



REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram



ARTÍCULO ESPECIAL

Estrategias para el diagnóstico y monitoreo de citomegalovirus en pacientes trasplantados

María Daniela Borgnia^{a,k,*}, María Vanesa Romano^{b,k}, Marilina Rahhal^{c,k},
Ana María Zamora^{d,k}, Martín Cañete^{e,k}, Marina Medina^{f,k},
María Paula Eguiguren^{g,k}, Belen Marti^{h,k}, Maria de los Ángeles Baridon^{i,k}
y Cristina Videla^{j,k}

^a Laboratorio de Virología Clínica, Servicio de Microbiología, Hospital de Pediatría «Prof. Dr. Juan P. Garrahan», Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^b Laboratorio Central, Área de Biología Molecular, Hospital Universitario Austral, Pilar, Buenos Aires, Argentina

^c Hospital El Cruce-Nestor Kirchner, Florencio Varela, Buenos Aires, Argentina

^d División Virología, Laboratorio de Salud Pública de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina

^e Laboratorio de Análisis Clínicos, Hospital Británico de Buenos Aires, Sección Biología Molecular, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^f Laboratorio Central, Sección Biología Molecular, Departamento de Patología Clínica, Hospital Italiano de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^g Hospital de Niños Sor María Ludovica, La Plata, Buenos Aires, Argentina

^h Hospital Provincial del Centenario, Rosario, Santa Fe, Argentina

ⁱ Laboratorio, Área Virología y Biología Molecular, HIGA Dr. Rodolfo Rossi, La Plata, Buenos Aires, Argentina

^j Laboratorio de Virología Clínica, Departamento de Análisis Clínicos, Hospital Universitario CEMIC, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^k Grupo de trabajo «Infecciones virales en pacientes trasplantados», Sociedad Argentina de Virología

Recibido el 28 de enero de 2025; aceptado el 20 de octubre de 2025

PALABRAS CLAVE

Citomegalovirus;
Trasplante;
Diagnóstico y
monitoreo viral;
Estandarización

Resumen El citomegalovirus (CMV) es una de las principales complicaciones vinculadas con el trasplante, ya sea de órgano sólido o de células progenitoras hematopoyéticas, y se asocia a un incremento de la morbilidad posttrasplante. A causa del alto impacto que tiene, se prefiere que su prevención sea mediante el uso de profilaxis o terapia preventiva. Esta última requiere el monitoreo viral del paciente, dado que la viremia es predictiva de la enfermedad, de modo que el monitoreo permite la detección temprana y el tratamiento preventivo oportuno. En la actualidad, la técnica de monitoreo viral por excelencia es la determinación cuantitativa de ácidos nucleicos. En este sentido, los laboratorios suelen enfrentarse a desafíos prácticos relacionados con el tipo de muestra por tomar, sus condiciones de transporte y almacenamiento, los métodos adecuados de extracción y cuantificación de ácidos nucleicos,

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: dborgnia@garrahan.gov.ar (M.D. Borgnia).

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2025.10.006>

0325-7541/© 2025 Los Autores. Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Asociación Argentina de Microbiología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: M.D. Borgnia, M.V. Romano, M. Rahhal et al., Estrategias para el diagnóstico y monitoreo de citomegalovirus en pacientes trasplantados, Revista Argentina de Microbiología, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2025.10.006>

KEYWORDS

Cytomegalovirus;
Transplant;
Viral diagnosis and
monitoring;
Standardization

la frecuencia del monitoreo y los puntos de corte a utilizar. Todos estos aspectos son importantes para garantizar precisión y reproducibilidad de los resultados de las pruebas de carga viral de CMV. Es por ello que la Sociedad Argentina de Virología ha conformado un grupo de trabajo dedicado específicamente a abordar estas temáticas. En este documento se brinda una serie de recomendaciones referidas a los puntos mencionados, consensuadas sobre la base de la evidencia científica disponible y la experiencia del grupo de trabajo a cargo.

© 2025 Los Autores. Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Asociación Argentina de Microbiología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Strategies for the diagnosis and monitoring of cytomegalovirus in transplant patients

Abstract CMV is one of the main complications associated with transplantation, whether of solid organs or hematopoietic stem cells, and is related to an increase in post-transplant morbidity and mortality. Due to its significant impact, prevention is recommended, either through prophylaxis or other preventive therapies. The latter require viral monitoring of the patient, as viremia serves as a predictor of the disease, allowing for an early detection and timely preventive treatment. The gold standard for viral monitoring is the quantitative determination of nucleic acids. Laboratories often face practical challenges regarding the type of sample to be used, its transport and storage conditions, the appropriate methods of nucleic acid extraction and quantification, the frequency of monitoring and establishment of cut-off points to ensure the accuracy and reproducibility of CMV viral load test results. The Argentine Society of Virology has formed a working group specifically dedicated to addressing these difficulties.

This document aims to provide recommendations on the aforementioned points based on the available scientific evidence and the expertise of the working group.

© 2025 The Authors. Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Asociación Argentina de Microbiología. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El citomegalovirus (CMV), también conocido como citomegalovirus humano B5 (CMVH-B5), pertenece a la familia *Ortoherpesviridae* y se clasifica en la subfamilia *Betaherpesvirinae*, género *Cytomegalovirus*. Es un virus envuelto, de simetría icosaédrica y genoma ADN de doble cadena⁷¹.

Las infecciones por CMV son comunes y tienen una distribución global; pueden ocurrir en cualquier etapa de la vida, aunque son más frecuentes en la infancia. Se estima que la proporción de individuos seropositivos para CMV oscila entre el 40% y más del 90%, según la región geográfica^{5,12,102}.

El CMV se transmite a través de líquidos corporales, como la saliva, la orina, la sangre, las lágrimas, el semen y la leche materna. Las vías de transmisión son por contacto directo con la saliva o la orina, especialmente en bebés y niños pequeños, a través de la leche materna en los lactantes, por contacto sexual y por medio de trasplantes de órganos y transfusiones de sangre^{6,39,91,95}.

En individuos inmunocompetentes, el CMV generalmente no presenta complicaciones significativas. Después de la primoinfección, el virus entra en un estado de latencia de por vida y puede dar lugar a reactivaciones en situaciones particulares. Sin embargo, en pacientes inmunodeprimidos, receptores de trasplantes, personas con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) o en casos de infección congénita, se comporta como un patógeno

oportunisto. En estos individuos puede ocasionar enfermedades graves, dejar secuelas e incluso llevar a consecuencias fatales, lo que destaca la importancia crítica de su diagnóstico, monitoreo y manejo en diferentes contextos clínicos específicos⁶⁶. En el caso particular de los pacientes trasplantados, al recibir tratamientos inmunosupresores para prevenir el rechazo del órgano, su sistema inmunitario se debilita, lo que los hace más propensos a infecciones y reactivaciones virales, entre ellas la de CMV. En este tipo de población, la infección primaria o la reactivación del CMV pueden producir un amplio espectro de enfermedades, como síndrome febril, hepatitis, neumonía, enfermedad gastrointestinal, encefalitis y retinitis. El CMV es una de las principales complicaciones asociadas al trasplante, ya sea de órgano sólido (TOS) o de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH), y se asocia a un incremento de la morbilidad postrasplante⁶⁶.

Teniendo en cuenta este escenario, la Sociedad Argentina de Virología ha conformado un grupo de trabajo que tuvo a su cargo la elaboración de una guía de recomendaciones que abordan de manera integral los aspectos claves del diagnóstico y el seguimiento de las cargas virales del CMV en pacientes trasplantados. Esta iniciativa se concretó a partir de la fundamentación proporcionada por la evidencia científica, así como de la experiencia y los conocimientos especializados de nuestro equipo de trabajo. Nuestro propósito es ofrecer una herramienta práctica y confiable que sirva como referencia fundamental para los profesionales de

la salud, garantizando un enfoque integral de la atención del paciente trasplantado.

Infección y enfermedad: definiciones de interés

En 1993, en la Cuarta Conferencia Internacional de CMV realizada en París, se establecieron por primera vez definiciones de infección y enfermedad debido a las dificultades para diferenciar estos dos estadios en diferentes tipos de pacientes y enfermedades^{53,55}. Luego de dos actualizaciones de estos conceptos en los años 1995⁵⁸ y 2002⁵⁷, y teniendo en cuenta los grandes avances logrados en el manejo, el tratamiento y los métodos de diagnóstico, en 2016, el *CMV Drug Development Forum*, un grupo de especialistas estadounidenses, europeos y canadienses, junto con representantes de la *Food and Drug Administration* (FDA), la *European Medicines Agency* (EMA) y la industria farmacéutica y de diagnóstico, ampliaron estas definiciones. Se incorporaron a la categoría de enfermedad probada las categorías de enfermedad probable y posible, al mismo tiempo que se incorporó la PCR cuantitativa como método diagnóstico de algunas categorías de enfermedad en órgano por CMV. En 2024, el *Transplant Associated Virus Infections Forum* (creado en 2014) publicó una actualización de las definiciones referidas al CMV para ser empleadas en estudios clínicos tanto en TOS como en TCPH^{53,55}.

Algunas definiciones que vamos a considerar por su importancia en el diagnóstico son las siguientes:

- **Infección por CMV o replicación de CMV.** Se define por el aislamiento del virus o por la detección de proteínas (antígenos) o de ácido nucleico viral en cualquier fluido o tejido corporal: plasma, suero, sangre entera, leucocitos de sangre periférica, líquido cefalorraquídeo (LCR), lavado broncoalveolar (BAL), orina y diversos tejidos. Según la metodología empleada, la replicación del CMV puede valorarse y denominarse como CMV ADNemia, si se emplean técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT); CMV antigenemia, si se detecta la presencia de antígenos, y CMV viremia, si se basa en el cultivo viral. No siempre la detección de ADNemia representa que el CMV se está replicando activamente. Los llamados «blips de ADN» se caracterizan por una detección única de ADN, usualmente con baja carga viral, y podrían representar una replicación viral incompleta o el control del CMV por parte de la respuesta inmune.
- **Infección primaria por CMV.** Primera detección de infección por CMV en el paciente sin evidencia de exposición al virus antes del trasplante.
- **Enfermedad por CMV.** Se establece cuando la infección está acompañada de signos y síntomas, y puede presentarse como «síndrome por CMV» o «enfermedad en órgano».
 - **Síndrome por CMV:** detección dentro de la primera semana de inicio de síntomas de CMV en sangre mediante NAAT, antigenemia o cultivo viral, sumado al menos a dos de las siguientes condiciones⁵⁵:
 1. Fiebre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ por al menos 2 días.
 2. Nuevo malestar o fatiga, o incremento de esta.
 3. 5% de linfocitosis atípica.

4. Leucopenia o neutropenia en dos mediciones distintas.
5. Trombocitopenia.
6. Transaminasas hepáticas elevadas.

Esta denominación debe ser empleada solo en pacientes con trasplante de órgano sólido; no es aplicable en individuos con TCPH. Además, el síndrome por CMV se clasifica solo bajo la categoría de probable dada la imposibilidad de excluir todas las causas posibles de la sintomatología descrita.

- **Enfermedad en órgano.** Algunos pacientes trasplantados desarrollan enfermedad por CMV en órganos (neumonía, enfermedad gastrointestinal, hepatitis, retinitis, encefalitis, nefritis, cistitis, miocarditis, pancreatitis), y, en ocasiones, con cargas virales en plasma no detectables. Los cuadros más frecuentes son neumonía y gastroenteritis. En cuanto al diagnóstico de estas enfermedades, se han consensuado definiciones internacionales específicas que señalan con qué métodos diagnósticos documentarlas. La mayor dificultad que se presenta con el CMV es no solo su capacidad de estar en estado latente y poder ser detectado con técnicas muy sensibles, sino también que, aun si se está replicando activamente, puede no ser el agente etiológico de la enfermedad. Estas definiciones establecen diferentes categorías de acuerdo a la certeza o posibilidad de que el CMV sea el agente etiológico: enfermedad probada, enfermedad probable o enfermedad posible.

A continuación se presentan las definiciones de las principales enfermedades asociadas a CMV^{53,55}.

