

Optimización del diagnóstico de hepatitis por citomegalovirus en receptores de trasplante hepático: diez años de experiencia

Cytomegalovirus hepatitis diagnosis optimization in liver transplant recipients: 10 years of experience

Jimena Prieto^{1,3}, Ana Masllorens¹, Gonzalo Ardao¹, Viviana Machado², Martín López¹, Solange Gerona¹ y Julio Medina^{1,3}

¹Programa Nacional de Trasplante Hepático, Uruguay.

²Hospital Militar, Uruguay.

³Universidad de la República.

Recursos habituales disponibles, sin financiamiento externo.
Los autores no presentan conflictos de interés.

Recibido: 6 de febrero de 2020 / Aceptado: 24 de agosto de 2020

Resumen

Introducción: Para los pacientes receptores de trasplante hepático (TH) la hepatitis por citomegalovirus (CMV) constituye una entidad de difícil diagnóstico. Nuestro objetivo fue determinar la real incidencia de hepatitis por CMV aplicando técnicas diagnósticas más específicas. **Material y Métodos:** Estudio retrospectivo/prospectivo, en un centro de trasplante hepático. Período de estudio: años 2009 al 2019. Se incluyeron los TH que presentaron elementos sugestivos y/o específicos de CMV en la histopatología de la punción biopsia hepática (PBH), a los que se les realizó inmunohistoquímica (IHQ) en la PBH. Población control n = 17. **Resultados:** 41 casos cumplieron los criterios de inclusión. La IHQ fue positiva en n = 6 (14,6%). En la población control, la IHQ fue negativa en el 100% de los casos. Esto traduce un valor predictor negativo de 100% para la histopatología en el diagnóstico de hepatitis por CMV, con un valor predictor positivo de 14,6%. En 85% de los pacientes con IHQ negativa, hubo diagnósticos alternativos. La terapia antiviral en la fase retrospectiva se indicó en 48% y en la prospectiva en 21%. **Conclusiones:** Combinar la histopatología con la IHQ optimiza el diagnóstico de hepatitis por CMV; lo que permite la racionalización del uso de antivirales de alto costo y la búsqueda de etiologías diferenciales.

Palabras clave: trasplante hepático; citomegalovirus; hepatitis; histopatología; inmunohistoquímica.

Abstract

Background: Cytomegalovirus (CMV) hepatitis constitutes a challenging diagnostic entity in liver transplant (LT) recipients. **Aim:** To determine the real incidence of CMV hepatitis using more specific diagnostic tools as those currently used before. **Methods:** Retrospective/prospective study conducted in a hepatic transplant unit from 2009 to 2019. LT recipients with CMV specific or suggestive elements in histopathology of hepatic biopsies were included. Immunohistochemistry (IHQ) was performed in tissue samples of the studied cohort as well as in a control one. **Results:** 41 patients met the inclusion criteria. IHQ was diagnostic in 6 (14.6%), and was negative in 100% of the control population. The negative predictive value of the histopathology for CMV hepatitis diagnosis was 100% and the positive predictive value was 14.6%. 85% of patients in whom the IHQ was negative had alternative diagnosis. Antiviral therapy in the retrospective analysis was indicated in 48% of patients and in 21% of the prospectively analyzed cohort. **Conclusions:** Histopathology and IHQ combination improves the diagnostic accuracy of CMV hepatitis which translates into a rational use of expensive antiviral therapy and to search for differential diagnosis.

Keywords: liver transplant; cytomegalovirus; hepatitis; histopathology; immunohistochemistry.

Correspondencia a:

Jimena Prieto
jimeprieto78@gmail.com

Introducción

Citomegalovirus (CMV) es un virus de la familia *Herpesviridae*, ubicuo y de distribución universal. Al igual que todos los herpesvirus, CMV establece una infección latente en el hospedero tras la recuperación de la infección aguda. La reactivación a partir de dicho estado latente puede producirse en pacientes inmunodeprimidos; ejemplo de ello son los receptores de trasplante de órgano sólidos (TOS)¹⁻¹⁰. La infección por CMV constituye una causa mayor de morbimortalidad en los receptores de TOS, con una incidencia reportada entre 30 y 80%^{2,11-18}.

La presentación clínica de la infección por CMV se divide en: infección (viremia) asintomática y enfermedad por CMV; esta última se subdivide a su vez en síndrome viral y enfermedad con compromiso visceral (hepatitis, neumonitis, colitis), siendo esta forma la que determina una importante morbilidad²⁻¹⁹⁻²⁸.

En receptores de trasplante hepático (TH), la hepatitis por CMV es un problema, tanto por su frecuencia con una incidencia reportada de hasta 17%, como por las dificultades en la realización de un diagnóstico certero^{10,11,19,29-33}. En la mayoría de los centros de Latinoamérica los criterios utilizados para el diagnóstico de hepatitis por CMV son los de hepatitis probable; con la presencia de viremia en sangre periférica (detectada mediante antigenemia o carga viral de CMV) y el hallazgo en la histopatología de elementos sugestivos pero no específicos de infección por CMV³². La falta de realización de técnicas diagnósticas específicas determina un sobre-diagnóstico de esta entidad y, por ende, la instauración de terapias dirigidas, con el consiguiente gasto en salud y toxicidad adicional para el paciente. En el año 2017, nuestro grupo elaboró una encuesta *online* a diferentes centros latinoamericanos dirigida al diagnóstico de hepatitis por CMV; 10 centros respondieron (Argentina, Colombia, Paraguay, Perú, Uruguay, Costa Rica, Brasil (n = 2), Ecuador, México); la incidencia reportada varió de menos de 10% a más de 20%. El algoritmo diagnóstico utilizado lleva a que 50% de los centros realicen punción-biopsia hepática (PBH) de manera sistemática para el diagnóstico de hepatitis por CMV, mientras que otro 50% solo realiza PBH en algunas ocasiones. Esto conlleva a muchos diagnósticos de hepatitis por CMV probable pero no confirmados³².

