**Influencia de la carga viral en la transferencia materno-neonatal de citomegalovirus en recién nacidos a término.**

Moreno Jaramillo Gabriela Alheli. Asesor: Dr. José Arellano Galindo.

**Resumen:**

**Introducción**: La infección posnatal por CMV se asocia a lactación. La prevalencia de la virolactia, es del 27% durante los tres primeros meses posteriores al parto. La tasa de transmisión en recién nacidos prematuros expuestos a leche materna positiva a CMV es entre 5%-50%. La transmisión del CMV madre-hijo suele coincidir con el máximo de virolactia. **Metodología:** Obtención de DNA de muestras de leche materna, sangre absorbida en papel filtro y saliva de neonatos que resultaron positivas a la región IE4 de CMV por PCR anidada; Cuantificación de DNA viral mediante PCR en tiempo real utilizando el método SYBR® Green Tipo I. **Resultados y conclusiones**: La lactancia materna tiene un alto impacto sobre la inmunidad del neonato, lo que ayuda a que la replicación viral se limite. Nuestros resultados apoyan la continuidad de la lactancia materna en pacientes con madres que tengan una reactivación del virus en glándula mamaria y en aquellos en los que adquirieron infección viral durante la gestación.

**Introducción:**

En México la infección perinatal por CMV es la primera causa de hipoacusia y sordera sensorioneural en los niños, además de ser causante de un número no despreciable de casos de parálisis cerebral y trastornos cognitivos. La infección congénita por este virus es un problema subdiagnosticado debido a la amplia gama de sintomatología que pueden presentar estos pacientes.1,2

Aproximadamente el 8.6% de las mujeres en México en edad fértil (13 a 44 años) son seronegativas a CMV. En el año 2010 hubo en México 2, 628,885 nacimientos, por lo tanto 226,084 fueron hijos de madres seronegativas a CMV. 3,5

La infección posnatal por CMV puede producirse por contacto con secreciones del tracto genital materno durante el parto, por alimentación con leche materna, transfusiones sanguíneas o a través de líquidos biológicos de pacientes infectados que excretan el virus, especialmente orina y saliva.

La secreción del virus en leche materna comienza la primera semana tras el parto con una baja carga viral que se va incrementando hasta alcanzar el máximo sobre las 4-8 semanas tras el nacimiento y posteriormente va descendiendo hasta desaparecer en la semana 9-12 postparto. La transmisión del CMV madre-hijo suele coincidir con el máximo de virolactia. Se han publicado estudios de detección molecular basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que sugieren que la reactivación del virus se produce a nivel local en la glándula mamaria de madres seropositivas.6

Si bien la tasa de ADN viral en la leche materna es igual a la seroprevalencia por citomegalovirus y la reactivación viral es auto limitada, el porcentaje de transmisión es aproximadamente del 40% (17-85%) de los amamantados por más de 1 mes. 1

Los factores de riesgo relacionados con la transmisión son la magnitud de la carga viral la excreción viral precoz en la leche, la duración de la lactancia y los métodos de preservación de la leche la mayoría de los pacientes de término permanecen asintomáticos cuando adquieren la infección por citomegalovirus por leche materna y suelen resolver la infección de manera espontánea, debido a que nacen con anticuerpos protectores adquiridos a partir de la semana 28 de gestación.11,12

Cargas virales superiores a 1.000 copias/ml de plasma se correlacionan con el desarrollo posterior de alteraciones neurosensoriales, y quizás en estos pacientes estaría recomendado el inicio de terapia antiviral. Por lo tanto, la cuantificación del CMV en la leche materna permitiría un mejor seguimiento del neonato y el pronóstico de aparición de infecciones sintomáticas con secuelas neurológicas.7

