio de 1994;97 Suppl 1:53-7.

65. Lilleri D, Baldanti F, Gatti M, Rovida F, Dossena L, De Grazia S, et al. Clinically-based determination of safe DNAemia cutoff levels for preemptive therapy or human cytomegalovirus infections in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Med Virol.* julio de 2004;73(3):412-8.

66. Kalpoe JS, Kroes ACM, de Jong MD, Schinkel J, de Brouwer CS, Beersma MFC, et al. Validation of Clinical Application of Cytomegalovirus Plasma DNA Load Measurement and Definition of Treatment Criteria by Analysis of Correlation to Antigen Detection. *J Clin Microbiol.* abril de 2004;42(4):1498-504.

67. Sanghavi SK, Abu-Elmagd K, Keightley MC, St George K, Lewandowski K, Boes SS, et al. Relationship of cytomegalovirus load assessed by real-time PCR to pp65 antigenemia in organ transplant recipients. *J Clin Virol.* agosto de 2008;42(4):335-42.

68. Benmarzouk-Hidalgo OJ, Cordero E, Martín-Peña A, García-Prado E, Gentil MA, Gomez-Bravo MA, et al. Prevention of cytomegalovirus disease using pre-emptive treatment after solid organ transplant in patients at high risk for cytomegalovirus infection. *Antivir Ther (Lond).* 2009;14(5):641-7.

69. Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clin Infect Dis.* junio de 2012;54(12):1793-7.

70. Gracia-Ahufinger I, Tormo N, Espigado I, Solano C, Urbano-Ispizua A, Clari MA, et al. Differences in cytomegalovirus plasma viral loads measured in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients using two commercial real-time PCR assays. *J Clin Virol.* junio de 2010;48(2):142-6.

71. Garrigue I, Doussau A, Asselineau J, Bricout H, Couzi L, Rio C, et al. Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol.* febrero de 2008;46(2):493-8.

72. De la Torre-Cisneros J, Fariñas MC, Castón JJ, Aguado JM, Cantisán S, Carratalá J, et al. GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* diciembre de 2011;29(10):735-58.

73. Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Miller GG, Caliendo AM, Preiksaitis JK. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant.* febrero de 2009;9(2):258-68.

74. Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA, Du Mond C, Cays M, Ebeling DF, et al. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 5 de diciembre de 1991;325(23):1601-7.

75. Schmidt GM, Horak DA, Niland JC, Duncan SR, Forman SJ, Zaia JA. A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplants; The City of Hope-Stanford-Syntex CMV Study Group. *N Engl J Med.* 11 de abril de 1991;324(15):1005-11.

76. Merigan TC, Renlund DG, Keay S, Bristow MR, Starnes V, O'Connell JB, et al. A controlled trial of ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after heart transplantation. *N Engl J Med.* 30 de abril de 1992;326(18):1182-6.

77. Winston DJ, Wirin D, Shaked A, Busuttil RW. Randomised comparison of ganciclovir and high-dose acyclovir for long-term cytomegalovirus prophylaxis in liver-transplant recipients. *Lancet.* 8 de julio de 1995;346(8967):69-74.

78. Preiksaitis JK, Brennan DC, Fishman J, Allen U. Canadian Society of Transplantation Consensus Workshop on Cytomegalovirus Management in Solid Organ

Transplantation Final Report. American Journal of Transplantation. febrero de 2005;5(2):218-27.

79. Humar A, Michaels M, on behalf of the AST ID Working Group on Infectious Disease Monitoring+. American Society of Transplantation Recommendations for Screening, Monitoring and Reporting of Infectious Complications in Immunosuppression Trials in Recipients of Organ Transplantation. American Journal of Transplantation. febrero de 2006;6(2):262-74.

80. 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. 15 de abril de 2010;89(7):779-95.

81. Boillat Blanco N, Pascual M, Venetz J-P, Nseir G, Meylan PR, Manuel O. Impact of a preemptive strategy after 3 months of valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in kidney transplant recipients. Transplantation. 27 de enero de 2011;91(2):251-5.

82. Beam E, Razonable RR. Cytomegalovirus in solid organ transplantation: epidemiology, prevention, and treatment. Curr Infect Dis Rep. diciembre de 2012;14(6):633-41.