Neumonía por CMV

Se distinguen tres categorías:

- a) **Neumonía por CMV probada.** Síntomas y/o signos de neumonía (infiltrados en imágenes, hipoxia, taquipnea y/o disnea) más la detección de CMV en biopsia de tejido de pulmón por aislamiento viral, cultivo rápido, histopatología, inmunohistoquímica o técnicas de hibridación de ADN.
- b) **Neumonía por CMV probable.** En pacientes con TCPH, se define como la detección de CMV por cultivo tradicional o rápido en muestra de BAL o una carga viral elevada en BAL, más signos y síntomas de neumonía, en ausencia de otro patógeno. El valor de corte de carga viral no se ha definido aún por falta de estandarización en el procedimiento de toma de muestra y en los ensayos utilizados en la cuantificación de ácidos nucleicos. Se han sugerido niveles de al menos $3 \log_{10}$ para este tipo de pacientes. La especificidad aumenta con niveles más altos de carga viral y la ausencia de ADN viral en BAL tiene un alto valor predictivo negativo.

En pacientes con trasplante de órgano sólido, este síndrome es un evento más raro y no hay consenso respecto de la definición de un punto de corte para la carga viral en BAL. Sin embargo, se acordó que cargas virales altas junto con los síntomas señalan una neumonía probable.

- c) *Neumonía por CMV posible*. Detección de altos niveles de carga viral en BAL junto con otro patógeno.

Se ha reconocido la existencia de infecciones asintomáticas por CMV en el tracto respiratorio inferior, ya sea mediante aislamiento o por detección molecular; la detección de bajas cargas virales se asocia a presencia asintomática: cuanto más alta es la carga viral, mayor es la asociación con neumonía. En relación con esto, un hecho controversial tanto en TCPH como en TOS es cuando se detectan otros patógenos junto con CMV. En esos casos, cuando la carga viral de CMV es baja, la probabilidad de que la neumonía se deba a CMV es baja. Por el contrario, cuando las cargas virales son altas, la probabilidad es mayor.

El gran desafío de utilizar la carga viral en BAL para predecir neumonía es definir qué valores se consideran «bajos» y «altos». Recientemente se realizó un estudio para determinar la utilidad de la PCR cuantitativa para el diagnóstico de neumonía por CMV y establecer un valor umbral para diferenciar la enfermedad de la presencia asintomática en BAL. Se determinaron las cargas virales en BAL de pacientes con TCPH y neumonía por CMV probada, usando como controles pacientes con neumonía de origen idiopático, pacientes asintomáticos y pacientes con neumonía por otras causas distintas del CMV. Se encontró para la neumonía por CMV una carga viral media de aproximadamente $4 \log_{10}$ UI/ml (rango: $2,6-6 \log_{10}$ UI/ml); en neumonía no por CMV y en la idiopática, este valor fue de $0 \log_{10}$ UI/ml (rango: $0-1,6 \log_{10}$ UI/ml) y en la asintomática fue de $1,63 \log_{10}$ UI/ml (rango: $0-2,5 \log_{10}$ UI/ml). Se determinó un valor de 500 UI/ml en BAL para diagnóstico de neumonía. Estas cargas se ajustaron al número de células contenidas en el BAL mediante la detección del gen de la beta-globina⁸.

En otro estudio se compararon las cargas virales en plasma y en BAL de pacientes con TCPH y cuadro clínico de neumonía; se observó una amplia variabilidad en los valores de las cargas en BAL, y, comparadas con las cargas en plasma, estas últimas fueron siempre más bajas o negativas. En este caso no se determinó un valor umbral; al contrario, se asumió que cualquier valor de carga viral en BAL que fuera mayor que el del plasma sería sugestivo de neumonía por CMV⁴².

Estos estudios son el comienzo de la aplicación de PCR cuantitativa en muestras con células y van a requerir no solo armonizar la carga viral de CMV con el estándar internacional (detallado más adelante), sino también considerar la variabilidad de utilizar la PCR en muestras no homogéneas, como BAL o biopsias.

Otra enfermedad de órgano que se presenta con frecuencia en los pacientes trasplantados es la enfermedad gastrointestinal.

Enfermedad gastrointestinal por CMV

Se distinguen también tres categorías:

- a) *Enfermedad gastrointestinal probada*. Requiere la presencia de síntomas relacionados con el tracto gastrointestinal superior o inferior, más lesiones macroscópicas en la mucosa, más CMV documentado en tejido por histopatología, aislamiento viral, cultivo rápido, immuno-

histoquímica o técnicas de hibridación de ADN. Además, es importante descartar la presencia de enfermedad injerto contra huésped como diagnóstico alternativo en receptores de TCPH.

- b) *Enfermedad gastrointestinal probable*. Requiere la presencia de síntomas relacionados con el tracto gastrointestinal superior o inferior más CMV documentado en tejido, pero sin lesiones macroscópicas en mucosas. Además, es importante descartar la presencia de enfermedad injerto contra huésped como diagnóstico alternativo en receptores de TCPH.
- c) *Enfermedad gastrointestinal posible*. En muchos centros, la práctica clínica habitual ha evolucionado hacia no realizar endoscopias y biopsias en pacientes con TOS que no sea de intestino delgado. En su lugar, se los trata como casos de enfermedad gastrointestinal por CMV, especialmente cuando presentan una carga viral de CMV en sangre elevada o en aumento, acompañada de diarrea clínicamente significativa u otros síntomas gastrointestinales, y en ausencia de otras causas probables. En estos casos, la ADNemia por CMV junto con la presencia de síntomas gastrointestinales con una calificación de intensidad de grado ≥ 2 según los criterios de terminología común para eventos adversos del Instituto Nacional del Cáncer (versión 4.0) se puede utilizar para establecer un posible diagnóstico de enfermedad gastrointestinal por CMV.

En TCPH, la detección de CMV en biopsias intestinales por PCR sin lesiones macroscópicas en mucosa puede usarse para definir enfermedad gastrointestinal posible.

El hallazgo de CMV en plasma mediante PCR no es suficiente para diagnosticar enfermedad gastrointestinal por CMV. Es posible que se desarrolle dicha enfermedad en el tracto gastrointestinal aun cuando la carga viral en plasma no sea detectable⁵³. Se ha sugerido investigar la materia fecal como una muestra no invasiva para diagnosticar este cuadro. La presencia de CMV en heces se correlaciona con altas cargas virales en biopsias intestinales; su detección en heces puede tener una sensibilidad y especificidad del 67% y del 96%, respectivamente, para el diagnóstico de enfermedad intestinal²². Además, se ha intentado estandarizar la detección cuantitativa de CMV en biopsias gastrointestinales expresando los resultados en UI/ μ g de ADN o de órganos⁹³. Se requieren más estudios para poder validar las cargas virales en biopsias de diversos orígenes y determinar valores umbrales que permitan reemplazar la histopatología.

Se han consensuado las definiciones de otras enfermedades menos frecuentes, como hepatitis, retinitis y encefalitis por CMV. A continuación se detallan sus definiciones.

Hepatitis por CMV

Se considera que hay hepatitis por CMV *probada* frente a la presencia de pruebas hepáticas alteradas más CMV documentado en tejido hepático por histopatología, aislamiento viral, cultivo rápido, immuno-

Retinitis por CMV

Se considera que hay retinitis por CMV *probada* frente a la presencia de signos oftalmológicos típicos más la presencia de ADN en humor vítreo u otra parte del ojo. Cuando se cuenta solo con la presencia de signos oftalmológicos típicos, se debe considerar bajo la categoría de «probable».

Encefalitis por CMV

Se distinguen dos categorías:

- a) *Encefalitis por CMV probada*. Si hay presencia de síntomas en el sistema nervioso central (SNC) más CMV documentado en tejido del SNC por aislamiento viral, cultivo rápido, inmunohistoquímica o técnicas de hibridación *in situ* o PCR cuantitativa.
- b) *Encefalitis por CMV probable*. Si hay presencia de síntomas en el SNC más detección de CMV en LCR, sin signos visibles de contaminación con sangre, más anomalías en el estudio de imágenes.

El CMV también puede causar enfermedad en otros órganos, aunque con menor frecuencia. Para su interpretación se pueden utilizar las definiciones generales o referirse a las definiciones específicas de nefritis, cistitis, miocarditis y pancreatitis en el documento de consenso mencionado anteriormente⁵³.

Enfermedad tardía por CMV

Se denomina así a la enfermedad por CMV que aparece una vez que se discontinúa la profilaxis antiviral. Generalmente se presenta entre los 3 y 12 meses luego de finalizada la profilaxis en los TOS y luego de los 100 días postrasplante en los TCPH, en especial en donantes seropositivos. Sin embargo, también puede presentarse años después de realizado el trasplante, dependiendo de los factores de riesgo. Esta enfermedad puede considerarse en subgrupos de riesgo, dentro de los cuales es posible encontrar pacientes de alto riesgo. En ellos se recomienda utilizar profilaxis prolongada o estrategias híbridas (iniciar con profilaxis y continuar con monitoreo viral). El seguimiento de la infección tardía por CMV, la frecuencia de las pruebas de CMV y la duración del seguimiento difieren entre distintas publicaciones.

En la bibliografía se han definido los conceptos de infección refractaria y enfermedad refractaria⁸¹:

Infección refractaria por CMV

Con la nueva actualización, las categorías de infección probada y probable se unieron en una sola definición, la de *infección refractaria por CMV*, a saber: aumento de ADNemia o antigenemia de CMV ($> 1 \log_{10}$ en el mismo compartimento sanguíneo respecto de la máxima carga viral medida en el mismo laboratorio y con el mismo ensayo comercial) o persistencia (aumento o descenso de $\leq 1 \log_{10}$) después de al menos 2 semanas de tratamiento antiviral con la dosis apropiada^{43,56}.

Enfermedad refractaria por CMV

Lo mismo ocurrió con la definición de enfermedad refractaria, dentro de la cual se fusionaron las dos categorías, probada y probable. El criterio para considerar *enfermedad refractaria por CMV* es el siguiente: empeoramiento de los signos y síntomas o progresión a enfermedad localizada en órgano (para pacientes no diagnosticados previamente con enfermedad de órgano), o falta de mejoría en los signos y síntomas luego de al menos 2 semanas de tratamiento antiviral con la dosis apropiada.

Hay algunas enfermedades de órgano en las que no se realizan cargas virales en sangre, en cuyo caso es posible que no pueda recuperarse el virus para hacer estudios de resistencia.

Las posibles razones de refractariedad por CMV son las siguientes: a) estado de inmunosupresión excesiva, incluida la ausencia o deficiencia de la inmunidad de células T específicas de CMV; b) concentraciones subterapéuticas de fármacos antivirales, y c) resistencia al ganciclovir u otros fármacos antivirales.

Resistencia antiviral del CMV

Otro concepto importante para definir es la resistencia a los antivirales del CMV. Esta se define como la infección refractaria por CMV (antes definida) sumada a la presencia de alteración genética viral que confiere una reducida sensibilidad frente a una o más drogas antivirales.

Las principales mutaciones que confieren resistencia son las que se encuentran en los genes *UL97* y *UL54*. El gen *UL97* codifica una quinasa viral que cataliza la fosforilación inicial y la activación del ganciclovir. El gen *UL54* codifica la ADN polimerasa del CMV responsable de la elongación de la cadena del ADN viral. El grado de resistencia asociado a las mutaciones en cada gen depende del sitio en el que se encuentra la mutación, y estas pueden conferir bajo o alto nivel de resistencia. Las mutaciones más comunes son las del gen *UL97*, que confieren resistencia a ganciclovir. Las mutaciones en *UL54* son menos frecuentes y pueden conferir resistencia cruzada a ganciclovir, foscarnet y cidofovir.

Se han descrito mutantes resistentes a drogas antivirales que se están utilizando más recientemente, como el maribavir y el letermovir. El maribavir actúa inhibiendo la quinasa viral que fosforila el ganciclovir; el letermovir interfiere en la replicación del ADN viral y la formación de los nuevos viriones.

Las mutaciones más conocidas en el gen *UL97* son: M460V/I, H520Q, C592G, A594V, L595S y C603W^{14,46}. También se han descrito otras mutaciones menos frecuentes, concentradas entre los codones 590 y 607. Se ha observado que mutaciones en el gen *UL97* pueden producir resistencia cruzada al ganciclovir y maribavir, ya que los dos antivirales actúan sobre el mismo blanco. En el caso particular del maribavir, las mutaciones de resistencia descritas en *UL97* son las sustituciones T409M, H411Y y C480F¹⁴. En el gen *UL54*, que codifica la polimerasa, las mutaciones ocurren en múltiples sitios, la mayoría concentradas en las regiones 395-545 y 809-987. Así también, se han descrito mutaciones en el gen *UL56*, que codifica el complejo de la terminasa viral, blanco del letermovir.

