



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA, MEXICALI B.C.**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**HOSPITAL DE GINECO-PEDIATRIA CON MEDICINA FAMILIAR NO. 31**



# **ASOCIACIÓN DE LA SEVERIDAD DEL SÍNDROME DE DIFICULTAD RESPIRATORIA CON INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS EN RECIÉN NACIDOS**

**TESIS**

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias de la Salud

**PRESENTA:**

**Angélica María Martínez Contreras**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. Sawako Oshima**

**CO-DIRECTORA DE TESIS**

**María Rosalía Lira Carmona**

**ASESORES**

**Carmen Gorety Soria Rodríguez**

**María Teresa Álvarez y Muñoz**

Mexicali B.C. México, 30 de noviembre del 2015

Universidad Autónoma De Baja California  
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

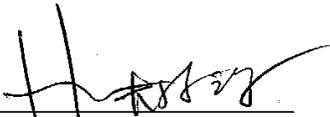
Mexicali Baja California, 9 de noviembre de 2015

DRA. JULIA DOLORES ESTRADA GUZMAN  
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI, UABC  
PRESENTE:

En mi calidad de directora de tesis de Angélica María Martínez Contreras, alumna del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud, me permito informar a usted que después de dar seguimiento a las observaciones que los sinodales realizaron, he leído y revisado la versión final de su tesis titulada "**Asociación de la severidad del síndrome de dificultad respiratoria con Infección por citomegalovirus en recién nacidos**" y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos académicos del Posgrado en Ciencias de la Salud, por lo tanto, la estudiante puede continuar con los trámites para solicitar fecha de su examen de grado.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente



Dra. Sawako Oshima  
Directora de Tesis de Doctorado en Ciencias de la Salud  
Facultad de Medicina, UABC Mexicali.

C.c.p. Carmen Gorety Soria Rodríguez, Coordinadora de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Mexicali.  
C.c.p. Angélica María Martínez Contreras  
C.c.p. Archivo

Mexicali Baja California, 30 de Octubre del 2015

D. en C. Sawako Oshima Hori Katsuragui

Directora de Tesis de Doctorado en Ciencia de la Salud

Facultad de Medicina, UABC. Mexicali

Presente

Por este conducto me permito comunicar que, en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante de Doctorado en Ciencias C. Angélica María Martínez Contreras, he leído y revisado la tesis titulada "Asociación de la severidad del síndrome de dificultad respiratoria con infección por citomegalovirus en recién nacidos" y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos académicos del Posgrado en Ciencias de la Salud; por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites para solicitar fecha de examen de grado.

Sin más por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Raul Diaz Molina", is written over a horizontal line. The signature is enclosed within a hand-drawn circle. A diagonal line is drawn across the circle and the signature from the top-left to the bottom-right.

DR. RAUL DIAZ MOLINA

Mexicali Baja California, 30 de Octubre del 2015

D. en C. Sawako Oshima Horí Katsuragui  
Directora de Tesis de Doctorado en Ciencia de la Salud  
Facultad de Medicina, UABC. Mexicali  
Presente

Por este conducto me permito comunicar que, en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante de Doctorado en Ciencias C. Angélica María Martínez Contreras, he leído y revisado la tesis titulada "Asociación de la severidad del síndrome de dificultad respiratoria con infección por citomegalovirus en recién nacidos" y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos académicos del Posgrado en Ciencias de la Salud; por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites para solicitar fecha de examen de grado.

Sin más por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente



---

DRA. MARIA ROSALIA LIRA CARMONA

Mexicali Baja California, 30 de Octubre del 2015

D. en C. Sawako Oshima Hori Katsuragui

Directora de Tesis de Doctorado en Ciencia de la Salud

Facultad de Medicina, UABC. Mexicali

Presente

Por este conducto me permito comunicar que, en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante de Doctorado en Ciencias C. Angélica María Martínez Contreras, he leído y revisado la tesis titulada "Asociación de la severidad del síndrome de dificultad respiratoria con infección por citomegalovirus en recién nacidos" y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos académicos del Posgrado en Ciencias de la Salud; por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites para solicitar fecha de examen de grado.

Sin más por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente



DRA. AURA ARCE RIVAS

Mexicali Baja California, 30 de Octubre del 2015

D. en C. Sawako Oshima Hori Katsuragui

Directora de Tesis de Doctorado en Ciencia de la Salud

Facultad de Medicina, UABC. Mexicali

Presente

Por este conducto me permito comunicar que, en mi calidad de jurado para examen de grado de la estudiante de Doctorado en Ciencias C. Angélica María Martínez Contreras, he leído y revisado la tesis titulada "Asociación de la severidad del síndrome de dificultad respiratoria con infección por citomegalovirus en recién nacidos" y considero que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos académicos del Posgrado en Ciencias de la Salud; por lo tanto, el estudiante puede continuar con los trámites para solicitar fecha de examen de grado.

Sin más por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente



---

DRA. MA. ELENA HARO

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

CARTA DE DICTAMEN DE LA EVALUACION DEL DOCUMENTO DE TESIS PARA  
SUSTENTAR EL EXAMEN DE GRADO

Mexicali, B.C. a 9 de Noviembre, 2015

Los abajo firmantes, miembros del Jurado Dictaminador del documento escrito denominado: **“Asociación de la severidad del síndrome de dificultad respiratoria con infección por citomegalovirus en recién nacidos”** que para obtener el grado de Doctor de Ciencias de la Salud presenta M.C. Angélica María Martínez Contreras.

Realizada la evaluación resolvimos: Aprobada

---

Dra. Sawako Oshima  
Presidente

---

Dr. Raúl Díaz Molina  
Secretario

---

Dra. Rosalía Lira Carmona  
Sinodal

---

Dra. Aura Arce Rivas  
Sinodal

---

Dra. Ma. Elena Haro Acosta  
Sinodal

## **Proverbios 2:2-6 Excelencias de la sabiduría**

2 Hijo mío, si recibieres mis palabras,  
Y mis mandamientos guardares dentro de ti,

<sup>2</sup> Haciendo estar atento tú oído a la sabiduría;  
Si inclinares tu corazón a la prudencia,

<sup>3</sup> Si clamares a la inteligencia,  
Y a la prudencia dieres tu voz;

<sup>4</sup> Si como a la plata la buscares,  
Y la escudriñares como a tesoros,

<sup>5</sup> Entonces entenderás el temor de Jehová,  
Y hallarás el conocimiento de Dios.

<sup>6</sup> Porque Jehová da la sabiduría,  
Y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia.

## DEDICATORIA

### A Dios

A Dios Padre y a Dios Hijo y a Dios Espíritu Santo por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy.

A Jesucristo mi Señor porque sé que te preocupas por el desvalido y el enfermo, no cabe duda que este proyecto de investigación salió de tu corazón para poder ayudar a los recién nacidos que lo necesitan.

A ti Espíritu Santo por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo éste periodo de estudio.

“El Señor da la sabiduría y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia”  
(Prov. 2:6)

A mi familia

A mi esposo José Gabriel

Gracias amor por soportar todo este camino conmigo, que aunque han sido muchas horas de no estar contigo sé que también te satisface este logro y lo celebras conmigo. Gracias por tu apoyo, paciencia y por tus oraciones. Te amo mucho.

A mis padres

A mi padre Nicolás

Gracias papá por tu amor, porque a tus 81 años me sigues mostrando con tu ejemplo la perseverancia y constancia que te caracterizan y que me has infundado siempre y por el valor mostrado para salir adelante a pesar de la adversidad.

A mi madre María Esperanza.

Gracias mamita por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me has apoyado aun en los momentos más sombríos de mi vida, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida.

A mis hermanos

Mis hermanos, Jorge, Guillermo, Leticia, Rene, Eduardo, Efrén, Elizabeth y Elsa Gabriela, por estar conmigo y apoyarme siempre, por sus oraciones, ustedes han sido un gran ejemplo para mi vida, le doy gracias a Dios por ser mis hermanos, los amo mucho.

A mis cuñados y cuñadas

Felipe de Jesús, José, Leticia Guadalupe, Rosalba, Ma. Enriqueta, Angelica Patricia y Liliana, gracias por todo su apoyo y oraciones.

A mis sobrinos

Leticia Esperanza, Jorge, Erika, Jaqueline, Enrique, Edith, Daniel, Gabriela, Isabel, Emmanuel de Jesús, Gisselle Jazmín, René David, Ángel Alonso, Eduardo Daniel, Paola, Efraín, Andrés, Angélica Elizabeth y José Ángel, para que sigan viendo mí un ejemplo a seguir, son a todo dar.

A mis pastores y amigos

A mis Pastores Manuel y Belén Olivas García, Pastora Rafaela García Guillen y a mis amigos y miembros de la congregación Maranatha, por su amistad, su interés y constante apoyo en oración para que este proyecto saliera adelante y culminara lo mejor posible.

A mis padres espirituales Abel y Leonila Vargas Benítez, por sus sabios consejos, apoyo y oraciones constantes por mí, los amo mucho.

A mis asesores.

Dra. Rosalía Lira Carmona por su gran apoyo y motivación, por su gran ejemplo, gracias porque desde el primer momento creyó en mí para este proyecto de investigación, gracias también por su amistad.

Dra. Sawako Oshima, por tu amistad, por la dedicación que me mostraste en todo ese tiempo de asesoramiento, por tu ejemplo, y por tu apoyo incondicional para la elaboración de esta tesis.

Maestra Carmelita Soria Rodríguez, por tu apoyo y amistad, y por tus sabios consejos, tu ayuda incondicional para elaborar esta tesis, estoy muy agradecida contigo.

Maestra Ma. Angélica Maldonado Rodríguez y Othón Rojas Montes por su apoyo y tiempo ofrecido en este trabajo, gracias por su paciencia.

A el maestro Rafael Ayala Figueroa, Julia Estrada Guzmán y Ma. Teresa Álvarez-Muñoz por su tiempo compartido y por apoyarnos en su momento.

#### A mis maestros de Doctorado

Dr. Raúl Díaz Molina y Dr. Octavio Robinson Navarro, mil gracias porque a través de los seminarios de investigación las observaciones que me hicieron, los detalles y sus comentarios muy sabios me dieron las herramientas para mejorar en una forma importante este trabajo, les estoy muy agradecida.

#### A mi directora de la Facultad de Medicina

Gracias Dra. Julia Dolores Estrada Guzmán, por todo su cariño, amistad y apoyo moral y económico para que yo pudiera salir adelante con este proyecto.

#### A mis compañeros de clases

A Dra. Carmelita Soria Rodríguez, Dra. Aura Arce Rivas, Dra. Ma. Elena Haro Acosta, Dr. Juan Valente Mérida Palacios, gracias a todos ustedes por sus comentarios en los Seminarios de Investigación, por su apoyo, disfrute de su amistad y compañía.

#### A los padres de los recién nacidos incluidos en este estudio.

Gracias a los padres de los recién nacidos que aceptaron que sus hijos(as) participaran en este proyecto de investigación, también les estoy agradecida a los recién nacidos a los cuales investigue, sin ustedes no hubiera sido posible llevar a cabo esta investigación.

A la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Baja California campus Mexicali, por ser mi casa en donde he tenido el gran privilegio de ser alumna y ser orgullosamente Cimarrona.

# INDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	2
1. El Citomegalovirus	2
1.1 Historia	2
1.2 Taxonomía de los Herpes virus	3
1.3 Características del Citomegalovirus	3
1.3.1 Estructura	3
1.3.2 Expresión génica	5
1.4 Ciclo de replicación del ADN y formación del virión.	6
1.5 Genes de importancia clínica para la replicación del CMV	8
Patogénesis	10
1.6 Vías de transmisión del virus	10
1.7 Tropismo celular del CMV	11
1.8 Activación de respuesta inmune	12
1.9 Evasión del sistema inmune	13
1.9.1 Inmunopresión	13
1.9.2 Mimetismo molecular	14
1.9.3 Respuesta contra el estrés celular	14
1.10 Latencia y reactivación	14
2. Cuadros clínicos	15
2.1 Madres gestantes	15

2.2 El feto	16
2.3 En la infeccion congenita	16
2.4 Infeccion post-natal	18
3. Prevencion y tratamiento	19
4. Tratamiento antiviral	21
5. Epidemiologia	23
6. Diagnosticos	23
7. Crecimiento y desarrollo intrauterino de recién nacidos	26
Caracterizticas del recién nacido pretérmino	27
8. El Síndrome de dificultad respiratoria en recién nacidos	28
8.1 El Test de Silverman y Anderson	29
8.2 Complicaciones en RN con SDR	30
ANTECEDENTES	31
JUSTIFICACIÓN.	34
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	36
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	37
OBJETIVOS.	37
HIPÓTESIS.	37
MATERIAL Y MÉTODO.	38
Diseño del estudio.	38
Selección de la Muestra.	38
Población de estudio.	38
Criterios para la selección de la Muestra.	38
Tamaño de la muestra.	39

Definición de variables.	40
Variable independiente	40
Variable dependiente	40
Covariables	40
PLAN DE ANALISIS	44
Determinaciones de laboratorio.	45
Determinación de IgG-CMV e IgM-CMV.	45
Ensayo de PCR punto final para la detección del ADN del CMV	46
Ensayo de PCR punto final	46
Estandarización de la PCR en tiempo real (PCRtr/ADN-CMV) SYBR Green	48
Identificación de infección por CMV utilizando el ensayo de PCRtr/ADN-CMV SYBR Green	49
Secuenciación del fragmento de 125 pb del gen gB UL55 de la región de la glicoproteína gB	50
ASPECTOS ETICOS, NORMATIVOS Y DE SEGURIDAD	51
RESULTADOS.	52
Antropometría y aspectos biológicos de los RN con SDR.	52
Manifestaciones clínicas más frecuentes en RN con SDR	54
Patologías más frecuentes en RN con SDR	55
Factores de riesgo materno para la severidad del SDR.	56
Serología y severidad del SDR	57
Estandarización del ensayo para detectar el DNA-CMV en RN con SDR.	58
Análisis de los resultados obtenidos en los RN infectados con CMV.	66
Distribución de variables por severidad de SDR y en todos los RN incluidos	

en el estudio.	67
Pruebas de normalidad por variables cuantitativas de RN con SDR severo y no Severo.	70
Comparación de los grupos de RN con SDR severo y SDR no severo.	72
Análisis univariado. Factores de riesgo asociados de SDR severo.	73
Análisis de la Regresión Logística Binaria no condicional	77
DISCUSION.	78
CONCLUSIONES.	84
RECOMENDACIONES.	85
AGRADECIMIENTOS.	85
DIFUSION	86
REFERENCIAS.	87
ANEXOS.	101
Anexo I. Tablas de crecimiento de Lubchenco.	101
Anexo II. Nuevo Ballard.	103
Anexo III. Test de Silverman-Anderson para valorar la función respiratoria del recién nacido.	104
Anexo IV. Hoja de captación de datos.	105
Anexo V. Métodos.	107
Anexo VI. Carta de consentimiento informado	116
Anexo VII Artículo publicado. Citomegalovirus: infección congénita y presentación clínica en recién nacidos con síndrome de dificultad respiratoria	117
Anexo VIII. Constancias de presentación de trabajos en Congresos	118

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura del citomegalovirus .....	4
Figura 2.	El ciclo de la replicación viral .....	8
Figura 3.	Organización del genoma y los marcos de lectura de CMV (cepa Towne) .....	10
Figura 4.	Electroforesis de producto de PCR del gen gB (125).....	59
Figura 5.	Electroforesis de productos de PCR del gen $\beta$ -actina (205).....	60
Figura 6.	Recta patrón obtenida por la PCRtr/ADN-CMV SYBER Green	61
Figura 7.	Curvas de amplificación de la PCRtr/ADN-CMV utilizando control estándar de CMV-ADN control 10e4 y los cebadores gB.....	62
Figura 8.	Curva de disociación (curva melting) específica para el gen gB del CMV, obtenida del CMV-ADN control 10e4.....	62
Figura 9.	Curvas de amplificación de la PCRtr/ADN-CMV SYBER Green de las muestras de RN con SDR .....	63
Figura 10.	Resultado de análisis de disociación de la PCRtr/ADN-CMV SYBER Green de muestras de RN con SDR.....	63
Figura 11.	Fragmentos de la PCRtr/ADN-CMV purificados para la secuenciación	64
Figura 12.	Análisis del BLAST de un amplicon con 100% de identidad al gen gB	66

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Cebadores de PCR del Gen gB/UL55.....	48
Tabla 2.	Clasificación del SDR en los RN.....	54
Tabla 3	Manifestaciones clínicas en los RN con SDR.....	55
Tabla 4.	Patologías más frecuentes en los RN con SDR.....	56
Tabla 5.	Factores de riesgo materno en el grupo de RN con SDR.....	57
Tabla 6.	Serología del CMV (IgG-CMV e IgM-CMV).....	58
Tabla 7.	Muestras secuenciadas de productos purificados con etanol de PCRtr/ADN-CMV SYBER Green de gen gB (125pb).....	65
Tabla 8.	Resultados -17 RN con CMV (+) Manifestaciones clínicas tempranas.	67
Tabla 9.	Distribución por severidad de SDR y SEG.....	68
Tabla 10.	Infección por CMV(+) poredad gestacional y severidad del SDR....	69
Tabla 11.	Frecuencia de variables serológicas, hematológicas y pruebas de función hepática en los RN con SDR.....	69
Tabla 12.	Frecuencia de las alteraciones en exámenes de laboratorio de RN Con SDR –CMV (+) y CMV (-), n 197.....	70
Tabla 13.	Pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov. Variables con distribución normal.....	71
Tabla 14.	Pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov. Variables con distribución normal.....	72
Tabla 15	Asociación de variables con la severidad del SDR. Hematología y Pruebas de función hepática (prueba <i>t</i> ).....	73
Tabla 16	Asociación de variables con la severidad del SDR. Variables biológicas, antropométricas y de laboratorio (Prueba U Mann Whitney).....	74

Tabla 17	Asociación de variables con la severidad del SDR. Patologías (análisis univariado).....	75
Tabla 18.	Asociación de variables con la severidad del SDR. Manifestaciones clínicas (análisis univariado).....	76
Tabla 19.	Asociación de variables con la severidad del SDR. Pruebas de función hepáticas, hematológicas y PCRtr/DNA-CMV SYBER Green (análisis univariado).....	77
Tabla 20.	Asociación de variables maternas con la severidad del SDR.....	78
Tabla 21.	Regresión logística binaria de las variables significativas para la severidad del SDR .....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	ácido desoxirribonucleico
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ARNm	ácido ribonucleico
β	Beta
BD	Bilirrubina directa
BHC	biometría hemática completa
BI	Bilirrubina indirecta
BT	bilirrubina total
BPN	bajo peso al nacer
C	Citosina
CID	Coagulación intravascular diseminada
CMIA	ensayo de inmunoanálisis quimio luminiscente de micropartículas
MHC I	acrónimo del inglés MHC I= Major Histocompatibility Complex I
CMV	citomegalovirus
CMV-F	acrónimo del inglés cmv forward = cmv secuencia hacia adelante
CMV-R	acrónimo del inglés cmv reverse = cmv secuencia hacia atrás
CPAP nasal	acrónimo del inglés, continuous positive airway pressure = presión positiva continua en la vía aérea nasal
CU	ciclo umbral
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP's	desoxirribo nucleótidos trifosfato
E	acrónimo del inglés early = temprano, genes de expresión tempranos
ECN	enterocolitis necrotizante

EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
EHI	Encefalopatía hipóxico-isquémica
EMH	enfermedad de membrana hialina
EUA	Estados Unidos de América
G	Guanina
gB	glicoproteína B
gH	glicoproteína H
HGP/MF No. 31	Hospital de Gineco-Pediatría con Medicina Familiar No. 31
HLA	siglas en inglés, Human leukocyte antigen= antígenos leucocitarios humanos
IC95%	Interval de confianza del 95%
IDT	acrónimo del inglés, integrated DNA technology = tecnología de ADN integrado
IE	acrónimo del inglés, immediate early = gen expresión inmediatamente temprano
IG-CMV	Globulina hiperinmune al CMV
IgG-CMV	inmunoglobulina G anti citomegalovirus
IgM-CMV	inmunoglobulina M anti citomegalovirus
IFN- $\alpha$	interferón alfa
IFN- $\gamma$	interferón gamma
IR	Repetidos internos
IRA	Infección respiratoria alta
IVU	infección de vías urinarias
K/uL	mil milímetros cubico
L	acrónimo del inglés = tardíos, genes de expresión tardíos
LI	limite inferior
LCR	liquido cefalorraquídeo
log	Logaritmo

LS	limite superior
mg/dL	Miligramos decilitro
MgCl <sub>2</sub>	cloruro de magnesio
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mM	Milimolar
MOD	moderado
ng/mL	Nanogramos por mililitro
NK	acrónimo del ingles Natural killer = naturales aseisinias
NOM	Norma Oficial Mexicana
nm	nanómetros
OR <sub>n</sub>	señal normalizada de referencia interna
PAN	peso adecuado para la edad gestacional
pb	pares de bases
PBEG	peso bajo para la edad gestacional
PCA	persistencia del conductoarterioso
pp 150	fosfoproteina 150
pp 53	fosfoproteina 53
pp 65	fosfoproteina 65
PFH	pruebas de función hepática
PCR <sub>tr</sub>	PCR, acrónimo del inglés polymerase chain reaction = reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
qPCR	PCR cuantitativa
R.I.	Rango intercuartil
RCIU	retardo en el crecimiento intrauterino

RM	razón de momios
RN	recién nacido
RPM	ruptura prematura de membranas amnióticas
SAM	síndrome de aspiración de meconio
SDR	síndrome de dificultad respiratoria
SEG	semanas de edad gestacional
SEV	Severo
SFA	sufrimiento fetal agudo
SNC	sistema nervioso central
STDA	sangrado de tubo digestivo alto
T	Timina
TNF- $\alpha$	acrónimo del inglés, tumor necrosis factor= factor tumoral de necrosis alfa
TBE	Tris base, borato y EDTA
TGO	Transaminasa glutámico oxalacética
TGP	Transaminasa glutámico pirúvica
<i>tm</i>	temperatura de fusión (temperatura melting)
RNT	recién nacido de término
RM	razón de momios
RNPT	Recién nacido prematuro
TPP	trabajo de parto pretérmino
RT	Repetidos terminales
RI	Repetidos internos
TTRN	taquipnea transitoria del recién nacido
U	Unidades
U	Uracilo

UA/mL	Unidades artificiales por mililitro
UCIN	unidad de cuidados intensivos neonatales
UI/mL	Unidades internacionales por mililitro
UL	acrónimo del en inglés, unikelong = regiones largas,
URL	unidades reactivas de luz
US	acrónimo del inglés, unique short = regiones cortas
UV	ultravioleta
xg	centrifugación por gravedad por revoluciones por minuto

## RESUMEN

### “Asociación de la severidad del síndrome de dificultad respiratoria con infección por citomegalovirus en recién nacidos”

**Introducción:** El síndrome de dificultad respiratoria (SDR) es una enfermedad común multifactorial que varía del 15 al 50 % en el recién nacido (RN), y la mortalidad es de 50 %. El SDR Puede estar asociado a infecciones bacterianas y virales, una de las más frecuentes: el citomegalovirus (CMV). En el periodo neonatal la incidencia de infección por CMV es de 0.4 a 2.5 % y la seroprevalencia de 50 a 75 %; se desconoce la incidencia de infección en los RN con SDR .**Objetivo:** Asociar la infección por citomegalovirus con mayor severidad del síndrome de dificultad respiratoria en los recién nacidos.

**Métodos:** Estudio transversal, analítico, consecutivo, no probabilístico, con dos grupos comparativos en una muestra de 197 RN a partir de las 25 semanas de gestación con SDR, se clasificaron en dos grupos: RN con SDR severo y RN con SDR no severo. El ADN-CMV fue identificado en plasma por reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (PCRtr). El análisis estadístico incluyó Prueba exacta de Fisher y valor de  $p < 0.05$ , y las variables maternas y neonatales que se asociaron a la severidad del SDR fueron analizadas por regresión logística. **Resultados:** Se obtuvo una frecuencia de RN con SDR de 10.46%, la frecuencia de infección por CMV fue de 8.6 % (IC 95 % 4.7-12.5). No hubo asociación de la infección por CMV con la severidad del SDR. Las variables significativas asociadas a la severidad del SDR en lo RN fueron: neutropenia ( $p = 0.012$ ), trombocitopenia ( $p = 0.021$ ), piel marmórea ( $p = 0.03$ ) y la variable materna significativa fue cervicovaginitis ( $p = 0.05$ ). Al comparar las frecuencias entre los dos grupos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las inmunoglobulinas en los dos grupos ( $p=0.44$ ).**Conclusiones:** Nuestro estudio se reporta por primera vez la frecuencia más alta de infección por CMV en RN con SDR y la asociación de varios factores de riesgo con la severidad del SDR.La serología puede ser útil en la evaluación de recién nacidos con SDR, sin embargo no es una prueba fiable para el diagnóstico de CMV sea más útil para la identificación de CMV por PCR. **Palabras claves:** síndrome de dificultad respiratoria del recién nacido, recién nacido, citomegalovirus, reacción en cadena de la polimerasa.

## ABSTRACT

### **“Association of the severity of respiratory distress syndrome with CMV infection in newborns”**

**Background:** Respiratory distress syndrome (RDS) is a multifactorial and common disease that varies from 15 to 50 % in the newborn, causing 50 % of mortality. The RDS may be associated with bacterial and viral infections, and one of the most common viral agents is the cytomegalovirus (CMV). In the neonatal period the virus incidence goes from 0.4 to 2.5 % with a seroprevalence of 50 to 75 %; the incidence of infection in newborn with RDS is unknown. The objective was to determine the frequency of CMV infection in neonates with RDS and identify the risk factors associated with infection. **Methods:** Methods: Cross-sectional, analytical, consecutive, non-probabilistic studies, with two comparative groups in a sample of 197 RN from 25 weeks of gestation with RDS, Study were classified into two groups: infants with severe RDS and RN with no severe RDS. CMV-DNA was identified in plasma by chain reaction quantitative polimersasa (qPCR). Statistical analysis included Fisher exact test and p value of < 0.05, and maternal and neonatal variables that were associated with the severity of RDS were analyzed by logistic regression. **Results:** RN with a frequency of SDR 10.46% was obtained, the frequency of CMV infection was 8.6% (95% CI 4.7-12.5). There was no association of CMV infection with the severity of RDS. Significant variables associated with the severity of the SDR in the RN were neutropenia (p = 0.012), thrombocytopenia (p = 0.021), marble skin (p = 0.03) and significant variable was cervicovaginitis mother (p = 0.05). No statistically significant differences for immunoglobulins against CMV in the two groups (p = 0.44) were found. **Conclusions:** Our research showed evidence of higher frequency of CMV infection in infants with RDS and the association of various risk factors with the severity of RDS. Serology may be useful in evaluating infants with RDS, however is not a reliable test for the diagnosis of CMV be most useful for identifying CMV PCR.

**Keywords:** Newborn respiratory distress syndrome, newborn infant, cytomegalovirus, polymerase chain reaction.

## INTRODUCCIÓN

El citomegalovirus (**CMV**) pertenece a la familia de los herpesvirus, es uno de los virus con una amplia circulación entre los seres humanos, y a medida que aumenta la edad, la frecuencia de contacto con el virus aumenta (1). El CMV ha sido identificado como un patógeno viral importante en los seres humanos desde hace más de un siglo, durante las últimas décadas, la prevalencia y la importancia de CMV como patógeno humano se hacen más evidentes (2). Con el advenimiento de los enfermos de VIH y los trasplantes renales en población adulta y población pediátrica, al CMV se le da mayor importancia para su investigación respecto a su estructura, mecanismos de infección y replicación (3), demostrando que entre los grupos más susceptibles se encuentran la embarazada, el feto y el recién nacido (**RN**) (4). La infecciones por CMV en estos grupos producen patologías y síndromes en diferentes sistemas y órganos, sobretodo en pacientes inmunocomprometidos (5-7). El CMV, es considerado el virus más común que causa infección congénita, con frecuencia de 0.2 a 2.5% en países desarrollados y hasta 6.1% en países en desarrollo (8, 9).

En el recién nacido (RN) la infección por CMV puede manifestarse, de acuerdo al tropismo del virus, en diversos padecimientos como son: sépticos, neurosensoriales, gastrointestinales, hematológicos, pulmonares, el síndrome de dificultad respiratoria (10-12), que es otra de las patologías neonatales que incrementan considerablemente la morbi-mortalidad, sobre todo si está asociado con infecciones bacterianas o virales y de estos virus el CMV (13, 14). En países europeos, asiáticos y de occidente se ha propuesto tamizados de CMV para identificar infección activa en las embarazadas y diagnosticar infección congénita en el feto o RN (15-17). Los métodos de diagnósticos más utilizados para corroborar infección mediante es cultivo o PCR tiempo real (**PCRtr**). La ventaja de la PCRtr es realizar carga viral, esto permite dar seguimiento al tratamiento antiviral en el RN y valorar la mejoría en este tipo de pacientes al determinar disminución en la replicación viral, y en el caso del RN con síndrome de dificultad

respiratoria (SDR) al disminuir la replicación viral con el tratamiento disminuye la inflamación del tejido pulmonar y por consecuencia la severidad del SDR (15). En el sistema de salud mexicano de los temas prioritarios es la salud materno-infantil e impactar en las infecciones neonatales, en particular, las que incrementan la morbi-mortalidad neonatal. Este estudio está enfocado a asociar la infección por CMV con la severidad del síndrome de dificultad respiratoria.

## **MARCO TEÓRICO**

### **1. El Citomegalovirus**

#### **1.1. Historia**

El CMV es identificado como un patógeno viral con distribución amplia en la población mundial, fue aislado por primera vez en ratones por la Dra. Margaret Smith, y en 1904 patólogos alemanes describieron la presencia de inclusiones intracelulares prominentes en vísceras de un paciente con sífilis en las parótidas de un niño (18). En 1952 estas células se demostraron en el sedimento urinario de niños graves antes de fallecer, pero el virus humano en sí no fue aislado sino hasta 1957 por Craiget, Macauley y Weller (18). El CMV infecta múltiples tipos de células humanas, incluyendo las células epiteliales de las glándulas salivales, de ahí el nombre original: virus de la glándula salival. En 1960, el Dr. Weller designa el virus como CMV basado en la aparición de células infectadas por virus etiquetadas como citomegálicas (19). El aislamiento del CMV humano fue publicado en forma concurrente por Smith, Weller y Rowe. Ante la generosidad de un caballero, ganador de un premio Nobel, el Dr. Weller cedió a la doctora Smith el mérito de la prioridad en el descubrimiento (19). La infección perinatal por CMV es común en los países en vías de desarrollo e infecta alrededor del 1% de todos los recién nacidos en el mundo, y es la causa más común de pérdida auditiva neurosensorial no hereditaria. (9, 20). Este patógeno es causa de morbilidad significativa en pacientes inmunocomprometidos, incluyendo coriorretinitis, neumonía, colitis y la neuropatía (2).

## **1.2 Taxonomía de los Herpesvirus**

Los Herpesvirus se agrupan en tres subfamilias: 1) Alfaherpesvirinae, la cual incluye dos géneros, los Simplexvirus como los virus Herpes Simple 1 (VHS-1) y Herpes Simple 2 (VHS-2), y los Varicelovirus como el virus de la Varicela Zoster (WZ); 2) Betaherpesvirinae, subfamilia que incluye dos géneros, los Citomegalovirus denominado también virus del Herpes humano 5 (VHH5), y los Roseolovirus como los virus del Herpes humano 6 (VHH6) y Herpes humano 7 (VHH7) y por último los 3) Gamaherpesvirinae, con dos géneros representativos, los Linfocriptovirus como el virus Epstein Barr (VEB) y los Radinivirus como los virus del Herpes humano 8 (VHH8) y Herpesvirus Saimiri (21, 22).

## **1.3 Características del Citomegalovirus**

Su replicación es lenta en cultivos celulares. El CMV es específico para cada especie de tejido y células diferenciadas son susceptibles a ser infectadas, tienen un ciclo replicativo largo; producen infecciones persistentes en células, con reactivaciones asociadas a alteraciones en la respuesta inmune del paciente (21, 23). El virus puede permanecer latente en células específicas, provocando cuadros clínicos parecidos o con manifestaciones clínicas diferentes (21, 23).

### **1.3.1 Estructura**

Es un virus de ácido desoxirribonucleico (ADN) que pertenece a la familia de los Herpesvirus y a la subfamilia  $\beta$  Herpesviridae (24).

El genoma es lineal de doble cadena de aproximado de 235 kb, con 165 genes el Herpesvirus más grande y el virus patógeno humano conocido de mayor tamaño (2, 24). La estructura del genoma comprende dos segmentos separados por dos regiones repetidas largas (UL, acrónimo para el inglés de unique long) y dos regiones cortas (US, acrónimo para el inglés de unique short) ya totalmente secuenciadas. Repetidos terminales (RT) y repetidos internos (RI) con secuencias únicas UL, US (2, 23).

Core o nucleoproteína: Es el conjunto de genes y proteínas íntimamente asociadas, estas proteínas tienen actividad enzimática y/o cumplen una función estabilizadora para el plegamiento del ácido nucleico y armado de la partícula viral. El genoma codifica aproximadamente para 200 proteínas (23).

Cápside viral: Capa viral que está formada por un gran número de subunidades polipeptídicas que se ensamblan adoptando una simetría de forma icosaédrica, tiene 162 capsómeros hexagonales (10, 22).

Nucleocápside: Lo forma el núcleo central rodeado por la cápside viral, mide 64 nm.