83. Manuel O, Kralidis G, Mueller NJ, Hirsch HH, Garzoni C, van Delden C, et al. Impact of Antiviral Preventive Strategies on the Incidence and Outcomes of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Recipients. American Journal of Transplantation. 2013;13(9):2402-10.

84. Khoury JA, Storch GA, Bohl DL, Schuessler RM, Torrence SM, Lockwood M, et al. Prophylactic Versus Preemptive Oral Valganciclovir for the Management of Cytomegalovirus Infection in Adult Renal Transplant Recipients. American Journal of Transplantation. septiembre de 2006;6(9):2134-43.

85. Kliem V, Fricke L, Wollbrink T, Burg M, Radermacher J, Rohde F. Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: results of a randomized clinical trial. Am J Transplant. mayo de 2008;8(5):975-83.

86. Reischig T, Jindra P, Hes O, Svecová M, Klaboč J, Treska V. Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. Am J Transplant. enero de 2008;8(1):69-77.

87. Witzke O, Hauser IA, Bartels M, Wolf G, Wolters H, Nitschke M. Valganciclovir prophylaxis versus preemptive therapy in cytomegalovirus-positive renal allograft recipients: 1-year results of a randomized clinical trial. Transplantation. 15 de enero de 2012;93(1):61-8.

88. Humar A, Lebranchu Y, Vincenti F, Blumberg EA, Punch JD, Limaye AP, et al. The Efficacy and Safety of 200 Days Valganciclovir Cytomegalovirus Prophylaxis in High-Risk Kidney Transplant Recipients. American Journal of Transplantation. mayo de 2010;10:1228-37.

89. Kalil AC, Sun J, Florescu DF. IMPACT Trial Results Should Not Change Current Standard of Care of 100 Days for Cytomegalovirus Prophylaxis. American Journal of Transplantation. enero de 2011;11:18-21.

90. Da Cunha-Bang C, Iversen M, Mortensen SA, Rasmussen A, Sengeløv H, Sørensen SS, et al. Regarding: Humar et al. The Efficacy and Safety of 200 Days Valganciclovir Cytomegalovirus Prophylaxis in High-Risk Kidney Transplant Recipients. Am J Transplant 2010;10:1228-1237. American Journal of Transplantation. febrero de 2011;11:408-408.

91. Palmer SM, Limaye AP, Banks M, Gallup D, Chapman J, Lawrence EC, et al. Extended valganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus after lung

transplantation: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 15 de junio de 2010;152(12):761-9.

92. Zamora MR, Nicolls MR, Hodges TN, Marquesen J, Astor T, Grazia T, et al. Following universal prophylaxis with intravenous ganciclovir and cytomegalovirus immune globulin, valganciclovir is safe and effective for prevention of CMV infection following lung transplantation. *Am J Transplant.* octubre de 2004;4(10):1635-42.

93. Kalil AC, Levitsky J, Lyden E, Stoner J, Freifeld AG. Meta-analysis: the efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Ann Intern Med.* 20 de diciembre de 2005;143(12):870-80.

94. Small LN, Lau J, Snyderman DR. Preventing post-organ transplantation cytomegalovirus disease with ganciclovir: a meta-analysis comparing prophylactic and preemptive therapies. *Clin Infect Dis.* 1 de octubre de 2006;43(7):869-80.

95. Humar A, Mazzulli T, Moussa G, Razonable RR, Paya CV, Pescovitz MD, et al. Clinical Utility of Cytomegalovirus (CMV) Serology Testing in High-risk CMV D+/R-Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation.* mayo de 2005;5(5):1065-70.

96. Singh N, Wannstedt C, Keyes L, Mayher D, Tickerhoof L, Akoad M, et al. Valganciclovir as preemptive therapy for cytomegalovirus in cytomegalovirus-seronegative liver transplant recipients of cytomegalovirus-seropositive donor allografts. *Liver Transpl.* febrero de 2008;14(2):240-4.

97. Martín-Dávila P, Fortún J, Gutiérrez C, Martí-Belda P, Candelas A, Honrubia A, et al. Analysis of a quantitative PCR assay for CMV infection in liver transplant recipients: an intent to find the optimal cut-off value. *J Clin Virol.* junio de 2005;33(2):138-44.

