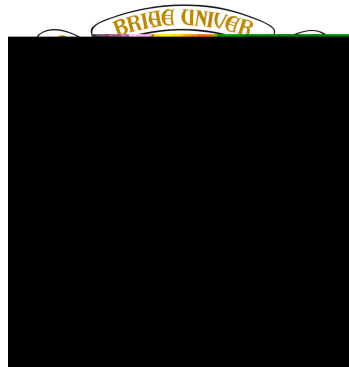


**ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL:
PAPEL DEL ANÁLISIS MOLECULAR
DE LOS VIRUS DE LA FAMILIA HERPES
SOBRE MATERIAL TISULAR**



Ainara Azueta Etxebarria

2014

Ante los retos del futuro hay tres tipos de personas:
Aquellos que lo hacen llegar,
aquellos que lo dejan llegar.
y aquellos que se preguntan cómo llegó.

A Javier...por todo.

A Estitxu, por trasmitirme su entusiasmo por la Anatomía Patológica.

A Giovanni, por su cariño, confianza y apoyo.

A todos mis amigos que creyeron en mí.

Por supuesto, a mi familia.

A Javier, porque sin él este trabajo no vería la luz.

A Pedro, por su paciencia, confianza, tiempo y el entusiasmo por sacarlo adelante.

A Ramón Díaz de Otazu, por su generosidad.

A todo el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, en especial al servicio de patología molecular: Servando Lazuén, Montse Nicolás, Montse Fernández, Estíbaliz Valdés, Saray Pereda y Javier Freire.

A Iñaki Zabalza, Chelo del Campo, Eduardo de Miguel y José Luis Cabriada del Hospital de Galdakao-Usansolo.

A Diana Rodríguez, Pilar García Arranz, Sònia Gatiús, Beatriz Martínez, Lidia Parra e Irene Esteve por su enorme generosidad y paciencia.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

AZA: Azatioprina.

CCR: Cáncer colorectal.

CMV: Citomegalovirus.

CU: Colitis ulcerosa.

DAB: Diaminobencidina.

EC: Enfermedad de Crohn.

EEUU: Estados Unidos.

ELL: Enfermedad inflamatoria intestinal.

Fe: Hierro.

H&E: Hematoxilina eosina.

Hb: Hemoglobina.

HHV6: Virus herpes humano tipo 6.

HHV7: Virus herpes humano tipo 7.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

IC: Intervalo de confianza.

Ig: Inmunoglobulina

IHQ: Inmunohistoquímica.

ISH: Hibridación in situ.

OR: Odds ratio.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

rtPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

RR: Riesgo relativo.

VEB: Virus Epstein Barr

VHS1: Virus herpes simple tipo 1.

VHS2: Virus herpes simple tipo 2.

VP: Valor predictivo.

VSG: Velocidad de sedimentación globular.

VZ: Virus Varicela Zoster.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La colitis ulcerosa (CU) y la Enfermedad de Crohn (EC) son enfermedades de etiología desconocida y numerosos factores han sido considerados responsables de la patogenia de la enfermedad.

La presencia de citomegalovirus (CMV) en la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un tema recurrente en los últimos 40 años en la bibliografía de la EII, planteándose la pregunta de si el CMV es causa primaria del deterioro del paciente o es consecuencia del tratamiento y/o inmunosupresión. Por otro lado, la presencia de amplificación viral detectada mediante métodos moleculares en tejido de virus ADN, que aparentemente no discrimina entre un estado latente o activo, es asimismo un asunto controvertido. Además desconocemos el papel que pueden jugar otros miembros de la familia Herpes humano en la EII.

Por tanto, antes de asignar al CMV o a cualquier otro virus un papel real como agente patógeno, debemos conocer la frecuencia con la que lo detectamos en el tejido de pacientes con EII, y si dicha detección se asocia a un peor comportamiento de la enfermedad.

OBJETIVOS

1. Evaluar la importancia pronóstica de la presencia de amplificación de virus de la familia Herpes en tejido en pacientes con EII.
2. Relacionar la presencia de amplificación viral en el tejido con el tratamiento recibido en pacientes con EII.
3. Objetivos secundarios
 - a. Evaluar la eficacia del tratamiento antiviral específico en pacientes con EII.
 - b. Definir características histológicas que permitan predecir la presencia de amplificación viral en el tejido de pacientes con EII.
 - c. Valorar las distintas técnicas diagnósticas y su valor predictivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron todos los pacientes diagnosticados de EII tanto de CU como de EC, en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander desde el

año 2005 hasta el 2010, de los que disponíamos al menos de una biopsia susceptible de ser analizada mediante métodos moleculares, correspondiendo a un total de 102 pacientes y 201 muestras.

Se revisaron las biopsias de manera ciega por dos patólogos para evaluación de lesiones morfológicas asociadas a infección viral y se realizó PCR semicuantitativa para virus de la familia herpes humano (Virus herpes simple tipos 1 y 2, Varicela zóster, Citomegalovirus, Virus de Epstein-Barr y Virus herpes tipo 6) con el ADN obtenido del tejido fijado en formol e incluido en parafina en cada una de las biopsias (201).

Se analizó el seguimiento clínico de cada paciente, de forma retrospectiva, en relación tanto al tratamiento farmacológico como quirúrgico recibido y la estancia hospitalaria en cada uno de los brotes de la enfermedad.

Además, en el caso de las biopsias positivas para CMV por PCR semicuantitativa se realizó inmunohistoquímica (IHQ), hibridación in situ cromogénica (CISH) y PCR cuantitativa a tiempo real frente a CMV.

Como control se realizó PCR semicuantitativa en 16 biopsias de mucosa de colon de pacientes sin EII a los que se realizó endoscopia y toma de biopsia por enfermedades no inflamatorias.

RESULTADOS

Las biopsias de los 16 pacientes sin EII resultaron ser negativas por PCR semicuantitativa para todos los tipos de virus de la familia herpes analizados. De las 201 biopsias de pacientes con EII 79 (39,3%) fueron negativas y 122 (60,6%) fueron positivas para algún virus de la familia *Herpesviridae*. El CMV apareció mediante técnicas moleculares de PCR en el 26,4% de todas las biopsias analizadas. Fue más frecuente encontrar amplificación viral en las biopsias de CU (65,2%) que en EC (38,2%), tanto la presencia de un único virus como de coamplificaciones de dos o de tres.

La mediana de tiempo de ingreso hospitalario para los pacientes sin presencia molecular de virus en las biopsias era de cero días (la mayoría no ingresaban y se trataba de biopsias realizadas de manera programada y sin complicaciones) mientras que para los pacientes con CMV fue de 16 días.

La media de días de estancia para los pacientes negativos en el análisis para virus fue de 7,12 días y para los pacientes con CMV fue de 20,26 días. El percentil 75 fue de 12,50 días para los pacientes sin virus y 34,50 días para los pacientes con CMV ($p < 0,05$).

De los 102 pacientes nueve fueron intervenidos quirúrgicamente mediante colectomía total. Observamos que los pacientes cuyas biopsias presentaban amplificación de CMV sufrían mayores porcentajes de colectomía (12,1%) en relación a los otros tipos de virus de la familia herpes (9,4%) y sobre todo en relación a los pacientes sin amplificación viral (5,4%). De las nueve colectomías totales cuatro resultaron positivas para CMV por pruebas moleculares en el tejido resecado. No son datos estadísticamente significativos probablemente debido a la escasez de pacientes en ambos grupos.

Al relacionar las biopsias con positividad para CMV por PCR con el tratamiento recibido para su EII, observamos que de las 52 biopsias evaluables con positividad para CMV un 46,15% correspondían a episodios asociados a tratamiento con azatioprina, es decir, aquéllos pacientes que tomaban azatioprina tenían mayor presencia de positividad molecular para CMV en sus biopsias. Además existían diferencias si comparábamos el grupo que tomaba azatioprina (35,8%) respecto al que tomaba fármacos anti-TNF (16,7%). Este dato no era estadísticamente significativo ($p > 0,05$) probablemente debido al escaso número de pacientes analizados ($n=20$). Por otro lado, la mayoría de los casos asociados a HHV6 estaban relacionados asimismo con la toma de azatioprina (47,05%).

La PCR cuantitativa a tiempo real demostró una tasa de positividad menor que la PCR semicuantitativa, sin que existieran diferencias en el análisis de curvas COR entre ambas técnicas en cuanto a predicción de un peor comportamiento clínico.