Tegumento: Es una estructura amorfa que está entre la nucleocápside y la membrana del virus, constituida por 27 fosfoproteínas estructurales y moduladoras de la respuesta inmune, codificadas por el virus (22).

Membrana o envoltorio viral: Es una membrana fosfolipídica compuesta aproximadamente de 30 a 40 proteínas virales y del hospedero, además con varias glicoproteínas (2), estos lípidos y glicoproteínas se encuentran en forma de espículas de una longitud de 8 nm, la cual se deriva de la célula infectada. Varias

proteínas de la membrana son inmunogénicas, un ejemplo es la pp65 (10, 21, 22).

En la figura 1 (25) muestra la estructura del CMV donde se representa las proteínas virales integrales de membrana que atraviesan la bicapa de lípidos. Las glicoproteínas virales tienen diversas funciones biológicas como: 1)

Absorción a la célula huésped, 2) Fusión que permite la entrada de la nucleocápside viral al citoplasma, 3) En la gemación, que permite la salida del virus envuelto a partir de la célula infectada (10). Además las glicoproteínas son el

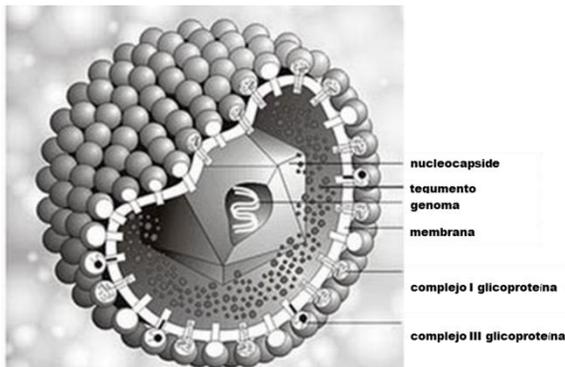


Figura 1. Estructura del citomegalovirus. Fuente: Reschke M. The Big Picture Book of Virus – Herpesvirus (25).

blanco de reacción para el sistema inmune tanto en la respuesta humoral como la respuesta celular (2,10, 21, 22).

### **1.3.2 Expresión génica**

En estudios de autopsia de pacientes infectados por CMV se ha demostrado la presencia del virus o antígenos de virus en macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, epiteliales y endoteliales (2, 22). El CMV entra a la célula por endocitosis o fusión, el virus vierte el ADN y nucleocápside al citoplasma y se desencadenan una serie de eventos moleculares para su replicación. El ADN y otros componentes del virus son transportados por los microtúbulos citoplasmáticos al núcleo, lugar donde se lleva a cabo la transcripción y replicación. Inmediatamente después de la infección, ocurre la replicación viral que tiene una duración de 72 a 96 horas y con una tasa de replicación que varía según el número de copias presentes del virus, el tipo de cepa viral y el estado inmunológico del paciente, después de la entrada del virus al organismo la expresión de los genes se da en tres fases (22, 23, 26):

**Fase 1. Genes de tegumento:** Los genes de tegumento o de expresión inmediatamente temprana (IE, acrónimo para el inglés de immediaty-early) se expresan entre una a tres horas después de la entrada del virus y permanecen de manera prolongada en la infección latente. Esta fase se caracteriza por la producción de proteínas reguladoras de la infección así como productoras de alteraciones en el ciclo celular (22), Las proteínas reguladoras son enzimas que regulan y estimulan su propia síntesis y en algunos herpesvirus la síntesis de estas proteínas son inducidas por las proteínas del tegumento. En el núcleo, el ADN viral se transcribe a ácido ribonucleico mensajero temprano (ARNm) que son transportados al citoplasma para la traducción de proteínas tempranas. Estas proteínas tempranas vuelven a introducirse en el núcleo y participan en la replicación del ADN del virus ya que son ADN polimerasas y timidinacinasas (2, 22). Otros ejemplos de proteínas sintetizadas en esta fase son Proteína Alfa-TIF

(factor alfa de la traducción), Proteína Alfa y ARN polimerasa (27), algunas proteínas producidas en esta fase altera la síntesis de interferón y la presentación del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I, acrónimo para el inglés de Major Histocompatibility Complex I), en la superficie celular (28).

**Fase 2. Genes de activación temprana:** Los genes de expresión temprana (E, acrónimo para el inglés de early) que se expresan entre las 3 a 8 horas posteriores a la infección y son necesarios para activar el metabolismo celular y conducirlo a la replicación del ADN y proteínas involucradas como es la ADN polimerasa (2, 22). Algunos ejemplos de proteínas sintetizadas en esta fase son: Proteínas  $\beta$ , Taq polimerasa y Timidina cinasas (27).

**Fase 3. Genes de activación tardía:** Los genes de expresión tardíos (L, acrónimo para el inglés de late) se expresan entre las 8 a 24 horas posteriores a la infección. Estos genes constituyen la mayoría del genoma viral y codifican principalmente para proteínas estructurales utilizadas en la formación de nucleocápsides y envolturas, que sirven para el ensamblado del virus y que son transcritas en abundancia sólo después de la replicación viral. Algunos ejemplos de proteínas sintetizadas en esta fase son asambolina (UL80), proteína menor de la cápside (UL85), pp65 (UL83) y glicoproteína gB (UL55) (2, 22, 26, 27).

#### **1.4 Ciclo de replicación del ADN y formación del virión**

El CMV penetra a la célula huésped por fusión de la envoltura viral con la membrana celular o vía fagocitosis mediada por receptores e inicia el ciclo de replicación.. La cápside y el tegumento son liberadas en el citoplasma de la célula. La cápside es transportada hasta el núcleo, donde el genoma es liberado y circularizado Las proteínas del tegumento regulan las respuestas de la célula hospedera e inician la cascada de expresión de los genes de expresión inmediata temprana (IE), después los tempranos (DE) y por último los genes tardíos (L). La expresión de genes tardíos inicia el ensamble de la cápside en el núcleo, seguidos de la salida nuclear hacia el citoplasma. La cápside se asocia con las proteínas del

tegumento en el citosol y es transportada al complejo de ensamblaje viral que contiene los componentes del RE, aparato de Golgi y la maquinaria endosomal. Las cápsidas adquieren la envoltura del tegumento y la viral por gemación dentro de vesículas intracelulares en el complejo de ensamblaje. Entonces la partícula envuelta es liberada de la célula (10, 22, 26). En la figura 2 (29) se muestra el ciclo de la replicación viral.

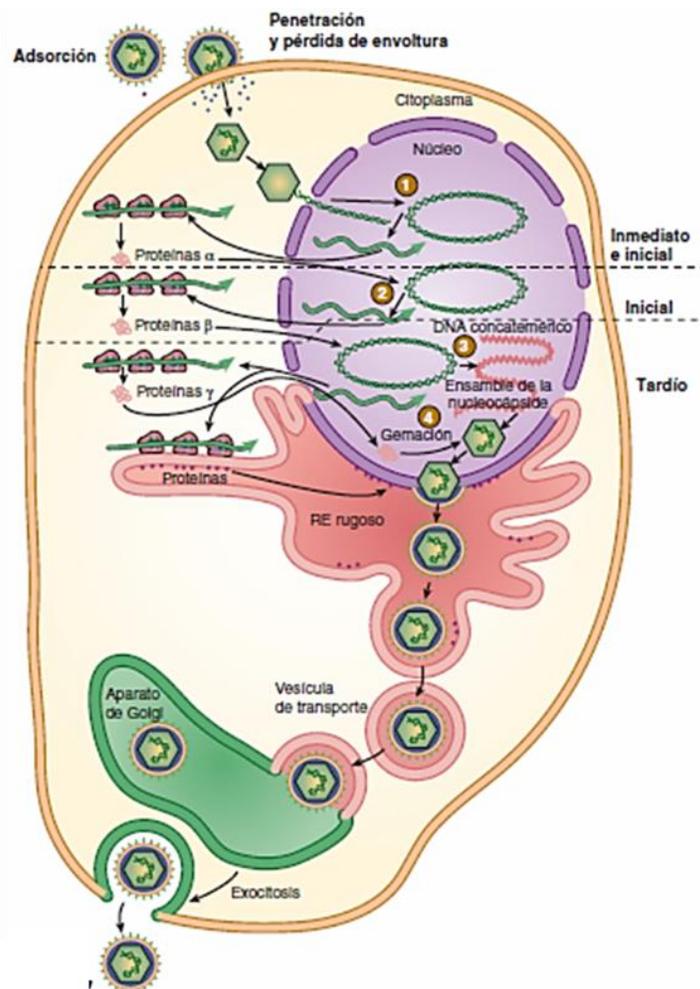


Figura 2. El ciclo de la replicación viral. Fuente: Ruiz V. 11-0607 y Méndez N. 11-0463. Ainigriv Zuir, 23 de junio 2013 (29).

### **1.5 Genes de importancia clínica para la replicación del CMV**

Algunos de los genes que participan en la replicación del CMV y que se han utilizado como blanco para el diagnóstico molecular son los siguientes: el gen UL54 que codifica para una ADN polimerasa, el gen UL97 que codifica para una proteína kinasa (30, 31, 32), el gen UL83 que codifica para la fosfoproteína 65 (pp65), la cual se detecta en los leucocitos infectados (22), así como los genes US17, UL123 y UL55.

El gen UL55 codifica para la glicoproteína B (gB), el componente multifuncional de envoltura predominante del CMV (33). Es una de las glicoproteínas más estudiada por ser altamente inmunogénica en humanos y provocar respuestas linfoproliferativas y citolíticas específicas (33, 34). En los individuos infectados, la glicoproteína gB estimula la producción de anticuerpos neutralizantes que inhiben la adhesión del virus a la membrana celular y bloquea la fusión, entre otras funciones (2) y pueden proteger al feto de desarrollar patologías graves ante subsecuentes re-infecciones maternas (10). La capacidad de CMV para entrar en una amplia variedad de tipos de células requiere de la interacción coordinada con varias glicoproteínas de la envoltura codificadas por el virus el cual cuenta con múltiples receptores de superficie celular (23, 35). Ésta proteína actúa en el ciclo de replicación del virus y en la propagación del virus de célula a célula. La gB es la proteína más conservada a lo largo de la familia de los herpesvirus, lo que sugiere que desempeña un papel importante en el ciclo vital de estos virus demostrando que es un gen esencial para la replicación del virus (2, 22, 35), En la figura 3 se muestra la organización genómica CMV de la cepa Towne (30).

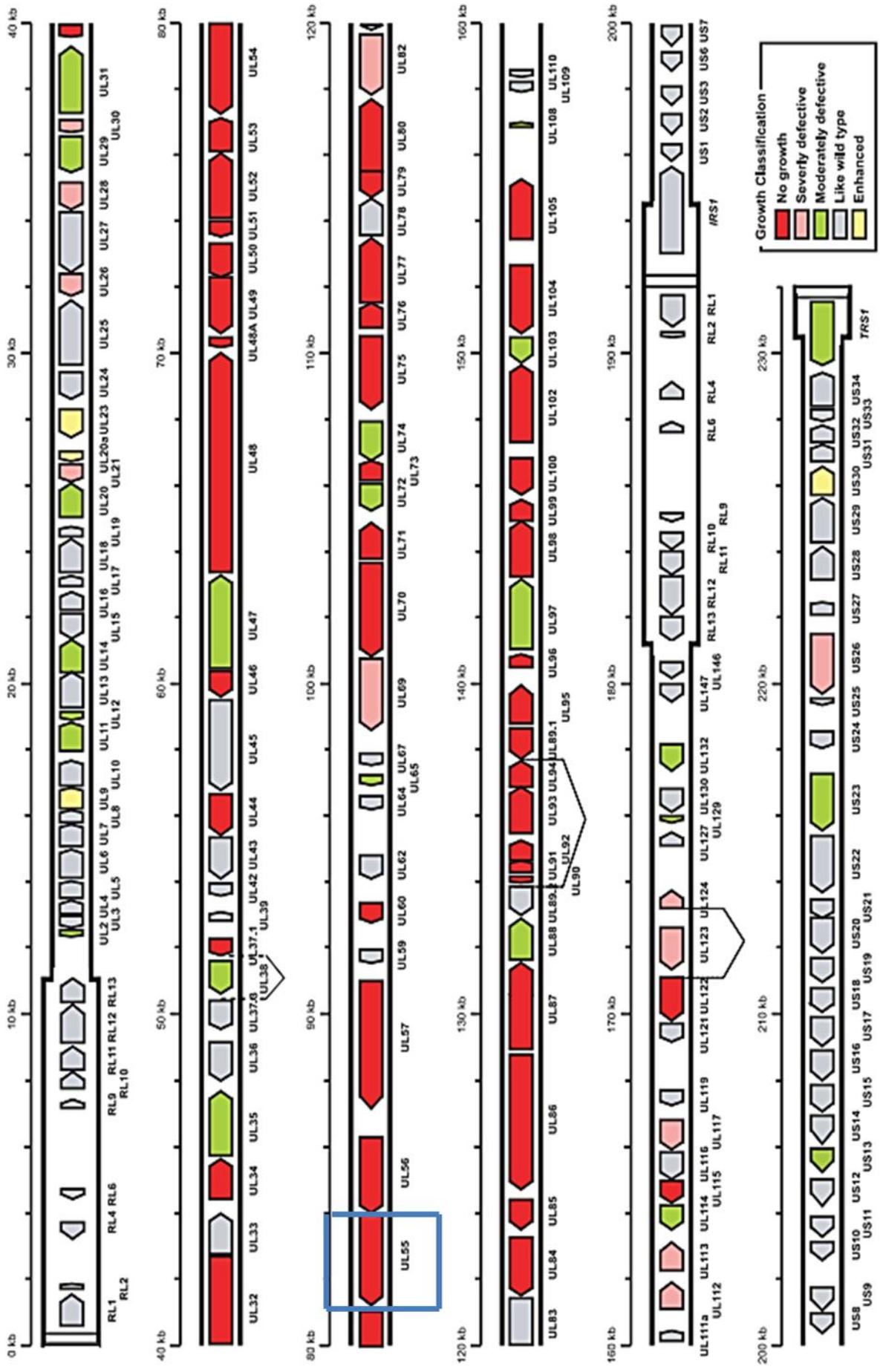


Figura 3. Organización del genoma y los marcos de lectura de CMV (cepa Towne). En base a la secuenciación genómica principal de la secuencia viral clonada en un cromosoma artificial bacteriano. Semejante al genoma HCMV AD169, el genoma Towne se compone de una región Única Larga y una región Única Corta, flanqueado por regiones invertidas de repetición (Repeticiones Largas y Repeticiones Cortas). Repetidos Largos y Repetidos Cortos se muestran en un formato más grueso que las regiones Únicas Largas y Únicas Cortas. Cada uno de los marcos de lectura (RL1-RL13, UL2-UL147, IRS1, US1-US34 y TRS1) es un código de colores de acuerdo las propiedades de crecimiento de sus correspondientes mutantes de delección de genes de virus en cultivos de fibroblastos humanos de prepujios (30).

## Patogénesis

**1.6 Vías de transmisión del virus.** El CMV se disemina por contacto interpersonal a través de besos, saliva, transfusión de sangre, secreciones genitales, orina, lágrimas o leche materna, trasplante de órganos, pero la forma principal de adquisición del CMV es por la vía sexual. Los datos disponibles sobre la transmisión del virus de la madre al feto se basan en diversas hipótesis, una de ellas es que el CMV es transmitido por medio de leucocitos infectados que pasan de la madre al feto, a través de la placenta. Los virus pueden replicarse en citotrofblastos placentarios y sincitiotrofblastos y entrar a la circulación fetal vía vena umbilical. Otra de las hipótesis es que el virus infectaría primero a los tejidos placentarios y después a las células amnióticas, que podrían ser ingeridas por el feto después de lo cual el virus se replicaría en la orofaringe mismo que es tragado y aspirado por el feto, e invadiría la circulación fetal para alcanzar los órganos diana (6, 36, 37).

En la infección primaria en madres gestantes, el CMV es transmitido por leucocitos infectados que pasan a las células endoteliales microvasculares para posteriormente infectar a los citotrofblastos y sincitiotrofblastos de las vellosidades de anclaje en placenta, que invaden las arteriolas maternas y que forman híbridos de células maternas y fetales. Los citotrofblastos y sincitiotrofblastos infectados pueden transmitir la infección a los tejidos subyacentes del corión vellosa, incluidos los fibroblastos y células endoteliales fetales, células amnióticas y entonces diseminarse al feto (38), esto induce inmunosupresión local en útero que causa una reactivación del virus latente en los macrófagos de la pared uterina, con una transmisión de CMV a los citotrofblastos placentarios y sincitiotrofblastos invasores. Se desconocen como el CMV daña al feto (39). Se cree que el CMV infecta al feto por propagación de la sangre y las células retículo endoteliales infectadas y causarle una vasculitis obliterante y lesiones inflamatorias en tejidos periféricos (40). La susceptibilidad del feto a la

infección por CMV es secundaria bajo varias condiciones como son: el tipo de cepa del virus, la edad y periodo gestacional del feto, el estado nutricional y el grado de inmadurez del sistema inmune (41). Se conoce poco de la inmunidad fetal, algunos fetos presentan afecciones severas, que incluyen hepatitis, depresión de la médula ósea, pero poco o ningún daño en el sistema nervioso central (**SNC**), mientras que otros fetos presentan daño esencialmente en el SNC (41). Estas células pueden continuar replicándose de manera que permite la colonización del tracto gastrointestinal, masa encefálica, pulmón, riñón, hígado, bazo y sangre, la infección por CMV genera diversas manifestaciones según los órganos afectados y el proceso inflamatorio desencadenado, originando diferentes cuadros patológicos (6, 36, 37). Posteriormente, el virus se puede diseminar de una manera retrógrada a las vellosidades de anclaje en placenta y subsecuentemente al feto (38). La patología del SNC en niños con infección congénita es variable e incluye déficit de migración, calcificaciones, déficit en la celularidad, áreas de cerebritis local e hipoplasia cerebelar, en general, la enfermedad del SNC permanece estática en el período post natal con la excepción del sistema auditivo (41).

### **1.7 Tropismo celular del CMV.**

El tropismo tisular de un virus se refiere a la afinidad que ese virus tiene a un tejido específico del huésped. El CMV puede infectar una gran cantidad de órganos y tipos celulares. La replicación del CMV en los diferentes tipos de células es variable (10, 26). Esta replicación inicia desde que se adhiere el CMV a la célula y tiene tropismo por casi todas las células del organismo, su presencia ha sido detectada en células epiteliales, endoteliales, de músculo liso y células del mesénquimas, en hepatocitos, fibroblastos dérmicos, granulocitos, monocitos y macrófagos. Así también puede identificarse en epitelio de casi todos los órganos y en células residentes del sistema nervioso central como son astrocitos, neuronas, oligodendrocitos, células del linaje monocito-macrófago y el endotelio de los capilares (10).

**1.8 Activación de respuesta inmune:** En la respuesta inmune innata los elementos más importantes en el control de la replicación viral son: la producción de interferón, la activación de células presentadoras de antígenos y células naturales asesinas (NK, acrónimo para el inglés de Natural Killer) (23, 33). Las células NK tienen un rol importante en el control precoz de las infecciones virales, la unión del CMV a la célula y el paso del virus a su interior inician la producción de factor 3 regulador de interferón que activa la producción de interferón y citocinas inflamatorias. La respuesta de la inmunidad innata celular se induce por la activación de los receptores toll like tipo 2 (TLR2), que reconoce las proteínas gB y gH, importantes en la adhesión y penetración celular del virus, posteriormente se liberan anticuerpos que neutralizan a estas y otras proteínas virales (pp150, pp65) (23, 33) aunque ninguno de ellos, ni aislada ni conjuntamente, consiguen eliminar el virus del organismo, donde permanece en estado de infección persistente o latente. La respuesta adaptativa protectora se encuentra mediada por los linfocitos T y los anticuerpos juegan un papel secundario importante en la protección del paciente. El recuento de linfocitos T CD8 (Linfocitos T citolíticos) se ha relacionado con la capacidad de evitar una infección letal por CMV. La respuesta inmune primaria es fundamentalmente de IgM y en las reactivaciones, de IgG (33). Las infecciones primarias del CMV ocurren en los primeros años de la vida, pueden permanecer en un estado de latencia con posteriores reactivaciones y en algunas ocasiones, reinfecciones. En la infección materna primaria, la respuesta inmune celular antiviral comienza con la transmisión del virus al feto, mientras que en la recurrencia viral la transmisión hacia el feto ocurre en presencia de la respuesta inmune celular y humoral. Como resultado de lo anterior, la viremia ocurre con mayor frecuencia en los casos con infección primaria (38), la respuesta inmune innata puede que prevenga parcialmente la transmisión vertical. Aproximadamente del 10 al 15 % de las mujeres que tienen una infección primaria en el primer trimestre de la gestación abortan espontáneamente ya que el CMV actúa en la diferenciación de las células

de la placenta, mostrando infección placentaria pero no fetal, o por malformaciones fetales incompatibles con la vida. Subsecuentemente, en el curso del embarazo la infección placentaria se asocia a infección fetal (38).

**1.9 Evasión del sistema inmune** El CMV es un patógeno ubicuo importante en individuos inmunosuprimidos y/o inmunológicamente inmaduros. La respuesta en la relación huésped-virus depende del estado del sistema inmune, el cual contribuye a través de varios mecanismos efectores al control viral. Ante una primoinfección, aun los individuos inmunocompetentes son incapaces de erradicar al virus debido al establecimiento de un estado de persistencia viral que es resultado del desarrollo de múltiples estrategias de evasión al sistema inmune, entre las que se incluyen el ocultamiento viral, el efecto de inmunosupresión y el mimetismo molecular, entre otros (23, 33)

1.9.1 Inmunosupresión. El CMV es capaz de inducir un estado de inmunodepresión generalizada en el paciente y favorece el progreso de la infección del propio virus y de otros patógenos. Esta inmunosupresión está relacionada al menos en parte, al bloqueo por parte del virus de la actividad de citocinas como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) y de distintas quimiocinas. Por otro lado, el CMV interfiere en la presentación de antígeno a células CD4+ y CD8+ bloqueando el transporte de moléculas de antígenos leucocitarios humanos HLA I y II (HLA, acrónimo para el inglés de Human leukocyte antigen) a la membrana celular y disminuye la expresión de dichas moléculas y origina una reducción de los mecanismos de reconocimiento de las células NK (22). En modelo murino y primates se han mostrado mecanismos antiapoptóticos virales que disminuyen apoptosis por vía Fas-ligand mediado por linfocitos T citolítico y NK (42, 43). Estos mecanismos incluyen la inhibición de la activación de las enzimas caspasas por medio de las proteínas IE-1 e IE-2, el bloqueo de receptor para el factor de necrosis tumoral y la inactivación de la proteína pp53. (42, 43).

1.9.2 Mimetismo molecular. El genoma del CMV tiene la capacidad de incorporar genes que son homólogos o mimetizan la función de genes celulares. Algunos de estos genes eliminan la respuesta del individuo, como son los genes que codifican para las proteínas vICA (vICA, acrónimo para el inglés de viral inhibitor of caspase-8 apoptosis) y anti-apoptóticas vMIA (vMIA, acrónimo para el inglés de viral mitochondria-localized inhibitor of apoptosis) (10) vMIA es el homólogo de la proteína anti-apoptótica celular de la familia Bcl-2, y regula negativamente proteínas pro-apoptóticas de mitocondria, Bax y Bak. La expresión de la proteína viral US28, receptor homólogo de quimiocinas promueve la migración de músculo liso, responsable de la aceleración de la enfermedad vascular, la arterioesclerosis y la enfermedad crónica de injerto contra el hospedero (42,43).

1.9.3 Respuesta contra el estrés celular. Las catecolaminas, hormonas del estrés y las prostaglandinas, incrementan las concentraciones de Adenosín monofosfato cíclico (AMPC) que también dispara el proceso de replicación viral, de esta manera, la inflamación, el estrés y la infección pueden reactivar infecciones latentes, el significado clínico de esta reactivación dependerá del estado inmune del individuo (44, 45).

## **1.10 Latencia y reactivación**

**Latencia.** En su forma latente, el genoma del CMV permanece en una molécula circular cerrada o lineal y expresa un número pequeño de genes virales. En el periodo de latencia no hay progenies virales, pero en la infección crónica si hay producción de virus (22, 23). Las potentes funciones inmunomoduladores del virus permiten su escape del sistema inmune y facilitan la latencia en las células por meses o años en sitios anatómicos específicos del paciente infectado y evita su eliminación por el sistema inmune utilizando tejidos inmunológicamente privilegiados para su estado de latencia y replicación (33, 44, 45). Entre éstas se incluyen las células epiteliales de las glándulas salivales, que expresan un número

insuficiente de moléculas del MHC I, necesarias para el proceso de eliminación de las células infectadas por los linfocitos CD8+ (10). El CMV puede permanecer latente en una células y replicándose en otras, provocando enfermedad lítica viral (22, 23).

**Reactivación.** No se conoce el mecanismo exacto de la reactivación y puede ser una respuesta diferente entre un virus a otro (22, 23). En pacientes enfermos y sobre todo inmunocomprometidos puede aparecer la reactivación del CMV y han sido propuestos varios mecanismos responsables, tales como: 1). Estrés, a través de catecolaminas usando el sistema del AMPc; 2). Inflamación, a través del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , acrónimo para el inglés de tumor necrosis factor) que se une a su receptor celular en las células infectadas por el virus latente y activa la proteína quinasa C y el factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) o prostaglandinas por la vía del AMPc, que se liga a proteínas activadoras del ciclo viral, iniciándose la síntesis de proteínas virales; y 3) drogas, a través de la elevación del AMPc (10, 23, 45).

## **2. Cuadros clínicos**

### **2.1 Madres gestantes.**

En las embarazadas se puede manifestar la infección hasta en un 10 a 30% de los casos, puede aparecer como un cuadro gripal o como un cuadro de mononucleosis clásica en caso de estar inmunocomprometidas o no cursar con síntomas (46). El cuadro gripal se presenta como debilidad, odinofagia, tos, escalofríos, mialgias, otalgias y náuseas, además se reporta parálisis de Bell, fiebre prolongada (22), polihidramnios, oligodramnios y el adelgazamiento o aumentado del grosor de la placenta; alteración de las pruebas de función hepática, trombocitopenia y linfocitosis (47). La embarazada infectada puede transmitir el virus al feto vía transplacentaria, al RN por vía vaginal y en el periodo postnatal con leche materna y/o secreciones corporales (20, 37, 38, 41). En las mujeres embarazadas con infección por CMV primaria comprobada, mediante

ultrasonido fetal, se puede encontrar anomalías causadas por infección congénita (47).

## **2.2 El feto.**

Fisiopatología fetal. Ante la transmisión placentaria la infección congénita puede ser adquirida en el útero luego de una primoinfección o una reactivación viral (40, 48); en el feto se ha descrito la falta de ganancia de peso, desnutrición in útero o malformaciones congénitas, al infectarse el feto con CMV ocurre una alteración multisistémica; las células infectadas producen un antígeno específico del CMV, posteriormente se desarrolla una respuesta inflamatoria generalizada que provoca infiltrado intersticial, depósito de complejos inmunes, e infiltrado celular mononuclear; cuando se asocia a una infección placentaria se puede desarrollar inflamación masiva pudiendo llegar hasta una necrosis placentaria con calcificación (49).

Estas alteraciones placentarias pueden provocar en el feto una alteración dinámica de los líquidos y electrolitos corporales, diferentes grados de disminución de acumulación de tejido: grasa, muscular, óseo, conectivo y masa cerebral, resultando en disminución de peso, talla e incluso perímetro cefálico (49).

Por ultrasonido fetal se pueden encontrar anomalías ecocardiográficas, incluyen en su orden de importancia: intestino hiperecogénico, ventriculomegalia, retraso en el crecimiento intrauterino, hidronefrosis, hidropesía fetal, hepatomegalia, atrofia cortical y calcificaciones intracraneanas; si la embarazada presenta alguno de estos hallazgos ecocardiográficos, se debe de investigar en forma intencionada infección por CMV (47).

## **2.3 En la infección congénita**

La definición de infección congénita es sinónimo de transmisión del CMV intrauterina o transplacentaria que infecta al feto provocando trastornos en sus órganos, confirmada la infección con cultivo viral o con la presencia de CMV-DNA. Por otro lado, si el RN presenta patología ligada al SDR, sobre todo el prematuro y

de bajo peso, su respuesta inmune estará alterada y ocurrirán modificaciones en el desarrollo pulmonar, incluyendo la síntesis de surfactante (49, 50).

Los efectos de la infección aguda por CMV adquirida durante el embarazo son más graves cuanto más tempranamente ocurre el contagio, además, la infección congénita por CMV puede ser causa de desnutrición grave y aumentar la morbilidad y mortalidad en este tipo de pacientes, mostrándose defectos congénitos evidentes hasta en un 20%.

En el RN prematuro infectado por CMV se ha reportado neumonitis, neumonía intersticial y enfermedad pulmonar quística (51). La neumonía y/o neumonitis por CMV puede ocasionar falla respiratoria con progresión rápida y complicarse con hipertensión pulmonar y shock séptico (52-55). La existencia de reportes de casos clínicos de RN con SDR por neumonitis viral causada por CMV nos orienta a pensar que otras etiologías del SDR pueden estar asociadas y que la severidad del SDR pudiera estar asociada con esta infección. Las manifestaciones clínicas más frecuentes en los RN sintomáticos son: ictericia, hepatoesplenomegalia, petequias, trombocitopenia, elevación de transaminasas y bilirrubinas en sangre y microcefalia. Hallazgos por imagenología (ultrasonido, tomografía o por resonancia magnética) son: atrofia, hidrocefalia, paquigiria, lisencefalea, calcificaciones intracraneales, hipoplasia o ausencia de cuerpo calloso. Hallazgos oftalmológicos son: cataratas, opacidad corneal, hemorragia retiniana y cicatrices retinianas, otras alteraciones incluyen hernia inguinal, neumonitis e hipertensión pulmonar (56), en RN prematuros y RN de término se reportan enfermedades agudas como son: encefalitis, hepatitis, enteritis, enterocolitis, retinitis, esplenomegalia, linfadenopatía y meningitis aséptica (6, 36, 37, 56).

Enfermedades crónicas y secuelas. El desarrollo de secuelas en estos pacientes es debido a la no detección de la infección por CMV en sus primeros meses de vida, respuesta inadecuada al tratamiento o por reinfecciones. (57, 58)

Se han reportado daños neurológicos como parálisis cerebral infantil, retardo en desarrollo psicomotor y pérdida de la audición uni o bilateral en recién nacidos asintomático (14, 59-61). La neumonía por CMV en recién nacidos de término y pretérmino se ha asociado con *Pneumocystis Carinii* y al VIH cuando estos pacientes están inmunocomprometidos (62, 63); otros reportes han relacionado la infección por CMV en infantes no inmunocompetentes con neumopatía, manifestada por tos persistente y falta de crecimiento, hepatoesplenomegalia, colitis y cuadros de fiebre prolongada, ceguera y convulsiones (9, 62, 63).

#### **2.4 Infección postnatal.**

Esta infección es transmitida por la leche materna, por aspiración de secreciones vaginales en el momento del parto o por otras secreciones corporales maternas. El RN prematuro y/o de bajo peso tiene menor cantidad de anticuerpos transferidos y pueden presentar una infección sintomática (20). Las infecciones postnatales suelen ser asintomáticas o se pueden manifestar como neumonitis, enteritis, hepatitis, neutropenia, trombocitopenia o apariencia séptica, hepatoesplenomegalia o colitis. En RN prematuros, puede manifestarse enfermedad séptica, acompañada de apnea y bradicardia. La neumonitis se puede manifestar afebril, con incremento de las secreciones orofaríngeas y pulmonares, taquipnea, tos que en ocasiones es paroxística, incremento progresivo de las necesidades de oxígeno. En la radiografía de tórax se aprecia atrapamiento de aire, infiltrados parahiliares y grados variables de atelectasia (20, 58) y cuadros parecidos a la displasia broncopulmonar en grados avanzados. La hepatitis suele ser asintomática y se manifiesta como hepatomegalia o hepatoesplenomegalia, ictericia leve con aumento de transaminasas. Puede evolucionar a cuadro grave con afección multisistémica, hipertensión portal y progresión a cirrosis. La enteritis se manifiesta con distensión y dolor abdominal, vómito y diarrea acuosa, en casos

graves aparece sangrado gastrointestinal. En prematuros, la perforación ileal y la estenosis colónica son complicaciones menos comunes (20).

### **3. Prevención y tratamiento**

#### **Vacunas**

El Dr. Pass (64) y su equipo de trabajo evaluaron una vacuna experimental hecha de glicoproteína B de CMV. La vacuna incluye un adyuvante experimental, MF59 para mejorar la respuesta del sistema inmune, esta vacuna fue suministrada por Sanofi Pasteur (Lyon, Francia), en mujeres sanas seronegativas a CMV, de 14 a 40 años y presentaron 42% menos propensas a infectarse por CMV durante el embarazo. Aunque la vacuna está en sus últimas fases de experimentación, este resultado es un paso importante en el camino hacia el objetivo final, una vacuna que prevenga la infección congénita por CMV en los RN (64).

En madres gestantes. Es difícil tener un plan para eliminar todos los riesgos de infectarse por el CMV, sin embargo, existen recomendaciones para disminuir la transmisión del CMV de persona a persona, entre estas tenemos:

- a) Lavarse las manos, especialmente después de cambiar pañales.
- b) No besar a los niños menores de 6 años de edad en la boca ni en las mejillas y
- c) c) no compartir con ellos la comida, las bebidas o los utensilios (cucharas o tenedores).
- d) La embarazada que trabaja con niños en escuelas y guarderías debe ser informada sobre el riesgo de contraer la infección por CMV y se disminuye el riesgo trabajando con niños de más de 2 a 3 años de edad (22).
- e) Las prevenciones realizadas en medios hospitalarios son: contar con programas informativos y preventivos sobre la infección congénita en salud materna y reproductiva. La búsqueda de anticuerpos anti-CMV en las gestantes y proporcionar las recomendaciones en las embarazadas que son seronegativas (2).