Epidemiología e impacto clínico

Sin una estrategia de prevención, la infección o la enfermedad por CMV se produce durante los primeros 3 meses luego de un TOS. A pesar de que actualmente se utilizan estrategias de prevención después del trasplante que disminuyen el riesgo de enfermedad por CMV, esta afección puede ocurrir en hasta el 50% de los pacientes con TOS de alto riesgo, receptor seronegativo y donante seropositivo (R-/D+), y en hasta el 17% de los receptores seropositivos (R+) ^{52,73}. Generalmente la infección por CMV es asintomática cuando se diagnostica en el contexto del monitoreo viral postrasplante.

Con respecto a los receptores de TCPH, el CMV produce enfermedad en el 10% al 40% de estos pacientes, manifestándose principalmente como neumonitis, en la mayoría de los casos, y con una tasa de mortalidad elevada, de alrededor del 70%. En la actualidad, con la implementación de estrategias de prevención, la incidencia de la enfermedad por CMV es del 5% al 10% ^{27,29}. A pesar de ello, la infección por CMV se asocia con mayor mortalidad no relacionada con recaída luego del trasplante, probablemente debido a los efectos indirectos de la infección o de su tratamiento ^{29,97}.

Estrategias de prevención

Debido a la elevada morbilidad asociada, a lo largo de los años se implementaron diversas estrategias de prevención con el objetivo de evitar la infección o la reactivación del CMV previa al desarrollo de la enfermedad. Entre estas estrategias se destacan la profilaxis y la terapia preventiva ³².

La *profilaxis* previene la infección primaria o la reactivación viral utilizando un antiviral, como el ganciclovir, por un plazo de 3 a 12 meses según el tipo de trasplante y los factores de riesgo asociados. En el caso de la *terapia preventiva*, el uso del antiviral está guiado por el monitoreo de la carga viral, ya que una vez detectada la replicación, se trata de prevenir la enfermedad. En este caso, el antiviral se incorpora cuando mediante el monitoreo se detectan niveles que superan ciertos puntos de corte preestablecidos ^{17,32}.

Tanto la profilaxis como la terapia preventiva tienen buena eficacia para prevenir la enfermedad por CMV. La selección entre una u otra estrategia depende del tipo de trasplante y de los factores de riesgo asociados en cada situación. Algunos centros optan por una estrategia híbrida para pacientes de riesgo alto, la cual implica iniciar con profilaxis y luego continuar con terapia preventiva ^{10,17,27,29,32,49,52,56,73,81,97}.

La profilaxis evita la infección o reactivación viral temprana y es más común la enfermedad por CMV tardía. El desarrollo de cepas resistentes es poco frecuente en ambos casos. En cuanto a la implementación, la profilaxis es más sencilla de llevar a cabo. La terapia preventiva requiere de cierta infraestructura del centro y coordinación para incorporar el monitoreo semanal de los pacientes, estar pendientes de los resultados y generar sistemas de comunicación de alertas, lo que demanda un trabajo en conjunto del equipo médico y del laboratorio. Además, es muy importante brindar una respuesta rápida (dentro de las 24-48h)

que permita la implementación oportuna del tratamiento, impactando positivamente en la evolución del paciente.

Los pacientes que se manejan con terapia preventiva requieren, además, considerar la prevención de otros herpesvirus, como varicela zóster (VZV) y herpes simplex (HSV), que sí estarían cubiertos con el uso de profilaxis. Por otra parte, en la terapia preventiva, se hace un uso selectivo de las drogas antivirales, con lo cual se reducen tanto los costos asociados como sus efectos adversos. Sin embargo, esta estrategia requiere considerar los costos adicionales derivados del monitoreo de las cargas virales. Con ambas estrategias se mejora la sobrevida del injerto. En la [tabla 1](#) se presenta un resumen de las principales ventajas y desventajas de cada estrategia. En la mayoría de los consensos internacionales se recomienda el uso de profilaxis en pacientes de riesgo muy alto. También es importante considerar que el uso de terapia preventiva no ha sido suficientemente estudiado en el caso de trasplantes de pulmón e intestino. A continuación se ejemplifican diferentes estrategias documentadas en la bibliografía.

En pacientes con TCPH, inicialmente se comenzó a utilizar profilaxis con ganciclovir hasta los 100 días postrasplante, con buenos resultados, pero debido a los efectos adversos, en especial la mielosupresión y el consecuente aumento de las infecciones por CMV tardías, se evaluó la terapia preventiva con ganciclovir al principio y luego con valganciclovir, dirigido solo a receptores seropositivos para CMV que presenten infección. Este esquema demostró la misma eficacia para la prevención de la enfermedad que la profilaxis con ganciclovir, pero con menos efectos adversos y menores costos ³¹. Es por esto que se ha recomendado seguir con esta última estrategia de prevención en TCPH ³².

En este sentido, en 2017 se realizó un estudio aleatorizado de profilaxis usando otro antiviral contra CMV, el letermovir, en pacientes con TCPH seropositivos para CMV durante los primeros 100 días luego del trasplante. Este régimen demostró una alta eficacia y un muy buen perfil de seguridad, sin mielotoxicidad, lo que motivó su aprobación como profilaxis primaria, inicialmente en Estados Unidos y luego en Europa ⁶³. Este antiviral se encuentra disponible en la Argentina desde fines de 2019; los estudios realizados señalan su efectividad en la prevención de la enfermedad por CMV y la hospitalización de adultos con TCPH ^{37,38}.

Actualmente, dada la mayor eficacia y el bajo riesgo de efectos secundarios graves del letermovir en comparación con otras opciones de profilaxis antiviral en adultos, no se recomienda el uso de otro fármaco, excepto que no sea posible usar letermovir. Se recomienda la profilaxis con letermovir en receptores de TCPH alogénico seropositivos para CMV. Se debe comenzar con este régimen dentro de los 28 días posteriores al trasplante y continuarlo durante los primeros 100 días, iniciándolo lo antes posible ⁵⁴.

La profilaxis secundaria con letermovir luego de una reactivación del CMV tratada no ha sido estudiada. La resistencia al letermovir es poco común durante la profilaxis primaria en receptores de TCPH, con una incidencia por debajo del 2% según ensayos de fase 3 ¹⁵.

La interrupción temporal del tratamiento o cualquier situación que provoque bajas concentraciones del fármaco constituyen un factor de riesgo para la rápida aparición de resistencia al letermovir durante la profilaxis.

Tabla 1 Comparación de las ventajas y desventajas del uso de profilaxis y de terapia preventiva

	Profilaxis antiviral	Terapia preventiva
ADNemia temprana	Rara	Común
Prevención de enfermedad por CMV	Buena	Buena (menor en población de alto riesgo)
CMV tardío (infección/enfermedad)	Común	Raro
Resistencia a drogas	Poco común	Poco común
Facilidad de implementación	Relativamente fácil	Más difícil
Costos	Costo asociado a las drogas	Costo asociado al monitoreo
Seguridad	Efectos adversos de las drogas	Menor toxicidad por uso de drogas
Acción sobre otros herpesvirus	Previene HSV y VZV	No previene

HSV: virus herpes simplex virus; VZV: virus varicela zóster.

En pediatría, su uso como profilaxis primaria y secundaria es seguro y eficaz en la prevención de la infección por CMV luego de un TCPH de alto riesgo. La incidencia de infección por CMV en pacientes seropositivos que reciben profilaxis con letermovir no supera el 9% en los 6 meses posteriores al TCPH. Aún no ha sido claramente establecido el impacto del letermovir sobre la supervivencia global en pacientes considerados de riesgo estándar, es decir, aquellos sin factores de riesgo elevado para reactivación o con enfermedad por CMV tras un TCPH¹⁰⁵.

Aunque no hay estudios aleatorizados, un estudio en fase 2b sobre profilaxis con letermovir en niños informó una incidencia de infección (24%) hasta la semana 24 después del TCPH en adolescentes (12 a 18 años) similar a la del estudio de fase 3 en adultos (37,5%)^{30,101}.

Hay pocos estudios clínicos que comparen ambas estrategias de prevención en pacientes con TOS. Algunos de estos estudios, realizados a baja escala, demostraron que ambas estrategias poseen similar efectividad en la prevención de la enfermedad por CMV, incluso en los pacientes R-/D+^{44,47,85,103}. Los antivirales de elección para la profilaxis de CMV son el valganciclovir y ganciclovir intravenoso. El letermovir fue aprobado recientemente en trasplantes de riñón de pacientes de riesgo alto, reduciendo la toxicidad mielosupresora.

En un ensayo clínico aleatorizado donde se evaluó la eficacia del uso de profilaxis prolongada en pacientes trasplantados de riñón R-/D+ se demostró una reducción de la incidencia de enfermedad por CMV del 16,1% con 200 días de profilaxis respecto al 36,8% con 100 días de valganciclovir⁴¹. No existen ensayos clínicos aleatorizados que evalúen la duración óptima de la profilaxis antiviral en pacientes receptores de trasplante de intestino y pulmón. Estos trasplantes son de muy alto riesgo y se utilizan profilaxis prolongadas que han demostrado una reducción en las tasas de infección y de enfermedad asociada^{40,106}.

Otra opción de antiviral de primera línea para utilizar en algunos pacientes es el maribavir. Este fue comparado con valganciclovir en un ensayo aleatorizado y controlado; se observaron resultados similares de disminución de la carga viral en sangre (valganciclovir 77,4% vs. maribavir 69,3%), con una toxicidad medular inferior con el maribavir. Por ello, se recomienda considerar el uso de maribavir en pacientes con neutropenia que no pueden ser tratados con valganciclovir o en pacientes con deterioro de la función renal, para quienes el uso de foscarnet no es apropiado⁵⁴.

En conclusión y de acuerdo con la evidencia documentada en la bibliografía, expertos en el tema recomiendan que cada centro defina las estrategias a utilizar en los diferentes tipos de trasplante y de acuerdo con los factores de riesgo asociados al paciente.

Factores de riesgo para la infección por CMV

Los factores de riesgo de infección o reactivación de CMV son el estado serológico del donante y el receptor, el tipo de trasplante de órgano sólido o de células progenitoras hematopoyéticas y el tratamiento inmunosupresor.

El principal factor de riesgo que predispone al desarrollo de la enfermedad por CMV después del TOS es una deficiencia cualitativa (funcional) o cuantitativa en la inmunidad global (inespecífica) o específica frente al CMV^{61,67}.

En la práctica clínica, la serología para CMV (anticuerpos IgG) previa al trasplante permite determinar la categoría de riesgo. Los pacientes con mayor riesgo son los R-/D+^{16,61,62,67}. Por otro lado, los R+ tienen un riesgo moderado de infección y enfermedad por CMV²⁰. En este grupo, el riesgo de infección por CMV es mayor cuando el donante también es seropositivo (D+) en comparación con el donante seronegativo (D-), probablemente debido a una sobreinfección con CMV transmitida por el donante. Un receptor seronegativo que recibe un órgano de un donante seronegativo (R-/D-) tiene el riesgo más bajo de enfermedad por CMV, siempre y cuando reciba hemoderivados filtrados.

La inmunosupresión inducida por fármacos, que reduce la cantidad (es decir, linfopenia grave) y paraliza la función de las células T (es decir, anergia de los linfocitos), aumenta el riesgo de CMV después del TOS^{23,65}. En particular, el uso de agentes que agotan los linfocitos (globulinas antitímocito y alemtuzumab)^{21,79}, o dosis altas de fármacos inmunosupresores de mantenimiento, incrementan el riesgo de CMV^{20,59}. El uso de inhibidores de mTOR (como sirolimus y everolimus), por el contrario, se ha asociado con un menor riesgo de CMV^{9,60,76}. El rechazo del aloinjerto es un factor de riesgo importante para el CMV, especialmente cuando se trata con anticuerpos antilinfocitos.

El riesgo de enfermedad por CMV también varía según el tipo de órgano trasplantado, en orden decreciente: pulmón, intestino delgado, hígado, corazón y riñón.

En el caso del TCPH, el estado serológico del donante y el receptor es también el primer factor de riesgo a considerar.

Otros factores por considerar son la fuente del trasplante, el tratamiento previo y el tratamiento inmunosupresor de mantenimiento²⁵. Los receptores seropositivos que reciben células de un donante seronegativo constituyen el principal factor de riesgo.

La interpretación de los resultados de la serología en pacientes menores de 12 meses puede resultar dificultosa por la posibilidad de que se detecten anticuerpos de origen materno. La PCR de CMV en orina o saliva puede ser de gran utilidad para definir el estado serológico del paciente, ya que la detección del virus en estos compartimentos confirma la infección⁷⁴.