El análisis morfológico reveló que el porcentaje de células en apoptosis en las biopsias positivas para VEB por PCR fue del 67,5% frente a las biopsias negativas para el mismo que fue del 33,6% ($p < 0,05$). El porcentaje de células en apoptosis en las biopsias con presencia de CMV por PCR fue mucho mayor (71,4%) que en la encontrada en las biopsias sin CMV (39,1%) ($p < 0,05$). No existieron diferencias entre la aparición de vasculitis y apoptosis al agrupar a los pacientes por tipo de

tratamiento recibido con lo que las diferencias observadas podrían corresponder a la presencia de amplificación viral.

Sólo una de las biopsias mostró inclusiones clásicas de CMV, demostradas a su vez por IHQ.

CONCLUSIONES

1. No hemos encontrado amplificación para ningún virus mediante pruebas moleculares en muestras de tejido intestinal de pacientes sin EII y sí en un 60,6% de pacientes con EII.
2. El CMV presentó amplificación en la PCR semicuantitativa en el 26,4% de las biopsias. Fue más frecuente encontrar amplificación viral en las biopsias de CU (65,2%) que en EC (38,2%).
3. Existió una tendencia no significativa estadísticamente a que el tiempo de estancia hospitalaria fuera mayor en los pacientes con presencia de ADN de CMV detectada por PCR semicuantitativa.
4. El porcentaje de pacientes que precisó tratamiento quirúrgico en forma de colectomía, en los enfermos con positividad para el CMV en algún momento de su evolución fue del 12% frente al 5,4% de los pacientes que no mostraron amplificación para ningún tipo viral.
5. Los pacientes en tratamiento con azatioprina tuvieron mayor tendencia a presentar amplificación de CMV en sus biopsias. Sin embargo, los pacientes que incorporaron anti-TNF mostraron una menor proporción de biopsias con positividad para CMV.
6. El tratamiento antiviral con valganciclovir en los casos en los que éste se practicó no disminuyó los niveles de absorbancia del CMV de forma significativamente diferente a los pacientes que no recibieron tratamiento.
7. Las biopsias con positividad molecular para CMV y VEB mostraron mayores índices de apoptosis frente a las biopsias negativas para virus por PCR semicuantitativa.
8. Las técnicas de inmunohistoquímica e ISH no resultaron de utilidad al no detectar más que un caso de positividad para CMV.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	19
1.1 Epidemiología y factores de riesgo	22
1.1.1 Epidemiología descriptiva	22
1.1.2 Factores extrínsecos	24
1.1.3 Factores de riesgo	27
1.2 Colitis ulcerosa	28
1.2.1 Características clínicas	28
1.2.2 Características patológicas	28
1.3 Enfermedad de Crohn	31
1.3.1 Características clínicas	31
1.3.2 Características patológicas	32
1.4 Diagnóstico diferencial de EC y CU	34
1.5 Tratamiento	35
1.5.1 Medidas generales	36
1.5.2 Medidas nutricionales	36
1.5.3 Tratamiento farmacológico	38
1.5.4 Indicaciones quirúrgicas generales de la EC	40
1.6 Virus de la familia Herpes	41
1.6.1 Citomegalovirus	42
1.6.2 HHV6 y HHV7	42
1.6.3 Virus de Epstein Barr	43
1.6.4 VHS1 y VHS2	43
1.7 El citomegalovirus en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal	44
1.7.1 Diagnóstico de la infección de CMV y enfermedad	45
1.7.2 Infección por CMV	45
1.7.3 Colitis por CMV	46
1.7.4 Significado de la enfermedad por CMV en pacientes con EII	48
1.7.5 Frecuencia de detección de CMV en colon en pacientes con EII	49
1.7.6 ¿La detección de CMV está asociada a un pronóstico peor?	50
1.7.7 ¿El tratamiento antiviral mejora el pronóstico de los pacientes con CMV+?	51

2. OBJETIVOS	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1 Pacientes	59
3.2 Muestras	59
3.3 Diagnóstico de las biopsias: Ell, CU, Crohn o inflamación inespecífica	60
3.4 Técnicas de Inmunohistoquímica de CMV	61
3.5 Detección de virus de la familia herpes mediante técnicas de PCR	61
3.6 Detección de virus de la familia herpes mediante técnicas de hibridación in situ	70
3.7 Observación sobre tejido de datos histológicos sospechosos de infección por virus y tipo de virus de la familia herpes: apoptosis, vasculitis (estigmas de infección)	71
3.8 Recogida de datos serológicos	72
3.9 Recogida de otros datos	72
3.10 Seguimiento de los tratamientos de cada paciente en relación a cada biopsia	73
3.11 Revisión de la historia clínica de cada paciente para nuevos datos	73
3.12 Número de episodios de ingreso de cada paciente y el número de días de estancia hospitalaria	73
3.13 Procesamiento de los datos y análisis estadístico	74
3.14 Realización de tabla excell con todos los datos arriba mencionados	74
4. RESULTADOS	75
4.1 Objetivos principales	77
4.2 Objetivos secundarios	94
5. DISCUSIÓN	105
5.1 Objetivos principales	107
5.2 Objetivos secundarios	119
6. CONCLUSIONES	127
7. A TENER EN CUENTA	131
8. OTROS HALLAZGOS	135
9. BIBLIOGRAFÍA	139
10. ANEXOS	157

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad inflamatoria intestinal agrupa a un grupo de enfermedades que cursan con inflamación del tubo digestivo pero, en la práctica clínica, se hace referencia a la colitis ulcerosa, a la enfermedad de Crohn y a la colitis indeterminada.

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son enfermedades de etiología desconocida y numerosos factores han sido considerados responsables de la patogenia de la enfermedad: inmunológicos (Stange, 2008 y Baumgart, 2007), dietéticos (Bianchi, 2007), vasculares (Hawthorne, 1992) y virales (Meuwissen, 2000 y Stack, 1999). En resumen, se supone que un factor iniciador, como un antígeno microbiano, provocaría en la mucosa del tubo digestivo una respuesta inflamatoria prolongada, grave y de forma inapropiada en individuos predispuestos de forma genética (Hugot, 2001 y Ogura, 2001). Esta respuesta sería amplificada perpetuándose en el tiempo y confiriendo a ambas entidades un carácter crónico.

En el curso clínico de la enfermedad inflamatoria intestinal, existe la alternancia de periodos de actividad, de variable gravedad, denominados recidivas o brotes, con periodos de quiescencia o inactividad, llamados fases de remisión. Se define recurrencia como la reaparición de nueva enfermedad macroscópica después de una resección quirúrgica “curativa”.

Una de las respuestas más frecuentes tras someter a los pacientes a cuestionarios sobre calidad de vida es el hecho de tener una enfermedad de causa desconocida y curso impredecible, así como la frustración ante su naturaleza crónica. El concepto de cronicidad está también asociado a la tasa de refractariedad al tratamiento médico, la posibilidad de progresión en su extensión anatómica y en la alta tasa de recidiva postquirúrgica.

Aproximadamente la mitad de los pacientes presentan episodios de recidiva cada año. Aunque los principios y bases generales del tratamiento farmacológico son similares, su tratamiento quirúrgico difiere en cada una de las enfermedades. Sólo un 5-10% de pacientes con colitis ulcerosa precisan colectomía, en cambio, el 50% de pacientes con enfermedad de Crohn son operados durante los primeros diez años del curso de su enfermedad. La proctocolectomía en la colitis ulcerosa es curativa pero conlleva una morbilidad (30%) y discapacidad considerables. La

cirugía de la enfermedad de Crohn no es curativa, la recidiva o la reaparición de síntomas clínicos es del 40% a los cuatro años de la resección quirúrgica y la recurrencia anatómica (endoscópica o radiológica) a los cuatro años es del 90%. También es distinta la incidencia del cáncer de colon en la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

Los datos anteriormente citados demuestran la importancia del diagnóstico diferencial entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, y los criterios utilizados para su diagnóstico se basan fundamentalmente en sus distintas características endoscópicas, radiológicas e histológicas (Lennard-Jones, 1989).

1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA DESCRIPTIVA

- Incidencia y prevalencia

Las tasas de incidencia de la EI han sufrido un notable incremento en todos los países más desarrollados, estabilizándose desde los años 80, entre 10-15 casos/1000.000/ año (Maté, 1994) y la alta incidencia en países del norte de Europa en relación a los países meridionales.