98. Paudice N, Mehmetaj A, Zanazzi M, Moscarelli L, Piperno R, Di Maria L, et al. Preemptive therapy for the prevention of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients: our preliminary experience. *Transplant Proc.* mayo de 2009;41(4):1204-6.

99. Casillo R, Grimaldi M, Ragone E, Maiello C, Marra C, De Santo L, et al. Efficacy and limitations of preemptive therapy against cytomegalovirus infections in heart transplant patients. *Transplant Proc.* abril de 2004;36(3):651-3.

100. Kim JM, Kim SJ, Joh J-W, Shin M, Kim EY, Moon JI, et al. Preemptive therapy in adult liver transplant recipients in CMV-endemic area. *Transplant Proc.* abril de 2010;42(3):825-9.

101. Sun H-Y, Cacciarelli TV, Wagener MM, Singh N. Preemptive therapy for cytomegalovirus based on real-time measurement of viral load in liver transplant recipients. *Transpl Immunol.* agosto de 2010;23(4):166-9.

102. Bodro M, Sabé N, Lladó L, Baliellas C, Niubó J, Castellote J, et al. Prophylaxis versus preemptive therapy for cytomegalovirus disease in high-risk liver transplant recipients. *Liver Transpl.* septiembre de 2012;18(9):1093-9.

103. Couzi L, Helou S, Bachelet T, Martin S, Moreau K, Morel D, et al. Preemptive therapy versus valganciclovir prophylaxis in cytomegalovirus-positive kidney transplant recipients receiving antithymocyte globulin induction. *Transplant Proc.* noviembre de 2012;44(9):2809-13.

104. Helanterä I, Lautenschlager I, Koskinen P. The risk of cytomegalovirus recurrence after kidney transplantation. *Transpl Int.* diciembre de 2011;24(12):1170-8.

105. Strippoli GF, Hodson EM, Jones CJ, Craig JC. Pre-emptive treatment for cytomegalovirus viraemia to prevent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;(1):CD005133.

106. Owers DS, Webster AC, Strippoli GFM, Kable K, Hodson EM. Pre-emptive treatment for cytomegalovirus viraemia to prevent cytomegalovirus disease in solid

- organ transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;2:CD005133.
107. Asberg A, Humar A, Rollag H, Jardine AG, Mouas H, Pescovitz MD, et al. Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* septiembre de 2007;7(9):2106-13.
108. Eid AJ, Razonable RR. New Developments in the Management of Cytomegalovirus Infection after Solid Organ Transplantation. *Drugs.* mayo de 2010;70:965-81.
109. Hodson EM, Jones CA, Webster AC, Strippoli GFM, Barclay PG, Kable K, et al. Antiviral medications to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet.* 18 de junio de 2005;365(9477):2105-15.
110. Wiltshire H, Hirankarn S, Farrell C, Paya C, Pescovitz MD, Humar A, et al. Pharmacokinetic profile of ganciclovir after its oral administration and from its prodrug, valganciclovir, in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(5):495-507.
111. Wiltshire H, Paya CV, Pescovitz MD, Humar A, Dominguez E, Washburn K, et al. Pharmacodynamics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Transplantation.* 15 de junio de 2005;79(11):1477-83.
112. Paya C, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, et al. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* abril de 2004;4(4):611-20.
113. Kalil AC, Freifeld AG, Lyden ER, Stoner JA. Valganciclovir for cytomegalovirus prevention in solid organ transplant patients: an evidence-based reassessment of safety and efficacy. *PLoS ONE.* 2009;4(5):e5512.
114. Lopau K, Greser A, Wanner C. Efficacy and safety of preemptive anti-CMV therapy with valganciclovir after kidney transplantation. *Clinical Transplantation.* 1 de enero de 2007;21(1):80-5.
115. Díaz-Pedroche C, Lumbreras C, San Juan R, Folgueira D, Andrés A, Delgado J, et al. Valganciclovir preemptive therapy for the prevention of cytomegalovirus disease in high-risk seropositive solid-organ transplant recipients. *Transplantation.* 15 de julio de 2006;82(1):30-5.
116. Len O, Gavaldà J, Aguado JM, Borrell N, Cervera C, Cisneros JM, et al. Valganciclovir as treatment for cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 1 de enero de 2008;46(1):20-7.
117. Hodson EM, Ladhani M, Webster AC, Strippoli GFM, Craig JC. Antiviral medications for preventing cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;2:CD003774.
118. De la Torre-Cisneros J, Fariñas MC, Castón JJ, Aguado JM, Cantisán S, Carratalá J, et al. GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* diciembre de 2011;29(10):735-58.
119. Torres-Madriz G, Boucher HW. Immunocompromised hosts: perspectives in the treatment and prophylaxis of cytomegalovirus disease in solid-organ transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 1 de septiembre de 2008;47(5):702-11.
120. Sarmiento E, Rodríguez-Molina J, Muñoz P, Fernández-Yáñez J, Palomo J, Fogueda M, et al. Decreased levels of serum immunoglobulins as a risk factor for infection after heart transplantation. *Transplant Proc.* noviembre de 2005;37(9):4046-9.
121. Limaye AP, Corey L, Koelle DM, Davis CL, Boeckh M. Emergence of

ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. *Lancet*. 19 de agosto de 2000;356(9230):645-9.

122. Gracia-Ahufinger I, Gutiérrez-Aroca J, Cordero E, Vidal E, Cantisán S, del Castillo D, et al. Use of high-dose ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus replication in solid organ transplant patients with ganciclovir resistance-inducing mutations. *Transplantation*. 27 de abril de 2013;95(8):1015-20.

123. Boivin G, Goyette N, Rollag H, Jardine AG, Pescovitz MD, Asberg A, et al. Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. *Antivir Ther (Lond)*. 2009;14(5):697-704.

124. Couzi L, Helou S, Bachelet T, Moreau K, Martin S, Morel D, et al. High incidence of anticytomegalovirus drug resistance among D+R- kidney transplant recipients receiving preemptive therapy. *Am J Transplant*. enero de 2012;12(1):202-9.

125. Stoelben S, Arns W, Renders L, Hummel J, Mühlfeld A, Stangl M, et al. Preemptive treatment of Cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients with letermovir: results of a Phase 2a study. *Transpl Int*. enero de 2014;27(1):77-86.

126. La Rosa C, Diamond DJ. The immune response to human CMV. *Future Virol*. 1 de marzo de 2012;7(3):279-93.

127. Radha R, Jordan S, Puliyananda D, Bunnapradist S, Petrosyan A, Amet N, et al. Cellular immune responses to cytomegalovirus in renal transplant recipients. *Am J Transplant*. enero de 2005;5(1):110-7.

128. Benmarzouk-Hidalgo OJ, Cisneros JM, Cordero E, Martín-Peña A, Sanchez B, Martín-Gandul C, et al. Therapeutic effect of the acquisition of cytomegalovirus-specific immune response during preemptive treatment. *Transplantation*. 27 de abril de 2011;91(8):927-33.

129. Sester M, Sester U, Gärtner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, et al. Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation*. 15 de mayo de 2001;71(9):1287-94.

130. Abate D, Fiscon M, Saldan A, Cofano S, Mengoli C, Sgarabotto D, et al. Human cytomegalovirus-specific T-cell immune reconstitution in preemptively treated heart transplant recipients identifies subjects at critical risk for infection. *J Clin Microbiol*. junio de 2012;50(6):1974-80.

131. Walker S, Fazou C, Crough T, Holdsworth R, Kiely P, Veale M, et al. Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl Infect Dis*. junio de 2007;9(2):165-70.

132. Kumar D, Chernenko S, Moussa G, Cobos I, Manuel O, Preiksaitis J, et al. Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. mayo de 2009;9(5):1214-22.

133. Razonable RR. Management strategies for cytomegalovirus infection and disease in solid organ transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am*. junio de 2013;27(2):317-42.

134. Li H, Dummer JS, Estes WR, Meng S, Wright PF, Tang Y-W. Measurement of human cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients. *J Clin Microbiol*. enero de 2003;41(1):187-91.

135. Humar A, Gregson D, Caliendo AM, McGeer A, Malkan G, Krajden M, et al. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Transplantation*. 15 de noviembre de 1999;68(9):1305-11.