Actualmente existe una nueva definición de hepatitis por CMV propuesta por Ljugman y cols.³³. La misma plantea como criterio necesario para realizar diagnóstico la detección del CMV en el tejido hepático mediante histopatología (inclusiones intranucleares), inmunohistoquímica (IHQ), hibridación *in situ* por ADN o cultivo rápido. La IHQ constituye una técnica accesible que aumenta fundamentalmente la especificidad diagnóstica en comparación con la histopatología aislada.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la incidencia real de hepatitis por CMV en nuestro centro mediante la aplicación de técnicas diagnósticas más específicas como la IHQ, lo que permitiría mejorar la certeza diagnóstica y optimizar el tratamiento de los pacientes.

Material y Métodos

Estrategia

Estudio analítico, que incluyó dos fases, retrospectivo/prospectivo, en un único centro de trasplante hepático, en Montevideo, Uruguay. Los pacientes fueron incluidos prospectivamente en nuestra base de datos nacional BaDaInTOS. El período prospectivo se extendió desde el 1 de mayo de 2017 al 1 de mayo de 2019. El análisis retrospectivo se realizó desde el 14 de julio de 2009 (momento en el que comenzó el programa de trasplante) al 31 de abril de 2017.

Criterios de inclusión

Se incluyeron todos los receptores de TH que por presentar alteraciones en el hepatograma se les realizó PBH y que presentaron elementos sugestivos y/o específicos de CMV en la histopatología de la punción biopsia hepática (PBH). A todos estos casos se les realizó IHQ en la PBH.

Criterio de exclusión

Fueron excluidos los receptores de trasplante hepático que fallecieron antes del mes post trasplante.

Población control

Estuvo constituida por receptores de TH en quienes se realizó PBH y que no presentaron elementos sugestivos ni específicos en la histopatología de hepatitis por CMV. En estos casos también se realizó IHQ en la PBH.

El diagnóstico definitivo de hepatitis por CMV confirmado se realizó con la IHQ consistente con infección por este virus. Estos pacientes se trataron con antivirales hasta tener dos resultados de carga viral de CMV en periferia indetectables por dos semanas consecutivas.

PBH

Efectuada mediante punción guiada por ecografía.

Histopatología con tinción con hematoxilina/eosina (H&E)

Fueron elementos considerados sugestivos de CMV en la histopatología la identificación de microabscesos, microgranulomas, granulomas, alteraciones citopáticas e infiltrado polimorfonuclear. Se consideró específico de CMV en la histopatología las inclusiones intranucleares pigmentadas o no (ojo de búho).

Inmunohistoquímica

Procedimiento técnico basado en la utilización de anticuerpos del tipo inmunoglobulina G, que permiten identificar marcadores antigénicos en los tejidos previamente fijados en formol tampón e incluidos en parafina. Para este estudio se utilizó el anticuerpo concentrado de ratón, monoclonal CMV, Clonas: CCH2+DDG9. Dako. Dinamarca. Código:M0854, realizando la técnica de inmunohistoquímica según el protocolo estandarizado por el laboratorio de Anatomía Patológica del Servicio del Hospital Militar, y respaldado en las instrucciones del *datasheet* correspondiente a este anticuerpo.

Se utilizaron casos controles positivos para validar la técnica en cada procedimiento realizado, asegurándose así que no hubiera falsos negativos o positivos.

Las muestras sometidas a este estudio con sus respectivos controles, se de-parafinaron con xilol, (Entox, Uruguay CAS 1330-20-7) se rehidrataron con alcoholes con graduación decreciente y posteriormente en olla a presión a 126°C de temperatura y con solución de recuperación tapón ph 9, se procedió a la recuperación antigénica, desenmascarando la proteína P 52, a la cual se va a unir el anticuerpo CMV monoclonal mouse (CCH2+DDG9).

Posteriormente, se incubó el anticuerpo en cámara húmeda, a temperatura ambiente y se colocó el *kit* de conjugación DAKO EnVision-HRP, luego se agregó diaminobencina (DAKO, Canadá, CAS 8007-47-4) para hacer la reacción visible. Entre cada paso del procedimiento se realizó lavados con tampones salinos. Finalmente se realizó una coloración de contraste para diferenciar las áreas de tejido con inmunomarcación de las que no han sido inmunomarcadas, se deshidrató las muestras con alcoholes de graduación creciente, xilol y montaje con Bálsamo de Canadá. (Biopack, proveedor bioquimidiagnostics).

La formalina utilizada es formol buffer tamponado al 4%, con un tiempo de fijación de tres horas.

Se consideró IHQ positiva para CMV a la marcación nuclear en células infectadas por este virus (Figura 1).

Definiciones³³⁻³⁴

Infección por CMV: aislamiento del virus o la detección de antígenos (antigenemia pp 65) o ADN de CMV por técnica calibrada por World Health Organization International Standard for Human CMV en cualquier fluido corporal o tejido.

La hepatitis por CMV según la nueva definición se clasifica en PROBADA como aquella que presenta elementos de disfunción hepática (alteración de las transaminasas, bilirrubinemia, etc.) sumado a la documentación del CMV en: 1) la histopatología (inclusiones intranucleares); 2) IHQ; 3) aislamiento del virus; 4) cultivo rápido o 5) detección por técnica de hibridación por ADN, en ausencia de otra causa identificada de hepatitis.

No se recomienda la categoría de probable ya que su uso lleva confusiones con otras patologías como rechazo del injerto.

Estrategias establecidas para la prevención de infección por CMV

Universal: La profilaxis universal consiste en la administración de un agente antiviral (valganciclovir-VGC) a pacientes de alto riesgo (donantes positivos/ receptores negativos) durante tres meses.

Selectiva: La profilaxis selectiva consiste en administrar VGC a pacientes de alto riesgo por exposición a timoglobulina durante tres meses.

Estrategia anticipada: Se realiza monitorización de viremia por CMV en forma protocolizada y cuando ésta supera el punto de corte establecido por el laboratorio del centro se inicia VGC para detener su replicación.

Híbrida: Esta estrategia se aplica en pacientes de alto riesgo bajo profilaxis universal o selectiva una vez culminado el antiviral indicado. Consiste en controlar la replicación viral en sangre periférica y reiniciar la terapia si la misma supera el punto de corte establecido por el centro.