- Edad

La edad en el momento del diagnóstico y la edad del primer síntoma, son ambas reproductibles y relevantes en relación a la evolución de esta enfermedad. Por consenso de la reunión de Viena 1998 (Gasche, 2000), se utiliza sólo la edad al diagnóstico y se subdividen los grupos de edad en ≥ 40 años y < 40 años. Los grupos de trabajo que han repetido el mismo estudio epidemiológico en diferentes periodos de tiempo, como el de Ruiz Ochoa, 1998, observan un adelanto de la edad del diagnóstico, sin especificar si también se relaciona con adelanto de la edad del primer síntoma. Como refiere Maté esta anticipación en la edad del diagnóstico, sólo es significativa para la EC (Maté, 1994).

- Sexo

En la bibliografía se refiere que en zonas de alta incidencia la CU es más frecuente en varones y la EC es más frecuente en mujeres, presentando una relación inversa en países de baja incidencia (Gower Rousseau, 1994). La distribución de la incidencia por sexos es mayor entre los varones en el estudio de Brullet, 1998 y similar al estudio Europeo de Shivanda, 1996. En nuestra área Saro, 1999 y Saro, 2001, no han encontrado diferencias significativas en la distribución por sexos, incluso en la comparación por grupos de edad.

- EII y cáncer colorrectal

Se acepta que el riesgo de padecer cáncer colorrectal (CCR) a lo largo de la evolución en la CU es más elevado que en la población general. En las diferentes publicaciones, el riesgo acumulado de cáncer oscila entre el 8-43%, durante un tiempo de seguimiento de 25-35 años. Este riesgo es muy superior al de la población general. El riesgo aumenta a medida que aumentan los años de evolución de la enfermedad (aparece después de los 8-10 años y se incrementa de 0,5 a 1,0%/año), a mayor extensión y mayor número de episodios de actividad de la misma. Sin embargo, en los más recientes estudios, parece que este riesgo ha disminuido, y esta disminución se atribuye al uso de antiinflamatorios en el tratamiento de la CU, como hipótesis más aceptada. Un estudio realizado en nuestro país (Saro, 1999), sugiere que la frecuencia de CCR a lo largo de la evolución en la EII es más elevado que entre la población general, sin diferencias entre la CU y la EC.

- Raza y área geográfica

La variación de la incidencia de la EII en las distintas áreas geográficas ha llevado a realizar numerosos estudios de investigación para descubrir sus causas. Para unos se debe a causas ambientales y para otros causas genético-étnicas. Se han descrito dos etnias con comportamiento antagónico: la raza negra con una incidencia mínima (Mayberry, 1984) y la raza judía con elevada incidencia. Estudios epidemiológicos realizados en diversos países, encontraron que el riesgo de EII en la población judía inmigrante, estaba aumentada 3-4 veces en relación con la población nativa. Posteriores trabajos en Israel, demostraron que la incidencia en los judíos nacidos en Europa o en los EEUU era el doble que los nacidos en Asia,

África o Israel. Estos hallazgos fueron interpretados como una mayor predisposición en la etnia judía Ashkenazi, posiblemente genética, a padecer EII y a un marcado efecto de los factores ambientales (Gilat, 1986).

- Agregación familiar

Los estudios de agregación familiar indican alta incidencia de familiares con la EII. El riesgo para familiares consanguíneos es 30 veces mayor (entre el 15 y 50%). Entre el 10-20% de los enfermos tiene antecedentes de EII entre sus familiares. Estas cifras son muy variables dependiendo del país investigado, con las cifras más bajas en Italia (2%) y las más altas entre los judíos Ashkenazi de Pensilvania (incluyendo los emigrados) y no así entre los judíos de Israel. Por ello, se admite que la historia familiar de EII es el factor de riesgo conocido más importante.

- Factores genéticos

De los diferentes estudios étnicos y familiares, y más recientemente, de las investigaciones de biología molecular en el hombre y en el animal de experimentación, se ha inferido la existencia de un origen genético o al menos una predisposición hereditaria, para desarrollar este grupo de enfermedades. El sistema a través del cual la EII parece ser hereditaria, continúa siendo desconocido, aunque se describe como una herencia no mendeliana. La estrategia de investigación genética se encamina a estudiar zonas coincidentes en los cromosomas de familiares afectos (así se han identificado los cromosomas 12 y 16) y estudio de los genes implicados en la regulación de la inflamación (HLA, TNF, etc.). Los resultados de los diferentes estudios con estos marcadores son heterogéneos y presentan gran variabilidad en los distintos grupos poblacionales, por lo que no parece que puedan extraerse, de momento, resultados concluyentes (Kobayashi, 1990 y Toyoda, 1993).

1.1.2. FACTORES EXTRÍNSECOS

- Ámbito poblacional

Clásicamente, la CU y la EC son enfermedades asociadas a niveles socioculturales elevados y áreas urbanas e industrializadas. No hay estudios actualizados si esta situación está influenciada por factores ambientales que

coinciden en estas áreas, o más bien tienen relación con un mayor nivel económico-cultural.

- Tabaco

Se ha especulado mucho sobre el hábito de fumar y la EII. Su efecto parece estar ligado a la nicotina. Las primeras observaciones que relacionan el uso del tabaco y la EII, se descubren al constatar que la CU es más frecuente en la población de no fumadores (Harries, 1982). Posteriores estudios caso-control confirman estos hallazgos, encontrando en los fumadores un riesgo relativo (RR) de 0,26 para padecer CU en contraposición con un RR de 3,5 para la EC (Logan, 1986). Lindberg encontró un RR de 1 en los no fumadores, de 0,6 en fumadores y de 2,5 en exfumadores, alcanzando un RR de 4,4 en los fumadores de más de 11 cigarrillos/día (Lindberg, 1988). Otros autores escriben como efecto beneficioso para la CU (Calkins, 1989). A la vista de estos datos, parece probado que el dejar de fumar puede desencadenar un primer brote de CU, que el tabaco tiene un efecto protector para la CU activa y posiblemente para el mantenimiento de la remisión. En los niños expuestos al humo de tabaco, parece haber un efecto de protección según otros autores (Sandler, 1992). Sin embargo, los estudios terapéuticos con nicotina, vía oral o en parches, no han aportado los resultados beneficiosos esperados. Se desconoce el papel que juega la ansiedad del fumador.

En la EC, el tabaco es el mayor factor de riesgo extrínseco conocido, aumentando la frecuencia por lo menos al doble, en relación con los no fumadores y hasta cinco veces más en las mujeres fumadoras (Rhodes, 1994). Para la EC, el hábito de fumar provoca un efecto prejudicial tanto en el desarrollo de la enfermedad como en su evolución, marcando un peor pronóstico en esta enfermedad (Spanish Group, 1999).

- Anticonceptivos orales

El uso de anticonceptivos orales como factor predictivo es más controvertido. En el estudio prospectivo, randomizado y controlado de Timer, 1998, se asocia con un incremento del riesgo de recidiva en los pacientes con EC. Por el contrario, el estudio de Cosnes, 1998 se concluye que el uso de contraceptivos orales no tiene efecto en el grado de actividad de la EC y en el meta-análisis de Godet, 1995, que

analiza 15 estudios, concluye que el uso de anticonceptivos se asocia con muy discreto riesgo de desarrollar tanto EC como CU.

En el estudio caso-control randomizado de Boyco, 1994, que empareja los casos por edades, evalúan los efectos del uso de anticonceptivos orales en CU y el riesgo en la EC, el riesgo de CU tiende a ser más alto entre los consumidores de estrógenos a dosis altas, mientras que el riesgo para la EC fue independiente de la dosis de estrógenos.

- Antiinflamatorios no esteroideos

En diferentes publicaciones como la de Davies, 1995, se ha sugerido un papel inductor de EII asociado al consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINES). Igualmente, se ha asociado con la recidiva de EII.

- Dieta

Se ha intentado implicar diversos tipos de alimentación en la patogenia de la enfermedad, sugiriendo que las poblaciones que consumen más hidratos de carbono refinados y “comidas rápidas” tienen mayor riesgo de padecer EC, mientras que la alimentación rica en fibra tiene un efecto protector (Persson, 1993). También se ha relacionado el reciclaje de aceite y el uso de diferentes tipos de aceites implicados en la cadena del ácido araquidónico, como posibles causantes de la CU (Chuanh, 1992). Otros autores tras sus investigaciones, más bien concluyen en la dificultad de relacionar tipos de comida rápida con este grupo de enfermedades y valoran la posibilidad de que estén influyendo otros factores desconocidos de la “vida moderna” (Russel, 1998). De momento, ninguno de los estudios es concluyente.