- f) La prevención en preparaciones de globulina hiperinmune al CMV (IG-CMV) y vacunas, aunque su utilidad no ha sido completamente demostrada (9).

En el feto y el RN se deben dirigir los esfuerzos en la prevención materna, esto ayuda a disminuir el riesgo de transmisión del CMV al feto; durante el embarazo no se recomienda el tratamiento con antivirales por su actividad frente al CMV, con reportes de efectos teratógenos en animales. Desde algunos años, en estudios de investigación, se ha evaluado la eficacia profiláctica de la IG-CMV en mujeres con infección primaria demostrada durante el embarazo y se ha confirmado la reducción de la transmisión de infección por CMV de la madre al feto hasta en un 40%, además de revertir alteraciones ecográficas fetales comprobadas y no causó efectos adversos significativos (9). En otras investigaciones, se reportan casos de administración de ganciclovir en las embarazadas con concentraciones adecuadas en líquido amniótico y sangre fetal y no se han observado efectos teratógenos fetales. En otros casos, el feto, en el que se ha demostrado infección, se han centrado en la prevención de la aparición de los síntomas administrando a la madre gestante valganciclovir, pero los estudios son poco significativos (9).

La prevención en los RN se realiza a través de la búsqueda de datos clínicos de infección por CMV, incluyendo desnutrición, alteraciones neuromotoras y sensoriales, ictericia, hepatoesplenomegalia, prematurez, restricción en el crecimiento intrauterino, microcefalia, trombocitopenia, neutropenia, linfocitosis, alteración en las enzimas hepáticas, problemas renales y pulmonares entre otras (2).

#### 4. Tratamiento antiviral

Actualmente hay cuatro drogas antivirales para el tratamiento de infecciones por CMV: ganciclovir (GCV), valganciclovir (VGCV), foscarnet (FOS), y cidofovir (CDV), análogos de nucleósidos.

El uso de antivirales (AV) está dirigido a reducir la viremia y prevenir morbilidades o controlar la enfermedad. Los AV aprobados para el tratamiento de la infección por CMV en RN, debido a su toxicidad, solo se utilizan cuando hay gran riesgo de mortalidad y de invalidez. En madres gestantes se ha aplicado 200U/kg de IG-CMV dosis única con el supuesto que la IG-CMV tiene efectos inmunomoduladores y reduce la carga viral materna, disminuye la inflamación placentaria y mejoraría la nutrición y la oxigenación fetal. Además, las embarazadas se han tratado con ganciclovir y valganciclovir en estudios de investigación (9).

**Ganciclovir.** Indicado en neonatos menores de un mes con CMV congénito sintomáticos con afectación del SNC (microcefalia, alteraciones en la neuroimagen, PCR-CMV positivo en líquido cefalorraquídeo), alteraciones del citoquímico del LCR, coriorretinitis o sordera neurosensorial. En neonato menor de un mes con enfermedad órgano específica como: neumonitis, trombocitopenia significativa, hepatitis, hepatomegalia, esplenomegalia o colitis, si existe afectación multisistémica o riesgo vital (9, 20). Es importante considerar el tratamiento antiviral en: neonatos sin afectación del SN cuando son mono sintomáticos o con afectación leve. Las recomendaciones es que todos los neonatos con infección congénita y afectación del SNC reciban tratamiento con ganciclovir para prevenir el desarrollo de hipoacusia y de alteraciones en el lenguaje y el aprendizaje. El ganciclovir es un análogo de nucleósido, que compite con el sustrato desoxiguanosina para la Taq polimerasa e inhibe la replicación viral, se elimina por los riñones. Efectos adversos de este medicamento son: supresión de la médula ósea, neutropenia, trombocitopenia, sangrados, náuseas, diarreas, fiebre, erupción, aumento de las enzimas hepáticas, nefrotoxicidad y cambios del estado

mental (9, 23), posibilidad de carcinogenicidad y la toxicidad reproductiva, estas últimas son la razones por la que no se han aprobado agentes antivirales para tratar la infección congénita en el feto (9, 22). Baquero y col. refiere que las únicas contraindicaciones del tratamiento serían los niños con sordera bilateral profunda, insuficiencia renal (creatinina plasmática superior a 1,5mg/dl) o afectación estructural grave en la neuroimagen, especialmente hidranencefalia. El tratamiento con ganciclovir incrementa rápidamente las plaquetas y mejora la hepatitis colestásica y la coriorretinitis (9). El tratamiento indicado es de 12 mg/kg/día intravenoso, dividido en dos dosis por 6 semanas.

**Valganciclovir.** El valganciclovir es un profármaco de ganciclovir con biodisponibilidad alrededor del 60%. Es un análogo de nucleósido, cuando se procesa por el intestino e hígado da origen al ganciclovir y tiene una biodisponibilidad diez veces mayor que el ganciclovir oral (23). Tiene las mismas indicaciones y efectos secundarios que el ganciclovir, su administración puede prolongarse hasta por 6 meses en lactantes sintomáticos, diagnosticados retrospectivamente con hipoacusia progresiva y en lactantes asintomáticos con hipoacusia en evolución (9, 20, 65). Se considera tratamiento antiviral con valganciclovir oral en pacientes que en el seguimiento manifiestan algún grado de hipoacusia o incluso en los neonatos asintomáticos con cargas virales muy elevadas. Es una alternativa en el tratamiento ambulatorio por problemas derivados de un acceso intravenoso prolongado. La administración de valganciclovir en neonatos se ha tolerado bien y ha conseguido inhibir la replicación viral de forma prolongada, incluso en prematuros de muy bajo peso. (9, 20, 65) El tratamiento indicado es de 32 mg/kg/día dividido en dos dosis por vía oral.

**Foscarnet.** Es un inhibidor no nucleósido de la polimerasa viral. Se tiene muy poca experiencia con este antiviral para el tratamiento de la infección congénita por CMV. Presenta importante nefrotoxicidad, pero se ha utilizado en aquellos casos de toxicidad repetida al ganciclovir (20).

**La IG-CMV.** El tratamiento con esta hiperinmunoglobulina está en fase experimental. Se ha utilizado asociada a ganciclovir en neonatos sintomáticos y trombocitopenia, con buena tolerancia y normalización precoz de alteraciones de pruebas de laboratorio (20).

**En la infección postnatal** se utiliza el tratamiento con ganciclovir por lo menos 6 semanas a 12 mg/kg/día, intravenoso, dividido en 2 dosis. Se puede continuar con valganciclovir con un máximo de 6 meses (20, 65).

Lactantes entre uno y 6 meses sintomáticos con afectación del SNC diagnosticados retrospectivamente y en lactantes menores de 6 meses sin hipoacusia o con hipoacusia leve a moderada para intentar preservar la función auditiva (20, 65).

## **5. Epidemiología**

A nivel mundial, la seroprevalencia del CMV entre las madres gestantes en los rangos de edad reproductiva y periodo perinatal es de 35 a 45% en los países desarrollados y 84 a 100% en los países en desarrollo (2, 8). En Latinoamérica la seroprevalencia es variable, se reporta en Brasil una frecuencia del 40%, en Chile del 60%, en Costa Rica 95%, en Venezuela 93.3%. En México, la seroprevalencia en mujeres embarazadas va de 90 a 97% (66, 67).

La prevalencia mundial de la infección congénita por CMV en RN está dentro de los rangos de 0.2-6.1% (8, 68), en México se reporta prevalencias del 0.68 al 0.89% (69, 70), la infección congénita por CMV en RN prematuros es de 1.8% a 2.3% (57, 71, 72).

## **6. Diagnóstico**

La infección por CMV puede demostrarse a través de la detección de anticuerpos específicos, de la comprobación de la presencia viral (cultivos) o de algunas de sus partes, entre las que se incluyen proteínas virales y el ADN viral (22). La infección por CMV congénito se puede sospechar ante títulos altos de IgG-CMV e IgM-CMV, se confirma mediante la detección del virus en la orina,

sangre o saliva dentro de las 3 primeras semanas de la vida, ya sea por cultivo o por reacción de cadena de la polimerasa (2, 22).

**6.1 Cultivo.** El cultivo sirve para aislar al CMV, es el estándar de oro para hacer el diagnóstico de infección. El virus se puede cultivar a partir de diferentes muestras como saliva, orina, sangre y tejidos. Es técnicamente complejo y tardío en la obtención de los resultados, aunque es totalmente específico. El método de cultivo habitual se realiza con fibroblastos humanos de los que existen varias líneas celulares comerciales, siendo las más utilizadas la MRC-5 y WI-38. (22). El efecto citopático consiste en hinchamiento celular y desprendimiento celular progresivo del soporte (22). La positividad del cultivo se determina por la detección del efecto citopático del CMV sobre la línea celular, que consiste en la aparición de focos de células grandes y redondeadas que se inician en el centro de la monocapa y se extienden hacia la periferia. Este efecto es apreciable habitualmente a partir del décimo día de incubación aunque se aconseja mantener el cultivo al menos durante 3 semanas para obtener la máxima sensibilidad (22).

## **6.2 Serología (IgG e IgM).**

La seropositividad para IgG-CMV en los RN nos da información de los anticuerpos maternos ya que esta inmunoglobulina atraviesa la barrera placentaria. Títulos altos de IgG-CMV son sugestivos de una infección intrauterina. En los RN es difícil encontrar anticuerpos positivos para IgM-CMV debido a que durante los primeros meses de vida se presenta una pobre respuesta inmunológica, por lo anterior la infección por CMV en el neonato se confirma con otros estudios como es la PCR en muestras de plasmas de RN (72). Cuando se trata de una infección por CMV intrauterina, se pueden observar títulos altos de IgG-CMV en las primeras 3 semanas de vida. En caso de infecciones postnatales, los títulos se producirán en las siguientes semanas de vida. Los ensayos serológicos son ampliamente utilizados para detectar los anticuerpos IgG-CMV e IgM-CMV. La presencia de IgM-CMV orienta a sospechar de infección por CMV en el RN, sin

embargo, esta inmunoglobulina puede ser negativa al nacimiento del neonato. Los RN con infección por CMV poseen una respuesta inmunológica deficiente debido a que tienen un nivel bajo de linfocitos precursores y la IgM-CMV puede aparecer semanas o meses después, para este momento el neonato puede tener lesiones graves de múltiples órganos o haber muerto (73, 74).

Para los análisis serológicos de IgG-CMV e IgM-CMV se ha utilizado ensayo de inmunoanálisis quimioluminiscente de macropartículas (CMIA) de dos pasos para la determinación cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos IgG-CMV e IgM-CMV en suero y plasma humano. La presencia o ausencia de anticuerpos IgG-CMV e IgM-CMV en la muestra se determina al comparar la señal quimioluminiscente de la reacción con la señal del punto de corte, determinada en una calibración previa. Si la señal en la muestra es superior o igual a la señal del punto de corte, la muestra se considera positiva para IgG-CMV e IgM-CMV. Las muestras con valores de concentración menores al punto de corte se consideran negativas (66).

Los kits comerciales de ELISA disponibles para las determinaciones de IgG o IgM anti-CMV utilizan, como substrato antigénico de la reacción, extractos de células infectadas que contienen 50-100 proteínas (estructurales y no estructurales) o bien partículas víricas purificadas mediante gradiente (30-55 proteínas estructurales). El inconveniente de estas técnicas es que se pueden tener entre un 2% y un 10%, de falsos positivos; los nuevos kits de ELISA con proteínas recombinantes o péptidos sintéticos resuelven estos problemas de especificidad. En estos ensayos se utiliza la fosfoproteína pp150 (aminoácidos 555-701). En otros kits se han combinado varios péptidos de las proteínas pp150, la gB y la fosfoproteína pp28 y se ha obtenido un método ELISA de gran especificidad y sensibilidad (98,9%) (75).

### **6.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa de punto final (PCR).**

Esta prueba se basa en la amplificación de regiones específicas del genoma del virus, el ensayo de PCR punto final utiliza un sistema cualitativo de amplificación. Los oligonucleótidos que han sido utilizados para la identificación del virus, están dirigidos a diferentes regiones del genoma que codifican para productos tempranos y tardíos como es la gB (76).

### **Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCRtr).**

El método de PCRtr permite cuantificar el número de copias virales en una muestra dada en individuos infectados, esta técnica permite que moléculas del fragmento blanco se amplifiquen y se detecten al mismo tiempo que se generan (durante la fase exponencial de la amplificación), utilizando moléculas fluorescentes cuya emisión es proporcional al número de moléculas producidas, lo que permite hacer la prueba de forma cuantitativa y producir aproximadamente en 30 ciclos 1,000.000 copias, mientras que para PCR cualitativa la reacción se detiene hasta que todos los reactivos necesarios para la amplificación se han utilizado (77). Ambas pruebas se utilizan para el diagnóstico de infección por CMV, además de ser utilizadas para el monitoreo del tratamiento antiviral, evaluando la eficacia de los medicamentos en individuos con infección activa.

## **7. Crecimiento y desarrollo intrauterino normal del neonato**

En el patrón de crecimiento intrauterino normal existen tres estadios: Estado I (hiperplasia). Es el período de las 4-19 semanas de gestación, se caracteriza por rápida mitosis e incremento del contenido de ADN. Estado II (hiperplasia e hipertrofia). Es el periodo de las 20-28 semanas de gestación, se caracteriza por una declinación en la mitosis y un incremento en el tamaño de la célula. Estado III (hipertrofia). Periodo de las 29-40 semanas. En este periodo se caracteriza por un incremento rápido en el tamaño de la célula con un pico de velocidad de 33 semanas de gestación, en el cual se observa un crecimiento

corporal notable. El organismo presenta rápida acumulación de grasa, músculo, hueso, tejido conectivo, se duplica el peso de la masa cerebral y existe una buena arborización alveolo-pulmonar (78, 79). El prematuro, en sus primeros meses de vida extrauterina, desarrolla un acelerado crecimiento; sin embargo, el rendimiento de este factor de crecimiento depende en gran parte de las condiciones de crecimiento in útero, del compromiso de la causa asociada a la prematurez y de las características del medio familiar (78, 79).

### **7.1 El recién nacido prematuro (RNPT)**

Un recién nacido prematuro es aquel que nace antes de completar la semana 37 de gestación, siendo la gestación una variable fisiológica fijada en 280 días, más menos 15 días. La definición de pretérmino no implica valoración de madurez del RN, como lo hace la definición de prematuro, aunque en la práctica ambos términos se usan indistintamente (80).

### **7.2 Características del Recién nacido pretérmino (RNPT)**

Este tipo de pacientes presentan inmadurez en sus diferentes sistemas y órganos. El RNPT entre menor edad gestacional al momento de nacer, presenta menor reserva energética e inmadurez de funciones, entre estas: las pulmonares, intestinales, cerebrales y del sistema inmunológico. En el RNPT se aumenta el riesgo de enfermedad de membrana hialina (EMH), hemorragia intraventricular, enterocolitis necrotizante (ECN) e infecciones. Ante un alto riesgo de enfermedad, estos pacientes requieren de especial atención (79). El diagnóstico de RNPT se realiza con la exploración neuromotora del nuevo Ballard (81). La prematurez y el RCIU se asocian con aumento en la morbi-mortalidad neonatal, que puede incrementar entre menor peso y edad gestacional del neonato (82).

### **7.3 Infecciones en el RNPT de bajo peso al nacer (BPN)**

El crecimiento del RNPT con antecedentes de enfermedades asociadas presenta diferencias con relación al RN de término (RNT) y sano.

Una de las manifestaciones más frecuentes es el BPN y las causas de esta patología son múltiples, entre ellas se considera las infecciones perinatales. La incidencia de infección oscila de 1 por 1000 en RNT, de 4 entre 1000 en RNPT, En los RN con BPN, la incidencia aumenta notablemente a 300 por cada 1000 (80). De los gérmenes que producen BPN tenemos los agrupados en el síndrome de TORCH y son: toxoplasma, rubeola, herpes virus, varicela zoster, sífilis, treponema, hepatitis B, hepatitis C, Virus de la inmunodeficiencia humana, Parvovirus B19, malaria, tuberculosis y el CMV (83). La infección intrauterina por CMV en RNPT con PBA, puede dar lugar a enfermedades graves y con incremento en la morbi-mortalidad (84).

### **8. El síndrome de dificultad respiratoria (SDR) en RN**

El síndrome de dificultad respiratoria es una enfermedad caracterizada por inmadurez del desarrollo anatómico y fisiológico pulmonar del recién nacido prematuro, cuyo principal componente es la deficiencia cuantitativa de surfactante que causa desarrollo progresivo de atelectasia pulmonar difusa e inadecuado intercambio gaseoso, se manifiesta con dificultad respiratoria progresiva, que puede llevar a la muerte si no recibe tratamiento adecuado (85).

El SDR constituye una de las patologías más frecuentes en RN. Se presenta tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo, con una frecuencia varía del 15 al 50%, la morbilidad y mortalidad es variable y se ha relacionado con la heterogeneidad del tratamiento y el nivel hospitalario de atención (85).

### **8.1 El Test de Silverman y Anderson.**

En neonatología, el Test de Silverman y Anderson es un examen que valora la función respiratoria del neonato al nacer, basado en cinco criterios. Cada parámetro es cuantificable y la suma total se interpreta en función de dificultad respiratoria, en el Test de Silverman y Anderson, la puntuación más baja tiene el mejor pronóstico que la puntuación más elevada (86).

Los criterios evaluados en el Test de Silverman y Anderson están compuestos por movimientos toraco-abdominales evaluados como: movimientos rítmicos y regulares 0 puntos, tórax inmóvil y abdomen en movimiento 1 punto, y tórax y abdomen suben y bajan con discordancia 2 puntos; el tiraje intercostal: es decir, hundimiento de los espacios intercostales se evalúa por: no se aprecia tiraje 0 puntos, tiraje discreto 1 punto, tiraje acentuado y constante 2 puntos; retracción xifoidea: no se aprecia retracción 0 punto, retracción discreta 1 punto, acentuada y constante 2 puntos; aleteo nasal: no se aprecia aleteo 0 puntos, discreto aleteo 1 punto, y aleteo acentuado y constante 2 puntos; quejido espiratorio a la auscultación: no se aprecia quejido 0 puntos, quejido leve 1 punto, quejido acentuado y constante 2 puntos (86). La sumatoria de los puntos obtenidos durante la evaluación se interpreta de la siguiente manera: 1) 1 a 3 puntos: RN con SDR leve. 2) 4 a 6 puntos: RN con SDR moderado. 3) 7 a 10 puntos: RN con SDR severo (86).

En un RN con puntaje de 7 a 10 requerirá de una asistencia ventilatoria con respirador artificial, el puntaje de 4 a 6 el neonato podría requerir de ventilación con presión positiva continua con sistema de cpap nasal y el puntaje de 1 a 3 por lo regular requieren asistencia ventilatoria con casco cefálico o sin oxígeno, esta valoración con el test de Silverman Anderson debe realizarse al RN al momento del nacimiento según lo estipulado por la Norma Oficial Mexicana NOM) (87).

## **8.2 Complicaciones de RN con SDR**

Las complicaciones del SDR son múltiples y las más frecuente son: cardiovasculares, respiratorias, digestivas, neurológicas y sensoriales.

Cardiovasculares. Cuando están asociadas a patologías cardiovasculares como hipertensión pulmonar persistente (HPP), persistencia del conducto arterioso (PCA), hemorragia pulmonar, insuficiencia cardiaca, malformaciones cardiovasculares, como son la comunicación interventricular, comunicación interauricular y transposición de los grandes vasos (88).

Respiratorias. Este síndrome puede estar asociado a patologías como EMH, taquipnea transitoria del RN (TTRN), enfisema pulmonar intersticial, neumotórax, neumomediastino, atelectasia pulmonar, neumonías y neumonitis por infecciones de origen bacteriano y viral (89), estas últimas principalmente de adquisición en forma congénita (90). De los agentes virales que pueden asociarse más frecuentemente a neumonías y SDR están los del grupo herpes, entre ellos el CMV, presentándose como un cuadro de SDR moderada a grave, que puede progresar a la muerte, este virus es la causa más común de infección congénita en EUA y Europa (88).

Digestivas. Dentro de las complicaciones digestivas esta la distensión abdominal, ENC, íleo y sangrado de tubo digestivo alto.

Neurológicas y sensoriales. Retinopatía del prematuro, hemorragia intracraneanas, hemorragia intraventricular, isquemias cerebrales e hidrocefalia posthemorrágicas (91,92).

### Otras

-Trastornos hematológicos

Coagulación intravascular diseminada, anemia, petequias, trombocitopenia.

-Trastornos metabólicos e hidroelectrolíticos

Desequilibrio hidroelectrolítico, hipocalcemia, hipoglicemia, acidosis respiratoria, metabólica o mixta, hiperbilirrubinemia, entre otras (91, 92).

## ANTECEDENTES

El recién nacido (RN) se ha considerado como paciente de alto riesgo por la presencia de diversas patologías graves que presentan al nacer, como el SDR, prematuridad, infecciones virales y por hongos, malformaciones cardiopulmonares y EMH, que son las causas más frecuentes de ingreso a las unidades de cuidados intensivos neonatales. El (SDR) registra una incidencia del 5 a 20% en RNT y RNPT y un 60% en RN inmaduros (93). En el HGP/MF No. 31 donde se realizó la investigación, el SDR tiene una incidencia anual de 10.46 % de todos los nacimientos. El SDR presenta tres grados de dificultad respiratoria según la valoración de Silverman Anderson: leve, moderada y severa (86).

Las patologías asociadas a la infección por CMV y los efectos en los RN varían de acuerdo a factores como: la etapa de gestación en que ocurre la infección; si es una infección reciente por CMV adquirida durante el embarazo de la madre; o una reactivación en la misma, así, como el estado nutricional y la edad gestacional del neonato. De tal manera que el acceso a un diagnóstico oportuno de la infección por CMV es un elemento determinante para contribuir que las complicaciones patológicas asociadas a la enfermedad por CMV se vean reducidas por un tratamiento oportuno. Por otro lado, se ha observado que cuando la enfermedad es grave y la intervención es tardía los pacientes hospitalizados llegan a requerir tiempos prolongados en las unidades de cuidados intensivos neonatales provocando complicaciones y posiblemente la muerte (72, 94-97).

En Estados Unidos de América (EUA) se ha reportado hasta un 70% de la infección por CMV en la población general, del 30 al 40% son infecciones primarias maternas que pueden ser las formas más graves de infección en el feto, sobre todo si se adquiere en los primeros trimestres del embarazo (37), la infección intrauterina materna recurrente del 25% y la reinfección en el curso del embarazo se presenta en un 2% (98), alrededor del 38% de los prematuros tienen riesgo de adquirir infección primaria.

En África, Asia y América del Sur la seroprevalencia del CMV en mujeres embarazadas es del 90 a 100%, con una incidencia de infección en los RN que va del 0.2 al 6.1% (8,9); sin embargo, en China se ha reportado incidencias de infección por CMV en niños más alta (10 hasta 60%) durante los primeros seis meses de vida (52).

La existencia de reportes de casos clínicos de RN con SDR por neumonitis viral causada por CMV sugiere que la severidad de la dificultad respiratoria puede estar relacionada con CMV, por lo que es necesario evaluar la asociación de la infección por CMV con el SDR y la severidad del SDR (53, 54).

Como antecedentes directos de este trabajo, en el Hospital de Gineco-Pediatria con Medicina Familiar No. 31 (HGP/MF No. 31) se registran un promedio de 4,500 nacimientos al año, el 10.4% de los RN ingresan en los servicios de cuidados neonatales y la patología principal es SDR con una proporción del 80%. Por las condiciones propias de inmadurez que aumentan la morbilidad y mortalidad ha sido difícil determinar si el neonato con SDR tiene exclusivamente patología cardiopulmonar relacionada con su inmadurez, EMH, TTRN, síndrome de adaptación pulmonar (SAP) y cardiopatía congénita, o si cursa con infección congénita de tipo viral y sobre todo si la etiología de la misma pudiera estar asociada a CMV.

Las alteraciones que pueden generarse como consecuencia de la infección congénita por CMV resultan en una serie de secuelas progresivas que pueden ser tratadas si la infección se detecta a tiempo, por lo que es evidente que se requiere de un método diagnóstico adecuado de la infección congénita por CMV para que las consecuencias sean mínimas al intervenir precozmente. En este sentido, el desarrollo de técnicas moleculares de amplificación de ADN viral por PCRtr han permitido, a diferencia de las pruebas serológicas, la detección del CMV en diferentes tipos de muestras con una mayor especificidad y sensibilidad.

En plasma habitualmente se detecta el ADN viral de muestras obtenidas por venopunción, considerada la PCRtr hasta el momento con excelentes resultados

para diagnóstico de infección por CMV. En México, la prueba de PCRtr no es accesible a cualquier hospital público, de hecho la prueba está disponible en centros de investigación que tienen la línea de trasplantes de órganos, también se realizan en algunos hospitales universitarios y en laboratorios particulares pero con costos de hasta más de \$6,500.00 pesos M.N. (datos no publicados).

En particular, en los neonatos, este método está disponible en países desarrollados como EUA e Italia, realizándose en RN que presenta detención en el crecimiento o datos de neumonitis/neumonía (54, 63).

En México se han realizado dos estudios en RN con infección congénita por CMV, identificándose en cultivo de saliva y en papel filtro, las incidencias obtenidas han sido bajas de 0.89% y 0.68% respectivamente (69, 70), éstos resultados son parecidos a los reportado por otros países como son Israel, EUA y España (9, 15, 17).

En el HGP/MF No.31 IMSS, Mexicali se realizó un estudio acerca de infección por CMV asociado a bajo peso en recién nacidos prematuros, realizándose PCR de punto final en muestras de orina y serología IgG-CMV e IgM-CMV en 114 RN prematuros, ninguna muestra de orina fue positiva a la PCR, 4 muestras fueron positivas para IgM-CMV (99) y 27 muestras positivas para IgG-CMV (datos no publicados).

Sin embargo, no se cuenta con estudios donde se analice la frecuencia de SDR en relación a la infección por CMV, que nos brinde un panorama actual de dicha patología, considerada un problema de salud pública mundial por el impacto económico a los sistemas de salud ante las estancias hospitalarias prolongadas, las complicaciones y secuelas presentes en los pacientes, entre ellas, las discapacidades neurosensoriales y motoras (9, 17).

## JUSTIFICACIÓN

Una de las principales causas de demanda de atención en las unidades intensivas neonatales a nivel mundial es la prematurez y le sigue las patologías que originan SDR como es sepsis y neumonía/neumonitis intrauterina entre otras. La importancia y relevancia de las infecciones virales en el RN radica en las consecuencias clínicas a corto, mediano y largo plazo que pueden poner en peligro la vida del neonato o condicionarle discapacidad, así también el elevado costo de atención hospitalaria y en la atención en consulta externa.

Se considera trascendental, la repercusión de la infección por CMV en el RN, ya que propicia otras patologías además de la infecciosa, como son: sordera, RCIU, neumonías, neumonitis, hepatitis, colestasis hepática o alteraciones del neurodesarrollo, que comprometen la calidad de vida del niño.

El riesgo para mayor morbilidad y mortalidad que presenta el RN con infección por CMV y SDR y se incrementa cuando existe prematurez y bajo peso al nacer. Debido a que las manifestaciones clínicas tempranas por esta infección varían de acuerdo a la edad gestacional, es difícil fundamentar el diagnóstico sólo por observación clínica, las complicaciones más serias se han observado en el RN con SDR severo hospitalizado por infección sea bacteriana y/o viral y más en el RNPT con desnutrición debido a su pobre respuesta inmunológica en comparación del neonato de término.

Existen reportes de casos clínicos de RN con SDR por neumonitis viral por infección por CMV, sin embargo no se ha evaluado la asociación de la severidad del SDR con la infección por CMV por lo que se justifica estudiar esta relación. Las detecciones de infecciones virales en RN se han hecho una vez que hay manifestaciones clínicas evidentes, algunos estudios han documentado que cerca de 20% de niños con pérdida de la audición son secundarias a una infección silente por CMV (9, 20).

A nivel mundial (15-17) se ha evaluado la necesidad de programas de detección temprana de infecciones por CMV por las repercusiones de la enfermedad, sin embargo se tienen algunas limitantes en los métodos de diagnóstico para el RN.

En México se tienen pocos reportes (69, 70, 76) de infección por CMV en RN, con escasa información acerca de su frecuencia y la repercusión en el estado de salud de estos neonatos con SDR al nacer. Debido a que las manifestaciones clínicas tempranas del RN varían de acuerdo a la edad gestacional, es difícil fundamentar el diagnóstico sólo por observación clínica.

Por otro lado, las complicaciones más serias se observan en el neonato con SDR al nacer y que requiere hospitalización, sobre todo si el RNPT tiene además algún grado de desnutrición lo que favorece una pobre respuesta inmunológica en comparación al neonato de término (78, 100, 101).

Aunque se identifican algunos síntomas y signos frecuentemente relacionados con infección por CMV, otras patologías pueden manifestarse con sintomatología similar lo cual dificulta el diagnóstico específico. Entre los signos de infección se encuentran: desnutrición, decremento progresivo del peso o detención del mismo, hepatitis, hepatomegalia, colestasis hepática, esplenomegalia, ictericia, petequias, ceguera, sordera, hidrocefalia, anemia, trombocitopenia, hidropesía fetal y neumonitis, entre otras. Actualmente en el HGP/MF No. 31 IMSS, se cuenta con protocolos establecidos para el diagnóstico y manejo del SDR en el neonato, pero no para la infección por CMV.

Si se logra hacer un diagnóstico temprano de infección por CMV, al contar con metodología para la identificación de la infección congénita por CMV con PCRtr, sería de enorme beneficio para estos RN lo cual facilitaría a los médicos tratantes el establecer un mecanismo de detección oportuna y confiable de infección por CMV en los RN nacidos con SDR, y ofrecer el tratamiento específico para una enfermedad que es tratable y evitar discapacidades que pueden generar graves problemas de salud pública y con ello disminuir los costos en los sectores

sanitarios. El tratamiento debe iniciarse tan pronto como se tenga el diagnóstico y que se haya realizado la evaluación clínica del paciente y se determine si requiere tratamiento antiviral.

En el HGP/MF No. 31 donde se realizó el presente estudio cuenta con ganciclovir intravenoso que es uno de los antivirales más comúnmente usados en RN graves infectados con CMV y también se cuenta con valganciclovir para neonatos que reciben vía oral, las dosis de los antivirales están ampliamente recomendadas por la literatura internacional (9, 102, 103).

Además de generar a mediano y largo plazo información sobre el impacto clínico que la infección congénita por CMV tiene de las enfermedades en etapa neonatal, con esta información serviría para desarrollar medidas de prevención y estrategias de manejo.

Por lo anterior, se realizó la investigación de la infección de CMV en RN con SDR atendidos en el HGP/MF No. 31, Mexicali B.C.

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

En México se han reportados dos estudios de la infección por CMV en RN, sin enfoque en la población de RN con SDR, utilizando la prueba de cultivo y PCR de punto final en muestras de tarjetas de tamiz.

La prueba de PCRtr para determinar la infección por CMV en RN con SDR no está disponible en hospitales públicos de Baja California. Por lo que es necesario implementar la utilización de esta técnica para realizar el diagnóstico y tratamiento de ésta infección en el neonato.

Este estudio sobre la infección de CMV en RN con SDR nos brinda un panorama actual de dicha patología, la cual actualmente es considerada un problema de salud pública mundial.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existe asociación de la infección por CMV con la severidad del síndrome de dificultad respiratoria en los recién nacidos?

### **OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL.**

Determinar la asociación de la infección por CMV con la severidad del SDR en los RN.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinar la frecuencia de RN con SDR que nacen en el HGP/MF No. 31 IMSS.
2. Determinar la frecuencia de infección por CMV diagnosticada mediante detección del ADN viral en RN con SDR.
3. Determinar la asociación de la infección por CMV con la severidad del SDR en los RN.
4. Determinar la asociación de variables clínicas y de laboratorio del RN y de la madre con la severidad del SDR.

### **HIPÓTESIS**

#### **HIPÓTESIS NULA**

No existe asociación entre la presencia de la infección por CMV con la severidad del SDR en RN.

## HIPÓTESIS ALTERNA

Existe asociación entre la infección por CMV con la severidad del SDR en RN.

## MATERIAL Y MÉTODO

### **Diseño del estudio**

Se realizó un estudio transversal, consecutivo, no probabilístico, analítico, con dos grupos comparativos.

### **Selección de la muestra**

Recién nacidos a partir de las 25 semanas de edad gestacional que nacieron en el HGP/MF No. 31 IMSS con SDR, durante el periodo de agosto del 2010 hasta febrero del 2012. Se consultó el registro de RN total y con SDR nacidos en el hospital durante el periodo de estudio.

### **Población de estudio**

De un universo de 7437 RN, se obtuvo una población de 778 neonatos que nacieron con SDR, de la cual se obtuvo una muestra de 197 RN, captados en un periodo de 19 meses.

### **Criterios para la selección de la Muestra.**

#### **Criterios de Inclusión.**

- RN con edad gestacional igual o mayor de 25 semanas con SDR que nacieron y fueron atendidos en el HGP/MF No. 31 IMSS.
- Edad igual o menor a 3 semanas de vida extrauterina.
- Con carta de consentimiento informado para menores de edad firmada por los padres del paciente o solo por la madre en caso de ser madre soltera.