136. Hadaya K, Wunderli W, Deffernez C, Martin P-Y, Mentha G, Binet I, et al. Monitoring of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant recipients by an

- ultrasensitive plasma PCR assay. *J Clin Microbiol.* agosto de 2003;41(8):3757-64.
137. Levitsky J, Freifeld AG, Puumala S, Bargenquast K, Hardiman P, Gebhart C, et al. Cytomegalovirus viremia in solid organ transplantation: does the initial viral load correlate with risk factors and outcomes? *Clin Transplant.* abril de 2008;22(2):222-8.
138. Atabani SF, Smith C, Atkinson C, Aldridge RW, Rodriguez-Perálvarez M, Rolando N, et al. Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. *Am J Transplant.* septiembre de 2012;12(9):2457-64.
139. Martín-Gandul C, Pérez-Romero P, Sánchez M, Bernal G, Suárez G, Sobrino M, et al. Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection. *J Clin Virol.* enero de 2013;56(1):13-8.
140. Sia IG, Wilson JA, Groettum CM, Espy MJ, Smith TF, Paya CV. Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation. *J Infect Dis.* febrero de 2000;181(2):717-20.
141. Gerna G, Lilleri D, Chiesa A, Zelini P, Furione M, Comolli G, et al. Virologic and immunologic monitoring of cytomegalovirus to guide preemptive therapy in solid-organ transplantation. *Am J Transplant.* noviembre de 2011;11(11):2463-71.
142. Lautenschlager I, Loginov R, Mäkisalo H, Höckerstedt K. Prospective study on CMV-reactivations under preemptive strategy in CMV-seropositive adult liver transplant recipients. *J Clin Virol.* mayo de 2013;57(1):50-3.
143. 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.* marzo de 2013;56(6):817-24.
144. Cantisán S, Lara R, Montejo M, Redel J, Rodríguez-Benot A, Gutiérrez-Aroca J, et al. Pretransplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8⁺ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am J Transplant.* marzo de 2013;13(3):738-45.
145. Eid AJ, Brown RA, Arthurs SK, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Larson TS, et al. A prospective longitudinal analysis of cytomegalovirus (CMV)-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in kidney allograft recipients at risk of CMV infection. *Transpl Int.* 1 de mayo de 2010;23(5):506-13.
146. Andrews PA, Emery VC, Newstead C. Summary of the British Transplantation Society Guidelines for the Prevention and Management of CMV Disease After Solid Organ Transplantation. *Transplantation.* 15 de diciembre de 2011;92(11):1181-7.
147. Le Page AK, Jager MM, Kotton CN, Simoons-Smit A, Rawlinson WD. International survey of cytomegalovirus management in solid organ transplantation after the publication of consensus guidelines. *Transplantation.* 27 de junio de 2013;95(12):1455-60.
148. Humar A, Limaye AP, Blumberg EA, Hauser IA, Vincenti F, Jardine AG, et al. Extended valganciclovir prophylaxis in D+/R- kidney transplant recipients is associated with long-term reduction in cytomegalovirus disease: two-year results of the IMPACT study. *Transplantation.* 27 de diciembre de 2010;90(12):1427-31.
149. Welker H, Farhan M, Humar A, Washington C. Ganciclovir pharmacokinetic parameters do not change when extending valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis from 100 to 200 days. *Transplantation.* 27 de diciembre de 2010;90(12):1414-9.
150. Kalil AC, Sun J, Florescu DF. IMPACT trial results should not change current standard of care of 100 days for cytomegalovirus prophylaxis. *Am J Transplant.* enero de 2011;11(1):18-21.