- Infecciones infantiles y perinatales

El papel de diferentes agentes infecciosos de la etiología de la EII está sujeto a controversia, sugiriéndose que su efecto sería de activador del proceso de base (Mayberry, 1984). *Mycobacterium paratuberculosis*, *citomegalovirus*, RNA virus, rotavirus han sido los agentes más discutidos.

En el estudio de Wurzelmann, 1994, diseñado para valorar la relación de las enfermedades infecciosas durante la infancia y más específicamente la faringitis, concluyen que la EC se asocia con infecciones en la infancia, así como faringitis,

uso excesivo de antibióticos y amigdalectomía (que implica amigdalitis de repetición). La lactancia materna parece ofrecer una protección para padecer EII, estimulando el crecimiento y desarrollo de la mucosa intestinal y elevando los niveles de IgA. Parece que los procesos inflamatorios-infecciosos perinatales favorecen la aparición posterior de EII. La CU también se asocia con infecciones en general.

- Apendicectomía y amigdalectomía

El grupo de Rutgeers, 1994, investigando entre los antecedentes de los pacientes con CU con el hábito de recoger hábitos dietéticos, encuentra muy pocos apendicetomizados. En base a este dato, inician un estudio caso control en el que sólo aparece un caso previamente apendicetomizado entre los 174 pacientes con CU (0,6%) frente a 25 (4%) en los controles. Esta diferencia resulta estadísticamente significativa, lo que les hace concluir que la apendicetomía sería un factor protector en el caso de la CU. Posteriores estudios llegan a conclusiones similares, pensando que el apéndice puede representar un factor de riesgo en la CU debido a su papel en el sistema inmunológico intestinal (Russel, 1997 y Logan, 1995). En la CU se presentan menos episodios de apendicitis que en los controles, mientras que en la EC no existe diferencia (Smithson, 1995), por lo que Russel, 1998, en su amplio estudio caso-control, demuestra que las apendicetomías previas, en esta enfermedad, probablemente se debían a un falso diagnóstico de apendicitis en una EC no diagnosticada.

Pensando que la amigdalectomía, al igual que la apendicetomía, supone una extirpación de un órgano del sistema linfóide intestinal, se investigó su posible relación con EII. Los resultados no son concluyentes, aunque se describe que la amigdalectomía modifica favorablemente el curso de la EC (menos recidivas), menos extensión y menos gravedad (Logan, 1995; Smithson, 1995 y Pérez-Miranda, 1994).

1.1.3. FACTORES DE RIESGO

Numerosos estudios epidemiológicos, han buscado factores intrínsecos y ambientales que se correlacionen con la aparición de EII en grupos de población. Algunos de estos factores se han definido, por su alta asociación, como grupos de

riesgo de padecer enfermedad, muchos de los cuales no están avalados por estudios que demuestren fuerte evidencia, precisándose por tanto nuevos trabajos con una metodología uniforme, multicéntricos que abarquen a un conjunto de población suficiente. Se consideran factores de riesgo aceptados: antecedentes familiares de EC o CU, asociación con espondilitis anquilopoyética HLA B27+, y como ya he comentado previamente el hábito de fumar para la EC, infecciones perinatales y el uso de anticonceptivos orales en la CU. El papel protector de la apendicectomía en la CU no es concluyente y en la EC se precisan más estudios para determinar predicción positiva. Otros factores como alto nivel de higiene, dieta con grasas recicladas, dietas con azúcares refinados y dietas pobres en fibra, no han podido demostrar una asociación evidente.

1.2. COLITIS ULCEROSA

1.2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La CU es una enfermedad crónica con brotes que tiene predilección por adolescentes y adultos jóvenes, aunque con un segundo pico entre los hombres de mediana edad. La incidencia anual de la CU en el Norte de América y Europa se sitúa entre el 4-20 por 100.000 individuos (Fiocchi, 1998). La incidencia de CU parece haberse establecido en las dos últimas décadas y parece no aumentar, a diferencia de la EC. De hecho, se ha estimado que aproximadamente el 1% de la población de los Estados Unidos y Europea desarrollarán CU.

1.2.2 CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS

En términos generales, la CU envuelve el recto y contiguamente el colon. Aunque algunos casos sólo afectan al recto (proctitis), otros afectan a todo el colon (pancolitis). La mucosa a menudo tiene un aspecto hemorrágico o granular, y el aspecto macroscópico depende en parte de la actividad de la enfermedad.

- Inflamación

La CU es un proceso predominantemente linfoplasmocitario. Esta inflamación linfoplasmocitaria, densa y homogénea se expande y engruesa la lámina propia y produce una superficie irregular (Le Berre, 1998 y Schumacher, 1993). Todas las

biopsias de la misma área colorrectal tienen una apariencia similar, una densidad uniforme de inflamación linfoplasmocitaria. La densidad de la células plasmáticas es mayor en la región basal de la lámina propia (plasmocitosis basal).

Los neutrófilos pueden estar en la lámina propia o pueden acusar daño activo de las criptas (criptitis) o formar abscesos de criptas. La ruptura de criptas puede producir agregados de histiocitos y escasas células gigantes, formando granulomas. Estos no deben hacernos confundir con los granulomas de la enfermedad de Crohn.

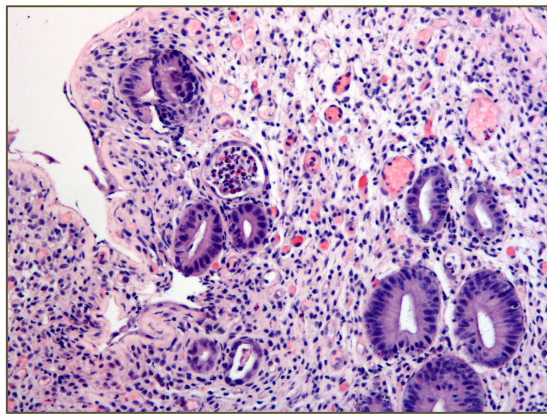


Fig. 1. Colitis Ulcerosa activa.

- Daño de las criptas y distorsión arquitectural

El signo histológico de la CU es la distorsión arquitectural de las criptas, caracterizado por distribución irregular, criptas ramificadas y acortamiento focal de las criptas (Ridell, 1975). Estas dos últimas son manifestaciones morfológicas de la regeneración de criptas. La mayoría de pacientes con CU tienen varias semanas de mínimos síntomas en las cuales la lámina propia está inflamada, numerosas células plasmáticas están concentradas en la lámina propia y se produce daño importante de las criptas con regeneración. Generalmente, se considera la distorsión arquitectural el criterio necesario para el diagnóstico de colitis crónica.

- Distribución de la enfermedad

Histológicamente, el recto es anormal en la mayoría de los casos con distorsión arquitectural de las criptas y actividad moderada (Markowitz, 1993). La CU limitada al recto se denomina proctitis ulcerosa. Se cree que esta enfermedad es menos severa y que tiene menores tasa de displasia y adenocarcinoma que las pancolitis

ulcerosas (Meucci, 2000 y Toyoda, 2000). Histológicamente, la proctitis ulcerosa es idéntica a la CU típica.

- Fase de resolución

La mayoría de los pacientes entran en fase de resolución con disminución de la actividad y la sintomatología tras un episodio de colitis activa; esta fase morfológicamente se caracteriza por disminución de la actividad y del daño de las criptas con regeneración de criptas seguida de reestructuración de criptas. Los neutrófilos y el daño de criptas acompañante disminuye y produce un aspecto parcheado. Los linfocitos y células plasmáticas persisten y son los últimos en abandonar la mucosa. La mucina aparece poco a poco, primero en células cuboidales y después en las células caliciformes. Pasado un tiempo, las células caliciformes pueden ser numerosas. La ramificación de criptas y el acortamiento focal son generalmente prominentes durante la fase temprana de resolución. Las células de Paneth metaplásicas aparecen en las bases de las criptas regeneradas desde la mucosa distal hasta la flexura hepática. Por ello, junto con la distorsión arquitectural de criptas y las plasmocitosis basal, la metaplasia de células de Paneth puede emplearse como marcador morfológico de lesión previa significativa de criptas (colitis crónica). Algunos pacientes desarrollan folículos linfoides prominentes que son más numerosos en el colon distal y recto, proctitis folicular (Flejou, 1988 y Bogomeletz, 1991). La proctitis folicular parece identificar un subgrupo de pacientes con un pronóstico menos favorable a tratamiento médico (Flejou, 1988).