El punto de corte establecido en nuestro centro para iniciar estrategia anticipada es de una célula en el antígeno pp 65 (Ag pp65) o carga viral (CV) de CMV de 1.500 UI/ml.

Análisis estadístico

Se presentan tablas y gráficos de frecuencia para la descripción de variables cualitativas, así como medidas de resumen para las continuas. El estudio de normalidad de las variables continuas se realizó con test de Kolmogorov-Smirnov. El análisis de diferencias para las medias se realizó por test t de Student para muestras independientes y para proporciones con test para dos proporciones. La incidencia acumulada se calculó como número de casos con el evento de interés en el total de población en riesgo



Figura 1. Inmunohistoquímica positiva. Se evidencia la marcación de anticuerpos monoclonales específicos para CMV.

expresado con una k de 100. La concordancia entre ambas pruebas se calculó con el Índice Kappa de concordancia. Se fijó un nivel de significación en 0,05. El software estadístico utilizado fue STATA v.12.0.

Ética

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la institución. En todos los casos se solicitó consentimiento informado.

Resultados

Durante el período de análisis se realizaron 185 TH en este centro. Un total de 41 casos (32 pacientes) cumplían con los criterios de inclusión. De éstos, 27 fueron analizados en la fase retrospectiva y 14 fueron incluidos en la fase prospectiva (Figura 2). La edad promedio fue de $40,0 \pm 2,9$ años estableciéndose mínima y máxima edad, en 15 y 69 años, respectivamente. En relación al género 44% ($n = 14$) fueron pacientes de sexo femenino. Con respecto al status CMV, 97% ($n = 31$) presentó un perfil D+/R+ (Tabla 1).

Considerando el resultado de la histopatología, 7% ($n = 3$ casos) presentaron elementos específicos de CMV

y en 93% ($n = 38$) se identificaron elementos sugestivos de CMV. El hallazgo más frecuente correspondió a la presencia de microabscesos en 61% de los casos (Tabla 2).

En seis casos (14,6%), la IHQ fue positiva para diagnóstico de infección por CMV. En los 17 casos-control se les realizó IHQ siendo la misma negativa en 100% (Tabla 3). Esto traduce un valor predictor negativo (VPN) de 100% para la histopatología en el diagnóstico de hepatitis por CMV, mientras su valor predictor positivo (VPP) fue de 14,6%.

En los seis casos de hepatitis por CMV, el status CMV fue de riesgo intermedio (receptor +), en dos de seis casos la histopatología mostró elementos específicos de CMV, mientras que en los restantes cuatro, este estudio mostró elementos sugestivos. (Tabla 4, Figura 3). Tomando a la IHQ como patrón oro, el VPP de la histopatología cuando se identificaron elementos específico fue de 67%, mientras el VPN fue de 89% (Tabla 4).

Los datos obtenidos muestran un índice de asociación Kappa entre la histopatología y la IHQ de 0,09.

Ochenta y cinco por ciento ($n = 30$) de los casos con IHQ negativa para CMV presentaron diagnósticos alternativos al de hepatitis por CMV, siendo el principal el de rechazo en 47% (Tabla 5).

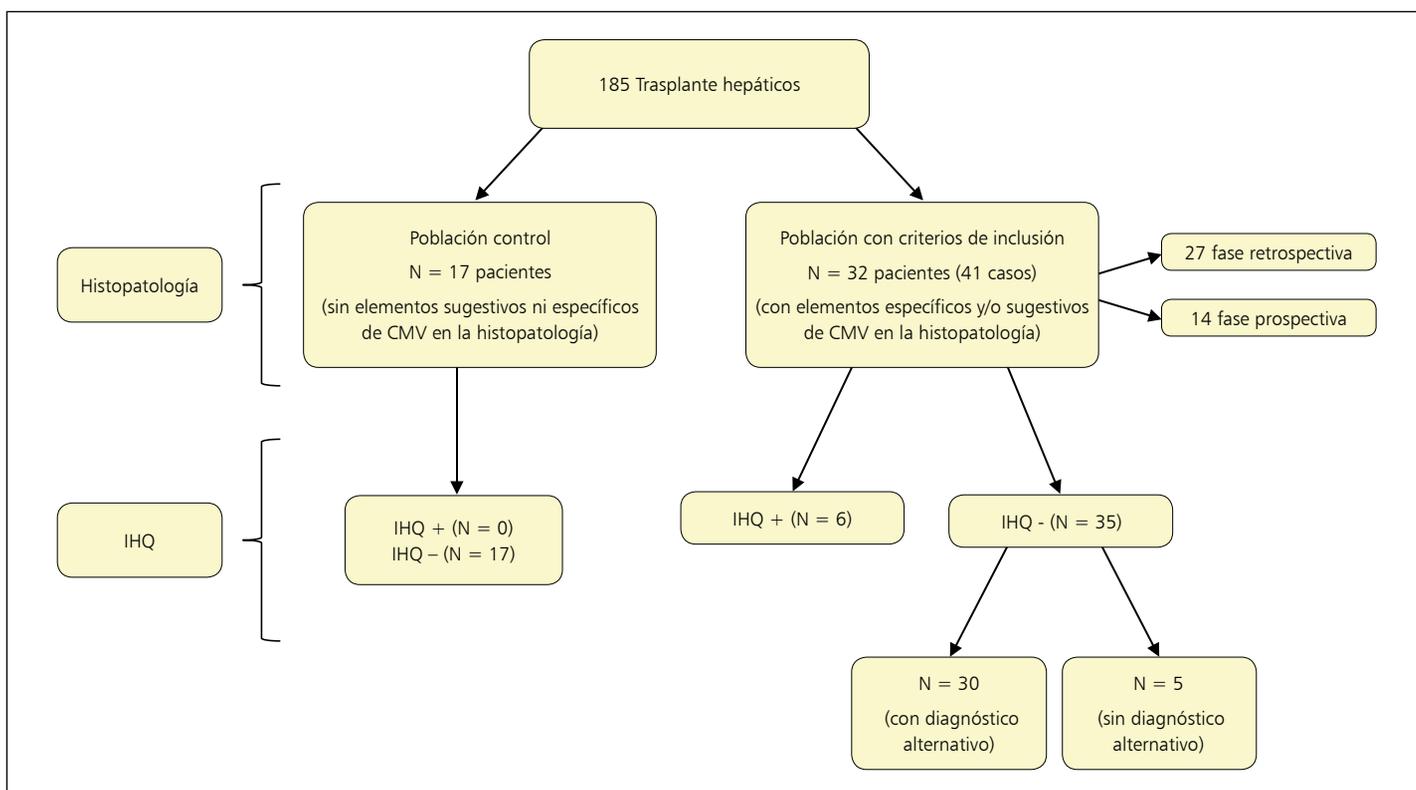


Figura 2. Flujograma de resultados.