Las ventajas del PCR en tiempo real son sensibilidad, rapidez, amplio intervalo de linealidad y riesgo reducido de contaminación. Esta metodología desempeña un rol clave en la prevención de la enfermedad provocada por CMV, permitiendo un diagnóstico temprano de la infección, así como para analizar la probabilidad de que un paciente asintomático la desarrolle. Y una reducción de la terapia antiviral a través del monitoreo de los niveles de ADN de CMV en sangre. La cuantificación de ADN de CMV mediante Real Time PCR también es utilizada como predictor de recaída y resistencia Incrementos súbitos en la carga viral y valores altos de la misma desde el inicio, pueden ser considerados predictores del desarrollo de la enfermedad.8,9,10

La determinación de carga viral en leche-saliva-sangre permite monitorizar la transmisión vertical del virus y determinar el pronóstico del neonato así como una conducta a seguir adecuada según el caso. Dejando en claro que la alimentación a base de leche materna debe ser primera opción en la alimentación del niño, se pueden implementar diversas medidas para inactivar el virus y evitar complicaciones en el neonato.

En México no existen estudios que determinen la transferencia vertical según la carga viral, esto nos ayudara a determinar la prevalencia de la transferencia en la población estudiada y los factores predisponentes para que esta se transmita.

**Material y métodos:**

Obtención de DNA de muestras de leche materna, sangre absorbida en papel filtro y saliva de neonatos que resultaron positivas a la región IE4 de CMV por PCR anidada, en de neonatos en binomios del hospital de la mujer en la ciudad de México; Cuantificación de DNA viral mediante PCR en tiempo real utilizando el método SYBR® Green Tipo I.

Equipo

* Tiempo Real SmartCycler®

Material

* Guantes de látex esteriles
* Micropipetas calibradas de 10L, 100L y 200L
* Puntas nuevas y estériles de 10 y 100L
* Tubos SmartCycler® de 25L
* Gradilla para tubos SmartCycler®

Reactivos

* Master SYBR GREEN ROCHE, SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems) lotes 0605229, 1505002, 1604496.
* Agua inyectable libre de pirógenos
* Oligonucleótidos para la región:

5’->3’: ACTGGAACTTTACTCGCAGAAAGA;

5’->3’: CTCCACGTACTTTACCCGCTG

* Muestras de DNA de leche materna, sangre y saliva de neonatos.
* DNA de Citomegalovirus AD169 como control positivo

Métodos

PCR en Tiempo Real.

1. Preparar curva de límite de detección con DNA cuantificado a diferentes concentraciones, se emplearon los puntos equivalentes a 10 copias, 1000 copias y 10000 copias.
2. Procesar las muestras del estudio.
3. Obtención de datos y exportarlos a una hoja de cálculo, donde se realizará el cálculo de forma manual utilizando una regresión logarítmica de los puntos obtenidos en el límite de detección. Donde se establecerá en el gráfico el número de copias como variable independiente y el valor umbral o CT como variable dependiente. Después se llevó la cantidad a copias/ml, tomando en cuenta la cantidad de muestra recaudada para realizar el cálculo, de las cuales previamente se había realizado extracción de DNA (500 μl para leche, 30 μl de saliva recaudada con un hisopo que se dejó un minuto en la boca del neonato, 75 μl de sangre por circulo de 13 mm de diámetro extraído en una tarjeta para tamiz neonatal).

**Resultados y discusión:**

Existen muchos estudios que hablan sobre la transmisión hacia neonatos pretérmino que desarrollan con mayor facilidad la infección, en este caso nos centramos en neonatos a término desde los 0 hasta los 61 días, esto para evaluar la transmisión vertical del virus por la leche materna en diferentes etapas del crecimiento en el neonato. En nuestro estudio ningún paciente desarrollo sintomatología de infección por CMV.

Se tomaron en cuenta un total de 59 binomios con sus tríos de muestras, estos previamente habían sido analizados dando con positivo para CMV por PCR anidada. De los 59 binomios 37 fueron positivos para CMV en alguna de sus muestras, de estos 37, 18 tuvieron una replicación significativa en leche, sin embargo existió un comportamiento diferente entre las muestras de saliva y sangre, por lo que se agruparon los binomios según sus resultados en graficas que serán analizadas más adelante.