151. Bhat V, McIntyre M, Meyers T. Efficacy and safety of a lower-dose valganciclovir (valcyte) regimen for cytomegalovirus prophylaxis in kidney and pancreas transplant recipients. *P T*. diciembre de 2010;35(12):676-9.
152. Avery RK. Low-dose valganciclovir for cytomegalovirus prophylaxis in organ transplantation: is less really more? *Clin Infect Dis*. 1 de febrero de 2011;52(3):322-4.
153. Strippoli GFM, Hodson EM, Jones C, Craig JC. Preemptive treatment for cytomegalovirus viremia to prevent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Transplantation*. 27 de enero de 2006;81(2):139-45.
154. Aubert O, Sberro-Soussan R, Scemla A, Casadevall N, Teyssandier I, Martinez F, et al. Autoimmune neutropenia after kidney transplantation: a disregarded entity of posttransplant neutropenia. *Transplantation*. 15 de abril de 2014;97(7):725-9.
155. Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med*. febrero de 1966;64(2):328-40.
156. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 15 de abril de 2002;34(8):1094-7.
157. ctcae3.pdf [Internet]. [citado 28 de noviembre de 2011]. Recuperado a partir de: <http://www.eortc.be/services/doc/ctc/ctcae3.pdf>
158. Ruell J, Barnes C, Mutton K, Foulkes B, Chang J, Cavet J, et al. Active CMV disease does not always correlate with viral load detection. *Bone Marrow Transplant*. julio de 2007;40(1):55-61.
159. Fica A, Cervera C, Pérez N, Marcos MA, Ramírez J, Linares L, et al. Immunohistochemically proven cytomegalovirus end-organ disease in solid organ transplant patients: clinical features and usefulness of conventional diagnostic tests. *Transpl Infect Dis*. septiembre de 2007;9(3):203-10.
160. Kaplan B, Meier-Kriesche HU, Jacobs MG, Friedman G, Bonomini L, DeFranco P, et al. Prevalence of cytomegalovirus in the gastrointestinal tract of renal transplant recipients with persistent abdominal pain. *Am J Kidney Dis*. julio de 1999;34(1):65-8.
161. Grim SA, Pereira E, Guzman G, Clark NM. CMV PCR as a diagnostic tool for CMV gastrointestinal disease after solid organ transplantation. *Transplantation*. 15 de octubre de 2010;90(7):799-801.
162. Jang E-Y, Park SY, Lee EJ, Song EH, Chong YP, Lee S-O, et al. Diagnostic performance of the cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay in patients with CMV gastrointestinal disease. *Clin Infect Dis*. 15 de junio de 2009;48(12):e121-124.
163. Boaretti M, Sorrentino A, Zantedeschi C, Forni A, Boschiero L, Fontana R. Quantification of cytomegalovirus DNA by a fully automated real-time PCR for early diagnosis and monitoring of active viral infection in solid organ transplant recipients. *J Clin Virol*. febrero de 2013;56(2):124-8.
164. Egli A, Binet I, Binggeli S, Jäger C, Dumoulin A, Schaub S, et al. Cytomegalovirus-specific T-cell responses and viral replication in kidney transplant recipients. *J Transl Med*. 2008;6:29.
165. La Rosa C, Limaye AP, Krishnan A, Longmate J, Diamond DJ. Longitudinal assessment of cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses in liver transplant recipients at high risk for late CMV disease. *J Infect Dis*. 1 de marzo de 2007;195(5):633-44.
166. Reusser P, Cathomas G, Attenhofer R, Tamm M, Thiel G. Cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immunity after renal transplantation mediates protection from CMV disease by limiting the systemic virus load. *J Infect Dis*. agosto de 1999;180(2):247-53.
167. Asberg A, Humar A, Jardine AG, Rollag H, Pescovitz MD, Mouas H, et al.

Long-term outcomes of CMV disease treatment with valganciclovir versus IV ganciclovir in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* mayo de 2009;9(5):1205-13.

168. Kalil AC, Mindru C, Florescu DF. Effectiveness of valganciclovir 900 mg versus 450 mg for cytomegalovirus prophylaxis in transplantation: direct and indirect treatment comparison meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 1 de febrero de 2011;52(3):313-21.

169. Emery VC, Griffiths PD. Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 5 de julio de 2000;97(14):8039-44.

170. Limaye AP. Antiviral resistance in cytomegalovirus: an emerging problem in organ transplant recipients. *Semin Respir Infect.* diciembre de 2002;17(4):265-73.

171. Díaz-Pedroche C, Lumbreras C, San Juan R, Folgueira D, Andrés A, Delgado J, et al. Valganciclovir preemptive therapy for the prevention of cytomegalovirus disease in high-risk seropositive solid-organ transplant recipients. *Transplantation.* 15 de julio de 2006;82(1):30-5.

172. Caldés A, Gil-Vernet S, Armendariz Y, Colom H, Pou L, Niubó J, et al. Sequential treatment of cytomegalovirus infection or disease with a short course of intravenous ganciclovir followed by oral valganciclovir: efficacy, safety, and pharmacokinetics. *Transpl Infect Dis.* junio de 2010;12(3):204-12.