Tabla 1. Generalidades de la población receptora de trasplante hepático con diagnóstico de hepatitis por citomegalovirus según tinción de hematoxilina y eosina: (Unidad Bi Institucional de Enfermedades Hepáticas Complejas (Hospital Militar, Hospital de Clínicas). Uruguay. Período 14 de julio de 2009 a 14 de julio de 2019

Variables	n: 41 casos (32 pacientes)
Edad mediana en años (± DE)	40,0 ± 2,9
Sexo femenino n, (%)	14 (43,75)
Enfermedad que determina falla de órgano trasplantado n (%)	
Cirrosis alcohólica	7 (22)
Autoinmune	11 (34,4)
Hepatitis C crónica	2 (6)
Cirrosis biliar primaria	1 (3)
Nash	3 (9,3)
Otras ¹	8 (25)
Status CMV D/R	
D-/R-	0
D+/R+	31 (96,8%)
D-/R+	1 (3,2%)
Estrategia de prevención CMV, n%	
Anticipada	31 (96,8%)
Universal	0
Selectiva	1 (9,7%)
Replicación viral de CMV	
CV CMV, media ± (DE), n: 36 pacientes	7.749 ± 3.227
Ag pp 65, media ± (DE), n: 22 pacientes	6 ± 3

DE: desviación estándar; CMV: citomegalovirus; D: donante; R: receptor; CV CMV: carga viral de citomegalovirus. ¹Otras: Aguda en crónica, Bud Chiari, colangitis esclerosante primaria (CEP), criptogénica, hemocromatosis, hepatitis neonatal, idiosincrática, más de una etiología.

Tabla 2. Histopatología de biopsia hepática por punción, con tinción de hematoxilina y eosina. Unidad Bi Institucional de Enfermedades Hepáticas Complejas (Hospital Militar, Hospital de Clínicas). Uruguay. Período 14 de julio de 2009 a 14 de julio de 2019

Histopatología	n (%)
Microabscesos	17 (41)
" + pseudoinclusión nuclear	1 (2,4)
" + área de necrosis	1 (2,4)
" + cuerpos apoptóticos + microgranulomas	1 (2,4)
" + cuerpos apoptóticos + infiltrado inflamatorio	1 (2,4)
" + cuerpos apoptóticos	1 (2,4)
" + cuerpos de inclusión intracitoplásmico	1 (2,4)
" + microgranulomas	1 (2,4)
" + microgranulomas + nucleomegalia + cuerpo apoptótico	1 (2,4)
Granuloma	1 (2,4)
Microgranulomas	1 (2,4)
Inclusión citomegalica	1 (2,4)
Otros ¹	13 (34)

¹Otros: Moderado infiltrado inflamatorio difuso + nucleomegalia; cuerpos apoptóticos + focos necrosis e inflamación lobular; infiltrado inflamatorio mixto, premiación PMN (polimorfonucleares), necrosis focal, PMN; cuerpos apoptóticos + acúmulos PMN; infiltrado PMN lobular.

Tabla 3. Resultados de histopatología, hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica en población control y población de estudio. Unidad Bi Institucional de Enfermedades Hepáticas Complejas (Hospital Militar, Hospital de Clínicas). Uruguay. Período 14 de julio de 2009 a 14 de julio de 2019. Resumen de resultados de histopatología e inmunohistoquímica (n: 41 biopsias hepáticas)

	Histopatología		
	Sugestiva CMV	Específica CMV	Negativa para CMV
Inmunohistoquímica positiva	4	2	0
Inmunohistoquímica negativa	34	1	17
Total	38	3	17

IHQ: inmunohistoquímica; CMV: citomegalovirus.

Tabla 4. Características de casos confirmados de hepatitis por citomegalovirus con inmunohistoquímica

	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6
Edad	59	54	21	57	52	60
Sexo	M	M	F	M	M	M
Status CMV	D+/R+	D+/R+	D+/R+	D+/R+	D+/R+	D+/R+
CMV viremia	75.750	72.300	26.400	15 células x 200.000 PMN	52.500	23.700
Histopatología	Microabscesos	Microabscesos, pseudoinclusión nuclear	Microabscesos	Inclusiones citomegálicas	Microabscesos, áreas de necrosis	Infiltrado inflamatorio mixto difuso Nucleomegalia

CMV: citomegalovirus; IHQ inmunohistoquímica; F: femenino; M: masculino; D: donante; R: receptor.

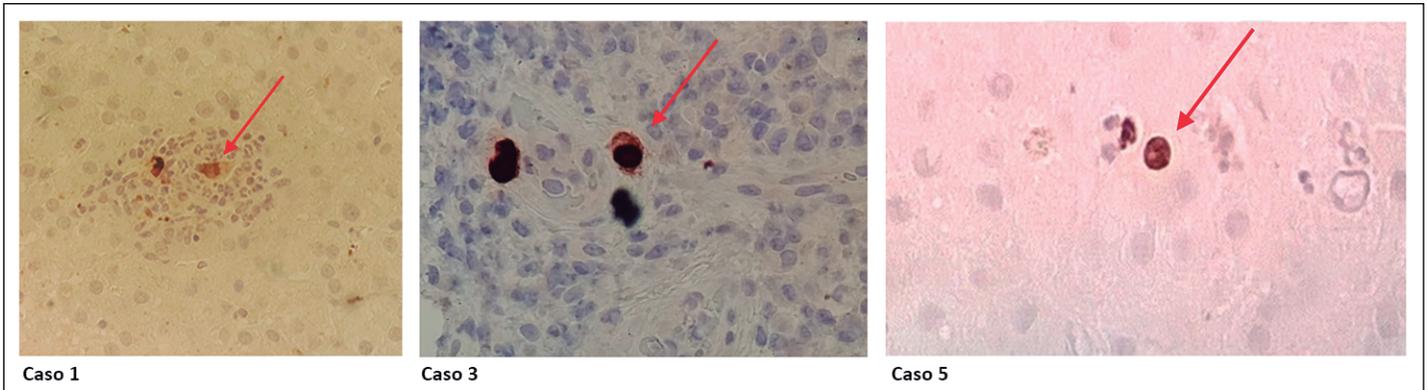


Figura 3. Inmunohistoquímica positiva de casos 1, 3 y 5. Se evidencia la marcación de anticuerpos monoclonales específicos para citomegalovirus.