- Colitis ulcerosa crónica

El periodo de resolución de la disminución de la actividad dura desde varios meses en la mayoría de los pacientes y cambian de forma imperceptible a la forma crónica de la enfermedad.

La distorsión arquitectural de las criptas marca una colitis activa previa. La velocidad a la que esto ocurre varía. Pacientes con moderada colitis activa de corta duración poseen una arquitectura normal de la mucosa meses después del episodio. El paso de la remodelación de las criptas es lento en la mayoría de los pacientes; este remodelado puede ocurrir en años o décadas. Además, estos pacientes pueden sufrir episodios activos de colitis o persistentes que enlentecen el remodelado. Algunos pacientes no tienen una completa remisión de la enfermedad y

poseen una colitis crónica mínimamente activa. La mayoría de estos pacientes reciben tratamiento médico. La morfología es generalmente una colitis parcheada con regiones de actividad separadas por áreas de inactividad.

1.3 ENFERMEDAD DE CROHN

1.3.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La EC fue descrita hace más de tres siglos, pero Crohn, Ginzberg y Oppenheimer son los que hicieron una descripción moderna de la EC en 1932 (Crohn, 1932). La EC puede afectar a cualquier porción del tracto gastrointestinal superior o inferior. Aproximadamente el 30-40% de los pacientes tienen sólo afectación del intestino delgado, el 30-40% tienen afectación del íleo-colon y solamente el 10-20% tienen afectación exclusiva del colon. La EC puede ser clasificada por su comportamiento clínico/patrón de la enfermedad que incluye inflamación, fístula o enfermedad fibroestenotante. El patrón de la enfermedad determina el signo, síntomas y complicaciones.

La mayoría de los pacientes con EC lo presentan entre la segunda y cuarta década de la vida, aunque hay un pequeño pico entre la quinta y séptima década de la vida. Aunque la EC puede afectar a todas las razas, la EC es claramente más prevalente entre los blancos Norteamericanos, los del Norte de Europa, los Ashkenazis judíos, los escandinavos y los galeses.

La causa de EC es desconocida pero parece que se debe a un conjunto de factores ambientales, anormalidades en la regulación inmune y la predisposición genética. Al contrario que los enfermos de CU, el tabaco es un factor de riesgo independiente para la clínica, la cirugía y las recurrencias endoscópicas; también influye la actividad de la enfermedad después de la cirugía (Fiocchi, 1984 y Somerville, 1984). Las dietas también pueden jugar un papel importante; las deficiencias de Zinc están asociadas con disfunciones inmunológicas en pacientes con EC, y algunos datos sugieren que la dieta elemental puede mejorar la EC reduciendo la permeabilidad intestinal (Teahon, 1991).

También se ha propuesto para la EC una causa infecciosa, y aunque métodos tradicionales han fracasado para detectar un patógeno específico, técnicas moleculares han detectado *Mycobacterium paratuberculosis* en el tejido de algunos pacientes con EC (Lamps, 2003).

Los factores genéticos son claramente importantes en la predisposición de los individuos a la EC. Los estudios han encontrado un riesgo mayor y una mayor tasa de concordancia de gemelos monocigotos comparado a gemelos dicigóticos (Orholm, 1991 y Tysk, 1988). Aunque los resultados no son constantes y varía con la población estudiada, numerosos estudios han encontrado tanto asociación positiva como negativa entre antígeno HLA y el desarrollo de la EC (Toyoda, 1993 y Nakajima, 1995). Más recientemente, polimorfismos en NOD2 (CARD15), un gen aislado en el cromosoma 16, ha sido asociado con susceptibilidad con EC (Hugot, 1996; Ohmen, 1996; Brant, 1998), en particular en aquellos con comienzo temprano de la enfermedad y enfermedad severa (Brant, 2000).

1.3.2 CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS

En el examen macroscópico, las piezas de colectomía de EC muestran escasa afectación del recto con enfermedad segmentaria con extensión variable de la mucosa y pared del colon. Las úlceras están presentes a menudo con áreas edematosas con áreas de mucosa normal histológicamente entre ellas, lo que le da un aspecto de mucosa en empedrado. Se pueden observar fisuras, tractos fistulosos y abscesos murales o pericolónicos.

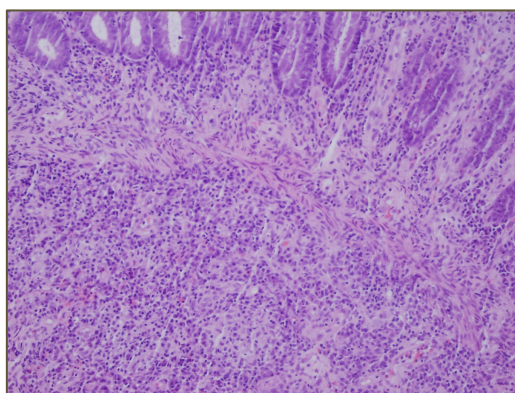


Fig. 2. Enfermedad de Crohn.

Histológicamente, como se aprecia en el análisis macroscópico, la EC muestra áreas segmentarias de colitis separadas de áreas de colon intactas. Por lo que a menudo hace su diagnóstico difícil, ya que se observan alteraciones no específicas en estos segmentos.

- Inflamación

La EC puede presentar un proceso mixto, o puede estar compuesto predominantemente de linfocitos y células plasmáticas, neutrófilos o granulomas.

- Linfocitos y células plasmáticas

La heterogenidad en la densidad y distribución de la inflamación linfoplasmocitaria es un dato morfológico clave en la EC. La mucosa adyacente a esta inflamación puede ser normal y a veces están separados por áreas de mucosa edematosa.

- Neutrófilos

Los neutrófilos en la EC son focales y poco uniformes. Pueden estar mezclados con la inflamación linfoplasmocitaria o ser, por otra parte, la célula predominante en la mucosa normal. En este último caso, se sitúan en la lámina propia basal, alrededor de las criptas.

- Granulomas

Hay dos tipos de granulomas en la EC. Pequeñas agrupaciones de histiocitos ordenados alrededor de las criptas, llamados microgranulomas pericriptales (Rotterdam, 1977). En la EC típica, los granulomas de alrededor de las criptas están mezcladas con la inflamación linfoplasmocitaria y escasos neutrófilos. Con seriaciones seguidas de este proceso inflamatorio podemos encontrar estos microgranulomas pericriptales (Surawicz, 1981; Kuramoto, 1987; Petri, 1982). Estos microgranulomas deben de ser distinguidos de los granulomas de mucina que se forman al lado de las criptas rotas. Estos granulomas de mucina no tienen importancia diagnóstica ya que pueden ser visto en CU y otras colitis. Los granulomas asociados a la EC son más pequeños y tienen bordes bien afilados que los granulomas de mucina.

Los granulomas necrotizantes, bien formados, se sitúan habitualmente en la submucosa pero ocasionalmente se pueden ver en la mucosa.

- Úlceras y lesión en las criptas

De forma típica, una o varias criptas lesionadas e inflamadas con depleción focal de mucina están situadas adyacentes a criptas normales. Las criptas lesionadas están focalmente infiltradas por neutrófilos, y la depleción de mucina está limitada a las células epiteliales justo al lado de la lesión de la cripta.

- Distorsión y desorden arquitectural de las criptas

Áreas de la lámina propia con inflamación, edema, úlceras aftosas, y daño focal de las criptas produce una distribución irregular de las criptas en la lámina propia. La lesión de criptas a lo largo del tiempo puede producir ramificación de las criptas y acortamiento de las mismas, y esta distorsión arquitectural es un indicativo de cronicidad. Al igual que la CU, la EC sólo debe de diagnosticarse de EC crónica cuando se observa metaplasia y distorsión arquitectural.

1.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE EC Y CU

A continuación (tabla 1) se detallan las diferencias diagnosticas histológicas entre la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

TABLA 1. DIFERENCIAS MICROSCÓPICAS ENTRE LA CU Y EC

Colitis ulcerosa	Enfermedad de Crohn
Enfermedad difusa	Enfermedad segmentaria
Afecta al recto	Afectación rectal variable
Empeoramiento distal	Severidad variable
No fisuras	Fisuras y trayectos fistulosos
No agregados transmurales	Agregados transmurales
No afecta al ileon	Afectación tracto gastrointestinal superior
Menos granulomas	Granulomas

1.5 TRATAMIENTO

La evaluación clínica y analítica nos permite valorar la gravedad del brote de actividad y, por tanto, decidir sobre la necesidad de ingreso hospitalario y el tratamiento a instaurar.