Enseguida se discuten los resultados que se presentan por gráfica:

En la gráfica 1 podemos observar una mayor replicación en saliva y una limitación de la replicación en leche y sangre, probablemente los pacientes tuvieron otra vía de contagio que no tiene que ver con la leche materna como vía canal de parto o una infección congénita ya que se detectó antes de los 21 días, lo que es curioso es que no desarrollaron síntomas y que la transmisión se limita a saliva sin extenderse hacia sangre, creemos que la leche materna en lugar de ser en estos pacientes la vía de transmisión, puede llegar a ser el factor de protección que ayuda a que los pacientes con un sistema inmunológico inmaduro aprovechen la inmunidad pasiva que transmite la madre contra el virus, ya sea por medio de inmunoglobulinas o micro RNAs, aunque faltaría estudiar de una manera más profunda estos mecanismos de protección para confirmar esta teoría.

Pasándonos a la gráfica 2, podemos observar una alta replicación tanto en leche como en saliva, haciendo la comparación de un estudio realizado en 2006 por Kerrey et al, en el que determinan la carga viral en leche materna en diferentes periodos de la madre de un paciente prematuro que desarrollo sepsis por CMV en la cual el rango fue de 1000 a 100000 copias/ml, denotamos que la carga viral de nuestras muestras llegan a estar en este rango sin mostrar ninguna sintomatología, atribuimos esto a la inmunidad que pasa la madre al producto, por la corta edad de los pacientes (<10 días), inferimos que la transmisión a glándulas salivales pudo haberse dado por otra vía además de la de la leche materna, y como en el caso anterior la leche materna esté funcionando como un factor protector ya que la transmisión solo llego a saliva y se limita en sangre.

En la gráfica 3 observamos una replicación en leche aumentada con respecto a la replicación en saliva y sangre que es muy poca, sin embargo no sobrepasa las 300 copias/ml, la infección se limita a leche materna, parece que no se transmite hacia saliva de manera significativa.

En las gráficas 4 y 5, resalta el hecho de que las pruebas dieron negativo o con un resultado de muy pocas copias/ml de cmv en leche materna, sin embargo la replicación en saliva y sangre de varios neonatos fue muy alta, predominando las cargas virales más altas en sangre en los pacientes de menor edad, esto nos habla de una probable infección congénita que hasta el momento no ha dado manifestaciones. En estas 2 graficas la vía de transmisión probable fue congénita, a través de sangre del cordón umbilical, en los pacientes en los que la madre dio completamente negativo al virus en leche materna la cantidad de carga viral en sangre es mayor, esto puede ser porque la madre no está pasando inmunidad contra el virus al neonato y este no tiene como detener la replicación del mismo o por infección de 2 genotipos diferentes del virus.

En las gráfica 6 y 7 se muestran casos en los que existe replicación del virus tanto en leche materna como en sangre, pero que en saliva es muy poca o nula, por su edad, probablemente nos encontramos frente casos de infección congénita que hasta el momento no ha dado manifestaciones.

En los tríos de la gráfica 8 se puede observar una alta replicación en las 3 muestras, en 2 de los casos se puede observar una alta replicación en saliva pero que se limita en sangre en el paciente de 44 días puede que el efecto protector de la leche hiciera que se limitara la replicación en sangre, en cambio en el caso del paciente de 5 días puede que la infección todavía no llegase al torrente sanguíneo. En los otros 2 casos la replicación en sangre predomina, siendo pacientes mayores a 25 días, nos hace pensar en transmisión a través de leche materna y que no ha podido limitarse, aun así no se han presentado síntomas, puede ser que en estos casos el genotipo del virus sea uno que la inmunidad de la madre no puede controlar.

En las muestras de la gráfica 9 podemos observar que existe una replicación muy baja tanto en leche como en saliva, en cambio tenemos una alta replicación en sangre, ya que son pacientes menores a 21 días, lo más seguro es que se trate de una infección congénita.