Tabla 5. Diagnóstico alternativo en pacientes con diagnóstico de hepatitis citomegalovirus por histopatología con tinción de hematoxilina y eosina. Unidad Bi Institucional de Enfermedades Hepáticas Complejas (Hospital Militar, Hospital de Clínicas). Uruguay. Período 14 de julio de 2009 a 14 de julio de 2019. (N: 30)

Diagnóstico alternativo	n (%)
Rechazo	11 (36,7)
Rechazo + hepatitis autoinmune	5 (16,7)
Hepatitis <i>de novo</i> autoinmune	1 (3,3)
Alteración de la arteria hepática	2 (6,7)
Colangitis	2 (6,7)
Patología biliar	1 (3,3)
Daño de preservación	1 (3,3)
Síndrome linfoproliferativo	1 (3,3)
Toxicidad farmacológica	2 (6,7)
Reactivación de VHC	1 (3,3)
Otra enfermedad viral	1 (3,3)
Hepatitis por CMV reciente	1 (3,3)
Esteatosis	1 (3,3)

VHC: Virus de hepatitis C; CMV: citomegalovirus.

Tabla 6. Características de la replicación viral del citomegalovirus en pacientes con inmunohistoquímica positiva e inmunohistoquímica negativa

Variables	IHQ positiva n = 6	IHQ negativa n = 35	Valor p
Carga viral CMV, media ± (DE)	50.130,0 ± 10.989,0	914,1 ± 549,6	p = 0,011
Ag pp 65, media ± (DE)	13,6 ± 10,3	3,0 ± 1,8	p = 0,109

DE: desviación estándar; IHQ: inmunohistoquímica.

El promedio del valor de carga viral para CMV en pacientes con IHQ negativa fue $914,1 \pm 549,6$, mientras que en aquellos con IHQ positiva, el promedio fue $50.130,0 \pm 10.989,0$, ($p = 0,011$). Para el Ag pp65 el promedio en pacientes con IHQ negativa fue $3,0 \pm 1,8$, mientras que en sujetos con IHQ positiva fue $13,6 \pm 10,3$, ($p = 0,109$) (Tabla 6, Figura 4). En 100% de los casos confirmados de hepatitis por CMV ($n = 6$) la viremia detectada fue mayor al punto de corte establecido de 1.500 UI/ml.

Con respecto a la indicación de terapia antiviral por plantearse una hepatitis debida a CMV, a 39% de los pacientes ($n = 16$) se le administró antiviral. De éstos, 15 recibieron ganciclovir (GCV) como terapia inicial y uno recibió VGC. Si analizamos los dos fases, en la retrospectiva de 27 casos con histopatología sugestiva de CMV se indicó terapia antiviral en 48% ($n = 13$), mientras que, en la fase prospectiva se indicó esta terapia en 21% ($n = 3$) de los casos ($p < 0,185$).

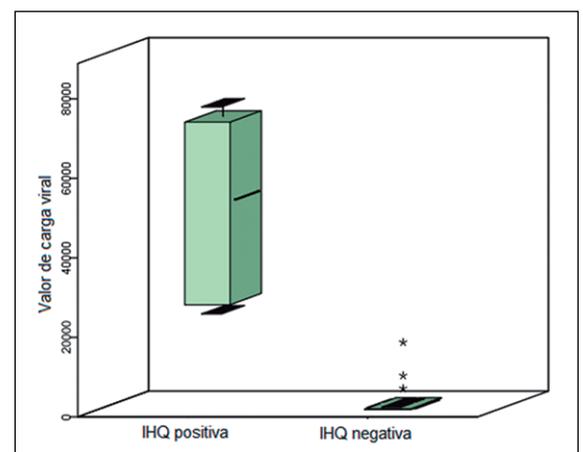


Figura 4. Cargas virales de citomegalovirus discriminadas en pacientes con inmunohistoquímica positiva y negativa. CMV: citomegalovirus; IHQ: inmunohistoquímica.

Discusión

Para los pacientes receptores de TH, la hepatitis por CMV constituye una importante causa de morbilidad. Ésta representa una entidad de difícil diagnóstico, debido a que puede presentarse clínica y bioquímicamente muy similar al rechazo del injerto, entidad que lleva un tratamiento opuesto al de la hepatitis por CMV. En la mayoría de los centros de Latinoamérica, los criterios utilizados para el diagnóstico de hepatitis por CMV son los de hepatitis probable, con la presencia de viremia en sangre y el hallazgo en la histopatología de elementos sugestivos, pero no específicos de infección por CMV. La falta de realización de técnicas diagnósticas específicas determina un sobre-diagnóstico de esta entidad y con esto se omite el diagnóstico de otras etiologías diferenciales, la instauración de terapias dirigidas para CMV, con el consiguiente gasto en salud y toxicidad adicional para el paciente.

Nuestro objetivo principal fue determinar la real incidencia de hepatitis por CMV en nuestro centro aplicando técnicas diagnósticas más específicas.

El presente estudio confirma el bajo valor predictor positivo (VPP) de la histopatología para el diagnóstico de hepatitis por CMV, siendo fundamental para su correcta confirmación diagnóstica la aplicación de otras técnicas con mayor especificidad como la IHQ. Las técnicas por hibridación *in situ* para CMV en la pieza anatómo-patológica han mostrado mayor sensibilidad en otros modelos de pacientes y localizaciones anatómicas sobre la IHQ para identificar el compromiso por CMV, habiendo de todas maneras pocos reportes específicos sobre su rendimiento en la población de pacientes receptores de TH.