Valoración clínica: anamnesis detallada acerca de la sintomatología; número, aspecto y consistencia de las deposiciones, existencia de clínica rectal (tenesmo, urgencia, esputo rectal), existencia y características del dolor abdominal, síntomas sistémicos (fiebre, astenia, anorexia, pérdida de peso, aparición de manifestaciones extraintestinales).

La exploración física: debe incluir siempre constantes vitales, inspección general (especial atención a piel y articulaciones), palpación abdominal (signos de peritonismo, masas), auscultación cardiorrespiratoria y abdominal y tacto rectal e inspección de la región perianal.

Valoración analítica: será suficiente un hemograma con fórmula leucocitaria, ionograma, albúmina sérica y reactantes de fase aguda (fundamentalmente proteína C reactiva, si bien la VSG, es necesaria para el cálculo de alguno de los índices de actividad).

Consideraciones generales sobre exploraciones complementarias:

Estudios microbiológicos: es aconsejable la realización de coprocultivos y, especialmente, determinación de toxina de *C. difficile* en heces (independientemente de que haya recibido tratamiento antibiótico) en los pacientes que presentan brotes graves o brotes de actividad de la EII con evolución tórpida. La determinación de parásitos en heces en nuestro medio únicamente debe realizarse en el debut de la EII.

Rx abdomen simple: debe realizarse en todo paciente con EII que ingrese por brote de actividad o complicaciones relacionadas. En el caso de EII en brote grave con afectación extensa de colon, se aconseja su realización cada 24-48 horas.

Rx tórax: debe disponerse de ella como previsión de un potencial tratamiento con agentes anti-TNF.

Colonoscopia: contraindicada en brotes graves de enfermedad cólica (riesgo de megacolon/perforación). La realización de rectosigmoidoscopia con biopsias puede ser útil para descartar sobreinfección por CMV en los casos de CU. EnteroRM, enteroTC: no existen contraindicaciones específicas. En caso de obstrucción intestinal no debe administrarse contraste oral.

Tránsito intestinal: contraindicado ante sospecha de estenosis cólica, dado el riesgo de impactación del contraste baritado.

1.5.1 MEDIDAS GENERALES

Anticoagulación profiláctica: la elevada incidencia y mortalidad asociada de enfermedad tromboembólica en los pacientes con EII en brote de actividad, justifica el empleo de anticoagulación profiláctica al menos en brotes graves o brotes leve-moderados asociados a otros factores de riesgo para trombosis venosa (inmovilización, obesidad,...).

Antibioterapia: indicada en caso de infecciones intestinales (*Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium difficile*...). Como la propia afectación intestinal, puede actuar como origen de sepsis, y aunque la propia EII puede cursar con fiebre, se aconseja cobertura antibiótica de bacilos gram negativos y gérmenes anaerobios en caso de brote de actividad con fiebre y hemograma séptico sin otra focalidad infecciosa. La antibioterapia no aumenta la eficacia del tratamiento específico de la EII.

1.5.2 MEDIDAS NUTRICIONALES

La EII comporta un aumento del catabolismo y de las pérdidas proteicas, así como, en ocasiones, anorexia o malabsorción intestinal. Todo ello se traduce en un aumento de los requerimientos energéticos y una elevada incidencia de malnutrición energético-proteica, más acentuada en pacientes hospitalizados y especialmente en la enfermedad de Crohn. Por esta razón, debe valorarse el soporte nutricional en todo paciente con EII activa. Es imprescindible la valoración del estado nutricional (albúmina sérica, parámetros antropométricos). En caso de que no exista malnutrición, podremos optar por dieta oral convencional, nutrición enteral o parenteral, dependiendo de la gravedad del brote de actividad, tolerancia digestiva y

características del paciente. Por otra parte, es necesario recordar que la nutrición enteral puede tener un efecto terapéutico primario sobre la enfermedad de Crohn activa, especialmente en pacientes pediátricos.

- Suplementación con minerales y oligoelementos

Potasio. Es frecuente la aparición de hipopotasemia en el contexto de brotes de actividad grave en pacientes con afectación cólica extensa.

Magnesio. Deben determinarse sus niveles en todo paciente que vaya a ser tratado con ciclosporina y suplementarse si procede, ya que su déficit aumenta el riesgo de crisis comicial.

Folatos. Su suplementación de forma sistemática está indicada en caso de tratamiento a largo plazo con salazopirina o metotrexato. Dada su igual eficacia, es preferible el uso de ácido fólico al de ácido folínico por su menor coste económico.

Calcio y vitamina D. Debe administrarse en todo paciente que deba seguir tratamiento con esteroides sistémicos durante un periodo mínimo de 2-3 meses, para prevenir la pérdida de masa ósea asociada al tratamiento.

Cobalamina. Su suplementación está indicada siempre en caso de resecciones ileales amplias o afectación amplia del íleon terminal. Deben determinarse sus niveles en caso de enfermedad ileal y proceder en consecuencia.

Hierro. En el caso de la anemia ferropénica (la forma más común de anemia en la EII), la administración de hierro (Fe) puede hacerse por vía oral o endovenosa. En situación de ferropenia sin anemia no existe consenso sobre la necesidad de iniciar tratamiento, pero deberán siempre tenerse en cuenta la patología concomitante, el curso previo y la situación actual de la EII, entre otros aspectos. En casos de anemia leve (Hb > 10 g/dl) puede utilizarse Fe oral a dosis diarias máximas de 100 mg de hierro elemental (dosis superiores no son absorbidas y pueden limitar la tolerancia). En estas circunstancias, niveles de ferritina > 100 µg/l indican depósitos adecuados de hierro. En caso de intolerancia a Fe oral, falta de respuesta al mismo o anemia importante (Hb < 10 g/dl), debe optarse por la administración de Fe endovenoso.

1.5.3 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

- Aminosalicilatos

Los aminosalicilatos, fármacos que contienen en su estructura molecular la molécula del ácido 5-aminosalicílico (5-ASA o mesalazina) son uno de los principales agentes en el tratamiento de los pacientes con CU; su posible papel en la quimioprolifaxis del cáncer de colon en los pacientes con EII y afectación colónica ha multiplicado sus indicaciones.

Comercializados en nuestro país como: *Claversal®*, *Lixacol®*, *Pentasa®*, *Salofalk®*.

- Corticoides

Estos fármacos son el principal agente terapéutico ya sea de forma oral o parenteral en brotes moderados y graves de ambas EII. Comercializados como: *Dacortín®*, *Prednisona Alonga®*, *Urbason®*, *Proctoesteroid®*...

- Antibióticos

Los antibióticos utilizados en la EII son una quinolona: ciprofloxacino y un derivado nitroimidazólico: el metronidazol. Otros antibióticos en experimentación en la EII son la claritromicina y la rifabutina.

- Inmunomoduladores

El 20-30% de los pacientes con EC son refractarios a tratamiento esteroideo convencional, otro 20-30% desarrollan corticodependencia, y en conjunto, alrededor del 70% de los pacientes con EC recidivan durante el primer año. La incidencia de corticodependencia en los pacientes con CU se desconoce, pero se estima que podría ser similar al 20-30% descrito para los pacientes con EC. En todos estos pacientes la primera opción terapéutica es la utilización de fármacos inmunosupresores.

Actualmente se utilizan en la práctica clínica, con indicación reconocida, cuatro fármacos inmunomoduladores así como otros dos fármacos que podrían tener su papel en el futuro de confirmarse los datos preliminares existentes. Las características de presentación, dosis recomendada y mecanismo de acción de estos fármacos los vemos resumidos en la tabla siguiente:

TABLA 2. INMUNOMODULADORES

PRESENTACIÓN	MECANISMO DE ACCIÓN
Azatioprina <i>Imurel®</i>	Inhibición proliferación de linfocitos T y B
Mercaptopurina <i>Mercaptopurina®</i>	Inhibición proliferación de linfocitos T y B
Metotrexato <i>Metotrexato®, Metojet®</i>	Inhibición dihidrofolato reductasa: Inhibición de la síntesis de DNA
Ciclosporina <i>Sandimmun Neoral®</i>	Inhibición de IL-2, IFN, IL-3, IL-4
Tacrolimus <i>Prograf®</i>	Anti-calcineurina Similar a la ciclosporina
Micofenolato-mofetil <i>Cellcept®</i>	Inhibición de la síntesis de la guanosina. Inhibición síntesis DNA.