Enseguida se muestran los resultados de las muestras en categorías según su carga viral.

Grafica 1: Carga viral en muestras por copia/ml, se muestra la comparación de leche, saliva y sangre, se observa una alta replicación en saliva y una baja replicación en leche y sangre (línea roja muestra el punto de corte, muestras hasta este punto representan una carga viral menor a 10 copias/ml). Entre paréntesis junto al número de folio del paciente se encuentra la edad del mismo en días. RN: recién nacido. SF: sin fecha.

Grafica 2: Carga viral en muestras por copia/ml, se muestra la comparación de leche, saliva y sangre, se observa una alta replicación en leche y saliva, así como una limitación de la replicación en sangre, (línea roja muestra el punto de corte, muestras hasta este punto representan una carga viral menor a 10 copias/ml). Entre paréntesis junto al número de folio del paciente se encuentra la edad del mismo en días. RN: recién nacido. SF: sin fecha.

Grafica 3: Carga viral en muestras por copia/ml, se muestra la comparación de leche, saliva y sangre, se observa una alta replicación en leche así como una limitación de la replicación en saliva y sangre, (línea roja muestra el punto de corte, muestras hasta este punto representan una carga viral menor a 10 copias/ml). Entre paréntesis junto al número de folio del paciente se encuentra la edad del mismo en días. RN: recién nacido. SF: sin fecha.Grafica 4: Carga viral en muestras por copia/ml, se muestra la comparación de leche, saliva y sangre, se observa una alta replicación en saliva y sangre, dando negativo en leche, (línea roja muestra el punto de corte, muestras hasta este punto representan una carga viral menor a 10 copias/ml). Entre paréntesis junto al número de folio del paciente se encuentra la edad del mismo en días. RN: recién nacido. SF: sin fecha.

Grafica 5: Carga viral en muestras por copia/ml, se muestra la comparación de leche, saliva y sangre, se observa una alta replicación en saliva y sangre, dando una replicación muy baja en leche, (línea roja muestra el punto de corte, muestras hasta este punto representan una carga viral menor a 10 copias/ml). Entre paréntesis junto al número de folio del paciente se encuentra la edad del mismo en días. RN: recién nacido. SF: sin fecha.

Grafica 6: Carga viral en muestras por copia/ml, se muestra la comparación de leche, saliva y sangre, se observa una alta replicación en leche y sangre, dando negativo en saliva, (línea roja muestra el punto de corte, muestras hasta este punto representan una carga viral menor a 10 copias/ml). Entre paréntesis junto al número de folio del paciente se encuentra la edad del mismo en días. RN: recién nacido. SF: sin fecha.

Grafica 7: Carga viral en muestras por copia/ml, se muestra la comparación de leche, saliva y sangre, se observa una alta replicación en leche y sangre, dando una limitación de la replicación en saliva, con pocas copias/ml, (línea roja muestra el punto de corte, muestras hasta este punto representan una carga viral menor a 10 copias/ml). Entre paréntesis junto al número de folio del paciente se encuentra la edad del mismo en días. RN: recién nacido. SF: sin fecha.

Grafica 8: Carga viral en muestras por copia/ml, se muestra la comparación de leche, saliva y sangre, se observa replicación en las 3 muestras, (línea roja muestra el punto de corte, muestras hasta este punto representan una carga viral menor a 10 copias/ml). Entre paréntesis junto al número de folio del paciente se encuentra la edad del mismo en días. RN: recién nacido. SF: sin fecha.

Grafica 9: Carga viral en muestras por copia/ml, se muestra la comparación de leche, saliva y sangre, se observa alta replicación en sangre, y también una baja replicación en leche y saliva, (línea roja muestra el punto de corte, muestras hasta este punto representan una carga viral menor a 10 copias/ml). Entre paréntesis junto al número de folio del paciente se encuentra la edad del mismo en días. RN: recién nacido. SF: sin fecha.