#### **Criterios de exclusión.**

- RN atendidos pero no nacidos en el HGP/MF No. 31.
- Consentimiento informado no autorizado.

**Criterios de eliminación.**

- RN que fallecieron antes de la toma de muestra de sangre.
- Información incompleta de historial clínico de RN y mamás.
- Muestras insuficientes.

**Tamaño de la muestra:**

El tamaño de la muestra se calculó con el algoritmo para muestreo no probabilístico, obteniendo un resultado de 167 pacientes, al cual se agregó 30 pacientes más, para prevenir las pérdidas a través del desarrollo de la investigación, quedando un total de 197 pacientes, (ver fórmula).

Algoritmo para muestreo no probabilístico

$$n = \frac{N * Z_{1-a}^2 * p * q}{d^2 * (N-1) + Z_{1-a}^2 * p * q}$$

$$d^2 * (N-1) + Z_{1-a}^2 * p * q$$

Parámetros empleados	
N= Tamaño de la población del sector salud	N= 4500
p= proporción del evento	0.2
q= 1-p (complemento de p para ser 1)	0.8
d= precisión (grado de precisión sobre el resultado)	0.05
a= nivel de significancia	5% valor convencional
1-a = nivel de confianza	95% valor convencional
Z 1-a = Valor tipificado	1.64 tablas
n= Tamaño de muestra	167

Desarrollo del algoritmo para muestreo no probabilístico:

$$\frac{4500 * 1.64^2 * 0.2 * 0.8}{0.05^2 * (4500-1) + 1.64^2 * 0.2 * 0.8} =$$

$$\frac{4500 * 2.69 * 0.16}{0.0025 (4499) + 2.69 * 0.16} =$$

$$\frac{4500 * 0.43}{11.24 + 0.43} =$$

$$\frac{1936}{11.67} = 167$$

## **Definición de variables**

**Variable independiente:** Infección por citomegalovirus en RN con SDR.

### **Definición de variables**

Variable independiente: Infección por CMV

Tipo de variable

Definición conceptual: Infección viral de transmisión transplacentaria que infecta al feto provocando trastornos en sus órganos.

Definición operacional: PCRtr (+) al CMV en muestras de plasma.

Escala de medición: Nominal dicotómica

**Variable dependiente:** RN con SDR severo al nacer y SDR no severo (considerado SDR moderado y SDR leve).

Definición conceptual: RN con SDR severo al nacer y SDR no severo (moderado y leve).

Definición operacional: RN de 25 a 42 SEG nacidos en HGP/MF No. 31 con SDR severo según el resultados del test Silverman Anderson de 7 a 10 de puntaje, que requirieron tratamiento con ventilación mecánica, SDR moderado con 4 a 6 puntos con cpap nasal, y SDR leve con 1 a 3 puntos tratado con casco cefálico (86).

Escala de medición: Nominal dicotómica.

Unidad de medición: Grados de severidad del SDR: No severo 1) leve, 2) Moderado y 3) severo.

Instrumento de medición: Test de Silverman y Anderson.

**Covariables. De los RN seleccionados se analizaron los siguientes variables:**

### **Variables clínicas:**

Escala de Medición: Cuantitativa.

Para peso, perímetro cefálico y talla, se utilizó las tablas de Lubchenco (79), (Anexo I).

Para edad gestacional se utilizó las tablas de Nuevo Ballard modificado (Anexo II).

Escala de Medición: Nominal dicotómica.

Test de Silverman Anderson (Anexo III) (86)

Signos clínicos patognomónicos y síndromes de las diferentes enfermedades:

-Neurológicas: asfixia, apnea primaria, apnea secundaria, depresión por anestésicos, manos empuñadas, facies de angustia, caput succedáneo, fractura de cráneo, midriasis, miosis, hemorragia intraventricular, microcefalia, macrocefalia, fontanela abombada, suturas craneales imbricadas, hidrocefalia, anencefalia, irritabilidad, hipoactivo, hiporeactivo, hiperactivo, hiperreactivo, letargia, espasticidad, hipertonía, hipotonía, posición en tijeras, hiporreflexico, hiperreflexico, mioclonias, movimientos tónicos, movimientos tónico-clónicos, llanto cefálico, crisis convulsivas.

-Pulmonares: broncoaspiración, neumotórax, neumomediastino, enfisema pulmonar, edema pulmonar, derrame pleural, atelectasia, secreciones pulmonares, hipoventilación, fracturas costales, fractura clavicular, HPP, tos seca, tos productiva, sibilancias, quejido respiratorio, tiraje intercostal, retracción xifoidea, broncoespasmo, hiperventilación, estertores finos, estertores gruesos, taquipnea, aleteo nasal, respiraciones periódicas, respiraciones superficiales, disociación toraco-abdominal, rudeza respiratoria, estridor laríngeo, congestión pulmonar.

-Cardiacos: choque cardiogénico, taquicardia, bradicardia, hipotensión arterial, hipertensión arterial, desdoblamiento del segundo ruido cardiaco, dilatación de cavidades cardiacas, precordio hiperdinámico, paro cardiaco, paro cardiorrespiratorios.

-Gastrointestinales: ascitis, diarrea, hipoperistalsis, secreción biliar, hepatomegalia, esplenomegalia, vómitos, regurgitaciones, red venosa colateral, abdomen globoso, abdomen doloroso, rechazo al alimento, residuos gástricos, dibujo de asas.

-Hepatobiliar: hiperbilirrubinemia conjugada, hiperbilirrubinemia no conjugada, transaminasemia alta.

-Renales: anuria, poliuria, oliguria.

-Hematológicos: hematuria, sangrado de tubo digestivo alto, sangrado de tubo digestivo bajo, melena, petequias, equimosis, sangrado pulmonar, sangrado de narinas, anemia, coagulación intravascular diseminada.

-Infecciosos: septicemia, choque séptico, hipotensión arterial, hipertensión arterial, pulsos débiles, pulsos saltones, palidez de tegumentos, acrocianosis, cianosis, distermias, hipotermia, hipertermia, onfalitis, acidosis metabólica, alcalosis metabólica, signo del arlequín, rubicundez, exantema papular, escleroderma, cambios de coloración, terroso, desaturaciones, grisáceo, reacción leucemoide y leucopenia.

-Metabólico: hiperglicemia, hipoglicemia, ictericia, hipercalcemia, hipocalcemia, hipercalcemia, hipocalcemia, hipermagnesemia e hipomagnesemia.

-Hidroelectrolítico: deshidratación hidroelectrolítica, edema generalizado, edema de partes declives, anasarca.

-Malformaciones: labio y paladar hendido, sindáctila, manos en tenaza, polidactila, micropene, luxación de cadera, encefalocele, meningocele, mielomeningocele, onfalocele, gastrosquisis, malrotación intestinal, atresia intestinal, riñones poliquisticos, hidronefrosis, riñones multiquísticos, criptorquidia, estenosis de la arteria pulmonar.

#### Diagnóstico del cuadro clínico de ingreso a las unidades neonatales.

-Síndrome de Down, síndrome hipotónico, síndrome de TORCH, síndrome de adaptación pulmonar, EMH, TTRN, síndrome de aspiración de meconio, síndrome de aspiración de sangre, síndrome de aspiración de líquido amniótico, sufrimiento fetal agudo, hernia diafragmática, hipoplasia pulmonar, hidropesía fetal no inmune, quiste broncogénico, quiste mesentérico, insuficiencia cardiaca congestiva, PCA, comunicación interauricular, comunicación interventricular, foramen oval permeable, insuficiencia tricúspide, insuficiencia miocárdica, cardiopatía congénita acianogena, atresia intestinal, malrotación intestinal, íleo

meconial, gastrosquisis, onfalocele, encefalopatía hipóxico-isquémica, miocardiopatía hipóxico-isquémica, insuficiencia renal aguda, enfermedad por reflujo gastroesofágico, poliglobulia, fetopatía diabética, enterocolitis necrotizante, colestasis hepática, hipertrofia del septum ventricular, desnutrido, BPN, peso alto para la edad gestacional.

### **Variables de laboratorio y estudios radiológicos**

Biometría hemática completa, pruebas de función hepática, grupo sanguíneo.

Cultivos: Hemocultivo, cultivo de: secreción pulmonar, secreción gástrica, urocultivo, coprocultivo, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido pleural, catéter intravenoso, catéter umbilical, catéter percutáneo.

Gasometría: De muestra de sangre arterial y muestra de sangre venosa.

Serología: Muestras de suero para IgG-CMV e IgM-CMV en los RN y en sus madres.

PCRtr: Muestras de plasma para PCRtr/ADN-CMV.

Estudios de gabinete: Radiografías de tórax, radiografías de abdomen, radiografías de cráneo, ultrasonido transfontanelar, ultrasonido abdominal, ecocardiogramas y tomografía axial computarizada de cráneo (TAC).

### **Variables maternas:**

Variables biológicas: Edad, peso al término del embarazo, talla.

Variables de salud materna y reproductiva: Números de gestaciones, abortos, óbitos, antecedentes de partos inmaduros y partos prematuros, antecedentes de hijos con malformaciones, antecedentes de hijos infectados con CMV, madre de 15 años o menor de edad, madre de 45 años o mayor de edad, madre con: obesidad, hipertensión arterial, sepsis, Rh negativa, desprendimiento prematuro de placenta normo inserta, oligohidramnios, polihidramnios, infección: urinaria, cervicovaginal, vías aéreas superiores, infección por CMV y ruptura prematura de membranas amnióticas de corta y larga duración; promiscuidad,

relaciones sexuales anales y relaciones sexuales orales, prácticas homosexuales, esposos o parejas promiscuas y/o con prácticas homosexuales; adicciones: usuarios de drogas, alcoholismo, tabaquismo, tatuajes y piercing.

Variables sociales, económicas y culturales: Nivel socioeconómico, escolaridad, trabaja y lugar de trabajo, dedicada al hogar.

## **PLAN DE ANÁLISIS**

Se realizó estadística descriptiva de las variables clínicas neonatales y maternas, las medidas de asociación se analizaron mediante razón de momios (RM), con un intervalo de confianza de 95% (IC95%), Chi<sup>2</sup> Mantel-Haenszel y prueba exacta de Fisher, con grado de significación  $p \leq 0.05$ . Se realizó la prueba de distribución de Kolmogorov-Smirnov y pruebas de comparación de grupos utilizando las pruebas de  $t$  y de Kruskal Wallis. Se realizó análisis univariado y análisis de regresión logística binaria no condicional. Se utilizó el programa computacional estadístico SPSS versión 17.

### **Registro de datos de pacientes.**

En un formato especial de recolección de datos se obtuvo la información necesaria del RN y de la madre (ver anexo IV).

### **Toma de muestras de laboratorio.**

Una vez que el RN fue seleccionado se le tomó la muestra de la siguiente manera: Se utilizó guantes estériles y cubre boca, se realizó la desinfección del sitio de punción con torundas de alcohol al 70%, se utilizó un liga como torniquete para ejercer presión en venas situadas en las manos o en los brazos por menos de 1 minuto, cuidadosamente se puncionó la vena y se tomó 4 mL de sangre utilizando una aguja pequeña, se recolectó la sangre en pequeños tubitos, posteriormente se presionó el sitio de punción levemente con una torunda

de alcohol por 2 minutos para evitar sangrados y se estuvo vigilando el sitio de punción por varios días para descartar infección. Cuando la muestras se obtuvo de catéteres umbilicales o subclavios, en todos los casos se manipuló con guantes y cubre bocas.

### **Determinaciones de laboratorio (BHC, PFH).**

Se realizaron determinaciones de: biometría hemática completa (BHC) y pruebas de función hepática (PFH), que conformaron parte del manejo de todo los RN que son atendidos en el HGP/MF No. 31 IMSS.

En el laboratorio de análisis clínicos del HGP/MF No.31 IMSS, se procesaron las muestras sanguíneas para la BHC con el aparato BECKMAN COULTER y para las pruebas de PFH se realizaron algunos parámetros bioquímicos en el autoanalizador automático secuencial de marca PRESTIGE 241 TOKYO BOEKI MEDICAL SYSTEM, que cumplen las condiciones requeridas siguiendo las especificaciones del fabricante (reactivos Abbott).

### **Determinación de IgG-CMV e IgM-CMV.**

En el laboratorio de análisis clínicos del Hospital General de Zona No. 30 IMSS, se procesaron las muestras de suero para detectar IgG-CMV e IgM-CMV utilizando el equipo VITROS® ECiQ inmunodiagnóstico de Ortho-Clinical Diagnostics, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de IgG-CMV se reportó en UI/mL con punto de corte de  $\geq 8$  UI/mL; la concentración de IgM-CMV se expresó en UA/mL, con punto de corte de  $\geq 1.0$  UA/mL.

La técnica de la prueba de IgG-CMV e IgM-CMV consistió en la reacción de anti-CMV IgG e IgM presentes en la muestra con un antígeno de CMV en los pocillos donde se vertió la muestra de suero. Después de una etapa de lavado, se añadió una peroxidasa conjugada con anticuerpos monoclonales IgG de ratón, que forma complejos con IgG e IgM anti-CMV.

## Ensayo de PCR de punto final para la detección del ADN del CMV

**Extracción de ácidos nucleicos.** Para la extracción de ADN del CMV, de cada muestra se utilizó el kit de Extracción de ADN total por columna *FavorPrep™ Viral Nucleic Acid Extraction I (FAVORGEN®)*. Se utilizaron 150µL de plasma y se siguieron las especificaciones del proveedor (Anexo V). El ADN se eluyó con 50µL de agua libre de RNasa a temperatura ambiente y se almacenaron a -20°C hasta su uso. El ADN se cuantificó en un espectrofotómetro marca *NanoDrop®*, programa ND-1000 V3.3, la cuantificación de ácidos nucleicos se realizó por duplicado (Anexo V).

## Ensayo de PCR punto final.

Se realizó PCR punto final con el objetivo de probar los cebadores e identificar muestras que utilizaron con controles positivos y negativos. Se utilizaron cebadores que amplifican un fragmento de 125 pb de la región gB, glicoproteína

**Tabla 1. Cebadores de PCR del Gen gB/UL55**

Gen	Secuencia oligonucleótidos	Posición	Tamaño del producto	Secuencia de referencia	Número de acceso
gB1-M	Sentido 5'GAGGACAACGAAATCCTG TTG GGC A-3'	82663 82639	125 PB	Human herpesvirus 5 strain AD 169 MCMV-ST-gB, 149pb, cepa AD-169 (ATCC VR-538)	X17403.1
gB2-M	Antisentido 5'TCGACGGTGGAGATA CTGCTGAGG-3'	82515 82538		gblFJ527563.1	

(104, 105)

codificada por el gen UL55, región altamente conservada la envoltura del virus (tabla 1).

Además se utilizaron cebadores que amplifican un fragmento de 205 pb del gen  $\beta$ -actina humana utilizando los iniciadores  $\beta$ -F y  $\beta$ -R con el objetivo de verificar que el ADN o templado no estuviera degradado, estos cebadores se diseñaron en el laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, las secuencias fueron: Secuencia sentido:  $\beta$ -F 5'-ATCCTAAAAGCCACCCCACT-3'. Secuencia anti-sentido:  $\beta$ -R 5'-CTCAAGTTGGGGGACAAAAA-3'.

Se estandarizaron las condiciones de la PCR para la gB, determinando las condiciones óptimas para realizar el ensayo (concentración de  $MgCl_2$ , temperatura de alineamiento y número de ciclos) basado en los artículos Atkinson C y Mattes FM (104, 105). Se tomaron 2.5  $\mu$ L del ADN previamente extraído, para ser dispensado en una mezcla conteniendo amortiguador para PCR 1X con 1.5 mM  $MgCl_2$  (KAPABIOSYSTEM, 0.2  $\mu$ L de dNTP's mix (INVITROGEN), cebadores gB1-MF y gB2-MR 0.75  $\mu$ M cada uno (IDT), Taq polimerasa 1.0 U equivalente a 0.2  $\mu$ L (KAPABIOSYSTEM) y agua hasta completar un volumen total de 12.5 $\mu$ L (Anexo V). Y la estandarización que realizamos de la técnica PCR para  $\beta$ -actina fue de la siguiente manera: Se tomaron  $\mu$ L ADN 2, 1 X PCR amortiguador 1  $\mu$ L (INVITROGEN), 0.2  $\mu$ l de dNTP's mezcla (KAPABIOSYSTEM Massachusetts. USA), cebadores  $\beta$ -F 0.05  $\mu$ L y  $\beta$ -R 0.05  $\mu$ L, Taq polimerasa 0.1 U/  $\mu$ L equivalente a 0.2  $\mu$ L (KAPABIOSYSTEM), y agua inyectable 6.5  $\mu$ L, completando un volumen total de 10  $\mu$ L.

La amplificación para la PCR gB se llevó a cabo en un termociclador (Biometra T Gradient Thermocycler, programa 31 UL69/gBG). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: Fase de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 60°C por 30 s, extensión a 72 °C por 30 s, con 30 ciclos de amplificación, duración de 1 h 10 min, se completó la reacción con una fase adicional de extensión a 72°C por 5 min (104, 105) (Anexo V).

La amplificación para la PCR  $\beta$ -actina se realizó en un termociclador con programa 04 ACTINA. Las condiciones de amplificación para la PCR fue: Fase de

desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 50°C por 30 s y extensión a 68°C por 45 s, con 35 ciclos de amplificación, duración de 1 h 35 min 09 s, se completó la reacción con una fase adicional de extensión a 72 °C por 7 min. (Anexo V)

Para ambas PCR punto final se realizó la electroforesis de los productos amplificados en gel de agarosa (Ultra Pure™ Agarose (*INVITROGEN*) al 2 % en cámara Bio-Rad, (Anexo V) en 25 min a 100 voltios. Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz UV marca *QUANTUM ST4 VILBER LOURMAT*, con un tiempo de resolución de 1.5 segundos (Anexo V).

Se utilizaron diferentes controles con el objetivo de 1) Verificar con control interno que al ADN no estuviera degradado 2) Verificar con control negativo, la ausencia de contaminación, 3) Verificar con control positivo interno la ausencia de inhibidores de la reacción de amplificación y presencia de suficiente ADN, y 4) Control positivo externo, como control en la técnica de amplificación de los ácidos nucleicos (Anexo V).

### **Estandarización de la PCR en tiempo real (PCRtr/ADN-CMV) SYBR Green**

Para realizar la detección del CMV ADN por el ensayo de PCRtr se siguió la metodología propuesta por Mattes y col. 2005 (104) con algunas modificaciones. Para la identificación y cuantificación del ADN-CMV se estandarizaron las condiciones para la PCRtr SYBR Green. Para la extracción del ADN es el mismo método utilizado en la PCR de punto final. Se estandarizó la PCRtr en un equipo LightCycler *LC480* (Roche). Se elaboró la curva estándar, a partir de diluciones seriadas utilizando un control de ADN del CMV cepa AD-169 con rangos de concentraciones de 10.000 a 20.000 copias/μL determinado por *PCRtr* (*Vircell Microbiologists*). Con las concentraciones previamente conocidas

del estándar se construyó una curva patrón con rango de detección de  $10^2$  a  $10^6$  copias/mL del genoma viral.

Para la PCRtr a evaluar se siguió la metodología propuesta por Mattes y col. 2005. La sonda y cebadores usados están diseñados para amplificar una región altamente conservada del genoma gB UL/55. Se utilizaron los siguientes cebadores: cebador sentido 5'-3' gB1-M 5'GAGGACAACGAAATCCTGTTGGGCA-3' posición 82663-82639, y cebador antisentido gB2-M 5'TCGACGGTGGAGATACTGCTGAGG-3' posición 82515-82538. El tamaño del amplicon esperado es de 125 pb, estos amplicones están dirigidos a las glicoproteínas B ubicadas en la envoltura del virus (24).

Las condiciones utilizadas para la amplificación y detección para realizar la PCRtr/ADN-CMV SYBR Green fueron: Mezcla de reacción con la concentración final: 5  $\mu$ L de Master Mix ( \*Master Mix LC®480 SYBERGreen I Master 2X (ROCHE), 0.75  $\mu$ M de gB1-MF y 0.75  $\mu$ M gB2-MR de cebadores gB/UL55 (IDT) y 3.5 $\mu$ L de ADN a cada reacción, un total de 10  $\mu$ L. El programa térmico fue de 95°C 5 m, 45 ciclos (10 s a 95°C, 10 s a 60°C, 10 s a 72°C). Las reacciones se realizaron por triplicado. Tiempo total 1:09:00 h. (104,105) (Anexo V).

**Identificación de infección por CMV utilizando el ensayo de PCRtr/ADN-CMV SYBR Green.** Para identificar la infección por CMV se realizó PCRtr/ADN-CMV SYBR Green de todas las muestras de ADN extraído de pacientes como se describe en la sección anterior. Se continuó con el análisis de la curva de disociación como la siguiente: desnaturalización de 5 min a 95°C, el alineamiento de 1 s a 65°C y extensión a 97 °C.

El análisis de los datos se realizó mediante el software LC®480 vs 1.2 (ROCHE). Los resultados se interpretaron como posibles positivos donde hubo amplicon de *tm* 86°C. Las muestras posibles (amplicones) positivas fueron secuenciadas para descartar amplificaciones no específicas.

Posteriormente se realizó la electroforesis de los productos de PCRtr/ADN-CMV SYBR Green como se describe en la sección anterior. Se utilizó el Kit comercial de purificación de ADN de gel de agarosa (*PureLink Invitrogene y Kit Quick Gel Extracción, QIAGEN*) para verificar las secuencias de ADN de gen B amplificado (Anexo V).

### **Secuenciación del fragmento de 125 pb del gen gB UL55 de la región de la glicoproteína gB.**

Para corroborar que el fragmento amplificado fuera específico del CMV, todos los amplicones positivos fueron secuenciados. La secuenciación de ADN del amplicon se llevó a cabo por el método de dideoxy con el kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction V.2 (*Applied Biosystems*), con equipo secuenciador de 16-capillaris, ABI Prism 3100 Genetic Analyzers (*Applied Biosystems, Foster City CA*), el programa utilizado fue el CLCbio para editar el electroferograma utilizando las secuencias de los dos sentidos y obtener la secuencia consenso (Anexo V). Como referencia se usó la secuencia consenso MCMV-ST-gB, 149pb, de la cepa de referencia AD-169 (ATCC VR-538).

Se realizó la búsqueda de similitud de secuencias en la base de datos BLAST (BLAST, acrónimo para el inglés de Basic Local Alignment Search Tool) en el GenBank del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Anexo V).

## **ASPECTOS ÉTICOS, NORMATIVOS Y DE SEGURIDAD PROCEDIMIENTOS ÉTICOS**

El estudio fue aprobado por el Comité Local de Investigación y de Ética en Investigación en Salud (CLIEIS 201) del Hospital de Zona No. 30 del IMSS y se solicitó consentimiento informado a los padres de los pacientes (Registro: R-2009-201-3) (Anexo VI).

### **Bioseguridad para el manejo de materiales de desecho y residuos biológicos**

Al tomar las muestras de laboratorio de los RN se previnieron accidentes en el personal del HGP/MF No. 31 IMSS con material que pudiera haber estado contaminado y se procedió a lo siguiente: Se separaron y envasaron todos los residuos peligrosos biológico-infecciosos generados en establecimientos de atención médica según sus características físicas y biológico-infecciosas según la NOM 087-ECOL-SSA1-2002 (106), que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que prestan atención médica.

### **Protección frente al riesgo de tensión física y/o emocional.**

El riesgo de tensión física y/o emocional se consideró tipo II según la Declaración de Helsinki (107) con un volumen de muestra sanguínea de extracción de 4 mL que no afectó las condiciones hemodinámicas del neonato.

## RESULTADOS

En el HGP/MF No. 31 en el periodo de captación de los RN que fue de agosto del 2010 a febrero del 2012 (19 meses) se reportó el nacimiento de 7437. Se registró una población de 778 RN con SDR, por lo que la frecuencia de RN con SDR fue de 10.46%, de los cuales se captaron 237 neonatos para incluirlos en el estudio. De los 237 (3.2%) RN con SDR incluidos, se excluyeron 40, uno de ellos por petición de la madre de retirarse del estudio y 39 pacientes por no contar con la información completa. Un total de 197 infantes con SDR (2.6%) fueron evaluados. Los datos de los pacientes y de las madres fueron recabados en un formato especial (anexo VII), posteriormente se vaciaron todos los datos adquiridos a una matriz de Excel 2010 de donde se obtuvieron todos los datos estudiados y analizados. Se clasificó la severidad del SDR de los RN incluidos según el Test de Silverman y Anderson (tabla 2).

**Tabla 2. Clasificación del SDR en los RN**

Variable		n (197)	%
SDR	Leve	85	43.1
	Moderado	48	24.4
	Severo	64	32.5

### **Antropometría y aspectos biológicos de los RN con SDR**

De la muestra de 197 neonatos se obtuvieron 104 mujeres (52.8%) y 93 hombres (47.2%) y de éstos 45 (22.85%) de peso bajo para la edad gestacional y 152 (77.15%) con peso adecuado para la edad gestacional. La mediana para peso fue de 2005.0 g (rango 600 a 4720) y para edad gestacional de 34.2 (rango 25 a 41.3), Talla 44 (32 a 56 cm), perímetro cefálico 31 (20 a 40.5 cm). La madurez

neonatal se distribuyó según la tabla de Nuevo Ballard como sigue: RN Inmaduro 11 (5.1%), RNPT 153 (77.6%) y RNT 33 (17.3%).

**Manifestaciones clínicas más frecuentes en RN con SDR.** En la tabla 3 se compendia la frecuencia de variables clínicas en el grupo de RN con SDR. Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron: ictericia 138 (70.1%), tiraje costal 127 (65.5%), estertores 95 (48.2%), polipnea, hipoactividad y secreción pulmonar de 85-84 (43.2 a 42.6%) entre otras.

**Tabla 3. Manifestaciones clínicas en los RN con SDR**

Variable	n	%	Variable	n	%
Ictericia	138	70.1	Hipotermia	39	19.8
Tiraje costal	127	64.5	Marmóreo	39	19.8
Estertores	95	48.2	Residuos gástricos	38	19.3
Polipnea	85	43.2	Enterocolitis	35	17.8
Secreción pulmonar	84	42.6	Sibilancias	35	17.8
Hipoactividad	84	42.6	Terroso	35	17.8
Abdomen globosos	75	38.1	Taquicardia	33	16.8
Hepatomegalia	69	35	Taquicardia	33	16.8
Cianosis	69	35	Bradycardia	33	16.8
Aleteo nasal	65	33	Soplo cardiaco	31	15.7
Quejido respiratorio	65	33	Taquipnea	30	15.2
Acidosis metabólica	63	32	Drenaje biliar	28	14.2
Rubicundez	61	31	Crisis convulsivas	26	13.2
Hipertermia	60	30.5	Desnutrido	25	12.7
Sangrado de tubo digestivo alto	57	28.9	Respiración débil	22	11.2
Disociación toraco-abdominal	58	29.4	Hipoglicemia	21	10.7
Retracción xifoidea	56	28.4	Vómitos	20	10.2
Hiporreactivo	55	27.9	Hiperglicemia	18	9.1
Hipoperistalsis	55	27.9	Precordio hiperdinámico	17	8.6
Rudeza respiratoria	54	27.4	Hipotensión	11	5.6
Dibujo de asas	52	26.4	Estenosis pulmonar	9	4.6
Acrocianosis	49	24.9	Broncoespasmo	9	4.6
Edema	49	24.9	Hiporreflexia	8	4.1
Palidez	46	23.4	Poliuria	7	3.6
Apneas	46	23.4	Petequias	6	3
Hipotonía	45	22.8	Abdomen doloroso	6	3

## Patologías más frecuentes de los RN con SDR

En la tabla 4 se resumen las variables más frecuentes, las cuales fueron: prematuridad 160 (82%), sepsis 121 (61%), neumonía 104 (53%), EMH 91 (46) y asfixia neonatal 65 (33%) entre otras.

**Tabla 4. Patologías más frecuentes de los RN con SDR  
(n=197)**

Variable	n	%	Variable	n	%
Prematurez	160	81.7	EHI	26	13.2
Sepsis	121	61.4	Oligohidramnios	26	13.2
Neumonía	104	52.8	RN desnutrido	25	12.7
EMH	91	46.2	Sufrimiento fetal agudo	22	11.2
Asfixia neonatal	65	33	Precordio hiperdinamico	17	8.6
Acidosis metabólica	63	32	PCA	12	6.1
STDA	58	29.4	Insuficiencia renal aguda	12	6.1
RN con peso menor a 1500 g	41	28.81	Polihidramnios	10	5.1
Enterocolitis necrotizante	35	17.8	Estenosis pulmonar	9	4.6
Soplos cardiacos	31	15.7	Fetopatía diabética	5	2.5

EMH: Enfermedad de membrana hialina, PCA: Persistencia del conducto arterioso EHI: Encefalopatía hipoxico-isquémica, STDA: Sangrado de tubo digestivo alto.

## Factores de riesgo materno para la severidad del SDR

En la tabla 5 se muestra las variables maternas para la severidad del SDR en los RN, lo más frecuente fue: madre con IgG-CMV positiva, infección de vías urinarias, antecedente de abortos, de nivel socioeconómico bajo, educación hasta secundaria, infección viral, madre que labora fuera del hogar y cervicovaginitis entre otras.

**Tabla 5. Factores de riesgo materno en el grupo de RN con SDR**

Variable	n	%	Variable	n	%
IgG-CMV positiva	170	86.3%	IgM-CMV positiva	41	20.8
Infección de vías urinarias	143	72.6	Amenaza de aborto	36	18.2
Antecedentes de abortos	142	72	Antecedentes :hijos prematuros	26	13.2
Nivel socioeconómico bajo	132	67	Partos	25	12.7
Educación hasta secundaria	125	63.5	Amenaza de parto pretérmino	24	12.2
Utilización de fármacos	123	62.4	Consultas recibidas menos de 5	24	12.2
Infección viral	120	60.9	Soltera	21	10.7
Trabaja	117	59.4	Madre de bajo peso	19	9.6
Cervicovaginitis	100	50.8	Alcoholismo	18	9.1
Fumadora pasiva	92	46.7	Madre añosa	17	8.6
Multigesta	67	34	Diabetes gestacional	14	7.1
RPM	58	29.6	Madre adolescente	12	6.1
Unión libre	56	28.4	Madre de talla baja	10	5.1
Promiscuidad sexual	53	26.8	Madre con sepsis	6	3
Hipertensión arterial en embarazo	47	23.9	Óbitos	6	3
Aplicación de esteroides	47	23.9	Madre con DPNI	5	2.5
RPM de larga evolución	42	21.3	Madre Obesa	5	2.5

RPM = Ruptura prematura de membranas; DPNI = Desprendimiento de placenta normoinserta; Madre con peso bajo = igual o menor a 50 kg; Madre con talla baja = igual o menor a 1 metro 50 centímetros de estatura.

## Serología y severidad del SDR

### Determinación de IgG-CMV e IgM-CMV

En la tabla 6 se muestra los resultados de la serología IgG-CMV e IgM-CMV con relación a la severidad del SDR. La frecuencia de IgG-CMV fue de 89.3% siendo más baja en los RN con SDR severo. La frecuencia de IgM-CMV positiva fue de 7.1% estando más alta en los RN con SDR severo. La concentración de IgG-CMV se reportó en UI/mL con punto de corte de  $IgG \geq 8$  UI/mL; la concentración de IgM-CMV se expresó en UA/mL, con punto de corte  $\geq 1.0$  UA/mL.

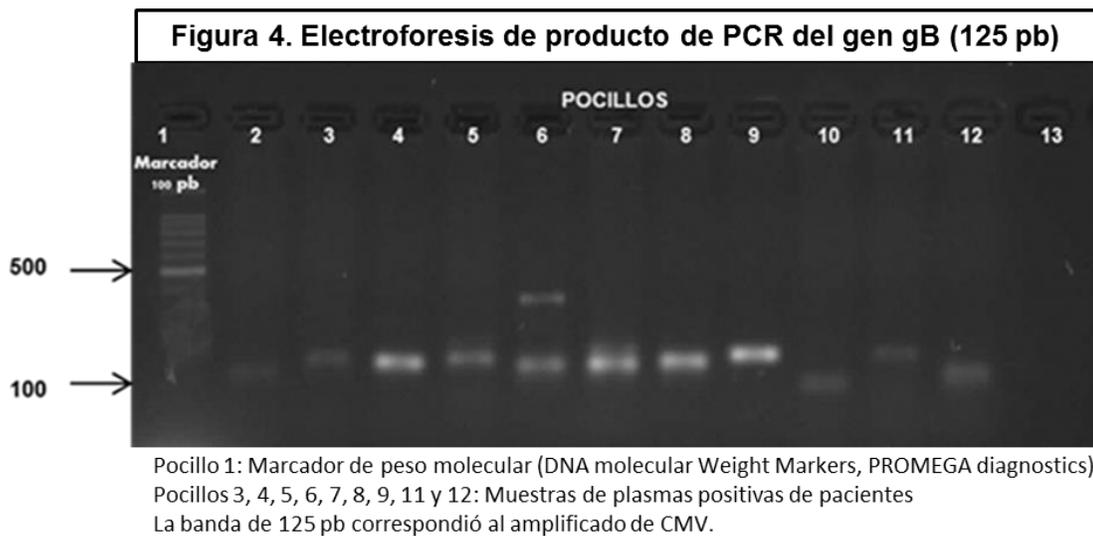
**Tabla 6. Serología del CMV (IgG-CMV e IgM-CMV)**

	IgG-CMV			IgM-CMV		
	Positivo		Negativo n (%)	Positivo		Negativo n (%)
	n (%)	IgG-CMV (UI/mL)		n (%)	IgM-CMV (UA/mL)	
RN con SDR (n=197)	176 (89.3%)		21 (10.7%)	14 (7.1%)		183 (92.9%)
leve (n=85)	75 (88.2%)	256.3±199	10 (11.8%)	5 (5.8%)	1.43±0.24	80 (94.2%)
moderado (n=48)	45 (93.7%)	224.4±174	3 (6.3%)	4 (8.3%)	1.4±0.46	44 (91.7%)
severo (n=64)	56 (87.5%)	161±168	8 (12.5%)	5 (7.8%)	1.66±0.76	59 (92.2%)

## Estandarización del ensayo para detectar el DNA-CMV en RN con SDR.

### A. Amplificación del fragmento de 125pb del Gen gB UL55 del CMV

Para determinar la eficiencia de los cebadores utilizados para la PCRtr primero se realizó una PCR de punto final y con este ensayo se observó la amplificación del fragmento esperado de 125 pb, como se muestra en la figura 4.