- Agentes biológicos y fármacos biotecnológicos

Este término engloba una serie de mecanismos terapéuticos que incluyen la administración de:

- Sustancias biológicas naturales, tales como productos derivados de la sangre o microorganismos muertos, atenuados o vivos (probióticos).
- Péptidos recombinantes o proteínas: hormona de crecimiento, eritropoyetina.
- Anticuerpos monoclonales contra sustancias inflamatorias (TNF- α , integrinas...).
- Ácidos nucleicos

Desde hace unos años se ha introducido en el tratamiento de la EI estos nuevos agentes terapéuticos con acción antiinflamatoria selectiva con la finalidad de restablecer una respuesta inmunológica normal. En España actualmente está

autorizado el infliximab y el adalimumab. Infliximab (Remicade®) y adalimumab (Humira®). Ambos fármacos son anticuerpos monoclonales IgG1 anti-TNF cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición del factor de necrosis tumoral (TNF), potente citocina pro-inflamatoria. Existen dos variables clínicas que aumentan la eficacia clínica de estos fármacos y son la utilización concomitante de inmunomoduladores (aunque con datos discordantes en algunos estudios) y el hecho de no fumar.

1.5.4 INDICACIONES QUIRÚRGICAS GENERALES DE LA EC

Las indicaciones quirúrgicas de la EC siguen siendo más o menos las mismas que cuando se hizo su primera descripción en 1932. Al tratarse de una enfermedad muy heterogénea en cuanto a localización, complicaciones específicas, curso clínico y recurrencias resulta difícil establecer indicaciones uniformes o generalizadas, aunque de modo global podríamos resumir en la siguiente tabla:

TABLA 3. INDICACIONES QUIRÚRGICAS GENERALES EN LA EC

Fracaso del tratamiento médico o intratabilidad

- **Respuesta inadecuada**
- **Complicaciones farmacológicas**
- **Corticodependencia**
- **Corticoresistencia**

Complicaciones específicas

- **Obstrucción**
- **Sepsis (absceso)**
- **Fístula (interna o externa)**
- **Hemorragia masiva**
- **Perforación**
- **Uropatía obstructiva**

Prevención o tratamiento del cáncer

Retraso de crecimiento en niños

Aproximadamente un 30% de pacientes con CU precisarán cirugía en algún momento de su vida, y de estos el 50% se operarán dentro de los primeros 10 años desde el comienzo de su enfermedad. Gracias al mejor manejo médico y tratamiento farmacológico de estos pacientes, una gran mayoría (> 90%) se intervendrán de modo electivo.

Asímismo se detallan a continuación en la tabla las indicaciones del tratamiento quirúrgico de la CU:

TABLA 4. INDICACIONES QUIRÚRGICAS EN LA CU

Cirugía electiva o semielectiva (>90%)	Fracaso tratamiento médico
	Nunca remisión completa
	Efectos secundarios farmacológicos
	Corticodependencia-corticoresistencia
	Brotos agudos frecuentes
Cirugía urgente (<10%)	Displasia, cáncer
	Manifestaciones extraintestinales (excepcional)
	Retraso de crecimiento en niños
	Brote grave de colitis sin respuesta médica
	Megacolon tóxico
	Hemorragia masiva
	Perforación
	Obstrucción (muy rara, excluir cáncer)

1.6 LOS VIRUS DE LA FAMILIA HERPES

Los herpes tienen propiedades comunes. Todos ellos son virus DNA con una cápside icosaédrica. Su prevalencia es muy elevada. Difieren en los receptores celulares y en la lesión inicial. Se acantonan (fase latente) en diferentes tipos celulares y en determinadas condiciones entran en fase lítica.

1.6.1 CITOMEGALOVIRUS

Es un beta-herpesvirus. Es un virus DNA con una nucleocápside de 105nm, 162 capsómeros. Posee una estructura similar a otros virus de la familia. Sintetiza un gran número de proteínas, algunas de función desconocida.

Lesiones:

- Infección: Se produce una replicación activa y liberación del virus. Los cultivos suelen ser positivos en muestras de sangre, lavado broncoalveolar, orina o tejidos. Suele haber una seroconversión. Y la infección puede ser sintomática o asintomática.
- Enfermedad: Se observan inclusiones citomegálicas en el tejido y suelen ser sintomáticas.

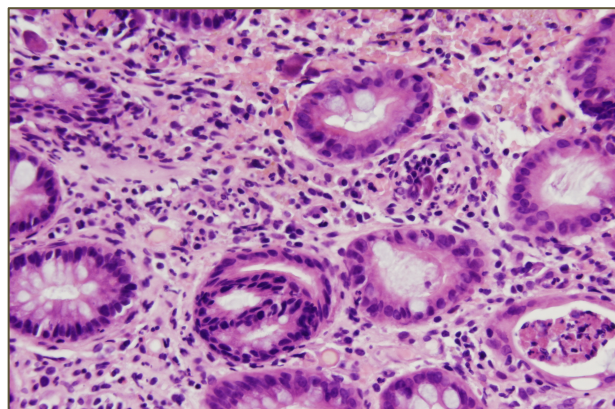


Fig. 3. CU con inclusiones virales de CMV.

1.6.2 HHV6 y HHV7

Pertenecen la a subfamilia de los beta-herpesvirus. El HHV6 tiene, a su vez, dos subtipos A y B. La variante B el la más patogénica. Tienen un genoma DNA de doble cadena de 170kbp. La principal célula diana es el linfocito T, aunque pueden infectarse los linfocitos B. Los dos virus comparten una homología de secuencia limitada y una reactividad cruzada antigénica. Se cree que el HHV6 y HHV7 están relacionados entre sí de la misma forma que VHS-1 y VHS-2.

Ambos virus se encuentran en todo el mundo. Se trasmiten por contacto con la saliva y a través de la lactancia materna. Se adquieren de forma temprana cuando

cae el título de anticuerpos transmitido por la madre. Se mantienen en un estado latente y se reactivan de forma variable. El diagnóstico es difícil a excepción de la Roseola Infantum: es de apariencia típica, diagnóstico fácil y no requiere tratamiento.

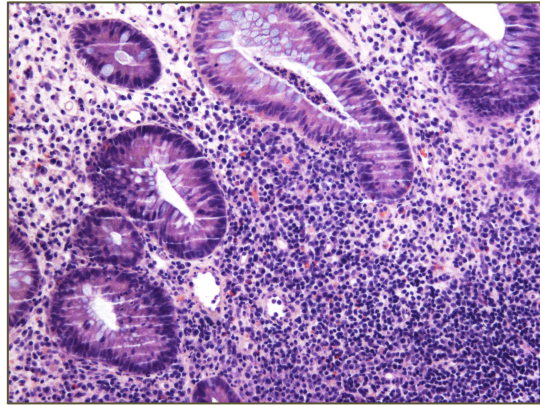


Fig. 4. CU positivo para HHV6 por PCR.

1.6.3 VIRUS DE EPSTEIN-BARR

Es un gamma herpes virus (linfocriptovirus). El 90-95% de adultos sanos son IgG positivos. Las células diana son los linfocitos T y B, células epiteliales y células musculares. Está formado por un DNA de doble cadena de 178kb. Y posee una cápside icosaédrica. Poseen receptores celulares (CD21, receptor de C3d, en linfocitos y células epiteliales orofaríngeas. Se transporta al núcleo y se integra en el genoma. Está asociado a mononucleosis infecciosa, carcinoma indiferenciado (linfopitelioma), Enfermedad de Hodgkin, linfoma de Burkitt y otros síndromes linfoproliferativos.

1.6.4 VIRUS HERPES SIMPLE 1 Y 2 (VHS1 Y VHS2)

Son virus DNA de la subfamilia alpha herpesviridae de la familia herpesviridae, que están envueltas en una proteína icosaédrica llamada cápside. El VHS1 y VHS2 tienen una doble cadena de DNA con 150kbp, que codifican una variedad de proteínas implicadas en la formación de la cápside así como en la replicación e infección por parte del virus. La vía de transmisión es por contacto directo del área infecciosa de la piel (la saliva en el caso del VHS-1) durante la reactivación del virus. También puede haber transmisión vertical durante el nacimiento. El virus entra en la

célula y el genoma viral penetra inmediatamente en el núcleo pero la proteína del virus permanece en el citoplasma. Los virus Herpes Simple pueden permanecer de forma quiescente, pero persistente, en los ganglios nerviosos. El VHS-1 es el responsable del herpes labial y el VHS-2 es el responsable del herpes genital.