Otros factores de riesgo son los siguientes: enfermedad injerto versus huésped, el uso de altas dosis de corticosteroides (≥ 1 mg/kg/día), depleción de células T, donante haploidéntico, sangre de cordón, trasplante no relacionado o HLA no idéntico, linfopenia, uso de ciclofosfamida, entre otros²⁸.

Las nuevas modalidades de trasplante inciden en el riesgo de infección y enfermedad por CMV. Los trasplantes de tipo haploidéntico y aquellos que se realizan a través de sangre de cordón umbilical tienen frecuencias similares de reactivación del CMV⁸⁰. Los receptores de TCPH de tipo haploidéntico, con manipulación del injerto *ex vivo*, son frecuentes en pediatría y representan un grupo de riesgo elevado, con una mortalidad asociada del 50%⁴.

La infección por CMV es frecuente después de un TCPH de sangre del cordón umbilical, probablemente debido a un retraso en la reconstitución inmune^{11,87}. Se ha documentado una mayor mortalidad, no relacionada con recaída de su enfermedad de base, en los receptores de TCPH a partir de sangre de cordón con serología pretrasplante positiva que reactivan CMV en comparación con otras fuentes celulares⁶⁹.

La incidencia de enfermedad luego de un TCPH dentro de los primeros 100 días postrasplante ha disminuido en las últimas décadas^{7,27}. La enfermedad por CMV *pre-engraftment*, aunque es rara, se asocia con una elevada mortalidad. La enfermedad gastrointestinal por CMV es el cuadro diagnosticado con mayor frecuencia (70-80% de los casos), aunque las pruebas de PCR generalmente son negativas al momento del diagnóstico. Esto probablemente se deba a que la enfermedad gastrointestinal, al menos en sus etapas iniciales, es un fenómeno local fuertemente asociado a la enfermedad injerto versus huésped^{28,64}. El uso de las estrategias de prevención, profilaxis o terapia preventiva ha incrementado el riesgo de desarrollo de la llamada enfermedad por CMV tardía (> 100 días post-TCPH)⁷. La enfermedad más frecuentemente asociada, en este caso, es la neumonía¹⁸.

Métodos de diagnóstico y monitoreo viral

Los métodos de diagnóstico de CMV han evolucionado a lo largo de los años. Inicialmente se comenzó con la serología, que en la actualidad se utiliza para determinar el estado inmune pretrasplante. Posteriormente se implementó el cultivo tradicional del virus, el cual fue reemplazado por el cultivo rápido (*shell vial*). Como primera técnica de monitoreo en pacientes trasplantados, se utilizó la detección del antígeno pp65 por inmunofluorescencia en polimorfonucleares de sangre periférica. Esta metodología requiere el procesamiento de la muestra en el día y es menos sensible

que los métodos moleculares. Además, en pacientes neutropénicos la sensibilidad es aún menor debido a la disminución de leucocitos circulantes. En la actualidad se utilizan técnicas altamente sensibles, como la amplificación de ácidos nucleicos por PCR y, de forma aún más avanzada, la cuantificación de ácidos nucleicos mediante PCR en tiempo real, que es el método de elección para realizar el monitoreo⁵⁴.

El fundamento que respalda el uso de la terapia preventiva guiada por el monitoreo viral es que la enfermedad, luego de una infección o reactivación viral, es precedida por una etapa de replicación viral clínicamente silenciosa. Detectar esta replicación de manera oportuna es crucial para iniciar la terapia preventiva y así prevenir el desarrollo de la enfermedad y sus graves consecuencias. Las técnicas moleculares cuantitativas han demostrado una correlación directa entre los valores hallados y el riesgo de desarrollar enfermedad; es por ello que la terapia preventiva se inicia al superar un determinado punto de corte.

Asimismo, el monitoreo postrasplante es la mejor herramienta para medir la respuesta a la terapia antiviral y permite identificar pacientes con riesgo de una recaída de la enfermedad y aquellos con riesgo de resistencia a antivirales.

La detección de CMV se puede realizar en diferentes tipos de muestras, pero su sola presencia no siempre es predictiva de enfermedad. Sin embargo, no ocurre lo mismo con la detección de ciertos niveles de ADNemia en sangre entera o plasma, que tiene un alto valor predictivo de enfermedad; por esta razón, es la sangre (o el plasma) la muestra de elección para el estudio cuantitativo de CMV.

Los laboratorios suelen enfrentarse a desafíos prácticos relacionados con el tipo de muestra a utilizar, sus condiciones de transporte y almacenamiento, los métodos adecuados de extracción de ácidos nucleicos, su cuantificación, la frecuencia de monitoreo y los puntos de corte a utilizar para garantizar precisión y reproducibilidad de los resultados de las pruebas de carga viral del CMV. El propósito del apartado siguiente es brindar recomendaciones acerca de estos aspectos sobre la base de la evidencia científica disponible y la *expertise* del grupo de trabajo.

Lineamientos para la evaluación de la carga viral de CMV en pacientes trasplantados

Tipos de muestra y condiciones de transporte y conservación

En el monitoreo viral se puede utilizar tanto sangre entera como plasma. No obstante, es de suma importancia el uso de un solo tipo de muestra en la vigilancia seriada para el correcto manejo clínico de los pacientes a fin de garantizar la comparabilidad de los resultados, ya que, si bien hay correlación entre ambos compartimentos, pueden encontrarse diferencias de hasta 2 o 3 log₁₀^{50,51,54,78,86}.

La recolección de las muestras (sangre entera o plasma) debe realizarse en tubos que contengan EDTA como anticoagulante. Las muestras recolectadas en tubos heparinizados son inadecuadas para el análisis por amplificación de ácidos nucleicos, dado que la heparina puede inhibir dicha reacción⁹⁹.

Para asegurar una proporción óptima de sangre/anticoagulante, es esencial utilizar el volumen de muestra adecuado, siguiendo las recomendaciones y especificaciones del fabricante de los tubos. El volumen mínimo requerido para la detección de CMV varía según el método de extracción de ácidos nucleicos seleccionado, por lo que se recomienda consultar con el laboratorio donde se procesarán las muestras cuando estas son derivadas. También es importante verificar la calidad de las muestras de sangre destinadas a obtener plasma, incluyendo la presencia de hemólisis, lipidemia, ictericia, entre otros. En el caso de detectar alguna de estas alteraciones, la muestra debe ser rechazada y se debe solicitar una nueva.

Se ha observado que las cargas virales son más altas en sangre entera que en plasma. Esto podría estar relacionado con la detección del virus latente presente en los monocitos, lo cual hace que la sangre sea una muestra más sensible pero menos específica. La detección de CMV en la fracción plasmática refleja replicación viral activa con liberación de partículas virales hacia el plasma desde diversos compartimentos, siendo una muestra de mayor utilidad para predecir enfermedad, mientras que la cuantificación en sangre entera no permite distinguir la infección latente de la infección activa por CMV^{24,86}.

Las muestras deben enviarse al laboratorio de forma inmediata, idealmente dentro de la hora de su recolección. En muestras de sangre entera se recomienda realizar la extracción del ADN viral lo más pronto posible, preferentemente dentro de las 4 horas posteriores a su recolección. En caso de ser necesario, podrá conservarse como máximo 24 horas refrigerada (2 a 8 °C) hasta el momento de su procesamiento, evitando la congelación^{75,88,94}. Del mismo modo, las muestras de plasma, si no pueden procesarse inmediatamente, es importante almacenarlas refrigeradas (2 a 8 °C) como máximo hasta 48 horas.

Para obtener el plasma es necesario centrifugar la muestra de sangre lo más pronto posible (idealmente de inmediato o dentro de las 4 horas de extraída la muestra) a 2.500 rpm durante 10 minutos^{2,74,88,104}.

En los centros o laboratorios que realizan derivaciones de muestras es esencial tener en cuenta las condiciones para su transporte. Las muestras deben transportarse en recipientes que cumplan con los estándares de bioseguridad de acuerdo con las instrucciones locales y nacionales para el transporte de material patológico. Las muestras de sangre entera deben enviarse refrigeradas (2 a 8 °C) dentro de las 24 horas de ser recogidas; si se trabajara con muestras de plasma, se recomienda su separación inmediata y posterior envío refrigeradas (2 a 8 °C) dentro de las 48 horas.

Si la muestra no cumple con los requisitos de aceptación, será necesario comunicarse con el servicio de salud de donde proviene para pedir el envío de una nueva muestra junto con una nueva solicitud diagnóstica⁹⁹. Debido a la variabilidad en el tiempo máximo de conservación de las muestras de sangre entera y plasma reportada en la literatura, las condiciones de conservación indicadas son las ideales. Sin embargo, si no es posible cumplir con dichos requisitos debido a dificultades en el envío, a la situación crítica del paciente o a otros motivos y se procesa la muestra de todos modos, es importante tener en cuenta y registrar esta circunstancia, ya que el valor obtenido podría no reflejar el valor real.

Extracción y conservación de ácidos nucleicos

Existe una gran variedad de métodos de extracción de ácidos nucleicos disponibles en el mercado; nos enfocaremos en aquellos que ofrecen resultados sensibles, cuantificables, rápidos y reproducibles, con rendimientos similares^{70,100}. Estos métodos incluyen aquellos basados en el uso de partículas magnéticas y columnas de sílica tanto en versiones manuales como automatizadas. En este contexto, se detallarán las características más importantes que se deben tener en cuenta en cada método.

- *Métodos de extracción mediante columnas de sílica.* El principio de extracción en este tipo de método se basa en la capacidad de adsorción de los ácidos nucleicos en una columna de sílice en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas. Los contaminantes presentes en la muestra se eliminan mediante lavados de la columna y, finalmente, el ADN se eluye utilizando agua o un tampón de resuspensión con baja fuerza iónica y pH neutro o ligeramente alcalino. Dado que los diversos ensayos disponibles no funcionan de la misma manera, se aconseja seguir las instrucciones específicas de cada uno según el tipo de muestra a procesar.

El rendimiento y la pureza de las columnas de extracción de ADN dependen de varios factores, como el tipo de muestra y su calidad, así como del protocolo de extracción utilizado. En general, con las columnas de sílice es posible obtener entre 1 y 100 ng de ADN cada 100 µl de muestra, con una pureza del ADN extraído generalmente adecuada, indicada por una relación de valores de absorbancia A260/A280 de entre 1,8 y 2,0. La pureza del ADN extraído se puede evaluar mediante espectrofotometría UV⁹⁸.

Si se va a utilizar un control interno (CI) como control del proceso de extracción del ADN e inhibición de la PCR, aquel se debe añadir al comienzo del procedimiento de extracción. Este paso no es requerido cuando se emplea un control interno endógeno para evaluar el proceso, debido a que ya está presente en la muestra.

- *Métodos de extracción basados en el uso de partículas magnéticas.* Los sistemas basados en partículas magnéticas emplean esferas magnéticas recubiertas con polímeros que presentan una alta afinidad por los ácidos nucleicos. Estas esferas se agregan al lisado de la muestra, lo que permite que se unan a las moléculas de ADN. Al colocar un imán en la pared del tubo, se agrupan las esferas con el ADN unido, mientras que los contaminantes de la muestra en solución se eliminan por pipeteo o decantación. Después de varios ciclos de resuspensión y lavado, en los que las esferas quedan retenidas por el imán, el ADN se eluye en un tampón adecuado⁸⁴.