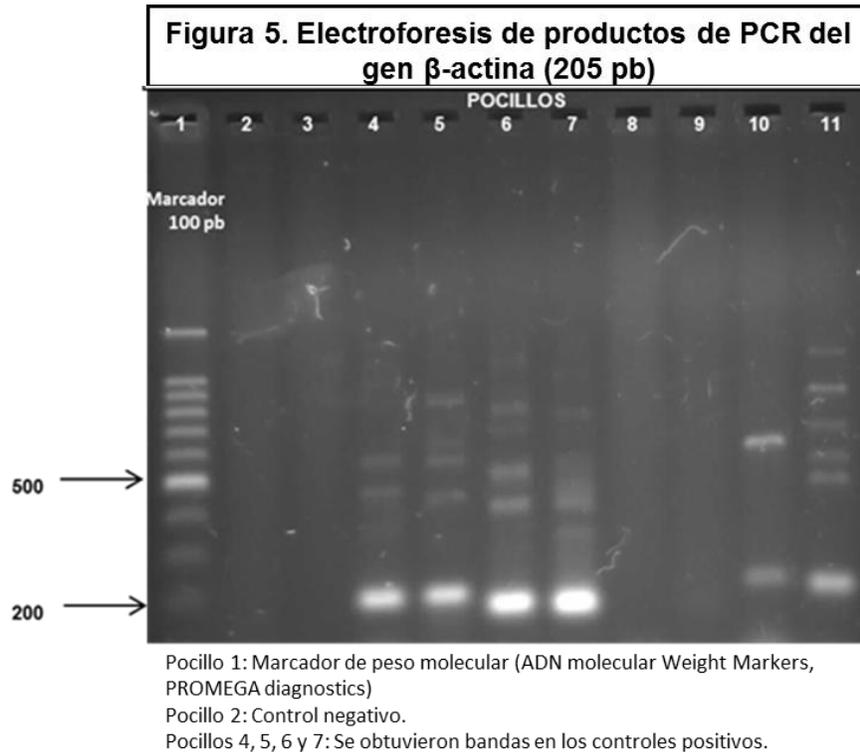


La figura 4 muestra la fotografía de un gel de agarosa que representa una PCR punto final para la amplificación del gen gB con los cebadores empleados. Se puede observar la localización y sentido de migración de los ácidos nucleicos representados por las bandas fluorescentes.

### B. Verificación de la calidad del DNA de las muestras mediante la amplificación del Gen de $\beta$ -actina humano.

Para determinar la calidad de ADN extraído y/o ausencia de inhibidores de PCR (muestras de carril 4-7) se realizó una PCR de punto final y con este ensayo se observó la amplificación del fragmento esperado de 205 pb del gen de la  $\beta$ -actina humana, como se muestra e la figura 5.

Muestras sin amplificación de  $\beta$ -actina (carril 2,3) se volvieron a extraer ADN hasta verificar la amplificación del control interno.



En la figura 5 muestra un gel de agarosa que representa una PCR de punto final de  $\beta$ -actina como control interno.

### **C. Estandarización de la PCR en tiempo real (PCRtr/ADN-CMV SYBER Green)**

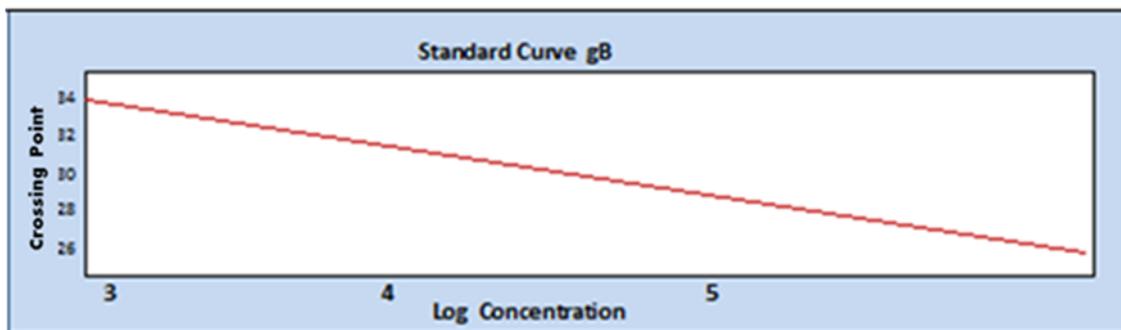
Resultados obtenidos de una curva estándar trazando el ciclo umbral (CU) contra la cantidad del ADN total de la reacción, que se utilizó para comparar la cantidad que puede haber de ADN-CMV. El cálculo de CU y de la señal normalizada de referencia interna (ORn), la preparación de la curva estándar y la cuantificación de ADN del CMV en las muestras se realizó por el software aportado con el termociclador a tiempo real, ver figura 6.

Se realizaron 5 diluciones seriadas estableciendo un límite de detección. Para el diseño de la curva estándar se utilizó el CMV-ADN control 10e4 y se determinó el rango de copias de CMV, los puntos de la curva estándar fueron: 100 copias/mL, 1000 copias/mL, 10.000 copias/mL, 100.000 copias/mL y 1,000.000 copias/mL, ver figura 7.

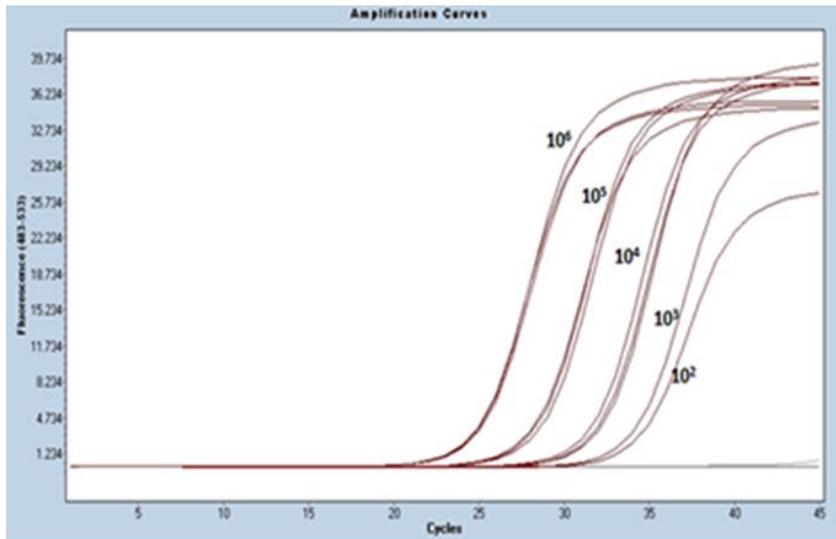
La curva de disociación específica fue generada por el software Óptico Monitor. Se obtuvo una temperatura de fusión (*tm*) de 86°C., (Figura 8).

En la identificación de infección por CMV utilizando PCRtr/ADN-CMV SYBER Green, la figura 9 es un ejemplo representativo de curvas de amplificación de muestras de plasma de los RN con SDR. A medida que transcurren los ciclos de amplificación, las señales emitidas por las muestras positivas comienzan a aumentar de forma exponencial, alcanzando al final una meseta cuando comienzan agotarse los reactivos presentes en la mezcla.

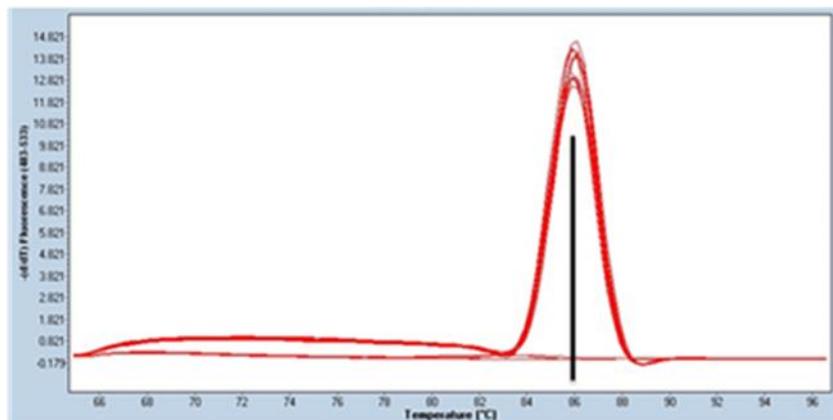
La figura 10 representa el resultado del análisis de disociación del PCRtr/ADN-CMV SYBER Green de las muestras de plasma de los RN con SDR. El pico específico para el amplicon del gen gB de CMV está indicado en la temperatura de *tm* 86°C. Se obtuvieron amplicones de distintas temperaturas de fusión (*tm*) los cuales no se logró eliminarlos por cambios de parámetros de PCRtr/ADN-CMV SYBER Green.



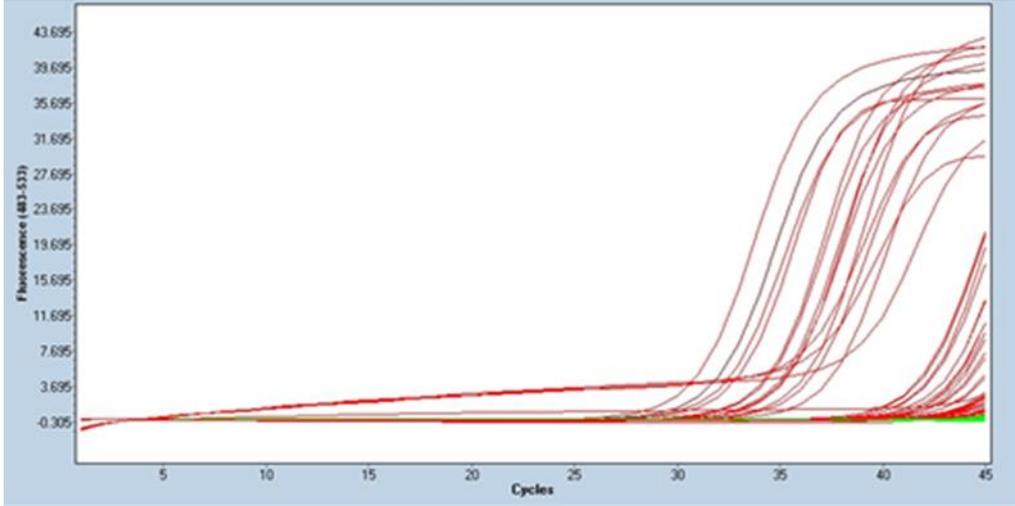
**Figura 6. Recta patrón obtenida por la PCRtr/ADN-CMV SYBER Green. En ella se representan los valores del ciclo umbral (CU) frente al número inicial de copias de ADN del CMV**



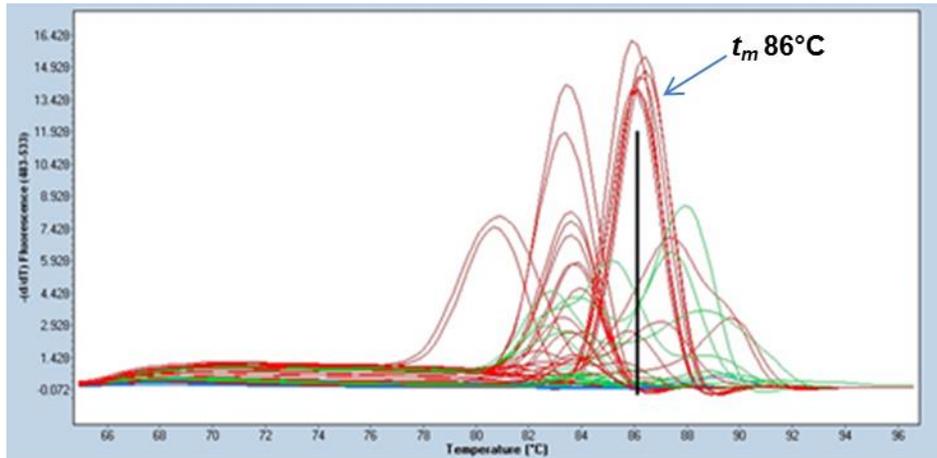
**Figura 7. Curvas de amplificación de la PCRtr/ADN-CMV utilizando control estándar de CMV-ADN control 10e4 y los cebadores gB**



**Figura 8. Curva de disociación (curva melting) específica para el gen gB del CMV, obtenida del CMV-ADN control 10e4**



**Figura 9. Curvas de amplificación de la PCRtr/ADN-CMV SYBER Green de las muestras de RN con SDR**

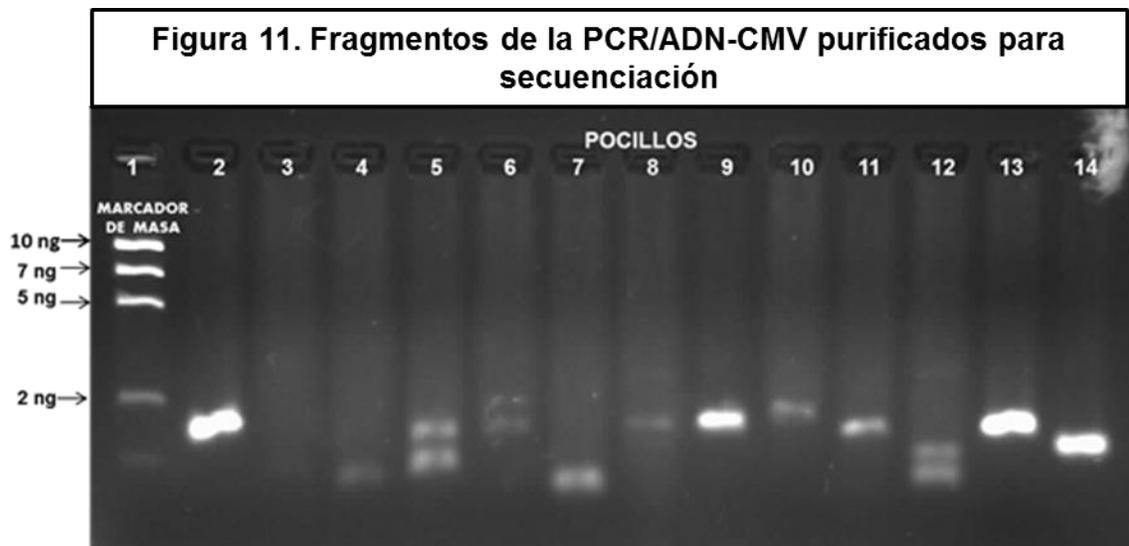


**Figura 10. Resultado de análisis de disociación de la PCRtr/ADN-CMV de muestras de RN con SDR en tiempo real sybergreen**

#### D. Análisis por electroforesis de los fragmentos amplificados para la secuenciación.

Para determinar todos los fragmentos con alrededor de *tm* 86°C fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa a 2%, los fragmentos fueron purificados y secuenciados para confirmar la secuencia consenso del CMV, número de acceso al Gen Bank para esta secuencia es X17403.1 (figura 11).

En la figura 11 se observa los fragmentos purificados de *tm* alrededor de 86°C, demostrando la integridad del ADN en diferentes cantidades expresadas en nanogramos (ng) que se refleja por el tamaño y la nitidez.



Pocillo 1, marcador de masa.

Pocillo 2 al 14, masa de fragmentos medidos en un rango de 1 a 60 ng.

## E. Secuenciación de fragmentos de PCRtr/DNA-CMV.

Al obtener los resultados de la purificación de los productos de la PCRtr/DNA-CMV se secuenciaron las siguientes muestras, ver tabla 7.

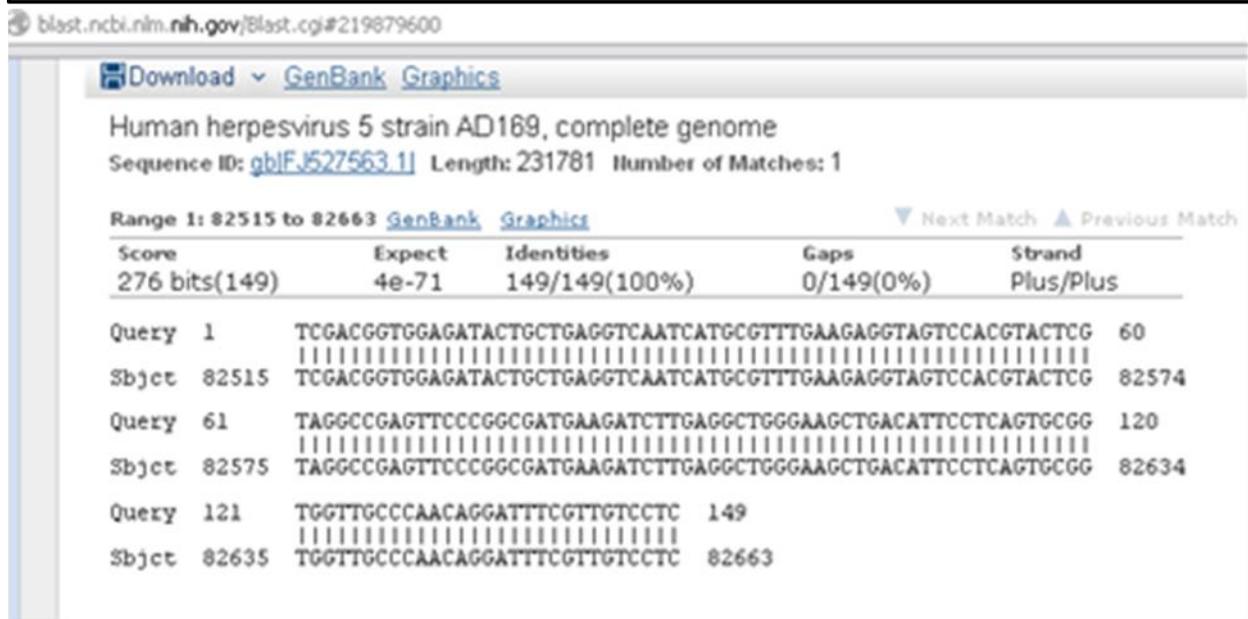
**Tabla 7. Muestras secuenciadas de productos purificados con etanol de la PCRtr/ADN-CMV SYBER Green del gen gB (125 pb)**

1	HP-139-A-1P/PR.RT-2F-215-219 3F	21	R-026P-gB-l-gB1
2	HP-139-A- 1P/215-219 3R-PR.RT-2F	22	R-028P-gB-l-gB1
3	HP-139-A-1P/PR.RT-2F-215-219 3F	23	R-037P-gB-l-gB1
4	HP-139-A- 1P/215-219 3R-PR.RT-2F	24	R-038P-gB-l-gB2
5	R-088P-gB-l-gB2 hacia adelante, hacia atrás	25	R-043PC1-gB-l-gB1
6	R-101P-gB-l-gB2	26	R-043PC2-gB-l-gB1
7	R-105P-gB-l-gB2	27	R-047P-gB-l-gB1
8	R-106P-gB-l-gB2 hacia adelante, hacia atrás	28	R-048P-gB-l-gB1 hacia adelante
9	R-126P-gB-l-gB2	29	R-049P-gB-l-gB1
10	R-003P-gB-l-gB1	30	R-051PD10-gB-l-gB1
11	R-004P-gB-l-gB1	31	R-051PD12-gB-l-gB1
12	R-005P-gB-l-gB1	32	R-053P-gB-l-gB1
13	R-009P-gB-l-gB1 hacia adelante	33	R-060P-gB-l-gB1 hacia adelante
14	R-010P-gB-l-gB1	34	R-061P-gB-l-gB1
15	R-011P-gB-l-gB1	35	R-062P-gB-l-gB1
16	R-012P-gB-l-gB1	36	R-065P-gB-l-gB1
17	R-013P-gB-l-gB1	37	R-066P-gB-l-gB1
18	R-017P-gB-l-gB1	38	R-009P-gB-l-gB2
19	R-022P-gB-l-gB1	39	R-013P-gB-l-gB2
20	R-025P-gB-l-gB1	40	R-025P-gB-l-gB2

En total cuarenta amplicones fueron secuenciados y de éstos 17 amplicones se confirmó su secuencia al 100% idéntica al gen gB del CMV según el análisis de búsqueda de similitud de secuencias mediante el programa BLAST.

En la figura 12 se muestra la secuencia de un fragmento alineado de un paciente con la secuencia del gen gB del CMV Cepa referencia AD169 (X17403.1) utilizando el programa BLAST del NCBI. La secuencia obtenida del paciente (R-028) mostró 100% de identidad a la secuencia del CMV por lo que se concluyó como la muestra positiva al CMV. En total de cuarenta muestras secuenciadas, 17 amplicones fueron confirmados positivos a CMV.

**Figura 12. Análisis del BLAST de un amplicon con 100% de identidad al gen gB**



### **Análisis de los resultados obtenidos en los RN infectados con CMV.**

Los diagnósticos clínicos más frecuentes al ingreso de los pacientes positivos a DNA-CMV fueron: prematuridad (76.4%); sepsis temprana e ictericia multifactorial (52.94%); neumonía (47.05%), EMH y sangrado de tubo digestivo alto (47.05%).

Los antecedentes perinatales que pudieron influir para la infección por CMV fueron: infecciones maternas durante el embarazo, Infecciones respiratorias altas, cervicovaginitis, infección de vías urinarias, ruptura prematura de membranas e IgG-CMV (+); la aplicación de esteroides, el sitio de trabajo con exposición de niños menores de cuatro años: guardería, Hospital pediátrico y restaurantes; el desenlace del embarazo: preeclampsia y ruptura prematuras de membranas amnióticas, trabajo de parto pretérmino, oligohidramnios severo y corioamnionitis, incluyendo líquido amniótico fétido y parto séptico, una de las madres tuvo parto gemelar y el segundo gemelo fue óbito. En la tabla 8 se resumen los porcentajes y el IC al 95% de las manifestaciones clínicas por órganos y sistemas de los 17 recién nacidos con SDR y CMV (+). Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron: letargia, hiperbilirrubinemia, sangrados, hipoventilación y dibujo de asas entre otras.

Las variables de riesgo inherentes a la madre que fueron más frecuentes para infección congénita por CMV en los RN con SDR. Fueron: IgG-CMV 94.11%; el nivel socioeconómico bajo y trabajo fuera del hogar 82.35%; infecciones urinarias y parto pretérmino 76.47%; cervicovaginitis, fumadora pasiva e infecciones respiratorias altas 70.58%; y estudios hasta secundaria 64.70%.

**Tabla 8. Resultados -17 RN con CMV (+) Manifestaciones clínicas tempranas**

Sistema Orgánico	Manifestaciones	%	IC95%	Sistema orgánico	Manifestaciones	%	IC95%
Intestinal	Dibujo de asas	35.3	(28-42)	Neurológico	Letargia	70.5	(64-77)
	Residuos	35.3	(28-42)		Apneas	23.5	(17-29)
	Hepatomegalia	29.4	(23-35)		Hipotonía	17.6	(12-23)
	Distensión abdominal	23.5	(17-29)	Convulsiones	17.6	(12-23)	
	Nauseas	23.5	(17-29)	Cardiopulmonar	Hipoventilación	52.9	(46-60)
	Vómito	23.5	(17-29)		Estertores	47	(40-54)
Hepatobiliar	Hiperbilirrubinemia no conjugada	64.7	(58-71)		Tiraje Costal	41.1	(34-48)
	Hiperbilirrubinemia conjugada	23.5	(17-29)	Polipnea	35.2	(28-42)	
	Transaminemia	23.5	(17-29)	↑ en la secreción pulmonar	35.2	(28-42)	
Hematológico	Sangrados	53.0	(46-60)	Aleteo nasal	35.2	(28-42)	
	Petequias	35.2	(28-35)	Cianosis	29.4	(23-35)	
	CID	5.8	(2.6-9.2)	Sibilancias	29.4	(23-35)	

RN = recién nacidos; CMV = citomegalovirus; CID = coagulación intravascular diseminada

### **Distribución de variables por severidad de SDR y en todos los RN incluidos en el estudio.**

De los 197 RN con SDR, 17 fueron positivos a la PCRtr con una frecuencia de 8.6% (17/197).

En la tabla 9 se resumen la distribución de la severidad del SDR en los 197 RN y no infectados. La infección por CMV fue más alta en los RN con SDR leve.

**Tabla 9. Distribución por severidad de SDR y SEG**

Infección por CMV en RN y severidad del SDR			
Severidad SDR		CMV (-)	CMV (+)
Leve	(n=85/43%)	76 (89.4 %)	9 (10.6%)
Moderado	(n=48/24.5%)	45 (93.7%)	3 (6.3%)
Severo	(n=64/32.5%)	59 (92.2%)	5 (7.8%)
TOTAL (n=197)		180 (91.4%)	17 (8.6%)

En la tabla 10 se muestra la distribución de la severidad del SDR y la edad gestacional en los 197 recién nacidos infectado y no infectados.

La infección por CMV fue más alta en los RNPT y con SDR leve.

**Tabla 10. Infección por CMV(+) por edad gestacional y severidad del SDR**

	CMV (-)	CMV (+)	SDR con CMV (+)		
			LEVE	MOD	SEV
RN inmaduro (n=11, $\bar{x}$ SEG 26)	11	0 (0%)	0	0	0
RN pretérmino (n=153, $\bar{x}$ SEG 33)	140	13 (9.3%)	7	2	4
RN t termino (n=33, $\bar{x}$ SEG 39)	29	4 (12%)	2	1	1
TOTAL	180	17	9	3	5

**Frecuencia de variables serológicas, hematológicas y de función hepática en los RN con SDR.**

En la tabla 11 reporta la frecuencia de variables de laboratorio que presentaron alteraciones en el grupo de RN con SDR. Entre las variables de laboratorio más frecuentemente alteradas fueron: IgG-CMV (89.3%), directa alta (59.9%), TGO (54.8%), bilirrubina neutrófilos bajos y linfocitos altos.

**Tabla 11. Frecuencia de variables serológicas, hematológicas y de pruebas de función hepática en los RN con SDR**

Variable		n (197)	%	Variable		n (197)	%
IgG RN	Alta	176	89.3	Bilirrubina directa	Alta	72	36.5
Bilirrubina directa	Alta	118	59.9	Plaquetas	Bajas	33	16.8
TGO	Alta	108	54.8	Monocitos	Altos	27	13.7
Neutrófilos	Bajos	99	50.3	Leucocitos	Bajos	25	12.7
Linfocitos	Altos	88	44.7	qPCR	Positiva	17	8.6
Basófilos	Altos	78	39.6	IgM RN	Alta	15	7.7
Bilirrubina total	Alta	76	38.6	TGP	Alta	12	6.1

En los 197 RN con SDR y CMV (-) y (+) se analizaron las variables de laboratorio que traducen datos indirectos de posible infección y se obtuvieron los porcentajes del grupo de RN con SDR infectados y no infectados. La IgG-CMV positiva, neutropenia y linfocitosis fueron los resultados con mayor alteración entre otras como se resume en la tabla 12.

**Tabla 12. Frecuencia de las alteraciones en exámenes de laboratorio de RN con SDR –CMV (+) Y CMV (-), n 197**

Variable	RN infectado (n=17)		RN no infectado (n=180)	
	%	e IC95%	%	e IC95%
IgG positiva (UI/mL)	100	(100-100)	88.33	(83.8-92.8)
IgM positiva (AU/mL)	0	(0)	6.06	(2.7-9.4)
Leucocitosis (%)	29.41	(23.0-35.8)	17.77	(12.4-23.1)
Neutropenia (%)	82.35	(77.0-87.7)	47.77	(40.8-54.7)
Linfocitosis (%)	70.58	(64.2-76.9)	42.22	(35.3-49.1)
Basofilia (%)	47.05	(40.1-54.0)	36.11	(29.4-42.8)
Trombocitopenia (%)	35.29	(28.6-42.0)	15.00	(10.0-20.0)
Hiperbilirrubinemia (%)	64.70	(58.0-71.4)	58.88	(52.0-65.8)
Transaminasemia (%)	23.50	(17.6-29.4)	56.66	(49.7-63.6)

**Pruebas de Normalidad para variables cuantitativas de RN con SDR severo y no severo.**

Para determinar las variables cuantitativas de RN con SDR severo y RN con SDR no severo tuvieran distribución normal se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov. Las variables con distribución normal fueron: neutrófilos, plaquetas, linfocitos, bilirrubinas totales y bilirrubina directa, los resultados se resumen en la tabla 13.

**Tabla 13. Pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov  
Variables con distribución normal**

Variables hematológicas y pruebas de función hepática							
Grupo de RN con SDR severo				Grupo de RN con SDR no severo			
Variable	Sig.	Media	D.E.	Variable	Sig.	Media	D.E.
Neutrófilos (%)	0.20	29.00	21.38	Neutrófilos (%)	0.20	39.71	18.22
Plaquetas (%)	0.20	221.29	117.87	Plaquetas (%)	0.20	232.96	73.49
Linfocitos (%)	0.20	49.96	19.14	Linfocitos (%)	0.20	43.60	14.96
BT (mg/dl)	0.20	7.79	3.46	BT (mg/dl)	0.20	9.46	4.50
BI (mg/dl)	0.20	7.16	4.40	BI (mg/dl)	0.17	8.82	5.50

\*BT: = Bilirrubina Total, \*BI = Bilirrubina Indirecta (mg/dL)

Las variables con distribución no normal en ambos grupos fueron: peso, monocitos, BD, leucocitos, eosinofilia, IgG-CMV e IgM-CMV; la variable con distribución no normal en el grupo de RN con SDR severo fue Hb, y para el grupo con SDR no severo fue SEG, estos resultados se resumen en la tabla 14.

**Tabla 14. Pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov  
Variables con distribución no normal**

Variables antropométricas, serológicas, hematológicas y pruebas de función hepática					
Grupo con SDR severo			Grupo con SDR no severo		
Variable	Sig.	Mediana	Variable	Sig.	Mediana
Peso (g)	0.001	1500	Peso (g)	0.000	2150
SEG	*0.098	32	SEG	0.043	35
Hemoglobina baja (g/dL)	0.024	15.2	Hemoglobina baja (g/dL)	*0.200	16.48
Monocitos altos (%)	0.000	7.75	Monocitos altos (%)	0.005	7.40
BD alta (mg/dL)	0.000	0.50	BD (mg/dL)	0.000	0.40
Leucocitos altos(K/ul)	0.000	11.45	Leucocitos altos(K/ul)	0.000	11.60
Eosinofilos altos (%)	0.000	1.20	Eosinofilos altos (%)	0.00	1.96
IgG RN (UI/mL)	0.000	49.35	IgG RN (UI/mL)	0.000	22 <sup>7</sup> <sub>1</sub>
IgM RN (AU/mL)	0.000	0.35	IgM RN (AU/mL)	0.000	0.28

\*Variable con distribución normal, se reporta media aritmética, SEG = Semanas de edad gestacional, BD = Bilirrubina directa.

### Comparación de los grupos de RN con SDR severo y SDR no severo.

Para las variables con distribución normal se aplicó la prueba *t* para muestras independientes asociando las variables con la severidad del SDR, tenemos que las variables con diferencia significativa en el grupo con mayor severidad del SDR fueron: plaquetas bajas, linfocitos altos, bilirrubina total (BT) y bilirrubina indirecta alta (BI). No se encontró diferencia de neutrófilos bajos entre ambos grupos. Ver tabla 15.

**Tabla 15. Asociación de variables con la severidad del SDR Hematología y pruebas de función hepática (prueba *t*)**

Variables	SDR Severo		SDR no Severo		t student
	Media ± D.E	<i>p</i>	Media ± D.E.	<i>p</i>	<i>p</i>
Neutrófilos (%)	29±21	0.20*	40±18	0.20*	0.318**
Plaquetas (%)	221±118	0.20*	233±73	0.20*	0.001**
Linfocitos (%)	50±19	0.20*	44±15	0.20*	0.029**
BT (mg/dL)	8±3	0.20*	9±4	0.20*	0.010**
BI (mg/dL)	7±4	0.20*	8±5	0.17*	0.016**

\* Pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov, distribución normal; \*\* Prueba *t* para muestras independientes.

Dentro de las variables que su distribución no fue exponencial se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para asociar las variables con la severidad del SDR, se reportó que la mayoría de las variables tuvieron diferencia significativa en el grupo con mayor severidad del SDR, estas fueron: peso, SEG, Hb. baja, monocitos altos, BD alta, leucocitos altos, eosinófilos altos. No se encontró diferencia en la IgG-CMV e IgM-CMV entre los grupos. Los demás datos se resumen en la tabla 16.