Conclusión:

En la población estudiada la transmisión vertical del virus por leche materna no parece ser significativa, sin embargo en muchos casos existe una limitación de la replicación de saliva a sangre además de la falta de síntomas en nuestros pacientes, esto puede ser explicado por la transferencia de inmunidad pasiva de la madre al neonato, ya sea por inmunoglobulinas o micro RNAs. La lactancia materna tiene un alto impacto sobre la inmunidad del neonato, lo que ayuda a que la replicación viral se limite. Nuestros resultados apoyan la continuidad de la lactancia materna en pacientes con madres que tengan una reactivación del virus en glándula mamaria y en aquellos en los que adquirieron infección viral durante la gestación. Se necesitan estudiar otros factores que influyen en la infectividad del virus como su genotipo, para aclarar la influencia que tuvo el mismo sobre la infección de nuestros pacientes, además se necesitan realizar más estudios para delimitar que factor protector de la leche materna es el que influye de manera predominante en la respuesta del neonato al virus.

Bibliografía:

1.- Aguilar F., Nieto J. EL LABORATORIO CLÍNICO EN EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN O ENFERMEDAD POR CITOMEGALOVIRUS. REV EXP MED 2(2), 2016.

2.-Carballal G, Oubiña JR. Virología Médica. 4a ed. Buenos Aires; 2014. 394-395 p.

3.- Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Infección por Citomegalovirus en la Edad Pediátrica. Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Infección por Citomegalovirus en la Edad Pediátrica. México: Secretaría de Salud, 2012.

4.- Colleen S. Kraft, et al. Interpreting Quantitative Cytomegalovirus DNA Testing: Understanding the Laboratory Perspective. Clin Infect Dis. 2012 Jun; 54(12):1793-7 p.

5.- Espinoza M., Tecuatl B., Saltigeral P. Infección congénita por Citomegalovirus. Rev. Enf. Inf. Ped. XXVII (102). 2012. 225-233 p.

6.- Sordelli N., Sapia E., Delgado M. Infección sintomática por citomegalovirus a través de la lactancia materna en un niño de 45 días. Arch Argent Pediatr 2015; 113(3): 145-148 p.

7.- Moraes Mario, Pablo Gesuele Juan, Rodríguez Andrea, Vaz Ferreira Catalina, Buonomo Florencia, Ghione Andrea et al. Infección congénita por citomegalovirus: Primer reporte nacional de tratamiento con valganciclovir vía oral en recién nacidos. Arch. Pediatr. Urug.  [Internet]. 2013  Dic [citado  2016  Jul  13];  84(4): 275-280. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S1688-12492013000400005&lng=es.

8.- Marchetti S. et. Al. Comparison of real-time PCR and pp65 antigen assays for monitoring the development of Cytomegalovirus disease in recipient of solid organ and bone marrow transplant. New Microbiologica, 34: 157-164. 2011.

9.-Reina J., Balliu P. Primoinfección postnatal por citomegalovirus (CMV) asociada a lactancia materna en pacientes de riesgo. Rev Esp Pediatr 2012; 68(5): 349-351 p.

10.- Caliendo AM, et al. Evaluation of real-time PCR laboratory-developed tests using analyte-specific reagents for cytomegalovirus quantification. J Clin Microbiol. 45:1723, 2007.

11.-Gutierrez J., Carmona R., Cruz L. Concentraciones de IgG e IgM en pacientes con infección por citomegalovirus diagnosticada mediante PCR cualitativa. Med Int Mex 2009; 25(2):105-10.

12.- García M., Torreblanca B., March G. La leche materna como vehículo de transmisión de virus. Nutr Hosp. 2015; 32(1):4-10 p.

13.- Kerrey B. ET AL. Breast milk as a source for acquition of citomegalovirus ia a premature infant with sepsis síndrome: detection by real-time PCR. Journal of clinical virology. 35(1). 2006. 313-316 p.

14.- Yamamoto A. Et. Al. Is a saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screning of congenital CMV infectio?. Journal of clinical virology 36. 2006. 228-230 p.