Métodos manuales y automatizados

Los métodos de extracción de ácidos nucleicos basados en columnas de sílice o partículas magnéticas están disponibles en el mercado en formatos tanto manuales como automatizados. Existe una gran variedad de plataformas o robots que automatizan todo o gran parte del proceso de extrac-

Tabla 2 Características generales de los métodos manuales y automatizados

	Métodos manuales	Métodos automatizados
Inversión inicial e infraestructura	Menor inversión inicial. Infraestructura de menor complejidad	Requieren mayor inversión inicial en equipamiento (o comodato) y gastos de mantenimiento. Mayor complejidad de infraestructura
Capacidad de procesamiento	Dependen de la capacidad operativa del personal abocado al proceso	Permiten manejar un mayor volumen de muestras de manera simultánea ^{40,61}
Eficiencia y rapidez	Dependientes del operador	Resultados más rápidos y concordantes al reducir el tiempo de procesamiento y minimizar errores humanos
Flexibilidad	Permiten adaptar la cantidad de muestras a procesar según la necesidad del laboratorio	Depende del instrumento; en general, requieren una mínima cantidad de muestras para optimizar la largada
Variabilidad del ensayo	La variabilidad, la reproducibilidad y la trazabilidad son operador-dependientes	Menor variabilidad, mejor reproducibilidad de los resultados y mayor trazabilidad de muestras, lo que impacta positivamente en la seguridad del paciente
Tiempo de RRHH	Requieren mayor número de horas de RRHH, son más laboriosos	Menor tiempo
Riesgo de contaminación	El manejo manual de las muestras y los reactivos aumenta el riesgo de contaminación cruzada y de contaminación del ADN extraído	Menor riesgo por automatización

ción de ácidos nucleicos. Los métodos manuales suelen ser más económicos y accesibles, pero pueden ser laboriosos y dar mayor lugar a errores humanos. Requieren la capacitación y el entrenamiento adecuado del personal para evitar contaminaciones, degradación del ADN o inhibiciones, que determinan variabilidad de los resultados. Los métodos automatizados ofrecen resultados más rápidos, precisos y reproducibles y tienen un menor riesgo de contaminación, aunque suelen ser más costosos en términos de equipamiento y reactivos. Adicionalmente, estos sistemas aportan trazabilidad y mayor calidad de resultados. Son menos laboriosos que los métodos manuales, cuyos resultados dependen muchas veces de la experiencia del personal y de factores extrínsecos difíciles de controlar^{19,68,96}. Esto contribuye a una mayor seguridad en el proceso de atención del paciente, ya que con los métodos automatizados se reducen los errores producidos por el operador. El rendimiento y la pureza de estos métodos son comparables con los de la extracción manual y dependen de la marca comercial que se utilice. La cantidad de muestras a procesar, la frecuencia de uso y los recursos disponibles en el laboratorio son los factores que suelen definir la elección entre un método u otro^{45,89}. En la [tabla 2](#) se muestran las principales características generales de los métodos de extracción manuales y automatizados.

Independientemente de que se utilicen metodologías manuales o automatizadas, es fundamental seguir las buenas prácticas establecidas por el sistema de gestión de calidad implementado en el laboratorio. En este sentido, los mantenimientos preventivos y correctivos del equipamiento, así como la calibración de micropipetas, resultan esenciales para garantizar la reproducibilidad de las técnicas moleculares. En el caso de los equipos automatizados también se recomienda realizar respaldos periódicos de los datos

generados. Para ambas metodologías es importante mantener un volumen de elución constante, ya que esta variable puede influir en la adecuada monitorización del paciente y es necesaria para calcular el factor de conversión. Además, se sugiere realizar una inspección visual de los eluatos para verificar tanto su volumen como su color.

Es esencial utilizar marcas de ensayos de extracción que estén aprobadas por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) para su uso en diagnóstico *in vitro* (IVD), asegurando así la calidad y la fiabilidad de los resultados.

Conservación del ADN extraído

Una vez extraído el ADN, es importante la adecuada conservación de los eluatos para garantizar su estabilidad e integridad. Pautas generales:

- Para conservación a corto plazo (hasta 5 días), se recomienda almacenar el ADN refrigerado a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C⁷⁷.
- Para períodos más prolongados se aconseja almacenar a -20 °C⁷².
- Es importante evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, ya que estos pueden afectar la calidad del ADN.
- Para conservación a un plazo largo se recomienda almacenar a -20 °C o -70 °C en condiciones ligeramente básicas (p.ej., Tris-HCl, pH 8,0, o tampón TE) porque las condiciones ácidas pueden provocar la hidrólisis de ADN.

Tabla 3 Factores que influyen en la variabilidad de la carga viral

Fuente de variabilidad	Descripción
Tipo de muestra	Sangre entera o plasma
Cinética viral	Varía según tipo de muestra, tipo de trasplante y tratamiento inmunosupresor
Método de extracción	• Fundamento del ensayo: columnas de sílica o perlas magnéticas • Manual o automatizado • Eficiencia de la extracción según tamaño del ADN
Blancos de reacción	Gen simple, múltiples genes, polimorfismo
Tamaño del amplicón	Mayores CV en ensayos con pequeños amplicones (< 100 pb) vs. grandes amplicones (> 250 pb)
Sondas de detección	• Secuencia elegida • Tipo de sonda: hidrólisis, hibridación, etc.

Cuantificación de ácidos nucleicos

La medición de la carga viral (CV) mediante PCR en tiempo real es el método de elección para el monitoreo viral en el paciente trasplantado. Esta técnica utiliza una curva estándar para calcular la concentración de ADN del CMV en la muestra.

En el mercado hay disponible una gran variedad de ensayos. El rendimiento, la sensibilidad y el rango lineal de los ensayos varían debido a los diferentes métodos de extracción de ácidos nucleicos, secuencias de amplificación blanco, cebadores, sondas de detección (región y tipo de sondas), condiciones de ciclado, métodos de detección y estándares de cuantificación (tabla 3). Como resultado, es posible que no haya una estrecha coincidencia en los valores de carga viral entre los diferentes laboratorios.

En el año 2010, para estandarizar y eliminar la variabilidad entre los laboratorios, el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) desarrolló el primer estándar internacional de CMV (EI), que consiste en un lote de virus cepa Merlín (genotipo 1) preparado en células MRC5 y con un valor consensuado en 5×10^6 UI/ml. Este estándar se utilizó como referencia primaria para calibrar estándares secundarios en ensayos comerciales, lo que ha demostrado reducir la variabilidad entre laboratorios en comparación con métodos no calibrados. Se esperaba que esto facilitara la correlación entre los niveles de carga viral y el desarrollo de enfermedad en estudios clínicos. Sin embargo, aunque el uso del EI ha disminuido la variabilidad en los resultados de muestras individuales, se han observado diferencias clínicamente relevantes, de entre $1,5 \log_{10}$ y $2,82 \log_{10}$ ⁵⁴.

Para estos materiales, el concepto de conmutabilidad hace referencia a una característica clave que ha ayudado a describir y explicar las diferencias en el rendimiento del ensayo y las disparidades en los resultados. La conmutabilidad describe el grado en el que el material de referencia se comporta de manera similar a las muestras de los pacientes. Esto es de vital importancia, porque si no existe conmutabilidad, entonces los materiales de referencia con la misma concentración objetivo pueden producir diferentes medidas finales de concentración de ADN cuando se usan para calibrar los resultados de las muestras de pacientes. Es importante resaltar que la conmutabilidad del ensayo debe ser asegurada no solo con la utilización del EI sino en todas las fases del proceso de cuantificación^{34,35}. La conmutabilidad mejora con amplicones pequeños⁸².

Los blancos de amplificación utilizados en los ensayos de cuantificación pueden ser varios: la polimerasa viral, la glicoproteína B, los genes inmediatamente tempranos y *UL83*, entre otros, pero en la gran mayoría de los casos estos no son informados por los fabricantes³⁶.

Se recomienda verificar o validar cada ensayo específico antes de su uso, según corresponda, con preferencia por los ensayos comerciales IVD o las plataformas automatizadas integradas sobre los métodos *in house*. Esto se debe a la menor variabilidad intra e interensayo, así como también a que son ensayos cuyos estándares están calibrados en UI/ml, y esto ayuda a reducir la variabilidad entre ensayos en el laboratorio. Además, es importante que los ensayos cuenten con un control interno de amplificación o de extracción (o ambos) que permita controlar todo el proceso.

Las plataformas automatizadas ofrecen ventajas significativas en términos de trazabilidad y son especialmente útiles en centros con un elevado volumen de muestras.

Los valores de concentración de ADN se calculan considerando el volumen de muestra utilizada, el volumen de eluato de la extracción, el volumen utilizado para la PCR en tiempo real y siguiendo las instrucciones del fabricante. Una fórmula general para el cálculo de la concentración de ADN de CMV en una muestra en UI/ml, utilizando el EI para la curva de calibración, es:

$$\text{Carga viral (UI/ml)} = \frac{\text{Resultado (UI/}\mu\text{l)} \times \text{volumen de eluato (}\mu\text{l)}}{\text{Volumen de muestra (ml)}}$$

Es importante destacar que la expresión de los valores específicos de carga viral (CV) y unidades puede variar según el ensayo y el equipo utilizado, por lo que es esencial seguir las instrucciones proporcionadas por el fabricante para realizar el cálculo de manera precisa y adecuada. Asimismo, cabe señalar que la variabilidad intra e interlaboratorio en la cuantificación del genoma del CMV tiene un impacto significativo en la calidad del cuidado del paciente trasplantado, sobre todo cuando se utilizan estrategias de terapia preventiva para la prevención de la enfermedad. Por ello, es importante que el laboratorio siga protocolos estandarizados para la cuantificación del genoma del CMV, donde se mantienen absolutamente todas las condiciones definidas en el ensayo¹.

Expresión de resultados

Los resultados de CV de CMV se informan de forma cuantitativa en UI/ml, preferentemente, o en copias/ml y también en $\log_{10}$ para facilitar su interpretación clínica. La escala logarítmica permite determinar rápidamente si los cambios en la carga viral son significativos o no.

Frecuencia de monitoreo

La frecuencia con la que se realiza el monitoreo es usualmente cada 5 a 7 días, pero en algunos casos de pacientes con factores de riesgo se puede requerir aumentar la frecuencia. Esto está relacionado con el grado de inmunosupresión del paciente, que regula la cinética viral —representada por el tiempo de duplicación del CMV (*doubling time*)— y que, en promedio, es de 1 a 2 días, y con el tiempo de vida media del virus, que es de 3 a 8 días en plasma. Cuanto mayor es la inmunosupresión, más corto es el *doubling time* y más rápidos son los incrementos de la carga viral en el tiempo.

En pacientes de riesgo alto que reciben profilaxis antiviral de inicio se utiliza el monitoreo mediante cargas virales una vez finalizada la profilaxis con el objetivo de evitar el desarrollo de la enfermedad por CMV tardía. En TOS, dependiendo del riesgo, el monitoreo luego de la profilaxis puede realizarse una vez al mes durante un año⁹³. En TCPH, luego del día 100 desde el trasplante (fin de la profilaxis), el monitoreo se continúa, inicialmente, una vez por semana hasta 1 año postrasplante en pacientes con riesgo elevado.

En el caso particular del seguimiento de pacientes en tratamiento es importante considerar que puede haber aumentos de la carga viral los días posteriores al inicio de aquel. Se recomienda enviar una nueva muestra antes de comenzar el tratamiento antiviral, de manera de contar con un valor de partida con el cual comparar los siguientes resultados y evitar así interpretaciones erróneas. La primera muestra de seguimiento se tomará a los 7-10 días desde el inicio del tratamiento y luego se continuará con el monitoreo de manera semanal⁵⁰.

Puntos de corte e interpretación de resultados

La variabilidad en los resultados de CV observada entre los laboratorios y entre los métodos de cuantificación ha impedido definir un valor de corte o de referencia para la CV que determine una decisión médica, como diagnóstico de enfermedad o inicio de terapia preventiva. Las diferentes situaciones que se presentan, como tipo de muestra, tipo de trasplante (TOS o TCPH), estado serológico del receptor y del donante y tipo de inmunosupresión, también dificultan el establecimiento de un punto de corte para diagnosticar una infección por CMV clínicamente significativa⁵⁴. A la hora de validar los resultados es importante considerar si se trata de un trasplante de órgano sólido o de un receptor de células progenitoras hematopoyéticas y los factores de riesgo asociados. Según el método que se utilice, se debe considerar que en los ensayos moleculares cuantitativos el límite de detección no siempre coincide con el de cuantificación. El límite de detección de un ensayo es la mínima concentración de ADN que puede detectarse en el 95% de los replicados,

mientras que el límite de cuantificación inferior es la mínima cantidad que se detecta con una «precisión aceptable». Este último valor no está establecido para los ensayos moleculares cuantitativos, aunque, en general, se acepta un valor de entre el 20 y el 30%.

Se presentan a continuación los diferentes escenarios de resultados que pueden obtenerse y una sugerencia para su informe:

- a) Una posibilidad es obtener un resultado menor que el valor del límite de detección del método utilizado, en cuyo caso se informará como «No detectable».
- b) Otra posibilidad es obtener un resultado de carga viral mayor que el límite de detección, pero menor que el límite de cuantificación del método utilizado; eso significa que se detectó ADN, pero que el resultado obtenido no tiene una precisión aceptable como para informar un valor absoluto. Frente a esta situación, hay dos opciones de informe: «Detectable no cuantificable» o «Menor de...», indicando en este último caso el límite de cuantificación (p.ej., «Menor de 250 UI/ml»).
- c) Por último, si el valor de CV obtenido se encuentra entre el menor y el mayor límite de cuantificación, se informarán directamente los valores numéricos de ambos en UI/ml y $\log_{10}$.