En este estudio se analizaron 41 casos (32 pacientes) con histopatología sugestiva y/o específica para hepatitis por CMV, en los cuales la IHQ fue diagnóstica en sólo seis casos mientras que en los casos control, la IHQ fue negativa en 100% de los mismos.

Estos resultados sugieren un valor predictor negativo (VPN) de 100% para la histopatología en el diagnóstico de hepatitis por CMV, con un valor predictor positivo (VPP) de solamente 14,6%.

De los tres casos con histopatología específica para CMV, uno de ellos presentó IHQ negativa. En el análisis de este caso no se evidenció viremia detectada para CMV, ni recibió tratamiento específico para CMV o disminución de la inmunosupresión. Todo esto nos lleva a plantear que el paciente no presentó una hepatitis por CMV y apoya el uso de IHQ como técnica que aporta especificidad al diagnóstico de esta entidad.

Los datos obtenidos muestran, a su vez, una muy baja concordancia entre la histopatología y la IHQ, con un índice de asociación Kappa entre ambas técnicas de 0,09.

Esta baja correlación entre las técnicas, sumado al bajo VPP de la histopatología confirma la necesidad de

contar con técnicas de IHQ para aumentar la especificidad del diagnóstico de hepatitis por CMV en situaciones en que la histopatología es sugestiva. Incluso, al analizar de manera separada los elementos específicos de infección por CMV en la histopatología, comparándolos con la IHQ, el VPP de la histopatología sigue siendo insuficiente, de 67%, mientras el VPN es de 89%. Esto confirma que por sí sola la histopatología no es suficiente para asegurar un diagnóstico adecuado.

Estos resultados concuerdan con lo publicado por otros autores como Barahoke y cols.³⁶, y Lautenschlager y cols.³⁷, que plantean el uso combinado de técnicas diagnósticas (en este caso la histopatología e IHQ) como una mejor estrategia para optimizar el diagnóstico de hepatitis por CMV en receptores de TH.

El uso de la IHQ como técnica diagnóstica de confirmación determinó una menor incidencia acumulada de hepatitis por CMV en nuestro centro, que fue de 3,2 (6 casos) cada 100 receptores de trasplante. Esta incidencia es inferior a lo reportado por varios programas latinoamericanos³² y acorde a lo publicado por centros europeos¹⁹.

La baja correlación encontrada entre la histopatología y la IHQ en nuestro estudio, consideramos que puede ser atribuida a que los microabscesos fueron el hallazgo identificado en mayor proporción (61% de los casos), mientras que las inclusiones intranucleares, consideradas elementos específicos a nivel de la histopatología, no superaron el 5% de los casos. Los microabscesos hepáticos se caracterizan por ser un hallazgo sumamente inespecífico que pueden observarse en múltiples complicaciones del TH, como otras enfermedades virales, colangitis, daño de preservación, etc.³⁶⁻⁴¹.

Sumado a lo anteriormente planteado, cabe destacar que en 85% de los casos que presentaron IHQ negativa se identificó un diagnóstico alternativo al de hepatitis por CMV, siendo el principal diagnóstico el rechazo del injerto hepático. Este hecho ya ha sido descrito por otros autores quienes objetivan una incidencia de rechazo de 20 a 40%, principalmente en los primeros meses post trasplante⁴¹⁻⁴⁶. Establecer un correcto diagnóstico entre estas entidades tiene suma relevancia ya que el rechazo del injerto conlleva un tratamiento opuesto al de la hepatitis por CMV (aumento de la inmunosupresión versus disminución de la misma).

Otro pilar utilizado por la mayoría de los centros para el diagnóstico de hepatitis por CMV es la replicación viral en sangre periférica (detección de ADN de CMV o Ag pp65), no existiendo a la fecha un punto de corte estandarizado para definir infección versus enfermedad, lo que constituye una limitante para el uso de esta técnica^{18,19,47}. Otras técnicas como la serología carecen de utilidad en el contexto de pacientes inmunodeprimidos receptores de trasplantes para predecir, tanto infección como enfermedad¹⁹. En el presente estudio, la replica-

ción viral de CMV en sangre periférica identificada por técnica de ADN, fue significativamente mayor en los casos confirmados por IHQ versus en pacientes con IHQ negativa. Se confirmó, a su vez, la utilidad del punto de corte establecido por nuestro centro de 1.500 UI/ml para el inicio de terapias antivirales, dado que en $n = 0$ de los seis casos confirmados la viremia detectada fue menor al valor de corte determinado.

Finalmente, y como resultado del uso de una técnica confirmatoria con mayor especificidad para el diagnóstico de hepatitis por CMV, en la fase prospectiva logramos una reducción a la mitad del uso de antivirales. Ésta, si bien no fue estadísticamente significativa, probablemente por el tamaño muestral, redundó en un claro beneficio, tanto en términos del propio paciente, como en términos económicos sentando las bases para un nuevo modelo de estudio y diagnóstico de esta complicación.

Planteamos que las limitantes de nuestro trabajo son fundamentalmente el pequeño tamaño de la muestra y la presencia de cinco casos en los que no se llegó a un diagnóstico confirmatorio alternativo. Esto último, pensamos se debe a la ausencia de herramientas diagnósticas para confirmar otros diagnósticos diferenciales como por ejemplo otras etiologías virales en la PBH.

Este es el primer trabajo realizado en nuestro país que documenta el alto VPN de la histopatología, demostrando que cuando ésta no es sugestiva de hepatitis por CMV, podemos descartar de manera razonable este diagnóstico; por el contrario, cuando la histopatología sugiere la presencia de hepatitis por CMV, dado el bajo VPP que presenta, debemos realizar otras técnicas diagnósticas más específicas que la confirmen, como la IHQ.

Los resultados de nuestro trabajo han modificado el estándar de cuidado de los pacientes receptores de TH en nuestro país, realizándoles en la actualidad a todos los pacientes donde la histopatología sugiera hepatitis por CMV, la técnica confirmatoria con IHQ.