**Tabla 16. Asociación de variables con la severidad del SDR**  
**Variables biológicas, antropométricas y de laboratorio**  
**(Prueba U Mann Whitney)**

Variables	Mediana y R. I.	<i>p</i> *	Mediana y R.I.	<i>p</i> *	<i>p</i> **
Peso (g)	1500 (1278)	0.001*	2150 (1363)	0.000*	0.000**
Edad gestacional (SEG)	32 ±D.E. 4.2**	0.098***	35 (4)	0.043*	0.000**
Hemoglobina (g/dL)	15.2 (3.3)	0.024*	16.5 ±D.E. 2.4***	0.200**	0.000**
Monocitos (%)	7.8 (6.3)	0.000*	7.4 (3.6)	0.005*	0.000**
BD (mg/dL)	0.5 (0.4)	0.000*	0.4 (0.3)	0.000*	0.000**
Leucocitos (K/ul)	11.5 (13.6)	0.000*	11.6 (8.1)	0.000*	0.040**
Eosinofilos (%)	1.2 (1.3)	0.000*	1.95 (1.9)	0.000*	0.034**
IgG RN (UI/mL)	49.3 (49)	0.000*	226 (425)	0.000*	0.442**
IgM RN (AU/mL)	0.35 (0.34)	0.000*	0.28 (0.37)	0.000*	0.277**

BD = bilirrubina directa, R.I. = rango intercuartil, \*Prueba Kolmogorov Smirnov, distribución no normal,  
 \*\*Prueba U Mann Whitney, \*\*\* Variable con distribución normal, se reporta Media

### **Análisis univariado. Factores de riesgo asociados de SDR severo**

Para determinar los factores de riesgo asociados al SDR severo se utilizaron tablas de contingencia. En la tabla 17 se resumen las variables de las diversas patologías y de las patologías que resultaron con mayor asociación al grupo de RN con SDR severo fueron: miocardiopatía hipoxico-isquémica, hemorragia pulmonar, encefalopatía hipoxico isquémica, hemorragia intraventricular, insuficiencia renal aguda, choque séptico y foramen oval permeable entre otras.

**Tabla 17. Asociación de variables con la severidad del SDR  
Patologías (análisis univariado)**

Variable	IC (95%)			Valor <i>p</i>
	RM	LI	LS	
Miocardopatía hipoxico-isquémica	14.44	4	51.78	0.000
Hemorragia Pulmonar	13.85	2.96	64.66	0.001
Encefalopatía hipoxico-isquémica	13.56	5.19	35.45	0.000
Hemorragia intraventricular	12.13	2.57	57.2	0.002
Insuficiencia renal aguda	12.13	2.57	57.2	0.002
Choque séptico	11.66	3.7	36.44	0.000
Foramen oval permeable	11.04	3.02	40.38	0.000
Persistencia del conducto arterioso	7.65	2.84	20.58	0.000
Atelectasia pulmonar	6.77	1.32	34.57	0.021
Sx de aspiración de líquido amniótico	5.51	1.04	29.43	0.044
Sangrado de tubo digestivo alto	5.51	2.1	14.33	0.000
Hidrocefalia	5.27	1.55	17.86	0.008
Asfixia	5.139	2.68	9.82	0.000
Sepsis	4.6	2.21	9.58	0.000
Hipertensión pulmonar arterial	4.58	2.67	10.14	0.000
Enterocolitis necrotizante	4.25	1.93	9.1	0.000
Insuficiencia tricuspídea	3.96	1.11	14.06	0.033
Comunicación interauricular	3.92	1.35	11.32	0.012
Enfermedad de membrana hialina	2.95	1.59	5.49	0.001

LI: Límite inferior, LS: Límite superior.

Respecto a los resultados de las múltiples manifestaciones clínicas con mayor asociación a la severidad del SDR grupo de RN con la razón de momios (RM) más altas fueron: oliguria 16.69, crisis convulsivas 12.5, abdomen doloroso 11.18 y petequias 11.1, las otras variables asociadas se resumen en tabla 18.

**Tabla 18. Asociación de variables con la severidad del SDR  
Manifestaciones clínicas (análisis univariado)**

Variable	RM	IC (95%)		Valor p
		LI	LS	
Oliguria	16.69	3.63	76.60	0.000
Crisis convulsivas	12.50	4.44	35.18	0.000
Abdomen doloroso	11.18	1.27	97.86	0.000
Petequias	11.18	1.27	97.86	0.000
Hiperglicemia	9.03	2.83	28.75	0.000
Estenosis pulmonar	8.04	1.62	39.90	0.011
Acidosis metabólica	7.47	4.05	15.68	0.000
Hiporreflexia	6.77	1.32	34.57	0.021
Secreción pulmonar	6.38	3.29	12.38	0.000
Hipotensión	6.19	1.50	24.20	0.009
Precordio hiperdinámico	5.90	1.98	17.60	0.001
Poliuria	5.55	1.04	29.43	0.044
Estertores	5.48	2.81	10.70	0.000
Drenaje biliar	4.81	2.07	11.09	0.000
Broncoespasmo	4.48	1.08	18.45	0.038
Hepatomegalia	4.32	2.29	8.16	0.000
Bradycardia	4.19	1.92	9.14	0.000
Sibilancias	4.15	1.94	8.88	0.000
Terroso	4.15	1.94	8.88	0.000
Marmóreo	4.10	1.97	8.51	0.000
Hiporreactivo	3.81	1.97	7.34	0.000
Abdomen globosos	3.79	2.02	7.09	0.000
Edema	3.68	1.87	7.23	0.000
Respiración débil	2.83	1.15	6.97	0.023
Soplo cardíaco	2.62	1.20	5.72	0.015
Hipopertalsis	2.45	1.28	4.68	0.007
Taquicardia	2.27	1.06	4.86	0.034
Palidez	2.11	1.07	4.16	0.031
Ictericia	2.07	1.02	4.20	0.043

En la tabla 19 se condensan las variables hematológicas y pruebas de función hepática que presentaron mayor asociación a la severidad del SDR en el grupo de RN. Leucopenia y monocitosis fueron las variables de laboratorio que presentaron las RM más altas. No se asoció la severidad con la PCRtr/ADN-CMV SYBER Green reportando RM 0.85, IC 0.28-2.53 y con *p* de 0.990.

**Tabla 19. Asociación de variables con la severidad del SDR  
Pruebas de función hepática , Hematológicas y PCRtr/ADN-CMV en  
SYBER Green (análisis univariado)**

Variable	RM	IC (95%)		Valor <i>p</i>
		LI	LS	
Monocitos (%)	3.10	1.32	7.30	0.009
Linfocitos (%)	2.67	1.44	4.93	0.002
Neutropenia (%)	2.47	1.32	4.62	0.005
Leucopenia (%)	3.85	1.41	10.49	0.008
Trombocitopenia (%)	2.37	1.10	5.09	0.026
Bilirrubina directa alta (mg/dL)	1.91	1.02	3.57	0.041
PCR tiempo real /DNA-CMV (positiva)	0.85	0.28	2.53	0.990

LI: Límite inferior, LS: Límites superior

De las variables de salud materna y reproductiva, la que resultó con mayor asociación a la severidad del SDR fueron menos de 5 consultas maternas en el periodo del control prenatal con una RM de 14.31, ver tabla 20.

**Tabla 20. Asociación de variables maternas con la severidad  
del SDR**

Variabes maternas	RM	IC (95%)	Valor <i>p</i>
Cervicovaginitis	2.23	1.20-4.13	0.015
Infección urinaria	2.30	1.09-4.84	0.040
Menos de 5 consultas	14.31	4.93-41.48	0.000
Aplicación de esteroides	2.01	1.02-3.94	0.000

### **Análisis de la Regresión Logística Binaria no condicional**

El análisis de regresión logística binaria no condicional estableció cuatro variables significativas para la infección por CMV que fueron: cervicovaginitis, piel marmórea, neutropenia y trombocitopenia. El signo clínico que se asoció a la severidad del SDR fue piel marmórea. La neutropenia y trombocitopenia fueron datos indirectos de laboratorio de infección. El principal factor materno de asociación a la severidad del SDR fue cervicovaginitis (Tabla 21).

**Tabla 21. Regresión logística binaria de las variables significativas para la severidad del SDR**

Variable	Coefficiente B	Significancia	RM
Cervicovaginitis	4.462	0.021	86.66
Piel marmórea	4.164	0.033	64.31
Neutropenia	-0.121	0.040	0.88
Trombocitopenia	-0.024	0.025	0.97

## DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron 197 RN con SDR con el objetivo de determinar la asociación de la infección por CMV con la severidad del SDR en los RN, además determinar la frecuencia de RN con SDR e infección por CMV y asociar con otras variables la severidad del SDR.

El ensayo de PCRtr/ADN-CMV SYBER Green estandarizado para la detección de ADN-CMV permitió la determinación de la frecuencia de infección que fue del 8.66% de los RN con SDR, en un grupo de edad gestacional desde la semana 25 hasta infantes de término de 41 semanas.

La frecuencia de infección reportada en este trabajo se considera elevada al compararla con cifras actuales de otros centros hospitalarios en otras partes del mundo que manejan neonatos infectados y asintomáticos, reportando de 0.3-2 % en E.U, Israel (15), Europa (17) y España (9). Los resultados obtenidos en esta investigación nos permiten confirmar que la infección por CMV fue congénita y no postnatal mediante el análisis de algunos de los factores de riesgo de infección postnatal (56), según los cuales la terminación del embarazo fue en su mayoría por cesárea (76.47%), solo el 17.64 % se transfundió con hemoderivados y solo 2 RN recibieron leche materna sin ser estos datos significativos en el análisis (20).

La frecuencia del CMV en el grupo de RN con SDR severo fue de 7.8% y SDR no severo fue de 14.1% (6.3% para moderado y 7.8% para leve). Estos resultados no sugieren que exista una asociación entre la severidad del SDR y la infección por CMV.

Dependiendo de la infección en RN asintomáticos, se ha reportado previamente que la gran mayoría de las infecciones congénitas por CMV es por primoinfección materna durante el embarazo, lo que ocurre entre el 1 al 4% de las gestantes seronegativas (9, 20). En este caso, el 40% de los fetos se infecta y un 10% presenta síntomas al nacimiento, de éstos el 4% fallece y alrededor del 50% presenta secuelas permanentes (109, 110). La infección también puede ocurrir en

mujeres previamente inmunes por reactivación o reinfección viral. En esta situación, solo del 1-2% de los fetos se infecta y la gran mayoría de los infectados (> 90%) están asintomáticos al nacimiento (109). Un 10-15% de los niños con infección asintomática también presenta secuelas de la infección a largo plazo.

La frecuencia global de CMV en RN total pudo estimarse en 0.91% o mayor, (al multiplicar la frecuencia del CMV en RN con SDR; 8.66%, con la frecuencia de SDR en RN total; 10.46%), lo que concuerda con los reportes anteriores (0.3-2%) en Israel (15), Europa (17) y España (9). Se requiere realizar más estudios para precisar la cifra incluyendo RN asintomáticos.

En el grupo de RN con SDR infectados por CMV los signos clínicos más frecuentes fueron los mismos que han sido reportados previamente en la literatura. Estas manifestaciones clínicas son: letargia, hiperbilirrubinemia, sangrados, hipoventilación, estertores, tiraje costal y dibujo de asas, petequias, piel marmórea, hepatomegalia y fiebre entre otras. Estos signos clínicos son considerados como un alto riesgo para la vida (56, 110-113), aunque en nuestro grupo de estudio no se reportó epilepsia (111). En un estudio que incluyó a 25 RN candidatos con sospecha de infección por CMV en un periodo de 1991 a 2002, se reportaron 15 positivos a la antigenemia, y con anomalías en la frecuencia cardíaca fetal, petequias, desnutrición, trombocitopenia, parálisis cerebral infantil, retardo mental, neumonitis, epilepsia, sordera y retinitis (111), estas 3 últimas características no fueron evaluadas en nuestros pacientes por no tener seguimiento.

Las patologías predominantes en los pacientes incluidos en el estudio fueron: prematuridad, sepsis temprana, EMH, ictericia, sangrado de tubo digestivo alto, colestasis hepática y neumonía/neumonitis intrauterina; estas dos últimas son mencionadas en la literatura como casos aislados (52, 63), los resultados antes mencionados concordaron con estudios previamente realizados en Japón y en E.U.A. (17, 56, 111-113).

De los hallazgos de laboratorio más frecuentes en RN con CMV encontramos BI y directa alta, transaminasa glutámico oxalacética alta, además de trombocitopenia (70), neutropenia, basofilia y linfocitosis, alteraciones hematológicas asociadas a infección por CMV que ya han sido también reportadas previamente en la literatura, por lo tanto la presencia de estas alteraciones hematológicas indican una alta probabilidad de infección sintomática (9, 17, 56, 111-113).

En nueve RN con SDR leve detectamos infección por CMV con mínimas manifestaciones clínicas, situación preocupante si no es identificada la infección debido a que del 10 al 15 % de los niños asintomáticos presentarán secuelas neuromotoras y sensoriales permanentes (15, 17, 113).

En el presente estudio, el porcentaje de RN prematuros con SDR que resultaron positivos al ADN del CMV fue de 76.4 %, mayor a lo reportado en la literatura de un 2.3 a 38 % (56, 71), mientras que la tasa del PBN coincidió con lo reportado por Kylat (56,112). La prematurez y el PBN son las dos condiciones que incrementan el riesgo de infección congénita por CMV debido a la inmadurez del sistema inmunitario y a la baja concentración de las inmunoglobulinas maternas (20, 112). A lo largo de este estudio se observó una baja mortalidad de 5.88 % en comparación con Stagno que fue del 20 al 30% (109).

En la embarazada su primer contacto con el virus llamado primoinfección puede pasar inadvertido sin ningún síntoma, aunque se reporta que un 30% de los casos puede aparecer fiebre prolongada, un cuadro gripal o un síndrome mononucleósico con alteraciones en las pruebas de laboratorio como es linfocitosis, trombocitopenia y aumento en las enzimas hepáticas, en este periodo la infección fetal puede ocurrir durante todo el embarazo. La demostración de seroconversión utilizando IgG-CMV e IgM-CMV es uno de los métodos más utilizado para el diagnóstico de infección primaria durante el embarazo, sin embargo, al no realizarse estos estudios de rutina en el control prenatal y así también posterior al parto, sobre todo cuando se sospeche de RN infectado, ha

sido una de las limitantes para poder realizar el diagnóstico de primo infección, reinfección o superinfección en la madre durante su embarazo o en periodo del posparto. Una limitante en esta investigación es que el diagnóstico serológico materno no se realizó, desconociendo si ocurrió seroconversión en las madres durante el embarazo, reinfección o superinfección por falta de varias determinaciones serológicas de IgG-CMV e IgM-CMV. El 94.11% de las madres de los RN con SDR infectados por CMV tuvieron IgG-CMV positiva, al igual comparado con lo reportado en otros países latinoamericanos, según lo cual del 60 al 80% de las mujeres entre 20 a 40 años ya se han expuesto al virus (105, 114).

En la literatura se han identificado factores socioculturales en los que se aprecia el nivel socioeconómico bajo, madres trabajadoras en su mayoría y bajo grado de escolaridad que conllevan a un desconocimiento de la enfermedad y a un inadecuado control prenatal (9, 20, 112, 114-116). En este estudio el factor de riesgo materno más significativo fue cervicovaginitis, menos de cinco consultas, además que la mayoría de las madres fueron seropositivas a IgG-CMV, de nivel socioeconómico bajo, que laboraron fuera del hogar, cursaron con infección de vías urinarias, con antecedente de parto pretérmino y 12 de las 17 madres presentaron infección respiratoria alta manifestada como cuadro gripal, tos, odinofagia, fiebre y cefalea (9, 20, 115, 117).

Los resultados de la seropositividad a IgG-CMV incluyendo IgM-CMV en los RN con SDR fue 93.9 %. Solo 2 pacientes de 40 madres IgM-CMV positiva fueron PCRtr positivos, cuando la tasa de transmisión *in útero* de madre con IgM-CMV positiva es de 35-40% (9), debido probablemente a inmadurez inmunológica y ausencia de transmisión transplacentaria, los resultados de la baja sensibilidad diagnóstica que tienen las pruebas serológicas para la detección de la infección congénita, debido probablemente a las bajas concentraciones de IgM-CMV no se detectaron por los reactivos utilizados. En el periodo de estudio se reportaron 15

RN con IgM positiva (>1.0 UA/mL) pero con PCRtr/ADN-CMV negativa, en estos neonatos la BHC y PFH fueron normales, 6 de los neonatos cursaron con SDR severo y 4 neonatos reportaron SDR moderado, además de presentar cuadros de neumonía y septicemia y 6 de ellos con malformaciones congénitas. No se descartó que estos resultados pudieran haber sido por reacciones cruzadas por ejemplo el factor reumatoide y sobre todo con otros virus de la familia de los Herpesvirus y/o con otros subtipos de CMV, por tratarse de miembros de la familia Herpesviridae, los cuales comparten alrededor del 70 a 80% de su secuencia génica. (118).

Se podría mejorar la sensibilidad y/o implementar la estandarización de una PCR cuantitativa en futuro, con sondas TaqMan y/o utilizar otros blancos de genes reportados en literatura como pp65 , UL 83 , UL 54, UL69 (105, 119-122).

La detección de altos títulos de IgG-CMV en combinación con hallazgos hematológicos, signos clínicos, y factores de riesgo materno puede considerarse como una evidencia que sustenta la infección congénita. Sin embargo los 17 pacientes con CMV todos positivos a IgG-CMV, los títulos más bajos de esta inmunoglobulina fue para los casos de RN con SDR severo, por lo que IgG-CMV demuestra limitaciones en el diagnóstico temprano de CMV. La determinación de IgG e IgM contra CMV es la prueba más utilizada en los RN en países en vías de desarrollo. Ninguno de los 17 pacientes positivos a PCRtr/ADN-CMV presentó IgM positivo.

La frecuencia de SDR en RN total durante el periodo de estudio fue de 10.46%, menor que lo reportado a nivel mundial de 15 a 50% (87). La mayoría de los pacientes fueron prematuros y con peso adecuado al nacer, al igual que a otros estudios en México (123) y en Cuba (124), la única diferencia fue la distribución del sexo (65.4% hombre y 35.5% mujer en este trabajo) (58, 87).

Las manifestaciones clínicas frecuentes de los pacientes fueron ictericia 70.1%, tiraje costal 64.5% y estertores 48.2%.

Las patologías más repetitivas en los 197 pacientes fueron prematuridad, sepsis y neumonía, mientras en el estudio de Castro L. y col. reportaron TRN, EMH y SAM. Los factores que se identificaron como contribuyentes a la severidad fueron las patologías de gravedad con las que cursaron los RN y entre estas: miocardiopatía hipoxico-isquémica, hemorragia pulmonar, encefalopatía hipoxico-isquémica, y hemorragia interventricular, insuficiencia renal aguda y choque séptico; manifestándose clínicamente con oliguria, crisis convulsivas, abdomen doloroso, petequias, hiperglicemia y estenosis pulmonar.

En los grupos infectados por CMV y no infectados la diferencia en porcentaje e intervalos de confianza fueron neutropenia, linfocitosis, basofilia, trombocitopenia y transaminasemia, datos que no se pudieron comparar a otros estudios por no encontrarse referidos en la literatura (Tabla 12).

Cuando se realizó la asociación de variables de pruebas de función renal, hepática, hematológica y PCRtr/ADN-CMV con la severidad del SDR, las variables con mayor significancia fueron: leucopenia, monocitosis, linfocitosis, neutropenia, trombocitopenia e hiperbilirrubinemia, sin asociarse la PCRtr/ADN-CMV, tampoco se pudieron comparar estos resultados por no encontrarse referidos en la literatura. De los factores de riesgo materno para SDR reportado en el estudio que fueron cervicovaginitis, menos de 5 consultas durante el embarazo, infección urinaria y aplicación de esteroides, mientras en estudios anteriores se reportaron como factor materno que contribuyeron a SDR de RN diabetes y amenaza de aborto en México (123) y RPM, hábitos tóxico y madres diabéticas en Cuba (124).

En la regresión logística se determinaron las principales variables significativas para la severidad del SDR en los RN y lo reportado fue neutropenia y trombocitopenia como datos indirectos de sepsis temprana, predominando el signo clínico de piel marmórea y como factor materno principal fue la cervicovaginitis.

La mortalidad en los pacientes con SDR a lo largo de este estudio fue de 10.65 % (21/197) correspondiendo el 4% (8/197) en RN inmaduros menores de 28 SEG, 4% (8/197) en RNPT de 28 a 36 SEG y 2.5% (4/197), en RNT mayor de 37 SEG. De los 21 RN fallecidos, uno de ellos fue positivo a ADN CMV positivo y 9 presentaron desde su ingreso SDR severo y 2 con SDR moderado los cuales posteriormente se agravaron.

## **CONCLUSIONES**

En el HGP/MF No. 31, Mexicali, la frecuencia de RN con SDR durante el periodo estudiado fue de 10.46% (778/7437 RN total).

En la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, se implementó una prueba de PCR SYBR Green para la detección del ADN-CMV que permitió determinar la frecuencia (8.6%) de la infección congénita por CMV en los RN con SDR.

No se rechazó la Hipótesis Nula planteada del estudio por lo que no hay evidencia de que la infección congénita por CMV estuviera asociada a la severidad del SDR en los RN.

Se encontró una asociación de otros factores con la severidad del SDR, como son piel marmórea, neutropenia y trombocitopenia como datos indirectos de sepsis, y la cervicovaginitis como el principal factor de riesgo materno.

La prueba de PCRtr/ADN-CMV SYBER Green tuvo mayor capacidad de detección temprana del CMV que la serología de IgM-CMV en los RN.

## **RECOMENDACIONES**

La detección de infección por CMV en RN tiene limitantes debido a la disponibilidad y el costo de pruebas para tamizaje y de diagnóstico en los centros hospitalarios.

Sospecha de RN infectado asintomático o con sintomatología como SDR y factores de riesgo perinatales: de madres VIH (+), de madres que no tuvieron control prenatal o sin un control prenatal adecuado y cursaron con cervicovaginitis e infección de vías urinarias; prematuros y menores de 32 semanas y de 1500 g, o peso normal al nacer.

Dar seguimiento a los RN con CMV ingresándolos a un grupo multidisciplinario para su rehabilitación, con el objetivo de disminuir las secuelas y el impacto económico al sistema de salud.

## **AGRADECIMIENTOS**

Equipo de trabajo IMSS, Dra. Rosalía Lira, QBP María Teresa Álvarez y Muñoz, M en C Angélica Maldonado Rodríguez, y al Biol Othón Rojas Montes.

Dr. Ricardo de León Figueroa, Dr. Eduardo Romero Martínez y personal que trabaja en el laboratorio del Hospital General de Zona No. 30.

Equipo de trabajo UABC, Dra. Sawako Oshima, MC Carmelita Gorety Soria Rodríguez, MC Rafael Ayala Figueroa y Dra. Julia Estrada Guzmán.

A Ivet Borja y a la empresa Distribuidor Científico Pallach Tijuana (DICIPA) por la donación de reactivos IgG-CMV e IgM-CMV y consumibles para la realización de pruebas serológicas con un costo de 65,000.00 m.n.

FINANCIAMIENTO. Una parte de este proyecto fue realizada con el Apoyo Financiero del Fondo de Investigación en Salud, IMSS, (200,000.00m.n.). (FIS/IMSS/PROT/MD13/1255/3).

## DIFUSIÓN

- I. Se publicó en revista científica con arbitraje estricto (Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2015; 53(3):286-93).
- II. Tesis de Doctorado en Ciencias de la Salud.
- III. El trabajo fue presentado en Seminario de Investigación en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Nacional Siglo XXI y en el Seminario de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Baja California Campus Mexicali.
- IV. El trabajo fue presentado en Congresos Nacionales y Estatales:
  - 1er Congreso de Investigación en Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma de Baja California, Unidad Valle Dorado, Escuela de Ciencias de la Salud. 6 de Septiembre del 2012, Ensenada Baja California.
  - XXXVIII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. Guadalajara Jalisco. Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica A.C. 30 de Mayo de 2013.
  - 7ª Reunión de Investigación Pediátrica y 4ª Reunión de Investigación en Enfermería Pediátrica. Unidad Médica de Alta Especialidad. Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. 28 al 30 de Agosto del 2013.
  - XXII Foro Nacional de Investigación en Salud. IMSS. Oaxtepec México. 5 al 8 de Noviembre del 2013.
  - XX Foro Norte de Investigación en Salud. IMSS. Universidad de Sonora. Hermosillo Sonora. 28 al 30 de Mayo del 2014.
  - XXI Foro Norte De Investigación En Salud. IMSS. Aguascalientes, Aguascalientes. 27 al 29 de mayo del 2015.
  -

## REFERENCIAS

1. Bughio F, Umashankar M, Wilson J, Goodrum F. Human cytomegalovirus UL135 and UL136 genes are required for postentry tropism in endothelial cells. *J Virol*. 2015; 89(13):6536-6550.
2. Plosa EJ, Esbenshade JC, Fuller MP, Weitkamp JH. Cytomegalovirus Infection. *Pediatrics in Review*. 2012;33(4):156-163.
3. Sissons JG, Wills MR. How understanding immunology contributes to managing CMV disease in immunosuppressed patients: now and in future. *Med Microbiol Immunol*. 2015;204(3):307-316.
4. Hadar E, Salzer L, Dorfman E, Amir J, Pardo J. Antenatal risk factors for symptomatic congenital CMV disease following primary maternal CMV infection. *J Perinat Med*. ISSN (Online) 1619-3997, ISSN (Print) 0300-5577, DOI: 10.1515/jpm-2014-0322, August 2015.
5. Simioni C, Sánchez ORC, Mosconi T, D' Agostini DA, Cordioli E, Santos E. Twin pregnancy and congenital cytomegalovirus: case report and review. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013; 26(6):622-624.
6. García Ruiz N, García Picazo L, Iglesias Goy E. Citomegalovirus y embarazo. *Ginecol Obstetr Clín*. 2004;5(3):156-169.
7. Ahlfors K, Ivarsoon SA, Johnsson T, Svanberg L. Primary and secondary maternal cytomegalovirus infections and their relation to congenital infection. Analysis of maternal sera. *Acta Paediatr Scand*. 1982; 71:109-113.
8. Lanzieri TM, Dollard SC, Bialek SR, Grosse SD. Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries. *IJID* 2014; 44–48.
9. Baquero-Artigao F. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre el diagnóstico y el tratamiento de la infección congénita por citomegalovirus. *An Pediatr (Barc)* 2009;71(6):535–547.

10. Jaramillo Rangel G, Novak IS, Ortega Martínez MG, Ramírez Rodríguez C, Ancer Rodríguez J, Trujillo JR. Neurotropismo del citomegalovirus. *Rev Mex Neuroci* 2005; 6(5):399-410.
11. Zhou M, Lanchy JM, Ryckman BJ. Human cytomegalovirus gH/gL/gO promotes the fusion step of entry into all cell types, whereas gH/gL/UL128-131 broadens virus tropism through a distinct mechanism. *J Virol.* 2015; 89(17):8999-9009.
12. Liu Z, Zhang P, Tang S, He X, Zhang R, Wang X y col. Urine real-time polymerase chain reaction detection for children virus pneumonia with acute human cytomegalovirus infection. *BMC Infect Dis.* 2014;14:1-9.
13. Kylat RI, Kelly EN, Ford-Jones EL. Clinical findings and adverse outcome in neonates with symptomatic congenital cytomegalovirus (SCCMV) infection. *Eur J Pediatr.* 2006; 165(11):773-778.
14. Lanari M, Lazzarotto T, Venturi V, Papa I, Gabrielli L, Guerra B, Landini MP, Faldella G. Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns. *Pediatrics.* 2006; 117:e76-e83.
15. Barkai G, Barzilai A, Mendelson E, Tepperberg-Oikawa M, Roth DA, Kuint J. Newborn screening for congenital cytomegalovirus using real-time polymerase chain reaction in umbilical cord blood. *Isr Med Assoc J.* 2013; 15(6):279-283.
16. Zhang Q, Gao Y, Peng Y, Fu M, Liu YQ, Zhou QJ et al. Epidemiological survey of human cytomegalovirus antibody levels in children from Southeastern China. *Virol J.* 2014; 123:1-6.
17. Ludwig A, Hengel H. Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *EUROSURVEILLANCE* 2009; 14(9) [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org).
18. Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol* 2008; 197:65-73.

19. Kluge RC, Wicksman RS, Weller TH. Cytomegalic inclusion disease of the newborn: report of case with persistent viruria. *Pediatrics*. 1960;25:35–39.
20. Alarcón Allen A, Baquero-Artigao F. Grupo de estudio de la infección por citomegalovirus de la Sociedad Española de Infectología. Revisión y recomendaciones sobre la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección posnatal por citomegalovirus. *An Pediatr (Barc)*. 2011; 74(1):52.e1-52.e13.
21. Pellett PE, Roizman B. The family herpesviridae: A brief Introduction. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2480-2497.
22. Mocarski ES, Shenk T, Pass R. Cytomegaloviruses. In: P.M. H, Knipe DM, editors. *Fields Virology*, 5th Edition. Philadelphia: Lippincotts Williams and Wilkins; 2007. p. 2702-2757.
23. Boza Cordero R. Citomegalovirus: De la infección neonatal a las infecciones en pacientes trasplantados y de la citomegalia a la Biología Molecular. *Rev CI EMed URC*. 2012; 2:5-23.
24. Chandramouli S, Ciferri C, Nikitin PA, Caló S, Gerrein R, Balabanis K et al. Structure of HCMV glycoprotein B in the postfusion conformation bound to a neutralizing human antibody. *Nat Commun*. 2015; 6:8176:1-12.
25. Copyright–\*97 Rschke M. The Big Picture Book of Virus – Herpesvirus. [http://www.virology.net/Big:\\_Virology/BVDNAherpes.html](http://www.virology.net/Big:_Virology/BVDNAherpes.html).
26. Brennan DC. Cytomegalovirus in Renal Transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12:848-855.
27. Sanbonmatsu GS, Pérez RM, José María Navarro MJM. Infección por citomegalovirus humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014; 32(1):15-22.
28. Medina JC, Pérez-Sartori G, Caltenco-Serrano R, Aguado JM. Immunologic response and pathogenic mechanisms of cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Trends Transplant*. 2009; 3:103-112.

29. [https://prezi.com/xtkwvl\\_liij\\_/citomegalovirus/?utm\\_campaign=share&utm\\_medium=copy](https://prezi.com/xtkwvl_liij_/citomegalovirus/?utm_campaign=share&utm_medium=copy)
30. Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stolc V y col. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100(24):14223-14228.
31. Drew WL. Cytomegalovirus resistance testing: pitfalls and problems for the clinician. *CID.* 2010; 50:733-736.
32. Oyarzún MA, Bustos P, González M, Domínguez MI, Aguayo F, Nervi B y col. Búsqueda de mutaciones en el gen UL 97 asociadas a resistencia a ganciclovir en citomegalovirus obtenidos desde muestras biológicas de pacientes chilenos. *Rev Med Chile.* 2010; 138:421-427.
33. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4:725-738.
34. Humar A, Kumar D, Gilbert C, Bolvin G. Cytomegalovirus (CMV) Glycoprotein B genotypes and response to antiviral therapy in solid-organ-transplant recipients with CMV disease. *J Infect Dis.* 2003; 188:581-584.
35. Isaacson MK, Compton T. Human cytomegalovirus glycoprotein B is required for virus entry and cell-to-cell spread but not for virion attachment, assembly, or egress. *J Virol.* 2009; 83(8):3891-3903.
36. Villalba-Magdaleno JDA, Valdés-Espinosa R. Las citocinas en la patogénesis por citomegalovirus. Revisión. *Rev Biomed.* 2000; 11:293-300.
37. DeVries J. The ABCs of CMV. *Adv Neonatal Care.* 2007;7:248-255.
38. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus and newborn infant. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(4):680-715.
39. Arvin AM, Fast P, Myers M, Plotkin S, Rabinovich R. Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease: report from the National Vaccine Advisory Committee. *Clin Infect Dis.* 2004; 39(2):233-239.

40. Collinet P, Subtil D, Houfflin-Debargue V, Kacet N, Dewilde A, Puech F. Routine CMV screening during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004; 114(1):3-11.
41. Britt W. Human cytomegalovirus infections and mechanisms of disease. In: Reddehase MJ, editor. *Cytomegaloviruses molecular biology and immunology.* Mainz: Caister Academic Press; 2006. p. 2-43.
42. Arnoult D, Skaletskaya A, Estaquier J, Dofour C, Goldmacher V. The murine cytomegalovirus cell death suppressor m38.5 binds bax and blocks bax-mediated mitochondrial outer membrane permeabilization. *Apoptosis.* 2008; 13:1100–1110.
43. Cam M, Handke W, Picard-Maureau, Brune M. Cytomegaloviruses inhibit bak- and bax-mediated apoptosis with two separate viral proteins. *Cell Death Diff.* 2010; 17:655–665.
44. Crough T, Khanna R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2009; 22:76-97.
45. Slobedman B, Stern JL, Cunningham AL, Abendroth A, Abate DA, Mocarski ES. Impact of human cytomegalovirus latent infection on myeloid progenitor cell gene expression. *J Virol.* 2004; 78:4054-4062.
46. Nigro G, Anceschi MM, Cosmi EV. Clinical manifestations and abnormal laboratory findings in pregnant women with primary cytomegalovirus infection. *BJOG.* 2003; 110(6):572-577.
47. Guerra B, Simonazzi G, Puccetti C, Lanari M, Farina A, Lazzarotto T y col. Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 198(4):380e1-7. PMID: 18191802.
48. Michaels MG. Treatment of congenital cytomegalovirus: where are we now? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007; 5(3):441-448.
49. Hassan J, Dooley S, Hall W. Immunological response to cytomegalovirus in congenitally infected neonates. *Clin Exp Immunol.* 2007; 147: 465-471.