Debido a la rápida dinámica de replicación, se recomienda que los resultados de las cargas virales de CMV se encuentren disponibles dentro de las 24 a 48 horas, para poder tomar decisiones clínicas de manera oportuna⁵⁰. El valor inicial de la carga viral es predictivo del riesgo de enfermedad y es el mejor indicador de la dinámica de replicación del virus. Cuanto más alta es la carga viral, mayor es el riesgo de enfermedad y de mortalidad⁷. Todavía no se ha establecido un valor de corte de carga viral ni un algoritmo para el inicio de la terapia preventiva. Se han utilizado diversas estrategias en los diferentes centros médicos; algunas de ellas son las enumeradas seguidamente:

- 1) Monitoreo semanal e implementación de terapia preventiva ante la positividad de la carga viral, cualquiera que sea su valor⁶⁷.
- 2) Monitoreo semanal e inicio del tratamiento definido por determinados valores de carga viral: se han utilizado valores de corte mayores de 10^2 a 3×10^3 copias/ml^{3,7}.
- 3) Monitoreo basado en la cinética viral mediante la aplicación del «tiempo de duplicación» del virus. El inicio del tratamiento se basa en el aumento de la carga viral entre dos muestras consecutivas^{33,90}.

Si se utiliza la diferencia entre dos cargas virales consecutivas como parámetro de inicio o seguimiento de la terapia, se debe considerar la variabilidad intralaboratorio de los ensayos de carga viral para asegurar que un aumento o disminución sea verdadero, es decir, que la variabilidad del ensayo debe ser menor que la diferencia considerada clínicamente significativa. El coeficiente de variación de los métodos moleculares cerca de la zona del límite de detección es de un 50%, con lo cual un cambio significativo estaría representado por 0,7 log, y en la zona media de la curva en

adelante es del 30%, motivo por el cual se deberían considerar como cambios significativos aquellos de $0,5 \log^{36}$.

En los estudios que se realizaron con el primer estándar se observó que, dependiendo del ensayo que se utilizaba, había poca o nula conmutabilidad en el 50% de estos; más aún, en los estándares secundarios posteriores se determinó que faltaba uniformidad y conmutabilidad³⁴.

Además de estas variables, para establecer los valores de corte se deben considerar las diversas situaciones diagnósticas, el estado de inmunosupresión de las distintas poblaciones de pacientes y el uso de letermovir como profilaxis⁵⁴.

Para determinar la finalización del tratamiento existen diferentes criterios, y cada centro debe definir los suyos. Varias guías sugieren suspender el tratamiento tras completar un mínimo de 2 semanas (duración mínima de la terapia), siempre que se haya alcanzado la resolución clínica y se haya logrado la clarificación de la ADNemia. En pacientes con TCPH, esto se debe confirmar con muestras consecutivas tomadas con un intervalo de 3-4 días, mientras que en los casos de TOS se recomienda un intervalo de 7 días^{10,81}.

Las primeras guías recomendaban tratar hasta detectar ADNemias negativas; dada la incorporación de técnicas ultrasensibles, se puede considerar la suspensión luego de 1 o 2 muestras negativas o con cargas virales inferiores al límite de detección de la metodología en uso⁴⁸.

Como alternativa, si la carga viral está en descenso luego de 1 a 2 semanas de terapia de inducción, puede considerarse un cambio a la dosis de mantenimiento y continuar el seguimiento hasta que desaparezca la ADNemia³².

En pacientes sometidos a profilaxis con letermovir se puede detectar ADN de CMV fragmentado o aún no encapsulado en sangre, sin evidencia de infección por CMV¹³. Este fenómeno, denominado «blips de letermovir», se ha atribuido, en parte, al mecanismo de acción del letermovir, que interfiere en la escisión del genoma viral luego de la replicación intranuclear del virus¹⁰⁵.

Las cargas de CMV en pacientes bajo profilaxis primaria con letermovir que desarrollan episodios de ADNemia que se resuelven solos generalmente no superan las 1.500 UI/ml en plasma o las 10.000 UI/ml en sangre entera. Estos blips no son signo de infección o de resistencia a letermovir y se puede suspender la terapia preventiva^{13,26,54,92}.

Cuando se sospecha una infección por CMV con resistencia a antivirales, se deben realizar estudios de resistencia genotípica para detectar mutaciones específicas asociadas a la resistencia. Se debe considerar que durante los primeros 5 a 7 días de inicio del tratamiento pueden observarse aumentos transitorios de la carga viral, sin que ello signifique resistencia. Para una mejor interpretación, es fundamental analizar los valores de carga viral junto con la fecha de inicio de tratamiento.

En ausencia de inmunidad mediada por células después de un TCPH, la carga viral puede tardar varias semanas en disminuir, a pesar de un tratamiento eficaz. Sin embargo, en ese contexto es razonable evaluar la posibilidad de realizar estudios de resistencia antiviral.

La incidencia de resistencia luego de la terapia con ganciclovir en TOS es generalmente baja (<5%); sin embargo, existen publicaciones que documentan un nivel de resistencia del 5 al 12%, con un valor aún más alto, del 18%, en

receptores de pulmón, y del 31% en receptores de intestino y en trasplantados de múltiples órganos⁴⁸. En TCPH, esta frecuencia varía entre el 0 y el 10%, según la población de pacientes (tipo de trasplante, edad, regímenes inmunosupresores utilizados y factores de riesgo), con valores más altos entre pacientes con trasplante alogénico con depleción de células T *ex vivo*.

Además de las mutaciones detectadas en los genes *UL97* y *UL54*, también se han identificado alteraciones en otros genes relacionados con la resistencia a letermovir y maribavir. Se han reportado mutaciones en los genes *UL56* y menos comúnmente en *UL51* y *UL89*, que codifican el complejo de terminasa viral. Las pruebas genotípicas de resistencia al ganciclovir y valganciclovir incluyen los genes *UL97* (codones 335-665) y *UL54* (codones 290-1000). En relación con el letermovir, la región importante para la genotipificación es *UL56* (codones 229-369), aunque también se pueden incluir *UL51* y *UL89*. En algunos casos refractarios al maribavir también podría incluirse, aparte del gen *UL97*, el análisis de *UL27*. Sin embargo, en la actualidad estos estudios no se encuentran ampliamente disponibles en la práctica diaria⁸³.

Resumen de las principales conclusiones y recomendaciones internacionales

Se resumen seguidamente las principales conclusiones de este documento (para mayores detalles en cuanto a profilaxis y tratamiento de las diferentes situaciones que se presentan en el TOS y en el TCPH, sugerimos consultar los dos últimos consensos internacionales^{50,54}).

- La disponibilidad del estándar internacional de CMV aprobado por la OMS ha llevado a una mejor concordancia de los valores de carga viral entre varios ensayos. Aún existen diferencias debido a una variedad de factores, incluyendo la matriz, el método de extracción, los blancos de amplificación, el tamaño del amplicón, las sondas de hibridación/detección, la cuantificación no estandarizada de estándares secundarios y el uso de estándares no conmutables.
- La armonización global y el desarrollo de umbrales universales se facilitarán mediante el uso de ensayos en los que todos los pasos se encuentren completamente estandarizados.
- Recomendamos utilizar técnicas de amplificación de ácidos nucleicos cuantitativas (QNAAT) calibradas según el estándar de la OMS tanto para el diagnóstico y la vigilancia como para orientar el tratamiento antiviral preventivo y realizar el seguimiento terapéutico, debido a la posibilidad de armonizar y estandarizar estas pruebas.
- Los resultados deben informarse en UI/ml y su log y denominarse ADNemia, en lugar de viremia.
- Se recomienda que los resultados de las cargas virales de CMV se encuentren disponibles dentro de las 24 a 48 horas para poder tomar decisiones clínicas de manera óptima.
- Se recomienda el uso de muestras de plasma o de sangre total para QNAAT, con un reconocimiento de las diferencias en los valores de carga viral, cinética viral y características de rendimiento del ensayo.

- Debido a la variabilidad, no debe cambiarse el tipo de muestra ni el ensayo al monitorear a los pacientes.
- A pesar de informar en UI/ml, se recomienda que los valores de carga viral no se comparen entre centros o laboratorios, a menos que se puedan utilizar reactivos y procedimientos de prueba idénticos asegurados o se haya documentado la equivalencia.
- Aunque la armonización de QNAAT ha mejorado, los umbrales universales para la terapia o los criterios de valoración del tratamiento no han sido establecidos aún y siguen siendo específicos del ensayo. En consecuencia, se recomienda que los centros establezcan sus propios umbrales y auditen los resultados clínicos para verificarlos. Una alternativa para la toma de decisiones tanto en la terapia preventiva como en el monitoreo antiviral es estudiar el dinamismo de las cargas virales en el tiempo, más que un valor único de carga viral.
- Se recomienda considerar los cambios en la carga viral que excedan $0,5 \log_{10}$ UI/ml (tres veces) como diferencias clínicamente significativas en la ADNemia. En cargas virales bajas, menores de $3 \log_{10}$, considerar cambios que excedan $0,7 \log_{10}$ UI/ml (cinco veces) como significativos.
- No se recomienda la vigilancia de rutina de la ADNemia por CMV durante la profilaxis.
- Se recomienda que, al monitorear la respuesta a la terapia antiviral, se realice QNAAT semanalmente.
- En el caso de que se emplee QNAAT altamente sensible, con un límite inferior de cuantificación (*lower limit of quantification* [LLOQ]) < 200 UI/ml, se sugiere suspender la terapia después de 1 resultado menor que el LLOQ. Si se utiliza este enfoque, las pruebas confirmatorias deben realizarse 1 semana después de suspender el tratamiento. Si el ensayo utilizado no es altamente sensible, entonces se necesitan 2 resultados «No detectable» consecutivos para suspender el tratamiento.
- No se debe emplear QNAAT en muestras de orina ni para el diagnóstico ni para el seguimiento de pacientes R+.
- El diagnóstico de la mayoría de las enfermedades en órganos por CMV debe confirmarse por histopatología, con o sin inmunohistoquímica, como método estándar. La importancia del empleo de QNAAT en la enfermedad en órgano es su alto valor predictivo negativo debido a su sensibilidad.
- En BAL, el uso de QNAAT se puede emplear para el diagnóstico de neumonía probable, pero el valor umbral para discriminar entre enfermedad y eliminación asintomática aún debe ser definido.

Financiación

Declaramos no haber recibido ningún tipo de financiación para la realización de este artículo.

Conflicto de intereses

Declaramos que no existe ningún conflicto de intereses en la realización de este trabajo.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dras. Andrea Mangano y Pamela Valva por su valiosa revisión y sugerencias, que han sido fundamentales para mejorar este trabajo.