Conclusiones

Reportamos una incidencia acumulada de hepatitis por CMV probada de 3 cada 100 TH. La histopatología sin elementos sugestivos y/o específicos de CMV permite descartar razonablemente este diagnóstico. Combinar la histopatología con la IHQ mejoró la certeza diagnóstica en estos casos optimizando las estrategias diagnósticas y terapéuticas.

Referencias bibliográficas

- 1.- Crumpacker I I C S, Zhang J L. Citomegalovirus. En Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia. Churchill Livingstone. 7th Edition, 2010. p: 1983-2000.
- 2.- Kotton C N, Kumar D, Caliendo A M, Asberg A, Chou S, Snyderman D R, et al; Transplantation Society International CMV Consensus Group. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation*. 2010; 89 (7): 779-95. doi: 10.1097/TP.0b013e3181cee42f.
- 3.- Prieto J, Medina J, Menéndez J M, López M, Scalone P, Castelli J, et al. Profilaxis para citomegalovirus. Experiencia del programa de trasplante hepático. Uruguay, 2013. XXII Congreso Latinoamericano y del Caribe de Trasplante - STALYC / XII Congreso Argentino de Trasplante - SAT. , Buenos Aires (Argentina), 2013.
- 4.- Zhang L J, Hanpf P, Rutherford C, Churchill W H, Crumpacker C S. Detection of cytomegalovirus, DNA, RNA, and antibody in normal donor blood. *J Infect Dis* 1995; 171: 1002-6. doi: 10.1093/infdis/171.4.1002.
- 5.- Smith M G. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 92: 424-30. doi: 10.3181/00379727-92-22498.
- 6.- Craig J M, Macauley J C, Weller T H, Wirth P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957; 94: 4-12. doi: 10.3181/00379727-94-22841.
- 7.- Chee M S, Bankier A T, Becks S, Bohni R, Brown C M, Cerny R, et al. Analysis of the protein coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain-AD 169. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 154: 125-69. doi: 10.1007/978-3-642-74980-3_6.
- 8.- Cha T, Tom S, Kemble G W, Duke G M, Mocarski E S, Spaete R R. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 1996; 70: 78-83. doi: 10.1128/JVI.70.1.78-83.1996.
- 9.- Penfold M E, Dairaghi D J, Duke G M, Saederup N, Mocarski E S, G Kemble G W, et al. Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9839-44. doi: 10.1073/pnas.96.17.9839.
- 10.- Rul P F, Powell K L. Physical and functional interaction of human cytomegalovirus DNA polymerase and its accessory protein (ZCP36) expressed in insect cells. *J Virol* 1992; 66: 4126-33. doi: 10.1128/JVI.66.7.4126-4133.1992.
- 11.- Sullivan V, Talarico C L, Stanat S C, Davis M, Coen D M, Biron K K. A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus infected cells. *Nature* 1992; 358: 162-4. doi: 10.1038/358162a0.
- 12.- Vanarsdall A, Johnson D. Human cytomegalovirus entry into cells. *Curr Opin Virol* 2012; 2: 37-42. doi: 10.1016/j.coviro.2012.01.001.
- 13.- Burke H G, Heldwein E E. Correction: crystal structure of the human cytomegalovirus glycoprotein B. *PLOS Pathogens* 2015; 11 (11): e1005300. <https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?type=printable&id=10.1371/journal.ppat.1005300>.
- 14.- Medina J, Aguado J M. Current strategies and future directions in cytomegalovirus (CMV) pneumonitis. In: *Pulmonary Infection in the Immunocompromised Patient*. USA. Editorial: John Wiley & Sons; 2009. p.: 383-400.
- 15.- Medina J, Pérez G, Aguado J M. Interactions between cytomegalovirus and other viruses (HHV6, HHV7, HCV and EBV) in transplantation [Review]. *Trends in*