173. Zafrani L, Truffaut L, Kreis H, Etienne D, Rafat C, Lechaton S, et al. Incidence, risk factors and clinical consequences of neutropenia following kidney transplantation: a retrospective study. *Am J Transplant.* agosto de 2009;9(8):1816-25.

174. Fortun J, Martin-Davila P, Pascual J, Cervera C, Moreno A, Gavalda J, et al. Immunosuppressive therapy and infection after kidney transplantation. *Transpl Infect Dis.* octubre de 2010;12(5):397-405.

175. Fellay J, Venetz J-P, Aubert J-D, Seydoux C, Pascual M, Meylan PRA. Treatment of cytomegalovirus infection or disease in solid organ transplant recipients with valganciclovir. *Transplant Proc.* marzo de 2005;37(2):949-51.

176. Fellay J, Venetz J-P, Pascual M, Aubert J-D, Seudoux C, Meylan PRA. Treatment of cytomegalovirus infection or disease in solid organ transplant recipients with valganciclovir. *Am J Transplant.* julio de 2005;5(7):1781-1782; author reply 1783.

177. Park S-Y, Kim YH, Han DJ, Park S-K, Park JS, Sung H, et al. Efficacy of a strategy for discontinuing pre-emptive ganciclovir therapy after a negative cytomegalovirus antigenaemia test result in seropositive kidney transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 16 de enero de 2013 [citado 25 de febrero de 2013]; Recuperado a partir de: <http://0-jac.oxfordjournals.org.fama.us.es/content/early/2013/01/15/jac.dks524>

PARTE VII. ANEXOS Y PUBLICACIONES

Artículo 1.

Journal of Clinical Virology 2013; 56:13-18.

Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection.

C. Martín-Gandul ^{a,*}, P. Pérez-Romero ^a, M. Sánchez ^a, G. Bernal ^b, G. Suárez ^c, M. Sobrino ^d, L. Merino ^a, J.M. Cisneros ^a, E. Cordero ^a, The Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).

^a Unit of Infectious Diseases, Microbiology and Medicine Preventive, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Spain

^b Service of Nephrology, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

^c Hepatobiliary and Pancreatic Surgery and Hepatic Transplant Unit, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

^d Service of Cardiology, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

Artículo 2.

Transplant International 2014; *Aceptado para publicación.*

Viral load, CMV-specific T cell immune response and CMV disease in solid organ transplant recipients at higher risk for cytomegalovirus infection.

Cecilia Martín-Gandul^{1, 2*}, Pilar Pérez-Romero^{1, 2*}, Pilar Blanco-Lobo^{1, 2}, Magdalena Sánchez^{1, 2}, Miguel A Gentil³, Carmen Bernal⁴, Manuel Sobrino⁵, M Jesús Rodríguez-Hernández^{1, 2}, Elisa Cordero^{1, 2} and The Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).

*Both authors have contributed equally to the manuscript

1) Unit of Infectious Disease, Microbiology and Preventive Medicine, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/ University of Sevilla, Spain, 2) Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, 3) Service of Nephrology, 4) Hepatobiliary and Pancreatic Surgery and Hepatic Transplant Unit, 5) Service of Cardiology, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla, Spain.

Artículo 3.

Journal of Infection 2014; *Enviado a la revista.*

Clinical impact of neutropenia related with the preemptive therapy of CMV infection in solid organ transplant recipients.

Cecilia Martín-Gandul^{a,b}, Pilar Pérez-Romero^{a,b}, Francisco M González-Roncero^c, Soledad Berdaguer^d, Miguel A Gómez^e, Ernesto Lage^f, Magdalena Sánchez^{a,b}, José M Cisneros^{a,b}, Elisa Cordero^{a,b} and The Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).

a) Unit of Infectious Disease, Microbiology and Preventive Medicine, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/ University of Sevilla, Spain, b) Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, c) Unit of Nephrology and Urology, d) Service of Clinical Pharmacology, e) Hepatobiliary and Pancreatic Surgery and Hepatic Transplant Unit, f) Service of Cardiology, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla, Spain.

Capítulo de libro.

Libro: 1000 TRASPLANTES HEPÁTICOS

Hospital Universitario Virgen del Rocío

Sevilla, 2014

ISBN: 978-84-695-9555-8

Capítulo 21. El tratamiento anticipado de la infección por cmv en el receptor de trasplante hepático (pag.205).