Bibliografía

1. Abbate I, Piralla A, Calvario A, Callegaro A, Giraldo C, Lunghi G, Gennari W, Sodano G, Ravanini P, Conaldi PG, Vatteroni M, Gaeta A, Paba P, Cavallo R, Baldanti F, Lazzarotto T, AMCLI – Infections in Transplant Working Group GLaIT. Nation-wide measure of variability in HCMV EBV and BKV DNA quantification among centers involved in monitoring transplanted patients. *J Clin Virol.* 2016;82:76–83.
2. Abdul-Ali D, Kraft CS, Ingersoll J, Frempong M, Caliendo AM. Cytomegalovirus DNA stability in EDTA anti-coagulated whole blood and plasma samples. *J Clin Virol.* 2011;52:222–4.
3. Atkinson C, Emery VC. Cytomegalovirus quantification; where to next in optimizing patient management? *J Clin Virol.* 2011;51:223–8.
4. Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, Felicini R, Falcinelli F, Velardi A, Ruggeri L, Aloisi T, Saab JP, Santucci A, Perruccio K, Martelli MP, Mecucci C, Reisner Y, Martelli MF. Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: A phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. *J Clin Oncol.* 2005;23:3447–54.
5. Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: The national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin Infect Dis.* 2010;50:1439–47.
6. Beam E, Razonable RR. Cytomegalovirus in solid organ transplantation: Epidemiology, prevention, and treatment. *Curr Infect Dis Rep.* 2012;14:633–41.
7. Boeckh M, Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood.* 2009;113:5711–9.
8. Boeckh M, Stevens-Ayers T, Travi G, Huang ML, Cheng GS, Xie H, Leisenring W, Erard V, Seo S, Kimball L, Corey L, Pergam S, Jerome K. Bronchoalveolar lavage DNA quantification in cytomegalovirus pneumonia after hematopoietic cell transplantation. *J Infect Dis.* 2017;215:1514–22.
9. Brennan DC, Legendre C, Patel D, Mange K, Wiland A, McCague K, Shihab F. Cytomegalovirus incidence between everolimus versus mycophenolate in de novo renal transplants: Pooled analysis of three clinical trials. *Am J Transplant.* 2011;11:2453–62.
10. British Transplantation Society. UK guideline on prevention and management of cytomegalovirus (CMV) infection and disease following solid organ transplantation. 2022. Disponible en: <https://bts.org.uk/uk-guideline-on-prevention-and-management-of-cytomegalovirus-cmv-infection-and-disease-following-solid-organ-transplantation/>
11. Brown JA, Stevenson K, Kim HT, Cutler C, Ballen K, McDonough S, Reynolds C, Herrera M, Liney D, Ho V, Kao G, Armand P, Koreth J, Alyea E, McAfee S, Attar E, Dey B, Spitzer T, Soiffer R, Ritz J, Antin JH, Boussiotis VA. Clearance of CMV viremia and survival after double umbilical cord blood transplantation in adults depends on reconstitution of thymopoiesis. *Blood.* 2010;115:4111–9.
12. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol.* 2010;20:202–13.
13. Cassaniti I, Colombo AA, Bernasconi P, Malagola M, Russo D, Iori AP, Girmenia C, Greco R, Peccatori J, Ciceri F, Bonifazi F, Percivalle E, Campanini G, Piccirilli G, Lazzarotto T, Baldanti F. Positive HCMV DNAemia in stem cell recipients undergoing

- letermovir prophylaxis is expression of abortive infection. *Am J Transplant.* 2021;21:1622–8.
14. Chou S, Watanabe J. Ganciclovir and maribavir cross-resistance revisited: relative drug susceptibilities of canonical cytomegalovirus mutants. *Antivir Res.* 2024;222:105792.
 15. Douglas CM, Barnard R, Holder D, Leavitt R, Levitan D, Maguire M, Nickle D, Teal V, Wan H, van Alewijk DCJG, van Doorn LJ, Chou S, Strizki J. Letermovir resistance analysis in a clinical trial of cytomegalovirus prophylaxis for hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis.* 2020;221:1117–26.
 16. Eid AJ, Razonable RR. New developments in the management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Drugs.* 2010;70:965–81.
 17. Einsele H, Ljungman P, Boeckh M. How I treat CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2020;135:1619–29.
 18. Erard V, Guthrie KA, Seo S, Smith J, Huang ML, Chien J, Flowers MED, Corey L, Boeckh M. Reduced mortality of cytomegalovirus pneumonia after hematopoietic cell transplantation due to antiviral therapy and changes in transplantation practices. *Clin Infect Dis.* 2015;61:31–9.
 19. Farfan MJ, Torres JP, Vergara A, Donoso G, Alba A, Paris C, Santolaya ME. 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;28:113–7.
 20. Fernandez-Ruiz M, Gimenez E, Vinuesa V, Ruiz-Merlo T, Parra P, Amat P, Montejo M, Paez-Vega A, Cantisán S, Torre-Cisneros J, Fortún J, San Juan R, López-Medrano F, Navarro D, Aguado JM. Regular monitoring of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity in intermediate-risk kidney transplant recipients: Predictive value of the immediate post-transplant assessment. *Clin Microbiol Infect.* 2018;25:381.
 21. Gala-Lopez BL, Senior PA, Koh A, Kashkoush SM, Kawahara T, Kin T, Humar A, Shapiro AMJ. Late cytomegalovirus transmission and impact of T-depletion in clinical islet transplantation. *Am J Transplant.* 2011;11:2708–14.
 22. Ganzenmueller T, Kluba J, Becker JU, Bachmann O, Heim A. Detection of cytomegalovirus (CMV) by real time PCR in fecal samples for non-invasive diagnosis of CMV intestinal disease. *J Clin Virol.* 2014;61:517–22.
 23. Gardiner BJ, Nierenberg NE, Chow JK, Ruthazer R, Kent DM, Snyderman DR. Absolute lymphocyte count: A predictor of recurrent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2018;67:1395–402.
 24. Garrigue I, Doussau A, Asselineau J, Bricout H, Couzi L, Rio C, Merville P, Fleury H, Lafon ME, Thiébaud R. Prediction of cytomegalovirus (CMV) plasma load from evaluation of CMV whole-blood load in samples from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2008;46:493–8.
 25. George B, Pati N, Gilroy N, Ratnamohan M, Huang G, Kerridge I, Hertzberg M, Gottlieb D, Bradstock K. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl Infect Dis.* 2010;12:322–9.
 26. Giménez E, Guerreiro M, Torres I, Aguilar C, Albert E, Hernández-Boluda JC, Pérez A, Amat P, Piñana JL, Montoro J, Solano C, Navarro D. Features of cytomegalovirus DNAemia and virus-specific T-cell responses in allogeneic hematopoietic stem-cell transplant recipients during prophylaxis with letermovir. *Transpl Infect Dis.* 2023;25:14021.
 27. Gooley T, Chien J, Pergam S, Hingorani S, Sorrow ML, Boeckh M, Martin PJ, Sandmaier BM, Marr K, Appelbaum F, Storb R, McDonald G. Reduced mortality after allogeneic hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2010;363:2091–101.
 28. Green ML, Leisenring W, Stachel D, Pergam SA, Sandmaier BM, Wald A, Corey L, Boeckh M. Efficacy of a viral load-based, risk-adapted, preemptive treatment strategy for prevention of cytomegalovirus disease after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18:1887–99.
 29. Green ML, Leisenring W, Xie H, Mast TC, Cui Y, Sandmaier BM. Cytomegalovirus viral load and mortality after haemopoietic stem cell transplantation in the era of pre-emptive therapy: A retrospective cohort study. *Lancet Haematol.* 2016;3:119–27.
 30. Groll AH, Schulte JH, Antmen AB, Fraser CJ, Teal VL, Haber B, Caro L, McCrea JB, Fancourt C, Patel M, Menzel K, Badsahah CMD, Badshah C. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in adolescent hematopoietic cell transplantation recipients. *Pediatr Infect Dis J.* 2024;43:203–8.
 31. Haidar G, Boeckh M, Singh N. Cytomegalovirus infection in solid organ and hematopoietic cell transplantation: State of the evidence. *J Infect Dis.* 2020;221:S23–31.
 32. Hakki M, Aitken SL, Danziger-Isakov L, Michaels MG, Carpenter PA, Chemaly RF, Papanicolaou GA, Boeckh M, Marty FM. American Society for Transplant and Cellular Therapy Series: #3-Prevention of cytomegalovirus infection and disease after hematopoietic cell transplantation. *Transplant Cell Ther.* 2021;27:707–19.
 33. Halfon P, Berger P, Khiri H, Martineau A, Pénaranda G, Merlin M, Faucher C. Algorithm based on CMV kinetic DNA viral load for preemptive therapy initiation after hematopoietic cell transplantation. *J Med Virol.* 2011;83:490–5.
 34. Hayden RT, Caliendo AM. Persistent challenges of interassay variability in transplant viral load testing. *J Clin Microbiol.* 2020;58:e00782-20.
 35. Hayden RT, Sun Y, Tang L, Procop GW, Hillyard DR, Pinsky BA, Young SA, Caliendo AM. Progress in quantitative viral load testing: Variability and impact of the WHO quantitative international standards. *J Clin Microbiol.* 2017;55:423–30.
 36. Hayden RT, Yan X, Wick MT, Rodríguez AB, Xiong X, Ginocchio CC, Mitchell MJ, Caliendo AM, College of American Pathologists Microbiology Resource Committee. Factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: a multivariate analysis. *J Clin Microbiol.* 2012;50:337–45.
 37. Herrera F, Torres D, Querci M, Bonvehí P, Temporiti E, Duarte P, Videla C, Riera L. Letermovir para prevención de la infección por citomegalovirus en receptores de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. *Rev Chil Infectol.* 2023;40:330–5.
 38. Herrera F, Torres D, Querci M, Rearte AN, Temporiti E, Riera L, Duarte P, Videla C, Bonvehí P. Letermovir primary cytomegalovirus prophylaxis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients: Real-life data from a university hospital in Argentina. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2024;16:1–8.
 39. Ho M, Suwansirikul S, Dowling JN, YoungBlood LA, Armstrong JA. The transplanted kidney as a source of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 1975;293:1109–12.
 40. Humar A, Kumar D, Preiksaitis J, Boivin G, Siegal D, Fenton J, Jackson K, Nia S, Lien D. A trial of valganciclovir prophylaxis for cytomegalovirus prevention in lung transplant recipients. *Am J Transplant.* 2005;5:1462–8.
 41. Humar A, Lebranchu Y, Vincenti F, Blumberg EA, Punch JD, Limaye AP, Abramowicz D, Jardine AG, Voulgaris AT, Ives J, Hauser IA, Peeters PL. The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2010;10:1228–37.
 42. Iglesias L, Perera MM, Torres-Miñana L, Pena-López MJ. CMV viral load in bronchoalveolar lavage for diagnosis of pneumonia in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2017;52:895–7.
 43. Jakharia N, Howard D, Riedel DJ. CMV infection in hematopoietic stem cell transplantation: Prevention and treatment strategies. *Curr Treat Options Infect Dis.* 2021;13:123–40.