- Transplantation 2007; 1: 129-36. <https://www.oatext.com/pdf/TiT-1-115.pdf>
- 16.- Kotton C, Kumar D, Caliendo A M, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, et al. Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplantation. *Transplantation* 2013; 96: 333-60. doi: 10.1097/TP.0b013e31829df29d.
 - 17.- Torre-Cisneros J, Aguado J M, Caston J J, Almenar L, Alonso A, Cantisán S, et al. Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: SET/GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations. *Transplant Rev (Orlando)* 2016 ; 30 (3): 119-43. doi: 10.1016/j.trre.2016.04.001.
 - 18.- Kotton C N, Kumar D, Caliendo A M, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, et al; The Transplantation Society International CMV Consensus Group. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation* 2018; 102: 900-31. doi: 10.1097/TP.0000000000002191.
 - 19.- Razonable R R, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients-Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin. Transplant* 2019; e13512. doi: 10.1111/ctr.13512.
 - 20.- Medina J C, Pérez-Sartori G, Caltenco-Serrano R, Aguado J M. Response and pathogenic mechanisms of cytomegalovirus infection in transplant recipients [Review]. *Trends in Transplantation* 2009; 3: 103-12. <https://www.oatext.com/pdf/TiT-3-139.pdf>.
 - 21.- Yadav S K, Saigal S, Choudhary N S, Saha S, Sah J K, Saraf N, et al. Cytomegalovirus infection in living donor liver transplant recipients significantly impacts the early post-transplant outcome: A single center experience. *Transpl Infect Dis* 2018; 20 (4):e12905. doi: 10.1111/tid.12905.
 - 22.- Manuel O, Husain S, Kumar D, Zayas C, Mawhorter S, Levi M E, et al. Assessment of cytomegalovirus specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin Infect Dis* 2013; 56 (6): 817-24. doi: 10.1093/cid/cis993.
 - 23.- Meesing A, Razonable R R. Pharmacologic and immunologic management of cytomegalovirus infection after solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2018; 11 (8): 773-88. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1501557>.
 - 24.- Manuel O, Pang X L, Humar A, Kumar D, Doucette K, Preiksaitis J K. An assessment of donor-to-recipient transmission patterns of human cytomegalovirus by analysis of viral genomic variants. *J Infect Dis* 2009; 199 (11): 1621-8. doi: 10.1086/598952.
 - 25.- Eid A J, Razonable R R. New developments in the management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Drugs* 2010; 70 (8): 965-81. doi: 10.2165/10898540-000000000-00000.
 - 26.- Fernández-Ruiz M, Giménez E, Vinuesa V, Ruiz-Merlo T, Parra P, Amat P, et al. 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* 2019; 25 (3): 381.e1-381.e10. doi: 10.1016/j.cmi.2018.05.010.
 - 27.- Gardiner B J, Nierenberg N E, Chow J K, Ruthazer R, Kent D M, Snyderman D R. Absolute lymphocyte count: a predictor of recurrent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2018; 67 (9): 1395-402. doi: 10.1093/cid/ciy295.
 - 28.- Meesing A, Abraham R, Razonable R R. Clinical correlation of cytomegalovirus infection with CMV-specific CD8+ T-cell immune competence score and lymphocyte subsets in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2019; 103 (4): 832-8. doi: 10.1097/TP.0000000000002396.
 - 29.- Winston D J, Ho W G, Howell C L, Miller M J, Mickey R, Martin W J, et al. Cytomegalovirus infections associated with leukocyte transfusions. *Ann Intern Med* 1980; 93: 671-5. doi: 10.7326/0003-4819-93-5-671.
 - 30.- Riverie Marcelin J, Beam E, Razonable R R. Cytomegalovirus infection in liver transplant recipients: Updates on clinical management. *World J Gastroenterol* 2014; 20 (31): 10658-67. doi: 10.3748/wjg.v20.i31.10658.
 - 31.- Seehofer D, Rayes N, Tullius SG, Schmidt C A, Neumann U P, Radke C, et al CMV hepatitis after liver transplantation: incidence, clinical, course, and long-term follow-up. *Liver Transpl* 2002; 18: 1138-46. doi: 10.1053/jlts.2002.36732.
 - 32.- Prieto J, Medina J C. Encuesta latinoamericana sobre diagnóstico de citomegalovirus en receptores de trasplante hepático. XXII Congreso Latinoamericano y del Caribe de Trasplante-STALYC. Montevideo. 2017.
 - 33.- Ljungman P, Boeckh M, Hirsh H H, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, et al. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. *Clin Infect Dis* 2017; 64(1): 87-91. doi: 10.1093/cid/ciw668.
 - 34.- Azevedo L S, Pierrotti L C, Abdala E, Costa S F, Strabelli T M, Campos S V, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics (Sao Paulo)* 2015; 70 (7): 515-23 doi: 10.6061/clinics/2015(07)09.
 - 35.- Fryer J, Heath A, Minor P D, Collaborative Study Group. A collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus (HCMV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. WHO/BS/102138 2010. Geneva, Switzerland: World Health Organization. *Biologicals* 2016; 44 (4): 242-51. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.04.005.
 - 36.- Barkholt L M, Ehrnst A, Veress B. Clinical use of immunohistopathologic methods for the diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in human liver allograft biopsy specimens. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29 (6): 553-60. doi: 10.3109/00365529409092472.
 - 37.- Lautenschlager L, Halme K, Höckerstedt Krogerus L, Taskinen E. Cytomegalovirus infection of the liver transplant: virological, histological, immunological, and clinical observations. *Transpl Infect Dis* 2006; 8: 21-30. doi: 10.1111/j.1399-3062.2006.00122.x
 - 38.- Lamps L W, Pinson W, Raiford D, Shyr Y, Scott M A, Washington M K. The significance of microabscesses in liver transplant biopsies: a clinic pathological study. *Hepatology* 1998; 28 (6): 1532-7. doi: 10.1002/hep.510280613.
 - 39.- Colina F, Juca N T, Moreno E, Ballestin C, Farinía J, Nevado M, et al. Histological diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in liver allografts. *J Clin Pathol* 1995; 48: 351-7. doi: 10.1136/jcp.48.4.351.
 - 40.- Adeyi O, Fischer S E, Guindi M. Liver allograft pathology: approach to interpretation of needle biopsies with clinicopathological correlation. *J Clin Pathol* 2010; 63: 47-74. doi: 10.1136/jcp.2009.068254.
 - 41.- Esquivel C O, Jaffe R, Gordon R D, Iwatsuki S, Shaw B W Jr, Starzl T E. Liver rejection and its differentiation from other causes of graft dysfunction. *Semin Liver Dis* 1985; 5: 369-74. doi: 10.1055/s-2008-1040634.
 - 42.- Snover D C, Freese D K, Sharp H L, Bloomer J R, Najarian J S, Ascher N L. Liver allograft rejection: an analysis of the use of biopsy in determining the outcome of rejection. *Am J Surg Pathol* 1987; 11 (1): 1-10. Doi: 10.1097/0000478-198701000-00001.
 - 43.- Busuttill R W, Goldstein L I, Danovitch G M. Liver transplantation today. *Ann Intern Med* .1986; 104: 377-89. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-104-3-377>.

- 44.- Wang Y-C, Wu T-J, Wu T-H, Lee C-F, Chou H-S, Chan K-M, et al. The risk factors to predict acute rejection in liver transplantation. *Transplant Proc* 2012; 44: 526-8. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.01.041.
- 45.- García González M, Pera Madrazo C, Bernardos Rodríguez A, Gómez Gutiérrez M, Ignacio Herrero J, Mir Pallardó J, et al. An open, randomized, multicenter clinical trial of oral tacrolimus in liver allograft transplantation: a comparison of dual vs. triple drug therapy. *Liver Transpl* 2005; 11 (5): 515-24. doi: 10.1002/lt.20382.
- 46.- Doga N, Hüsing-Kabar A, Schmidt H H, Cicinnati VR, Beckebaum S, Kabar I. Acute allograft rejection in liver transplant recipients: Incidence, risk factors, treatment success, and impact on graft failure *J Intern Med Res* 2018; 46 (9): 3979-90. doi: 10.1177/0300060518785543.
- 47.- Preiksaitis J K, Hayden R T, Tong Y, Pang X L, Fryer J F, Heath A B, et al. Are we there yet? Impact of the first international standard for cytomegalovirus DNA on the harmonization of results reported on plasma samples. *Clin Infect Dis* 2016; 63 (5): 583-9. doi: 10.1093/cid/ciw370.