50. Tsutsui Y, Kosugi I, Kawasaki H, Arai Y, Han GP, Li L y col. Roles of neural stem progenitor cells in cytomegalovirus infection of the brain in mouse models. *Pathol Int.* 2008; 58:257-267.
51. Bradshaw JH, Moore PPC. Perinatal cytomegalovirus infection associated with lung cyst. *J. Paediatr Child Health.* 2003; 39:563-566.
52. Choi J, Kim YS, Kim MS, Callaway Z, Youn UK, Kim HB y col. Acute respiratory distress syndrome by cytomegalovirus infection in an immunocompetent Infant. *Pediatric Pulmonology.* 2008; 43:824-827.
53. Takahashi R, Tagawa M, Sanjo M, Chiba H, Ito T, Yamada M y col. Severe postnatal cytomegalovirus infection in a very premature infant. *Neonatology.* 2007; 92:236-239.
54. Susumura H, Sakurai K, Kano K, Ichimura T. Chronic respiratory failure after acquired cytomegalovirus infection in a very low birth weight infant. *Acta Paediatr Jpn.* 1996; 38:677-680.
55. Trincado DE, Rawlinson WD. Congenital and perinatal infections with cytomegalovirus. *J Paediatr Child Health.* 2001; 37:187-192.
56. Kylat RI, Kelly EN, Ford-Jones EL. Clinical findings and adverse outcome in neonates with symptomatic congenital cytomegalovirus (SCCMV) infection. *Eur J Pediatr.* 2006; 165(11):773-778.
57. Seale H, Booy R, MacIntyre CR. Trends in hospitalizations for diagnosed congenital cytomegalovirus in infants and children in Australia. *BMC Pediatr.* 2009; 26(9):1-7. doi: 10.1186/1471-2431-9-7.
58. Guía de práctica clínica del recién nacido con trastorno respiratorio. Sistema General de Seguridad Social en Salud Colombia Guía para profesionales de la salud 2013 Guía No. 05.
59. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Cristina P, Pinto G, Morales Figueiredo LT, Jorge SM. Congenital cytomegalovirus infection in preterm and full-term newborn infants from a population with a high seroprevalence rate. *Pediatr Infect Dis J.* 2001;20(2):188-192.

60. Azam AZ, Vial Y, Fawer CL, Zufferey J, Hohlfeld P. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol.* 2001; 97:443-448.
61. Benoist G, Salomon LJ, Jacquemard F, Daffos F, Ville Y. The prognostic value of ultrasound abnormalities and biological parameters in blood of fetuses infected with cytomegalovirus. *BJOG.* 2008; 115:823-829.
62. Siret D, David V. Treatment of cytomegalovirus pneumonia with ganciclovir in an immunocompetent infant. *Archives de Pédiatrie.* 2002; 9(5):499-502.
63. Sritippayawan S, Jitchaiwat S, Chatchatee P, Prapphal N, Deerojanawong J, Samransamruajkit R. Disseminated cytomegalovirus infection associated with pneumocystis carinii pneumonia in a previously normal infant. *Scand J Infect Dis.* 2005; 312-314.
64. Pass RF, Zhang C, Evans A, Simpson T, Andrews W, Huang M-L y col. Vaccine Prevention of Maternal Cytomegalovirus Infection. *N Engl J Med.* 2009; 360:1191-1199.
65. Del Rosal T, Baquero-Artigao F, Blázquez D, Noguera-Julian A, Moreno-Pérez D, Reyes A y col. Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection beyond the neonatal period. *J Clin Virol.* 2012; 55(1):72-74.
66. González-García CL, Reyes-Méndez MA, Ortega-Pierres LE, Rodríguez-Sánchez AP, Sandoval-Guido V, Sereno-Coló JA. Seroprevalence and detection of primary infection by cytomegalovirus with IgG avidity test during the first quarter of pregnancy. *Salud Pública Mex.* 2014; 56:619-624.
67. Polanco-Marín GG, Puerto FI, Puerto-Solís M, González-Losa MR, Albertos-Alpuche NE, Baeza-Bacab MA. Prevalencia e incidencia de infección por citomegalovirus en mujeres embarazadas del estado de Yucatán, México. *Rev Biomed* 1996; 7:127-131.
68. Distéfano AL, González CA, Pardón F, Sarubi MA, Canero Velazco C. Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in newborn dried blood

- spots on Guthrie cards. A promissory technique. *Arch Argent Pediatr.* 2008; 106(2):132-137.
69. Noyola DE, Mejía-Elizondo AR, Canseco-Lima JM, Allende-Carrera R, Hernández-Salinas AE, Ramírez-Zacarías JL. Congenital cytomegalovirus infection in San Luis Potosí, México. *Pediatr Infect Dis J.* 2003; 22(1):89-90.
70. Noyola D, Matienzo-Serment L, Rodríguez-Vidal S, Ochoa-Pérez U, Piña-Granja J, García-Sepúlveda C. Congenital cytomegalovirus infection in newborn infants from the state of San Luis Potosí, México. *Salud Pública Mex.* 2011; 53(6):513-515.
71. Botet F, Figueras Aloy J, Álvarez E, de Alba C, Dorronsolo I, Echaniz Urcelay I y col. Universal cytomegalovirus infection screening in premature newborns less than 1500 g. *An Pediatr (Barc).* 2014; 81(4):256.e1-4. 10.1016/j.anpedi.2014.01.011. Epub 2014 Feb 21.
72. Distefano AL, Alonso A, Martín F, Pardon F. Human cytomegalovirus: detection of congenital and perinatal infection in Argentina. *BMC Pediatr.* 2004; 4(11):1-8.
73. Donner C, Liesnard C, Content J, Busine A, Aderca J, Rodesch. Prenatal diagnosis of 52 pregnancies at risk for congenital cytomegalovirus infection. *Obstet Gynecol.* 1993; 82:481-486.
74. Lynch L, Daffos F, Emanuel D, Giovannardi Y, Meisel R, Forestier F y col. Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:714-718.
75. Navarro Ortega D. Diagnóstico serológico de la infección por el citomegalovirus humano. Servicio de Microbiología. Hospital Clínico y Facultad de Medicina. Valencia. <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/serocmv.pdf>
76. Gonzales-Sánchez H, Alvarado-Hernández D, Guerra-Palomares S, García-Sepúlveda CA, Noyola DE. Cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Mexican children and women. *Intervirology.* 2015; 58:115-121.

77. Hernández-Hernández FC, Rodríguez MH. Avances biotecnológicos en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. *Salud Pública Mex.* 2009; 51 suppl 3:S424-S438.
78. Cassey PH. Growth patterns of low birth weight preterm infants: A longitudinal analysis of a large, varied sample. *J Pediatr.* 1990; 117(2):298-306.
79. Lubchenco LO, Hansman C, Boyd E. Intrauterine growth in length and head circumference as estimated from live births at gestational ages from 26 to 42 weeks. *Pediatrics.* 1966; 37:403-408.
80. Kimberly GL, Choherty J.P. Identificación del recién nacido de alto riesgo y valoración de la edad gestacional. Prematuridad, hipermadurez, peso elevado y bajo peso para su edad gestacional. *El Manual de Cuidados Neonatales.* Edt Choherty J P, Eichenwald E.C., Stark A.R. 4 Ed (Barc) 2005, 3:50-66.
81. Ballard JL, Khoury JC, Wedig K, Wang L, Eilers-Walsman. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr.* 1991; 119:417-423.
82. Ross G. Growth achievement of very birth weight premature children at school age. *J Pediatr.* 1990; 117(2):307-309.
83. González de Dios J, Moya M, Merino G, Zorraquino A. Estudios de infección connatal (TORCH) en el período neonatal: ¿uso o abuso? *Prog Obstet Ginecol.* 1998; 41:207-214.
84. Smithers-Sheedy H, Raynes-Greenow C, Badawi N, Khandaker G, Menzies R, Jones CA. Cytomegalovirus-related childhood mortality in Australia 1999-2011. *J Paediatr Child Health.* 2015;51(9):901-905.
85. Diagnóstico y tratamiento de síndrome de dificultad respiratoria en el recién nacido. *Guías de práctica clínica.* Secretaria Nacional de Salud, México: 2009.

86. Molina Robinson FJ. Valoración de Silverman-Andersen. Rev Sal Quintana Roo. 2009;2(10):14.
87. NOM-034-SSA-2002. Para la prevención y control de los defectos al nacimiento.
88. Liu S, Tong X. The clinical comparative study of preterm respiratory distress syndrome and transient tachypnea of newborn. Zhonghua Er Ke Za Zhi. 2015; 53(2):104-108.
89. Liu J, Shi Y, Dong JY, Zheng T, Li JY, Lu LL y col. Clinical characteristics, diagnosis and management of respiratory distress syndrome in full-term neonates. Chin Med J (Engl). 2010; 123(19):2640-2644.
90. Sun H, Xu F, Xiong H, Kang W, Bai Q, Zhang Y y col. Characteristics of respiratory distress syndrome in infants of different gestational ages. Lung. 2013; 191(4):425-33.
91. Smolarova S, Kocvarova L, Matasova K, Zibolen M, Calkovska A. Impact of updated European Consensus Guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome on clinical outcome of preterm infants. Adv Exp Med Biol. 2015; 835:61-66.
92. Pérez-Rodríguez J, Elorza D. Dificultad respiratoria en el recién nacido. Etiología y diagnóstico. An Pediatr Contin. 2003; 1(2):57-66.
93. Tapia IJL, Ventura-Juncá P. Problemas respiratorios del recién nacido. <http://escuela.med.pub.cl>
94. Baschat AA. Pathophysiology of fetal growth restriction: implications for diagnosis and surveillance. Obstet Gynecol Surv. 2004; 59:617-627.
95. Burke CJ, Tannenbergs AE, Payton DJ. Ischemic cerebral injury, intrauterine growth retardation, and placental infarction. Dev Med Child Neurol. 1997; 39:726-730.
96. Mazon MC, Cordovi-Voulgaropoulos L, Perol Y. Transient hydrops fetalis associated with intrauterine cytomegalovirus infection: prenatal diagnosis. Obstet Gynecol. 1994; 84:692-694.

97. Haginoya K, Ohura T, Kon K, Yagi T, Sawaishi Y, Ishii KK et al. Abnormal white matter lesions with sensorineural hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection: retrospective diagnosis by PCR using Guthrie cards. *Brain Dev.* 2002; 24:710-714.
98. Malm G, Engman ML. Congenital cytomegalovirus infections. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine.* 2007; 12:154-159.
99. Martínez Contreras AM, Soria Rodríguez GS, Prince Vélez R, Clark Ordoñez I, Medina Ramírez MCR. Preeclampsia: principal factor de riesgo materno para bajo peso del recién nacido pretérmino. *Ginecol Obstet Mex* 2008; 76(7):398-403.
100. Xanthou M. Immunologic deficiencies in small-for-dates neonates. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1985; 319:143-149.
101. Ross G, Lipper EG, Auld PA. Growth achievement of very low birth weight premature children at school age. *J Pediatr.* 1990; 117: 307-309.
102. Schulzke S, Bühner C. Valganciclovir for treatment of congenital cytomegalovirus infection. *Eur J Pediatr.* 2006 ;(165):575-576.
103. Adler SP, Nigro G, Pereira L. Recent advances in the prevention and treatment of congenital cytomegalovirus infections. *Sem Per.* 2007:10-18.
104. Mattes FM, Hainsworth EG, Hassan-Walker AF, Burroughs AK, Sweny P, Griffiths PD y col. Kinetics of cytomegalovirus load decrease in solid-organ transplant recipients after preemptive therapy with valganciclovir. *JID.* 2005; 191:89-92.
105. Atkinson C, Walter S, Sharland M, Tookey P, Luck S, Peckham C, Griffiths P. Use of stored dried blood spots for retrospective diagnosis of congenital CMV. *J Med Virol.* 2009; 81:1394-1398.
106. NOM 087-ECOL-SSA1-2002. Medidas de seguridad en el manejo de materiales de desecho y residuos biológicos.
107. Declaración de Helsinki de la AMM. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 2013.

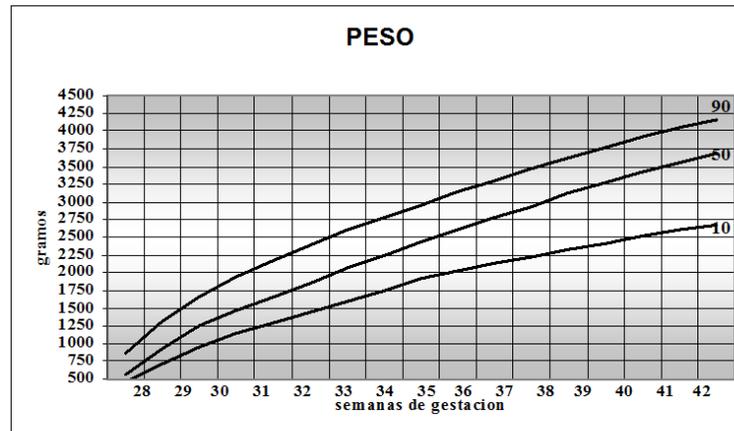
108. Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequela and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol.* 2007; 17:353-363.
109. Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, y col. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA.* 1986; 256(14):1904-1908.
110. Verboon-Maciolek MA, Krediet TG, Gerards LJ, Fleer A, van Loon TM. Clinical and epidemiologic characteristics of viral infections in a neonatal intensive care unit during a 12-year period. *Pediatr Infect Dis J.* 2005; 24:901-904.
111. Kaneko M, Sameshima H, Ikenoue T, Kusumoto K, Minematsu T. Clinical importance of cytomegalovirus antigenemia for intrauterine cytomegalovirus infection. *Pediatr Int.* 2009; 51(1):1-4.
112. Turner KM, Lee HC, Boppana SB, Carlo WA, Randolph DA. Incidence and impact of CMV infection in very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2014; 133:e609-e615.
113. Kang JW, Kim GN, Kim SY, Kim HJ, Park ES, Kim JY y col. Clinical and radiologic evaluation of cytomegalovirus-induced thrombocytopenia in infants between 1 and 6 months of age. *Korean J Hematol.* 2010; 45(1):29-35.
114. Barbi M, Binda S, Caropoo S, Primache V. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *J Clin Virol.* 2006; 35(2):206-209.
115. Fowler KB, Pass RF. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women: exposure to young children and recent onset of sexual activity. *Pediatrics.* 2006; 118(2):e286-e292.
116. Staras SA, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis.* 2006; 43(9):1143-1151.

117. Dar L, Pati SK, Patro AR, Deorari AK, Rai S, Kant S y col. Congenital cytomegalovirus infection in a highly seropositive semi-urban population in India. *Pediatr Infect Dis J*. 2008; 27:841-843.
118. Philco W, Terceros P, Terrazas K, Carvajal R. Estudio de frecuencia de casos de infección por citomegalovirus humano: Interpretación de los resultados de serología. *Vis Cientí*. 2007; 2(1):47-55.
119. Schleiss MR, Lacayo JC, Belkaid Y, McGregor A, Stroup G, Rayner J y col. Preconceptual administration of an alphavirus replicon UL83 (pp65 Homolog) Vaccine induces humoral and cellular immunity and improves pregnancy outcome in the guinea pig model of congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis*. 2007; 195(6):789-798.
120. Habbal W, Monem F, Gärtner BC. Comparative evaluation of published cytomegalovirus primers for rapid real-time PCR: which are the most sensitive? *J Med Microbiol*. 2009; 58(7):878-883.
121. Farfán UMJ, Torres TJP, Vergara AA, Donoso WG, Alba GA, Paris DC y col. Comparación de las técnicas de reacción de polimerasa en cadena en tiempo real y antigenemia para la detección de citomegalovirus en sangre de niños sometidos a trasplantes. *Rev Chil Infectol*. 2011; 28 (20):113-117.
122. Gómez-Marqués G, Alonso-Hernández A, Bayés B, Bernal G, Fernández AM, Franco A, et al. Diagnóstico de la infección por citomegalovirus. *Nefrología Sup Ext*. 2012; 3(1):14-20.
123. López-Candiani C, Santamaría-Arza C, Macías-Avilés HA, Cruz-Galicia J. Dificultad respiratoria por deficiencia de surfactante en un hospital público de tercer nivel sin maternidad. Factores asociados a mortalidad. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2010; 67:98-107.
124. Castro López FW, Labarrere Cruz Y, González Hernández G, Yamilé Barrios Rentería Y. Factores de riesgo del síndrome dificultad respiratoria

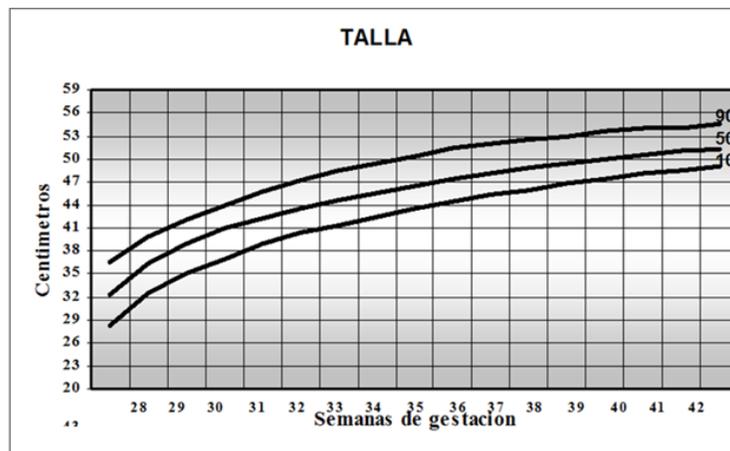
de origen pulmonar en el recién nacido. Rev Cubana Enfermer. 2007;  
23(3):1-15.

# ANEXOS

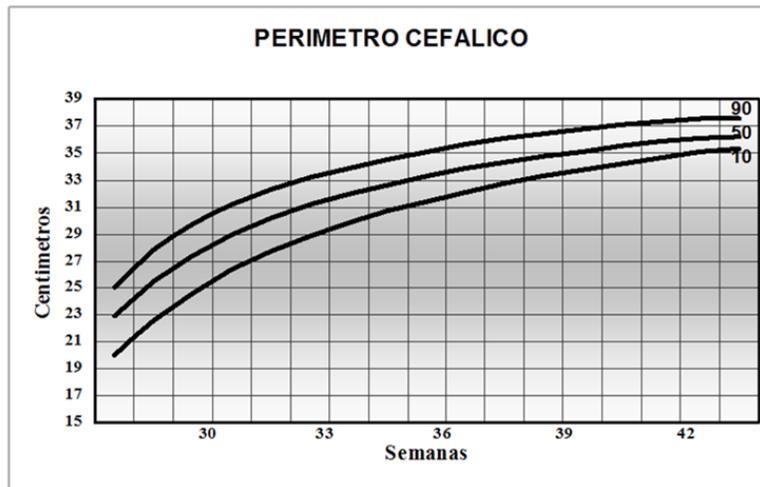
## Anexo I. Tablas de crecimiento de Lubchenco



Lubchenco LO, Hansman C, Boye E. Intrauterine growth in length and head circumference as estimated from live births at gestational ages from 26 to 42 weeks. Pediatrics 1966; 37:403-408.



Lubchenco LO, Hansman C, Boye E. Intrauterine growth in length and head circumference as estimated from live births at gestational ages from 26 to 42 weeks. Pediatrics 1966; 37:403-408.



Lubchenco LO, Hansman C, Boye E. Intrauterine growth in length and head circumference as estimated from live births at gestational ages from 26 to 42 weeks. *Pediatrics* 1966; 37:403-408.

## Anexo II. Nuevo Ballard modificado

### ESTIMACION DE LA EDAD GESTACIONAL NUEVA PUNTUACION DE BALLARD

	-1	0	1	2	3	4	5
Postura							
Ventana cuadrada (muñeca)							
Rebote de Brazos							
Angulo popiteo							
Signo de la Bufanda							
Talón - oreja							

Puntuación de madurez	puntuación	semanas
-10	20	
-5	22	
0	24	
5	26	
10	28	
15	30	
20	32	
25	34	
30	36	
35	38	
40	40	
45	42	
50	44	

Piel	Pegajosa friable transparente	gelatinosa roja traslucida	rosa suave venas visibles	descamación y/o exantema superficial pocas venas	agrietada áreas pálidas muy pocas venas	parches agrietado profundo sin vasos	corriosa agrietada arrugada
Lanugo	no	escaso	abundante	delgado	areas de calvicia	casí inexistente	
Superficie plantar	talón - dedos: 40-50 mm - 1 < 40 mm - 2	50 mm sin surcos	tenues marcas rojas	sólo surco transverso anterior	surcos 2/3 anteriores	surcos en toda la planta	
Mama	imperceptible	apenas visible	areola plana sin botón	areola punteada botón 1-2 mm	areola elevada botón 3-4 mm	areola con oleta botón 5-10mm	
Ojo - oreja	párpados fundidos ligeramente - 1 fuertemente - 2	párpados sooados pabellón plano permanece doblado	ligeramente curvado blando se desdobra lentamente	pabellón bien curvado blando pero se desdobra rápidamente	formado y duro se desdobra al instante	cartilago grueso oreja rígida	
Genitales masculinos	escroto plano liso	escroto vacío arrugas tenues	testículos en la parte superior del canal raras arrugas	testículos en descenso pocas arrugas	testículos bajos arrugas normales	testículos pendulantes arrugas profundas	
Genitales femeninos	clitoris prominente labios planos	clitoris prominente labios menores pequeños	clitoris prominente labios menores crecientes	labios menores y mayores igualmente prominentes	labios mayores grandes menores pequeños	labios mayores cubren clitoris y menores	

La nueva puntuación de Ballard expandida incluye a los recién nacidos extremadamente prematuros y se ha refinado para mejorar la exactitud en los recién nacidos más maduros. (Cortesía de Ballard, JI, Khoury JC, Wedig K, y cols. *J Pediatr* 119:417-423, 1991.)

**Anexo III. Test de Silverman-Anderson para valorar la función respiratoria del RN**

<b>Test</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Silverman – Anderson</b>			
<b>Movimientos tóracoabdominales</b>	Rítmicos y regulares	Tórax inmóvil. Abdomen en movimiento	Disociación tóracoabdominal
<b>Tiraje intercostal</b>	No	Leve	Intenso y constante
<b>Retracción xifoídea</b>	No	Leve	Intensa
<b>Aleteo nasal</b>	No	Leve	Intensa
<b>Quejido espiratorio</b>	No	Leve e inconstante	Intenso y constante

## Anexo IV. Hoja de captación de datos

### HOJA DE CAPTACION DE DATOS

#### IDENTIFICACIÓN

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento: día \_\_\_\_\_ mes \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_\_

Número de afiliación: \_\_\_\_\_

Sexo: Femenino ( ) Masculino ( )

Nombre de la madre: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

G: \_\_\_\_\_ P: \_\_\_\_\_ C: \_\_\_\_\_ A: \_\_\_\_\_ AA: \_\_\_\_\_ APP: \_\_\_\_\_

Domicilio particular: Calle \_\_\_\_\_ Colonia \_\_\_\_\_

TEL. casa \_\_\_\_\_, TEL. celular \_\_\_\_\_, TEL. de familia \_\_\_\_\_

TEL. trabajo \_\_\_\_\_

Trabaja: No ( ) Si ( ) Lugar \_\_\_\_\_

#### ANTECEDENTES DEL PACIENTE

RNT de \_\_\_\_\_ SEG, RNPT de \_\_\_\_\_ SEG, RN Inmaduro de \_\_\_\_\_ SEG (Nuevo Ballard)

Diagnósticos de ingreso (I) o diagnóstico agregado (A)

(1) \_\_\_\_\_ (2) \_\_\_\_\_ (3) \_\_\_\_\_

(4) \_\_\_\_\_ (5) \_\_\_\_\_ (6) \_\_\_\_\_

(7) \_\_\_\_\_ (8) \_\_\_\_\_ (9) \_\_\_\_\_

(10) \_\_\_\_\_ (11) \_\_\_\_\_ (12) \_\_\_\_\_

(13) \_\_\_\_\_ (14) \_\_\_\_\_ (15) \_\_\_\_\_

#### ANTROPOMETRÍA

Peso \_\_\_\_\_

Talla \_\_\_\_\_

Perímetro cefálico \_\_\_\_\_

#### ANTECEDENTES CLÍNICOS Y DE LABORATORIO DEL PACIENTE

Hipotrofia \_\_\_\_\_ Microcefalia \_\_\_\_\_ ECN o EII \_\_\_\_\_

Petequias \_\_\_\_\_ Macrocefalia \_\_\_\_\_ SDR \_\_\_\_\_

Hepatomegalia \_\_\_\_\_ Alteración en BHC \_\_\_\_\_ Meningitis o Encefalitis \_\_\_\_\_

Alteración craneal \_\_\_\_\_ VSG \_\_\_\_\_ Hipoglicemia \_\_\_\_\_

Esplenomegalia \_\_\_\_\_ sordera \_\_\_\_\_ CsCs \_\_\_\_\_

Ictericia \_\_\_\_\_ ceguera \_\_\_\_\_

Periostitis \_\_\_\_\_ calcificaciones cerebrales (UstFN) \_\_\_\_\_

Sangrados \_\_\_\_\_ Hemorragia intraventricular \_\_\_\_\_ Sepsis o choque séptico \_\_\_\_\_

#### MARCADORES SÉPTICOS

BHC alterada si \_\_\_\_\_ no \_\_\_\_\_ Hb \_\_\_\_\_, leucocitos \_\_\_\_\_, diferencial: Neutrófilos \_\_\_\_\_, Linfocitos \_\_\_\_\_, Monocitos \_\_\_\_\_, Eosinófilos \_\_\_\_\_; Basófilos \_\_\_\_\_, Bandas \_\_\_\_\_, Reticulocitos \_\_\_\_\_, PKT \_\_\_\_\_

TGO \_\_\_\_\_, TGP \_\_\_\_\_, Bilirrubina Total \_\_\_\_\_, Bilirrubina directa \_\_\_\_\_, Bilirrubina Indirecta \_\_\_\_\_.

PCRtr/ADN-CMV: positivo \_\_\_\_\_ (número de pb \_\_\_\_\_) negativa \_\_\_\_\_

## CULTIVOS

Secreción bronquial (-) o (+) a \_\_\_\_\_  
Secreción gástrica (-) o (+) a \_\_\_\_\_  
Hemocultivo (-) o (+) a \_\_\_\_\_  
Urocultivo (-) o (+) a \_\_\_\_\_  
Coprocultivo (-) o (+) a \_\_\_\_\_  
Catéter umbilical (-) o (+) a: \_\_\_\_\_  
Catéter central \_\_\_\_\_ (-) o (+) a: \_\_\_\_\_  
Catéter Percutáneo \_\_\_\_\_ (-) o (+) a: \_\_\_\_\_  
Cánula endotraqueal (-) o (+) a: \_\_\_\_\_  
Sonda oro gástrica (-) o (+) a: \_\_\_\_\_  
Sonda vesical (-) o (+) a: \_\_\_\_\_  
Otros cultivos \_\_\_\_\_ (-) o (+) a \_\_\_\_\_

## TRATAMIENTOS:

Surfactante\_\_\_\_, analgésicos\_\_\_\_, sedantes\_\_\_\_, antibióticos\_\_\_\_ alimentación parenteral\_\_\_\_  
Diuréticos\_\_\_\_ inotrópicos \_\_\_\_\_

TRANSFUSION: Sangre ( ), plasma ( ), paquete globular ( ), crioprecipitados ( ) y conc. Plaquetario ( )

## VENTILACION ASISTIDA CON:

Casco cefálico Si ( ) No ( ) días \_\_\_\_\_  
CPAP nasal Si ( ) No ( ) días \_\_\_\_\_  
Ventilador Si ( ) No ( ) días \_\_\_\_\_  
Gasometrías \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## ANTECEDENTES MATERNOS

Antecedentes de hijos prematuros \_\_\_\_\_ si ( ) no ( )  
Hipertensión sistémica durante el embarazo. \_\_\_\_\_ si ( ) no ( )  
Exposición prenatal a drogas: tabaquismo ( ), alcoholismo ( ), drogas ilícitas, cuales ( ), fármacos prescritos por medico ( ), número de exposiciones \_\_\_\_\_  
Diabetes gestacional durante el embarazo (clasificación de la D a la H: Enfermedad vascular grave). \_\_\_\_\_  
Madre con bajo peso \_\_\_\_\_ si ( ) no ( )  
Madre con talla baja \_\_\_\_\_ si ( ) no ( )  
Madre con nivel socioeconómico bajo \_\_\_\_\_ mediano \_\_\_\_\_, alto \_\_\_\_\_  
Escolaridad: Primaria ( ) Secundaria ( ) Prepa ( ) Técnica ( ) Universidad ( ) Postgrado( )  
Otras infecciones neonatales virales. \_\_\_\_\_  
Malformaciones congénitas. \_\_\_\_\_  
Malformaciones uterinas. \_\_\_\_\_ si ( ) no ( )  
Infecciones vaginales \_\_\_\_\_ si ( ) número de veces durante el embarazo \_\_\_\_\_ no ( )  
Compañeros sexuales 1( ) 2( ) 3 o más ( )

## Anexo V. Métodos

### Amplificación y secuenciación de la región de la glicoproteína B (fragmento de 125 pb) del gen gB UL55.

- 1) Extracción de ADN total
- 2) Amplificación del producto 125 pb (1ra PCR) y 205 pb (2da PCR) con PCR punto final y 125 pb (3er PCRtr) PCRtr SYBER Green
- 3) Elaboración de Gel de agarosa al 2% y Electroforesis
- 4) Electroforesis horizontal de ADN en geles de agarosa
- 5) Extracción de ADN para productos purificados
- 6) Purificación de productos de PCR con las columnas del kit PureLink (Invitogene) y los reactivos del kit QIA Quick Gel Extraction (QIAGEN)
- 7) Cuantificación del producto de PCR purificado
- 8) PCR de secuenciación del producto de 125 pb
- 9) Purificación del producto de secuenciación
- 10) Análisis de las secuencias de nucleótidos

#### 1. Extracción de ADN total.

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando 150µL de plasma de RN con el Kit comercial (Columnas) FavorPrep™ Viral Nucleic Acid Extraction I (FAVORGEN®),

#### *FavorPrep™ Viral Nucleic Acid Extraction I (FAVORGEN®)*

#### **Muestra: CMV-AD-169/MRC-SG24** (150µL)

Preparar los siguientes reactivos:

- Agregar 1ml de **VNE Buffer** al tubo del **Carrier RNA**, mezclar por vórtex y transferir la mezcla al tubo del **Buffer VNE**, separar una alícuota de 1 mL y almacenar el **Carrier RNA** en el **VNE Buffer** a 4°C.
- Agregar 6ml de **Etanol** al **Buffer 2 de lavado**, almacenar a temperatura ambiente.
- Transferir 150µl de **plasma** en un tubo de 1.5ml estéril.
- Agregar 570µl de **Buffer VNE** (verificar que se ha agregado el **Carrier RNA**) a la muestra.
- Mezclar con vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 570µl de **Etanol 96-100%** a la muestra y mezclar con vórtex.
- Transferir 700 µl de la mezcla anterior a la columna.
- Centrifugar a 8,000 xg por 1 minuto, desechar el eluido y regresar la columna al tubo de recolección.
- Transferir el resto de la mezcla a la columna y centrifugar, cambiar el tubo de recolección.
- Agregar 500µl de **Buffer 1 de lavado** a la columna y centrifugar a 8,000 xg durante 1 minuto.
- Descartar el eluido y regresar la columna al tubo de recolección.
- Agregar a la columna 750 µl de **Buffer 2 de lavado** (verificar que se agregó el etanol) a la columna y centrifugar a 8,000 xg por 1 minutos, descartar el eluido y regresar la columna al tubo de recolección.
- Repetir el paso anterior.

- Centrifugar a máxima velocidad (13,000 xg) por 3 minutos.
- Colocar la columna en un tubo de elusión de 1.5ml (desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado).
- Agregar 50µl de **RNase-free water** en el centro de la membrana de la columna, incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 8,000 xg 2 minutos.

## 2. Amplificación del producto 125m pb (1ra PCR) y 205 pb (2da PCR) con PCR punto final y 125 pb (3er PCRtr) PCR SYBER Green

Para la realización de todas las PCR punto final se requirieron los mismos materiales y los mismos procedimientos, con diferentes reactivos en cada una de ellas. Para amplificación del ADN se realizara PCR de punto final y se emplearan los siguientes pares de oligonucleótidos.

### 1er PCR 125 pb

Sentido gB: 5'GAGGACAACGAAATCCTGTTGGGC A-3'

Antisentido gB: 5'TCGACGGTGGAGATACTGCTGAGG-3'

### 2da PCR 205 pb

Sentido: β-F 5'-ATCCTAAAAGCCACCCCACT-3'

Anti-sentido: β-R 5'-CTCAAGTTGGGGGACAAAAA-3'

### 3er PCRtr 125 pb

Sentido gB: 5'GAGGACAACGAAATCCTGTTGGGC A-3'

Antisentido gB: 5'TCGACGGTGGAGATACTGCTGAGG-3'

## Materiales para la campana de flujo laminar

Bata limpia

Guantes de Nitrilo **CLP** Tools for Molecular Biology TITAN.

Gradillas para tubos de PCR.

Gradillas para tubos de 1.5 mL

Recipiente para desechar las puntas utilizadas.

Hielo

Vórtex marca **CE** Thermolyne\* Vórtex Maxi Mix\* II Mixers.

Microcentrífuga marca **Sprout**.

Micropipetas de 0,2-2µl, 10µl, 2-20µl, 5-40µl y 20-200 µl marca Labsystems y Gilson.