44. Khoury JA, Storch GA, Bohl DL, Schuessler RM, Torrence SM, Lockwood M, Gaudreault-Keener M, Koch MJ, Miller BW, Hardinger KL, Schnitzler MA, Brennanet DC. Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2006;6:2134–43.
45. Kim H, Hur M, Kim JY, Moon HW, Yun YM, Cho HC. Automated nucleic acid extraction systems for detecting cytomegalovirus and Epstein-Barr virus using real-time PCR: A comparison study between the QIA Symphony RGQ and QIAcube Systems. *Ann Lab Med.* 2017;37:129–36.
46. Kleiboeker SB. Prevalence of cytomegalovirus antiviral drug resistance in transplant recipients. *Antivir Res.* 2023;215:105623.
47. Kliem V, Fricke L, Wollbrink T, Burg M, Radermacher J, Rohde F. Improvement in long-term renal graft survival due to CMV prophylaxis with oral ganciclovir: Results of a randomized clinical trial. *Am J Transplant.* 2008;8:975–83.
48. Kotton CN, Kamar N. New insights on CMV management in solid organ transplant patients: Prevention, treatment, and management of resistant/refractory disease. *Infect Dis Ther.* 2023;12:333–42.
49. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A, The Transplantation Society International CMV Consensus Group. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation.* 2013;96:333–60.
50. Kotton CN, Kumar D, Manuel O, Chou S, Hayden RT, Danziger-Isakov L, Lara MD, Asberg A, Tedesco-Silva H, Humar A, Transplantation Society International CMV Consensus Group. The fourth international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation.* 2025;109:1066–110.
51. Lazzarotto T, Chierieghin A, Piralla A, Piccirilli G, Girello A, Gabrielli L, Costa C, Prete A, Bonifazi F, Busca A, Cairoli R, Colombo AA, Zecca M, Sidoti F, Bianco G, Paba P, Cavallo R, Baldanti F. Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus DNA kinetics in whole blood and plasma of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018;24:1699–706.
52. Limaye AP, Babu TM, Boeckh M. Progress and challenges in the prevention, diagnosis, and management of cytomegalovirus infection in transplantation. *Clin Microbiol Rev.* 2020;34:e00043-19.
53. Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, Pikis A, Razonable R, Miller V, Griffiths P, The Disease Definitions Working Group of the Cytomegalovirus Drug Development Forum. Definitions of Cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. *Clin Infect Dis.* 2016;64:87–91.
54. Ljungman P, Alain S, Chemaly RF, Einsele H, Galaverna F, Hirsch HH, Sadowska-Klasa A, Navarro D, Styczynski J, de la Camara R. Recommendations from the 10th European Conference on Infections in Leukaemia for the management of cytomegalovirus in patients after allogeneic haematopoietic cell transplantation and other T-cell-engaging therapies. *Lancet Infect Dis.* 2025;25:e451–62.
55. Ljungman P, Chemaly RF, Khawaya F, Alain S, Avery R, Badshah C, Boeckh M, Fournier M, Hodowanec A, Komatsu T, Limaye AP, Manuel O, Natori Y, Navarro D, Pikis D, Razonable RR, Westman G, Miller V, Griffiths PD, Kotton C, The CMV Definitions Working Group of the Transplant Associated Virus Infections Forum. Consensus definitions of cytomegalovirus (CMV) infection and disease in transplant patients including resistant and refractory CMV for use in clinical trials: 2024 update from the transplant associated virus infections forum. *Clin Infect Dis.* 2024;79:787–94.
56. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, Crocchiolo R, Einsele H, Hill JA, Hubacek P, Navarro D, Cordonnier C, Ward KN. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis.* 2019;19:e260–72.
57. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002;34:1094–7.
58. Ljungman P. Cytomegalovirus infections in transplant patients. *Scandinavian J Infect Dis.* 1996;100:59–63.
59. Lui SL, Halloran PF. Mycophenolate mofetil in kidney transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1996;5:508–13.
60. Malvezzi P, Jouve T, Rostaing L. Use of everolimus-based immunosuppression to decrease cytomegalovirus infection after kidney transplant. *Exp Clin Transplant.* 2016;14:361–6.
61. Manuel O, Husain S, Kumar D, Zayas C, Mawhorter S, Levi ME, Kalpoe J, Lisboa L, Ely L, Kaul DR, Schwartz BS, Morris MI, Ison MG, Yen-Lieberman B, Sebastian A, Assi M, Humar A. Assessment of cytomegalovirus specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: A multicenter cohort study. *Clin Infect Dis.* 2013;56:817–24.
62. Manuel O, Pang XL, Humar A, Kumar D, Doucette K, Preiksaitis JK. An assessment of donor-to-recipient transmission patterns of human cytomegalovirus by analysis of viral genomic variants. *J Infect Dis.* 2009;199:1621–8.
63. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, Maertens J, Dadwal SS, Duarte RF, Haider S, Ullmann AJ, Katayama Y, Brown J, Mullane KM, Boeckh M, Blumberg EA, Einsele H, Snyderman DR, Kanda Y, DiNubile MJ, Teal VL, Wan H, Murata Y, Kartsonis NA, Leavitt RY, Badshah C. Letermovir prophylaxis for cytomegalovirus in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2017;377:2433–44.
64. Marty FM, Ljungman P, Papanicolaou GA, Winston DJ, Chemaly RF, Strasfeld L, Young JA, Rodriguez T, Maertens J, Schmitt M, Einsele H, Ferrant A, Lipton JH, Villano SA, Chen H, Boeckh M. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: A phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:284–92.
65. Meesing A, Abraham R, Razonable RR. Clinical correlation of cytomegalovirus infection with CMV-specific CD8+T-cell immune competence score and lymphocyte subsets in solid organ transplant recipients. *Transplantation.* 2018;103:832–8.
66. Meesing A, Razonable RR. New developments in the management of cytomegalovirus infection after transplantation. *Drugs.* 2018;78:1085–103.
67. Meesing A, Razonable RR. Pharmacologic and immunologic management of cytomegalovirus infection after solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2018;11:773–88.
68. Mengelle C, Mansuy JM, Sauné K, Barthe C, Boineau J, Izopet J. A new highly automated extraction system for quantitative real-time PCRs from whole blood samples: Routine monitoring of opportunistic infections in immunosuppressed patients. *J Clin Virol.* 2012;53:314–9.
69. Milano F, Pergam SA, Xie H, Leisenring WM, Gutman JA, Riffkin I, Chow V, Boeckh MJ, Delaney C. Intensive strategy to prevent CMV disease in seropositive umbilical cord blood transplant recipients. *Blood.* 2011;118:5689–96.
70. Miller S, Seet H, Khan Y, Wright C, Nadarajah R. Comparison of QIAGEN automated nucleic acid extraction methods for CMV quantitative PCR testing. *Am J Clin Pathol.* 2010;133:558–63.

71. Mocarski ES, Shenk T, Pass RF. Cytomegalovirus. En: Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology*. 5 th edition Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p. 2701-72.
72. Mullegama SV, Alberti MO, Au C, Li Y, Toy T, Tomasian V, Xian RR. Nucleic acid extraction from human biological samples. En: William H, Yong, editores. *Biobanking: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*; 1897.
73. Natori Y, Alghamdi A, Tazari M, Miller V, Husain S, Komatsu T, Griffiths P, Ljungman P, Orchanian-Cheff A, Kumar D, Humar A. Use of viral load as a surrogate marker in clinical studies of cytomegalovirus in solid organ transplantation: A systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2018;66:617-31.
74. Navarro D, Fernandez-Ruiz M, Aguado JM, Sandonis V, Perez-Romero P. Going beyond serology for stratifying the risk of CMV infection in transplant recipients. *Rev Med Virol*. 2019;29:e2017.
75. Nesbitt SE, Cook L, Jerome KR. Cytomegalovirus quantitation by real-time PCR is unaffected by delayed separation of plasma from whole blood. *J Clin Microbiol*. 2004;42:1296-7.
76. Pascual J, Royuela A, Fernandez AM, Herrero I, Delgado JF, Solé A, Guirado L, Serrano T, de la Torre-Cisneros J, Moreno A, Cordero E, Gallego R, Lumberras C, Aguado JM. Role of mTOR inhibitors for the control of viral infection in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2016;18: 819-31.
77. Peinador M, Grupo de Patología Infecciosa AEPap. Aproximación diagnóstica a la infección por CMV. 2022.
78. Pérez JL. Técnicas de monitorización de la infección por citomegalovirus en los trasplantados de órgano sólido. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29:18-23.
79. Portela D, Patel R, Larson-Keller JJ, Ilstrup DM, Wiesner RH, Steers JL, Krom RAF, Paya CV. OKT3 treatment for allograft rejection is a risk factor for cytomegalovirus disease in liver transplantation. *J Infect Dis*. 1995;171:1014-8.
80. Raiola AM, Dominietto A, di Grazia C, Lamparelli T, Gualandi F, Ibatici A, Bregante S, van Lint MT, Valardo R, Ghiso A, Gobbi M, Carella AM, Signori A, Galaverna F, Bacigalupo A. Unmanipulated haploidentical transplants compared with other alternative donors and matched sibling grafts. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20:1573-9.
81. Razonable R, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients—Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33:1-23.
82. Razonable RR, Hayden RT. Clinical utility of viral load in management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:703-27.
83. Razonable RR. Drug-resistant cytomegalovirus: clinical implications of specific mutations. *Curr Opin Organ Transplant*. 2018;23:388-94.
84. Red Nacional de Biobancos. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, España: Protocolo de extracción de ácidos nucleicos; 2011.
85. Reischig T, Jindra P, Hes O, Svecova M, Klaboch J, Treska V. Valacyclovir prophylaxis versus preemptive valganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Am J Transplant*. 2008;8:69-77.
86. Rzepka M, Depka D, Gospodarek-Komkowska E, Bogiel T. Whole blood versus plasma samples—How does the type of specimen collected for testing affect the monitoring of cytomegalovirus viremia? *Pathogens*. 2022;11:1384.
87. Sauter C, Abboud M, Jia X, Heller G, Gonzales AM, Lubin M, Hawke R, van den Brink MR, Papanicolaou G, Small TN, Barkeret JN. Serious infection risk and immune recovery after double-unit cord blood transplantation without antithymocyte globulin. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17:1460-71.
88. Schafer P, Tenschert W, Schroter M, Gutensohn K, Laufs R. False-positive results of plasma PCR for cytomegalovirus DNA due to delayed sample preparation. *J Clin Microbiol*. 2000;38:3249-53.
89. Sharma P, Singh M, Singh A, Bhardwaj D, Bhatia P. Experience of quantity and quality of DNA and RNA extraction from limited pediatric blood samples: A comparative analysis of automated and manual kit-based method. *Indian J Pathol Microbiol*. 2022;65:105-10.
90. Solano C, Giménez E, Piñana JL, Vinuesa V, Poujois S, Zaragoza S, Calabuig M, Navarro D. Preemptive antiviral therapy for CMV infection in allogeneic stem cell transplant recipients guided by the viral doubling time in the blood. *Bone Marrow Transplant*. 2016;51:718-21.
91. Stowell JD, Forlin-Passoni D, Din E, Radford K, Brown D, White A, Bate SL, Dollard SC, Bialek SR, Cannon MJ, Schmid DS. Cytomegalovirus survival on common environmental surfaces: Opportunities for viral transmission. *J Infect Dis*. 2012;205:211-4.
92. Studer U, Khanna N, Leuzinger K, Hirsch HH, Heim D, Lengerke C, Tsakiris DA, Halter J, Gerull S, Passweg J, Medinger M, Gwerder M. Incidence of CMV replication and the role of letermovir primary/secondary prophylaxis in the early phase after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation—a single centre study. *Anticancer Res*. 2020;40:5909-17.
93. Suarez Lledo M, Marcos MA, Cuatrecasas M, Bombi JA, Fernández-Avilés F, Magnano L, Martínez-Cibrián N, Llobet N, Rosiñol L, Gutiérrez-García G, Jorge S, Martínez C, Rovira M, Urbano-Ispizua A. Quantitative PCR faster, more objective, and more reliable than immunohistochemistry for the diagnosis of Cytomegalovirus gastrointestinal disease in allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25:2281-96.
94. Suganda S, Tang L, Carr J, Sun Y, Pounds S, Hayden R. Comparative evaluation of whole blood versus plasma for quantitative detection of cytomegalovirus using an automated system. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;85:23-5.
95. Suwansirikul S, Rao N, Dowling JN, Ho M. Primary and secondary cytomegalovirus infection. *Arch Intern Med*. 1977;137:1026-9.
96. Tang TTA, Molina MA, Mateos M. Comparación de dos técnicas de extracción de ADN para la cuantificación de CMV en sangre. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24:409.
97. Teira P, Battiwalla M, Ramanathan M, Barrett AJ, Ahn KW, Chen M, Green JS, Saad A, Antin JH, Savani BN, Lazarus HM, Seftel M, Saber W, Marks D, Aljurf M, Norkin M, Wingard JR, Lindemans CA, Boeckh M, Riches ML, Auletta JJ. Early cytomegalovirus reactivation remains associated with increased transplant-related mortality in the current era: A CIBMTR analysis. *Blood*. 2016;127:2427-38.
98. Universidad de Salamanca. Banco Nacional de ADN Carlos III. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. 3.a edición. Madrid, España, 2024.
99. Universidad de Valparaíso. Departamento de Preclínicas Facultad de Medicina. Manual de Toma y Transporte de Muestras UVCLIN. Edición: 4.4. 2020. UVCLIN-POE09, GP-1.2, Chile.
100. Verheyen J, Kaiser R, Bozic M, Timmen-Wego M, Maier BK, Kessler HH. Extraction of viral nucleic acids: Comparison of five automated nucleic acid extraction platforms. *J Clin Virol*. 2012;54:255-9.
101. Vyas A, Raval AD, Kamat S, LaPlante K, Tang Y, Chemaly RF. Real-world outcomes associated with letermovir use for cytomegalovirus primary prophylaxis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Open Forum Infect Dis*. 2023;10:687.

102. Wentworth BB, Alexander ER. Seroepidemiology of infections due to members of the herpes virus group. *Am J Epidemiol.* 1971;94:496–507.
103. Witzke O, Hauser IA, Bartels M, Wolf G, Wolters H, Nitschke M. Valganciclovir prophylaxis versus preemptive therapy in cytomegalovirus-positive renal allograft recipients: 1-year results of a randomized clinical trial. *Transplantation.* 2012;93:61–8.
104. Xie L, Liang XN, Deng Y, Wang J, He Y, Li TJ, Huang S, Qin X, Li S. Effects of storage time on cytomegalovirus DNA stability in plasma determined by quantitative real-time PCR. *J Virol Methods.* 2014;207:196–9.
105. Yan B, Sun G, Wu Y, Wu W, Song K, Cheng Y, Huang A, Pan T, Tang B, Zhu X. Letermovir prophylaxis reduced cytomegalovirus reactivation and resistance post umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol.* 2024;204:2378–89.
106. Zamora MR, Nicolls MR, Hodges TN, Marquesen J, Astor T, Grazia T, Weillet DL. Following universal prophylaxis with intravenous ganciclovir and cytomegalovirus immune globulin, valganciclovir is safe and effective for prevention of CMV infection following lung transplantation. *Am J Transplant.* 2004;4:1635–42.