Puntas para pipetas de 10, 20, 100 y 200 µl marca **CLP** Neptuno.

Campana de flujo marca **Forma Scientific** (Laboratorio de células).

Tubos para PCR de 0.5 ml.

Tubos para PCR (200 µl)

Gasas.

Etanol al 70%

Vial de agua inyectable

Gradilla para tubos de PCR (fuera de la campana)

Plumón marcador permanente.

## Reactivos de PCR

H<sub>2</sub>O inyectable o estéril marca **PISA**  
 PCR Buffer  
 MgCl<sub>2</sub>  
 dNTP's mix  
 Primer  
 Primer  
 Enzima Amplificasa

**Material para la mesa de trabajo**

Micropipeta 10ul  
 Puntas con filtro de 10ul  
 Recipiente para desechar puntas  
 Hielo  
 Gradilla para tubos de 1.5ml  
 Muestras de ADN o producto de PCR externo  
 NOTA 1: Todos los reactivos, excepto el agua, se almacenan a -20°C  
 NOTA 2: El ADN se almacena a -70°C en alícuotas de 10ul en tubos libres de RNAsas (tubos de PCR)  
 NOTA 3: Los productos de PCR se guardan a -20°C  
 NOTA 4: No se debe mezclar en el Vórtex el reactivo Taq ADN polimerasa

**Preparar la campana de flujo**

Con gasas mojadas con etanol se limpia la campana y el material que se utilizara como son: puntas, pipetas, tubos para PCR, gradilla, caja para puntas desechadas, guantes, el vórtex y la centrifuga.  
 Se prende la luz ultravioleta para irradiar el material por 10 minutos previos, se deja la bata en la silla.  
 Se prende la luz ultravioleta del cuarto.  
 Mientras se irradia los materiales se ponen los tubos de reactivo de PCR en una hielera.  
 Antes de apagar la luz ultravioleta se enciende el flujo de aire.  
 Se mete a la campana los reactivos de PCR  
 Se pone la bata y después los guantes, y ya no sacar las manos de la campana.  
 Se marcan los tubos que se van a utilizar.

**Procedimiento (Preparación de la PCR tiempo final).**

Realizar la mezcla de PCR según la tabla siguiente:

**1era PCR. Amplificación del fragmento de 125 pb (cebadores del gen gB UL/55)**

Reactivos	Concentración inicial (Stock)	Concentración Final	X 1 rxn
H <sub>2</sub> O inyectable o estéril	-	-	6.376 µl
*PCR amortiguador <b>(KAPABIOSYSTEM)</b>	10X	1X	1.25 µl
dNTP's mix	10mM	0.2mM	0.25 µl
Cebadores gB1-MF <b>(IDT)</b>	10 µM	0.75 µM	0.937 µl
Cebadores gB2-MR <b>(IDT)</b>	10 µM	0.75 µM	0.937 µl

Enzima Taq Polimerasa ( <b>KAPA</b> )	5U/ $\mu$ l	0.1 U/ $\mu$ l	0.25 $\mu$ l
ADN <sub>TOTAL</sub>		-	2.5 $\mu$ l
Volumen final	-		12.5 $\mu$ l

\*El PCR amortiguador contiene MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM

Termociclador           **Biometra T Gradient Thermocycler**

Desnaturalización de inicio (tapa)                   98°C/5min  
Desnaturalización de ciclos                           95°C/30 s  
Alineamiento                                           50°C/30 s  
Extensión de ciclos                                   72°C/30 s  
Extensión final                                       72°C/5 min  
                                                                  4°C  
Programa                                                UL69/gBG  
Duración                                                1:10:00 h  
Ciclos                                                    35

**2da PCR. Amplificación del fragmento de 205 pb (cebadores del gen de  $\beta$ -actina)**

Reactivos	(Stock)	Concentración final	X 1 rxn Cl <sub>2</sub> Mg 1.5 mM
H <sub>2</sub> O inyectable o estéril	-	-	6.5 $\mu$ l
PCR Buffer ( <b>INVITROGEN</b> )	10X	1X	1.0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> ( <b>KAPABIOSYSTEM</b> )	25 mM	-	-
dNTP's mix	10mM	0.2mM	0.2 $\mu$ l
Primer $\beta$ -F	50 $\mu$ M	0.25 $\mu$ M	0.05 $\mu$ l
Primer $\beta$ -R	50 $\mu$ M	0.25 $\mu$ M	0.05 $\mu$ l
Enzima Taq Polimerasa ( <b>KAPA</b> )	5U/ $\mu$ l	0.1 U/ $\mu$ l	0.2 $\mu$ l
ADN <sub>TOTAL</sub>		-	2.0 $\mu$ l
Volumen final	-		10 $\mu$ l

Termociclador           **Biometra T Gradient Thermocycler**

Desnaturalización de inicio (tapa)                   94°C/2min  
Desnaturalización ciclos                           94°C/30 s  
Alineamiento                                           50°C/30 s  
Extensión de ciclos                                   68°C/45 s  
Extensión final                                       72°C/7 min  
                                                                  4°C  
Programa                                                04 ACTINA  
Duración                                                1:35:09 h  
Ciclos:                                                   35

**3era PCRtr. Amplificación del fragmento de 125 pb (cebadores del gen gB UL/55)**

[Inicial]	Reactivos	[Final]	X 1 rxn Vol. µL
-	H <sub>2</sub> O estéril	-	0
10 µM	Cebadores gB1-MF (IDT)	0.75 µM	0.75 µL
10 µM	Cebadores gB2-MR (IDT)	0.75 µM	0.75 µL
2X	Master Mix ( <b>ROCHE</b> )	1X	5 µL
	ADN (muestras)	-	3.5 µL
	Volumen final	-	10 µL

**PCR en tiempo real sybergreen**

<b>Sistema de PCR tiempo real LC®480 (ROCHE)</b>	<b>°C</b>	<b>Modo de adquisición</b>	<b>Hold</b>
<b>REINCUBACIÓN</b>	<b>95°C</b>	-	<b>5 minutos</b>
<b>AMPLIFICACIÓN 45 ciclos</b>	<b>95°C</b>	<b>Ninguna</b>	<b>10 segundos</b>
	<b>60°C</b>	<b>Ninguna</b>	<b>10 segundos</b>
	<b>72°C</b>	<b>Una</b>	<b>10 segundos</b>
<b>CURVA DE DISOCIACIÓN</b>	<b>95°C</b>	-	<b>5 segundos</b>
	<b>65°C</b>	-	<b>1 minuto</b>
	<b>97°C</b>	<b>Continuo</b>	<b>continuo</b>
<b>ENFRIAMIENTO</b>	<b>40°C</b>	-	<b>30 segundos</b>
<b>Programa</b>	<b>Tiempo total</b>	<b>1:09:00 horas</b>	

**Cálculo:**

Previamente se calcula el volumen de la muestra, calculando concentración final, el volumen X 1rxn y X5 rxn's (dependiendo lo que se va a trabajar de muestras)

Se calcula la cantidad de reactivo partiendo de una concentración de stock de todos los reactivos, llegamos a una concentración final sacando el volumen por cada muestra y el total del volumen de las 5 muestras.

**Preparación de la mezcla:**

Centrifugar y dar vórtex ligero a los tubitos con los reactivo, menos a la enzima, y se hace la mezcla.

Cuando se tiene la mezcla se agrega a cada tubito los microlitos requeridos.

Una vez cargado el tubo mix con los reactivos correspondientes, dividir la mezcla de PCR en los tubos correspondientes para el número de reacciones calculados en la tabla.

El primer tubito corresponderá al control negativo (este control no se pone muestra de ADN).

Cerrar los tubos de PCR que contienen la mezcla.

Apagar el flujo de la campana, cerrar los racks de las puntas, desechar las puntas usadas

Sacar las gradillas con los tubos que tienen el mix de la campana

Irradiar la campana de flujo laminar durante 10 min

Llevar los tubos de PCR que contienen el mix a la mesa del laboratorio

Adicionar el ADN o producto de PCR la mezcla de PCR

Cerrar los tubos de PCR y meter al termociclador

Una vez finalizado el PCR, almacenar las reacciones a -20°C.

### **Estandarización de la PCR cuantitativa en tiempo real (PCRtr/ADN-CMV SYBER Green)**

#### **Controles para la PCR punto final y PCRtr**

-Control interno de la amplificación con cebador  $\beta$ -actina humana. Se realizó PCR punto final con cebadores  $\beta$ -actina humana con el objetivo de verificar que el ADN o templado no estuviera degradado para hacer la PCR.

-Control negativo. La ausencia de contaminación se comprobó incluyendo un tubo conteniendo todos los componentes de la mezcla de reacción y 2.0  $\mu$ L de agua inyectable estéril en lugar de muestra de ADN.

-Control positivo interno. Junto a los indicadores destinados para amplificar el genoma viral, se añadió a la mezcla de reacción los cebadores gB1-MF y gB2-MR, que permitieron amplificar un fragmento de 125 pb del gen CMV. Este control permitió verificar la ausencia de inhibidores de la reacción de amplificación así como la presencia de suficiente ADN.

-Control positivo externo. Se utilizó ADN purificado de CMV (*Vircell Microbiologists*) como control en la técnica de amplificación de los ácidos nucleicos, con rango de concentración de 10.000-20.000 copias/ $\mu$ l

Además se utilizó extracto de cultivo celular CMV-AD-169/MRC-SG24 infectadas.

### **3. Elaboración de Gel de agarosa al 2% y Electroforesis**

#### **Preparación del gel de agarosa al 2% (Volumen 30 mL\*)**

##### **1. Materiales**

- Cámara de electroforesis marca **Horizon**® 58 Horizontal. GIBCO BLR LIFE TECHNOLOGIES™
  - Peines para la bandeja.
  - Formadores de gel
  - Charola para la preparación del gel
- Fuente de poder marca **BIO-RAD POWER SUPPLY MODEL 1000/500**
- Frasco de vidrio de 100 ml marca SIMAX CZECH REPUBLICS para preparar la agarosa a preparar.
- Guantes de Nitrilo **CLP** Tools for Molecular Biology TITAN
- Guante para calor

##### **2. Reactivos**

-Agarosa grado molecular marca **UltraPure™ Agarose Invitrogen**

-TBE 1X (**Tris Base, Ácido Bórico, EDTA**)

##### **3. Preparar la cámara de Electroforesis**

1. En la cámara se coloca el molde para la preparación del gel

2. Se colocan los peines de plástico sin borde hacia fuera
3. Se colocan los formadores de geles con borde hacia fuera para que no se fugue el líquido.
- 4. Preparación de gel de agarosa al 2%**
  1. Pesar 0.6 g de agarosa.
  2. Agregar 30 ml de TBE 1X.
  3. Agitar frasco, aflojar la tapa del frasco y fundir en horno de microondas por 1 a 2min, con pausas.
  4. Mezcle bien, agitando el frasco en forma circular, a evitar formen burbujas y vierta la solución en la charola de corrida y retire las burbujas que queden sobre el área de corrida de las muestras con una punta limpia.
  5. Esperar de 10 a 15 minutos a que enfríe el frasco y agregar la mezcla a los moldes de gel colocados en la cámara ( Ya que la mano aguante la temperatura del frasco caliente o de aproximadamente 35 °C).
  6. Esperar que la agarosa solidifique (aproximadamente de 8 a 10 minutos).
  7. Para la corrida, agregue al tanque de la cámara de electroforesis con amortiguador TBE 1X hasta cubrir el gel.
  8. Conecte los electrodos de la cámara a la fuente de poder, gradúe el voltaje a 100 y corra las muestras.

**Nota**

- El uso de guantes, y bata de laboratorio es obligatorio.
- Para los experimentos se está utilizando TBE amortiguador 10X comercial marca **PROMEGA Molecular Biology Grade** que contiene:  
Buffer TBE, 10X (pH 8,3),  
Composición: Tris-borato 890 mM, ácido bórico 890 mM, EDTA 20 mM.  
Propiedades: pH a 25 °C (1X): 8.2-8.4. Líquido incoloro de 1 litro. Cat-V4251 Lot 27094601

#### **4. Electroforesis horizontal de ADN en geles de agarosa**

Se realizó la electroforesis de los productos amplificados en gel de agarosa (Ultra Pure™ Agarose (**INVITROGEN**) al 2 % en cámara (Bio-Rad)

1. El gel de agarosa se coloca en la cámara de electroforesis horizontal (**Horizon ® 58** Horizontal. GIBCO BLR LIFE TECHNOLOGIES™)
2. Se llena la cámara de electroforesis con amortiguador de electroforesis TBE 0.5X hasta que cubra el gel
3. Se mezcla el producto de PCR (con cebadores gB y β-actina) utiliza 1µL de muestra y se le agrega GelRed™ 1X 1 µL,
4. Cargar la muestra en los pozos del gel y al final cargar 2 µL de ADN marcador de peso molecular de 100 pb (**DNA molecular Weight Markers, PROMEGA diagnostics**) el marcador se coloca en el primer pocillo del lazo izquierdo del gel, con un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo cual facilita la labor de determinar el tamaño de los ADN desconocidos
5. Conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder a 100 v/25 min, verificar el intercambio de iones que indica que la electroforesis se está llevando a cabo correctamente.
6. Apagar la fuente de poder y desconectar los cables de la cámara de electroforesis
7. Tomar el gel de la cámara de electroforesis usando la pala de uso exclusivo.
8. Observar el gel bajo luz UV usando el documentador (trasiluminador) de geles marca **QUANTUM ST4 VILBER LOURMAT**, con un tiempo de resolución de 1.5 segundos.
9. Capturar la imagen en el software del **QUANTUM ST4 VILBER LOURMAT**
10. Exportar y editar la imagen.

#### **5. Extracción de ADN para productos purificados**

## ***FavorPrep™ Viral Nucleic Acid Extraction I (FAVORGEN®)***

### **Muestra: CMV-AD-169/MRC-SG24 (150µL)**

Preparar los siguientes reactivos:

-Agregar 1ml de **VNE Buffer** al tubo del **Carrier RNA**, mezclar por vórtex y transferir la mezcla al tubo del **Buffer VNE**, separar una alícuota de 1 mL y almacenar el **Carrier RNA** en el **VNE Buffer** a 4°C.

-Agregar 6ml de **Etanol al Buffer 2 de lavado**, almacenar a temperatura ambiente.

- Transferir 150µl de **plasma** en un tubo de 1.5ml estéril.
- Agregar 570µl de **Buffer VNE** (verificar que se ha agregado el **Carrier RNA**) a la muestra.
- Mezclar con vórtex e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 570µl de **Etanol 96-100%** a la muestra y mezclar con vórtex.
- Transferir 700 µl de la mezcla anterior a la columna.
- Centrifugar a 8,000 xg por 1 minuto, desechar el eluido y regresar la columna al tubo de recolección.
- Transferir el resto de la mezcla a la columna y centrifugar, cambiar el tubo de recolección.
- Agregar 500µl de **Buffer 1 de lavado** a la columna y centrifugar a 8,000 xg durante 1 minuto.
- Descartar el eluido y regresar la columna al tubo de recolección.
- Agregar a la columna 750 µl de **Buffer 2 de lavado** (verificar que se agregó el etanol) a la columna y centrifugar a 8,000 xg por 1 minutos, descartar el eluido y regresar la columna al tubo de recolección.
- Repetir el paso anterior.
- Centrifugar a máxima velocidad (13,000 xg) por 3 minutos.
- Colocar la columna en un tubo de elusión de 1.5ml (desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado).
- Agregar 50µl de **RNase-free water** en el centro de la membrana de la columna, incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 8,000 xg 2 minutos.

### **6. Purificación de productos de PCR con las columnas del kit PureLink (Invitogene) y los reactivos del kit QIA Quick Gel Extraction (QIAGEN)**

1. Transferir el producto de PCR a tubo de 1.5 ml estéril.
2. Agregar 3 volúmenes de Buffer QG (QIAGEN) a un volumen del producto de PCR.
3. Agregar 1 volumen de isopropanol y mezclar por inversión.
4. Transferir a la columna del kit PureLink.
5. Centrifugar a 10,000xg por 1 minuto y desechar el eluido.
6. Agregar 650µL de Buffer PE (QIAGEN).
7. Incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 10,000 xg por 1 minuto y desechar el eluido.
9. Volver a centrifugar la columna por 3 minutos más a máxima velocidad (16,100xg).
10. Transferir la columna a un tubo eppendorf estéril de 1.5mL
11. Agregar 30µL de H<sub>2</sub>O inyectable e incubar 3 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar a máxima velocidad (16,100xg) por 2 minutos, el ADN se encuentra en el tubo eppendorf.
13. Cuantificar por espectrofotómetro y/o gel de agarosa como indica el procedimiento 4.

14.

### **7. Cuantificación del producto de PCR purificado.**

-Empleando el espectrofotómetro *Nanodrop*:

Una vez calibrado el Nanodrop, tomar 1 $\mu$ L del producto purificado y leerla en el nanodrop a 260 nm, el equipo da los resultados de la concentración en ng/ $\mu$ L.

-Empleando un marcador de masa molecular.

Se realiza una electroforesis de los productos purificados (como se indica en la sección 4) pero cargando un marcador de masa molecular.

### **8. PCR de secuenciación del producto de 125 pb**

La reacción de secuenciación, se realizará empleando el sistema de Big Dye Terminador v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems), 1X de Mix, 3.2 pmol/ $\mu$ L del iniciador interno, 50 ng del producto de PCR 125 pb purificado, 20  $\mu$ L de agua desionizada. Se realiza 25 ciclos de amplificación de secuenciación a 96°C/10 s, 50°C/5 s y 60°C/4 min.

### **9. Purificación del producto de secuenciación**

Purificación del Producto de secuenciación usando Etanol

1. Transferir la reacción de secuenciación en tubo de 1.5 mL estéril.
2. Completar el volumen a 20  $\mu$ L con agua inyectable.
3. Adicionar 16  $\mu$ L de agua inyectable.
4. Adicionar 64  $\mu$ L de Etanol al 95%, (recién preparado).
5. Mezclar con vórtex brevemente.
6. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a velocidad máxima por 20 minutos (**Herle Labnet Z 323 K**).
8. Desechar el etanol (con vacío y con puntas 10  $\mu$ L).
9. Adicionar 250  $\mu$ L de Etanol al 70%.
10. Mezclar brevemente con vórtex.
11. Centrifugar a velocidad máxima por 10 minutos (con la misma orientación de los tubos).
12. Desechar completamente el etanol (con vacío).
13. Secar las reacciones de PCR purificadas (con el concentrador al vacío por 5 minutos a temperatura ambiente con los tubos abiertos).
14. Agregar 10  $\mu$ L de agua inyectable, mezclar pipeteado.
15. Incubar 5 minutos a 65°C.
16. Almacenar las muestras a 4 °C. ó
17. Centrifugar brevemente y cuantificar en gel.

### **10. Análisis de las secuencias de nucleótidos**

Obtenidos los electroferogramas, donde se muestra la secuencia del fragmento de 125pb, se analiza la secuencia por medio del programa computarizado CLCbio Main Workbench versión 6.0 (URL:<http://www.clcbio.com/index.php?id=92>). Se hace la búsqueda de similitud de secuencias en base de datos mediante el programa BLAST (BLAST, acrónimo del inglés Basic Local Alignment Search Tool) en el GenBank del NCBI, donde se realiza el consenso de la secuencia ST-gB, 149pb, cepa AD-169 (ATCC VR-538) usando la secuencia *forward* y la *reverse* de la misma muestra, y obteniendo así el número de nucleótidos de dicha muestra.

## Anexo VI. Carta de consentimiento informado

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN  
Y POLITICAS DE SALUD  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD



### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN PROTOCOLO DE INVESTIGACION CLINICA

Por medio de la presente acepto que mi hijo(a) participe en el protocolo de investigación titulado:

**“Asociación de la severidad del síndrome de dificultad respiratoria con infección por citomegalovirus en recién nacidos”**

**Lugar y fecha:** Hospital de Gineco-Pediatría con Medicina Familiar No. 31. Mexicali, BC; a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 20\_\_.

**Registrado ante el Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud (CLIEIS 201), con el número: R-2009-201-3.**

**El objetivo del estudio es:**

Previa autorización del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación de Salud. El objetivo de este estudio es detectar agente infeccioso llamado Citomegalovirus que mi hijo(a) pudiera tener, esta infección puede ser adquirida durante el embarazo y podría ser causa de nacimientos de recién nacidos graves o muy delicados de salud que requieran hospitalización.

**Se me ha explicado que la participación de mi hijo(a) consistirá en:**

Toma de muestra de sangre y la captación de información del expediente clínico, además de entrevistarme para proporcionar datos de antecedentes de importancia.

**Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los beneficios derivados de la participación de mi hijo(a) en el estudio, que son:**

La toma de 4 mililitros de sangre para estudios especializados para realizar el diagnóstico y mejorar el tratamiento en los recién nacidos infectados con este virus. Por lo que doy plena autorización para el estudio y toma de sangre.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre las molestias y los riesgos que son mínimos. El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para su tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con su tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirar a mí representado(a) del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibe del Instituto Mexicano del Seguro Social.

El investigador responsable me ha dado seguridades de que no se identificará a mi hijo(a) en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con la privacidad de mi hijo(a) serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a la permanencia de mi hijo(a) en el mismo.

En caso de aclaraciones relacionadas con el estudio puedo dirigirme con la Dra. Angélica María Martínez Contreras, teléfono 686-5555150 ext. 339, correo electrónico [angelica.martinezc@imss.gob.mx](mailto:angelica.martinezc@imss.gob.mx).

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética e Investigación de la CNIC del IMSS, ubicada en Av. Cuauhtémoc No. 330, 4º piso, Bloque B de la unidad de Congresos, Col. Dolores, México DF, CP 06720, teléfono (55) 56 27 6900 extensión 21230, correo electrónico [comision.etica@imss.gob.mx](mailto:comision.etica@imss.gob.mx).

\_\_\_\_\_  
Nombre del Tutor o representante legal

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del Investigador Principal.  
Dra. Angélica María Martínez Contreras

\_\_\_\_\_  
Primer Testigo

\_\_\_\_\_  
Segundo Testigo

## Citomegalovirus: infección congénita y presentación clínica en recién nacidos con síndrome de dificultad respiratoria

Angélica Martínez-Contreras,<sup>a,b</sup> Rosalía Lira,<sup>b</sup> Carmen Soria-Rodríguez,<sup>c</sup> Sawako Hori-Oshima,<sup>d</sup> Angélica Maldonado-Rodríguez,<sup>e</sup> Othón Rojas-Montes,<sup>e</sup> Rafael Ayala-Figueroa,<sup>f</sup> Julia Estrada-Guzmán,<sup>e</sup> Ma. Teresa Álvarez-Muñoz<sup>b</sup>

### Cytomegalovirus: congenital infection and clinical presentation in infants with respiratory distress syndrome

**Background:** Respiratory distress syndrome (RDS) is a multifactorial and common disease that varies from 15 to 50 % in the newborn, causing 50 % of mortality. The RDS may be associated with bacterial and viral infections, and one of the most common viral agents is the cytomegalovirus (CMV). In the neonatal period the virus incidence goes from 0.4 to 2.5 % with a seroprevalence of 50 to 75 %; the incidence of infection in newborn with RDS is unknown. The objective was to determine the frequency of CMV infection in neonates with RDS and identify the risk factors associated with infection.

**Methods:** The CMV-DNA was identified in plasma by quantitative PCR; maternal and neonatal variables that defined the clinical findings were analyzed by logistic regression.

**Results:** The frequency of CMV infection in 197 infants with RDS was 8.6 % (95 % CI, 4.7-12.5). The significant variables in newborn were: neutropenia ( $p = 0.012$ ), thrombocytopenia ( $p = 0.021$ ), mottled skin ( $p = 0.03$ ), and the maternal significant variable was cervicovaginitis ( $p = 0.05$ ).

**Conclusions:** We reported for the first time the highest frequency of CMV infection in newborns with RDS and the association of various risk factors with CMV infection.

<b>Keywords</b>	<b>Palabras clave</b>
Newborn respiratory distress syndrome	Síndrome disneico respiratorio del recién nacido
Newborn infant	Recién nacido
Cytomegalovirus	Citomegalovirus
Polymerase chain reaction	Reacción en cadena de la polimerasa

El síndrome de dificultad respiratoria (SDR) es una de las patologías más frecuentes en recién nacidos (RN). Se presenta en países desarrollados y en vías de desarrollo, con una frecuencia que varía del 15 al 50 %.<sup>1</sup> La morbilidad y mortalidad es variable y se ha relacionado con la heterogeneidad del tratamiento y el nivel hospitalario de atención.<sup>1</sup> El SDR puede estar asociado a patologías como enfermedad de membrana hialina, taquipnea transitoria del recién nacido, malformaciones cardiopulmonares y las infecciones bacterianas y virales.<sup>2</sup> Estas últimas, principalmente de adquisición en forma congénita, pueden manifestarse como neumonía y complicaciones pulmonares.<sup>3</sup> De los agentes virales que pueden asociarse más frecuentemente a neumonías y SDR están los del grupo herpes, entre ellos el citomegalovirus (CMV). Este virus es la causa más común de infección congénita en Estados Unidos y Europa. En la etapa neonatal tiene incidencia del 0.4 al 2.5 % y seroprevalencia del 50 al 75 %.<sup>4</sup> Del 10 al 20 % de los pacientes que sufren infección congénita tendrán secuelas neurológicas y sensoriales o pérdida de la audición, alteraciones oculares y deterioro en las funciones motoras y cognitivas.<sup>5</sup> La presentación clínica de la infección es variable en los RN: pueden estar asintomáticos o presentar cuadros graves de sepsis, neumonías, neumonitis<sup>6,7</sup> y sangrado que llega a ser mortal de un 20 a un 30 %,<sup>8</sup> por lo cual en el caso del RN con SDR se debe identificar la infección.

La detección de infección por CMV en neonatos tiene limitantes debido a la disponibilidad y el costo de pruebas para tamizaje y de diagnóstico en los centros hospitalarios. En países en vías de desarrollo, la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG e IgM contra citomegalovirus (IgG-CMV e IgM-CMV) es más utilizada en los neonatos para el diagnóstico de infección por CMV. La positividad de IgG-CMV con niveles altos o la positividad de IgM-CMV, aunada al estado

<sup>a</sup>Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales, Hospital de Gineco-Pediatría y Medicina Familiar 31, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexicali, Baja California

<sup>b</sup>Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Distrito Federal

<sup>c</sup>Servicio de Infectología Pediátrica, Hospital General de Mexicali Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California

<sup>d</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California

México

Comunicación con: Angélica María Martínez Contreras  
Correo electrónico: ang1040n@prodigy.net.mx

Recibido: 27/03/2014

Aceptado: 04/02/2015



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**UNIDAD VALLE DORADO**  
**ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**1er CONGRESO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**CONSTANCIA A:**

**Martínez-Contreras A.M., Soria-Rodríguez C.G., Sawako Hori., Lira-Carmona M.R., Estrada-Guzmán J.D.**

Por su participación como ponentes en el I Congreso de Investigación en Salud con la presentación en poster, "RECIEN NACIDOS (RN) CON SÍNDROME DE DIFICULTAD RESPIRATORIA (SDR) Y FRECUENCIA DE SEROLOGÍA POSITIVA PARA CITOMEGALOVIRUS (CMV)".

  
Dr. David Sergio Salas Vargas  
Direc. Escuela de Ciencias de la Salud

  
Dr. Miguel Ángel Cadena Alcántar  
Coord. Gral. del Programa de Maestría y Doctorado en Cs. de la Salud



**6 de Septiembre 2012, Ensenada, Baja California**



**ASOCIACION MEXICANA DE INFECTOLOGIA Y  
MICROBIOLOGIA CLINICA A.C.**

*Otorga el presente*

***Diploma***

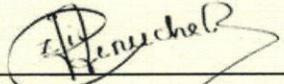
***Por presentación de trabajo libre***

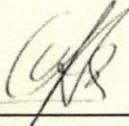
**Frecuencia de infección por citomegalovirus en recién nacidos con síndrome de dificultad respiratoria con método de diagnóstico con PCR tiempo real SYBER Green.**

MARTÍNEZ-CONTRERAS ANGÉLICA\*<sup>1</sup>, LIRA-CARMONA ROSALIA<sup>2</sup>, MALDONADO-RODRÍGUEZ ANGÉLICA<sup>2</sup>, ROJAS-MONTES OTHÓN<sup>2</sup>, ÁLVAREZ-Y-MUÑOZ TERESA<sup>2</sup>, SORIA-RODRÍGUEZ CARMEN<sup>3</sup>, SAWAKO-OSHIMA HORI<sup>3</sup>, AYALA-FIGUEROA RAFAEL<sup>3</sup>, ESTRADA-GUZMÁN JULIA<sup>3</sup> Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales. Hospital de Gineco-Pediatría y Medicina Familiar 31, Instituto Mexicano del Seguro Social. Mexicali B.C. México<sup>1</sup>. Laboratorio de Virología. Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D.F. <sup>2</sup>. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali B.C., México.<sup>3</sup>

***en el XXXVIII Congreso Nacional de Infectología y  
Microbiología Clínica***

*30 de Mayo de 2013 - Guadalajara, Jalisco.*

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Celia M. Alpuche Aranda**  
**Presidente**  
**AMIMC A.C.**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Carlos H. Castellanos González**  
**Presidente**  
**Sociedad Jalisciense de Infectología**



Sedes Invitadas



La UMAE Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, el Hospital Infantil de México Federico Gómez, el Instituto Nacional de Pediatría, la UMAE Hospital de Pediatría CMN de Occidente y el Instituto Nacional de Perinatología

Otorgan la presente

# Constancia

A los autores

Martínez Contreras Angélica, Lira Carmona Rosalía, Maldonado Rodríguez Angélica, Rojas Montes Othón, Álvarez Muñoz Ma. Teresa, Soria Rodríguez Carmen, Sawako Oshima Horl, Ayala Figueroa Rafael, Estrada Guzmán Julia.

Por la valiosa presentación del **TRABAJO DE INVESTIGACIÓN** titulado

**FRECUENCIA DE INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS EN RECIÉN NACIDOS CON SÍNDROME DE DIFICULTAD RESPIRATORIA CON MÉTODO DE DIAGNÓSTICO CON PCR TIEMPO REAL SYBER GREEN.**

Durante la 7a Reunión de Investigación Pediátrica y 4a Reunión de Investigación en Enfermería Pediátrica que se llevó a cabo del 28 al 30 de agosto del 2013 en este Hospital.



México, D.F. a 30 de agosto del 2013

Dr. Hermilio de la Cruz Yáñez  
Director de la UMAE Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI

Dr. José Alberto Oyola Aranda  
Director del Hospital General de México

Dr. Alejandro Serrano Sierra  
Director del Instituto Nacional de Pediatría

Dr. José de Jesús Artigas Osvilla  
Director de la UMAE Hospital de Pediatría del Centro Médico de Occidente

Dr. Javier Mancilla Ramírez  
Director del Instituto Nacional de Perinatología



**XXII**  
Foro Nacional  
de Investigación en Salud

**OBESIDAD**

Amenaza para la salud,  
reto para la investigación



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

Otorga la presente:

# CONSTANCIAS

**Al trabajo de investigación**

**DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS (CMV)  
EN RECIÉN NACIDOS CON SÍNDROME DE DIFICULTAD RESPIRATORIA, UTILIZANDO UN  
ENSAYO DE PCR TIEMPO REAL.**

*Autor(es): Lira-Carmona María Rosalía, Martínez-Contreras Angélica María, Maldonado-Rodríguez Angélica,  
Rojas-Montes Othon, Alvarez-Muñoz Ma. Teresa, Soría-Rodríguez Carmen, Oshima-Hori Sawako,  
Estrada-Guzmán Julia*

**OAXTEPEC 2013**

del 5 al 8 de Noviembre, Morelos, México.

Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez  
Coordinador de Investigación en Salud  
Instituto Mexicano del Seguro Social

La investigación y los determinantes sociales para la equidad en salud

EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Otorga la presente:

# CONSTANCIA

Al trabajo de investigación

FRECUENCIA DE INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS EN RECIÉN NACIDOS CON  
SÍNDROME DE DIFICULTAD RESPIRATORIA CON MÉTODO DE DIAGNÓSTICO CON  
PCR TIEMPO REAL SYBER GREEN

Autor(es): Martínez-Contreras Angelica María

**AGUASCALIENTES, AGS. DEL 27 AL 29 DE MAYO DEL 2015**

Dr. Alfonso Martínez Hernández  
**Jefe Delegacional de Servicios  
de Prestaciones Médicas  
del IMSS en Aguascalientes**

C.P. Diego Martínez Parra

**Delegado Estatal del IMSS en Aguascalientes**



**XX FORO NORTE  
DE INVESTIGACIÓN EN SALUD**  
"FORTALECIENDO LA EDUCACIÓN  
A TRAVÉS DE LA INVESTIGACIÓN"



**EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
Y LA UNIVERSIDAD DE SONORA**

Otorgan la presente:

# CONSTANCIA

**Al trabajo de investigación**

**FRECUENCIA DE INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS EN RECIÉN NACIDOS CON  
SÍNDROME DE DIFICULTAD RESPIRATORIA CON MÉTODO DE DIAGNÓSTICO CON  
PCR TIEMPO REAL SYBER GREEN**

Autor(es): Martínez-Contreras Angélica, Lira-Carmona Rosalía, Maldonado-Rodríguez Angélica,  
Rojas-Montes Othón, Soria-Rodríguez Carmen, Alvarez-Muñoz Ma. Teresa, Ayala-Figueroa Rafael,  
Estrada-Guzmán Julia

Hermosillo, Sonora 28, 29, y 30 de Mayo de 2014

IMSS