1.7 EL CITOMEGALOVIRUS EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La primera vez que se publicó la presencia de citomegalovirus (CMV) en la colitis ulcerosa se planteó la pregunta de si el CMV era la causa primaria del deterioro del paciente o era consecuencia del tratamiento o debilidad del paciente. (Powell, 1961). En los últimos 40 años ha sido un tema recurrente en la bibliografía de la EII.

Históricamente, la enfermedad sintomática del CMV se veía en pacientes inmunocomprometidos: recién nacidos, tras transplante de órganos sólidos, pacientes con VIH o pacientes con inmunosupresores (Alford, 1990 y Nelson, 1993). Una serie amplia de casos de detección de CMV en pacientes con EII, que no respondían a tratamientos estándar inmunosupresor, también han sido publicados (Kambham, 2004 y Ayre, 2009). Esto ha generado un interés si el CMV es un factor que contribuye a empeorar la enfermedad o si por el contrario es un marcador de gravedad de la enfermedad.

La infección por CMV se refiere a la detección de antígenos o anticuerpos en sangre, mientras que la enfermedad de CMV se refiere a la detección sintomática en órganos (Ayre, 2009). La infección por CMV es frecuente y se estima que su prevalencia es del 30-100% (Krech, 1973) en el mundo, dependiendo la edad. En EEUU, la prevalencia es de 35-80% (Zhang, 1995) y ocurre más frecuentemente en negros no hispanos y mejicanos americanos que los blancos no hispanos (Colugnati, 2007).

La infección primaria de CMV en personas inmunocomprometidas es habitualmente asintomática aunque puede ocurrir síntomas parecidos al causado por el virus Epstein-Barr (VEB) como fiebre, cansancio y linfadenopatía cervical. Tras una respuesta inicial por el sistema inmune del huésped, el virus entra en una

fase de latencia en células endoteliales, macrófagos o células stem granulocíticas (Crough, 2009). En los periodos de latencia, ocurren habitualmente periodos de reactivación sin producir síntomas al adulto sano. Pero esto no ocurre así en pacientes donde la respuesta inmune está comprometida (transplante de órganos sólidos, terapias inmunosupresoras, VIH...). El fracaso del sistema inmune lleva a síntomas y afectación de órganos como la colitis por CMV (Crough, 2009). Tras una infección primaria, se produce una temprana elevación de anticuerpos IgM en sangre y es detectable en la primera semana de infección (Van der Giessen, 1990). Durante los tres-seis meses siguientes los niveles de anticuerpos IgM caen a niveles indetectables, aunque en algunos pacientes pueden persistir hasta los 12-24 meses; la persistencia de IgM parece estar relacionado con inmunosupresión concomitante (Nagington, 1971). Curiosamente, la excreción del virus en orina y saliva ocurre durante el mismo periodo, y se ha visto que persiste en pacientes en quienes los anticuerpos IgM continúan más allá de los seis meses. La producción de IgG en respuesta a la infección de CMV ocurre después que la de IgM, generalmente aparece en pocas semanas tras la elevación de IgM, pero permanece elevada largo tiempo para dar protección en un largo periodo (Van der Giessen, 1990).

1.7.1 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN DE CMV Y ENFERMEDAD

Es importante clarificar la diferencia entre infección por CMV, donde la persona es infectada con el virus pero no muestra signos clínicos de daño tisular causados por el virus, y la enfermedad por CMV donde la reactivación del CMV conlleva a un daño tisular y síntomas clínicos (Ayre, 2009). Un número significativo de personas son infectadas en el mundo, aunque en la mayoría de los casos no manifiesta por sí mismo síntomas. En el contexto de la colitis, la enfermedad por CMV se refiere a la presencia del virus en el colon en tejido inflamado. La diferencia entre infección por CMV y enfermedad por CMV se puede complementar con el empleo tanto de sangre como tejido biopsiado.

1.7.2 INFECCIÓN POR CMV

El CMV genera una respuesta inmune que genera anticuerpos específicos IgM y consecuentemente el desarrollo de anticuerpos IgG (“seropositivos”). Esta

información es útil para distinguir infección de enfermedad, ya que el 35-80% de la población es seropositiva sin tener enfermedad por CMV (De la Hoz, 2002).

El estudio de antigenemia detecta el antígeno pp65 del CMV en leucocitos circulantes en sangre por tinción con anticuerpos fluorescentes específicos del pp65. Estudios de esta prueba muestran una sensibilidad del 60-100% y una especificidad del 83-100% para la infección del CMV, sensibilidad equivalente al cultivo del virus (De la Hoz, 2002; Landry, 1993). Sin embargo, la presencia de antigenemia no es predictivo de la detección de CMV en tejido de colon en pacientes con EII (Domenèch, 2008 y Matsuoka, 2007).

La utilidad de la antigenemia ha sido suplantada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en leucocitos en sangre, que proporciona una mejor cuantificación de la presencia viral.

La PCR de DNA leucocitario puede detectar y cuantificar la viremia de CMV. La sensibilidad oscila entre 65-100% y la especificidad entre 40-92% (Boivin, 1998 y Michaelides, 2001). La mayoría de los estudios de pacientes con EII han manifestado una correlación entre la identificación del CMV por PCR en sangre, y la detección en el tejido colónico por hematoxilina-eosina (H&E) o inmunohistoquímica (IHQ), pero otros autores no (Matsuoka, 2007; Criscuoli, 2004; Cottone, 2001 y Yoshino, 2007). Estudios en trasplante también han observado una correlación entre el nivel de viremia cuantificada por PCR y el riesgo de enfermedad sintomática (Gerna, 2006). Por ello, determinar el punto de corte para la positividad puede especificar si el paciente está realmente infectado por el CMV o tiene riesgo de enfermedad por CMV. Estos niveles no han sido establecidos para la colitis por CMV en pacientes con EII (Lawlor, 2010).

1.7.3 COLITIS POR CMV

El CMV puede ser detectado con el uso de la tinción por H&E, inmunohistoquímica o PCR en tejido. La H&E a menudo muestra células agrandadas (citomegálicas) con grandes inclusiones eosinófilas. La presencia de estas células denota no sólo infección, sino que también con colitis que pobremente responden a terapias estándar de EII, lo que sugieren enfermedad relevante de CMV. Es muy específico, con rangos de 92-100% pero poca sensibilidad (10-87%).

La inmunohistoquímica mejora la sensibilidad histológica. Identifica el antígeno del CMV mediante el empleo de anticuerpos monoclonales, por lo que identifica células infectadas en el colon. La sensibilidad es del 78-93% (Kandiel, 2006). También se puede emplear la PCR en tejido de colon para detectar la presencia de DNA viral, aunque el significado de resultados positivos sin otros signos histológicos no está claro (Lawlor, 2010). En ocho estudios en pacientes con EII que se han publicado hasta la fecha, solamente dos han demostrado correlación histológica entre la histología (H&E o IHQ) y los resultados de PCR en tejido, mientras que en los otros seis no hay esa correlación (ver tabla 5).

TABLA 5. PREVALENCIA DE CMV EN BIOPSIAS ENDOSCÓPICAS DEL COLON DE PACIENTES REFRACTARIOS A TRATAMIENTO ESTEROIDEO

Estudio	Año	H&E	IHQ	PCR tejido
Cottone et al	2001	36%	36%	SD
Domenèch et al	2008	26%	32%	42%
Kambham et al	2004	5%	25%	SD
Minami et al	2007	17%	SD	SD
Yoshino et al	2007	3%	SD	57%

H&E: Hematoxilina-eosina; IHQ: inmunohistoquímica; PCR: reacción en cadena de polimerasa. SD: Sin datos

Hasta hace unos años, el cultivo de virus se vio como el “gold estándar” en la detección del CMV. El cultivo se hacía una vez que el virus causaba los característicos cambios citopáticos en los fibroblastos. El cultivo tarda habitualmente días o semanas (De la Hoz, 2002). Es específico, 89-100%, aunque no tan sensible (45-78%). Además, el cultivo no cuantifica en nivel de viremia y ello no correlaciona con la actividad en el colon. Por eso, teniendo en cuenta la baja sensibilidad comparado con otras técnicas y el tiempo que hay que esperar para obtener el resultado, el cultivo de CMV no se emplea a menudo en la rutina.

Las más recientes guías internacionales publicadas sobre el CMV en la EII son la guía de Organización Europea de Colitis y Crohn's, 2009, (Rahier, 2009) donde sus autores recomiendan el uso de PCR en tejido o la IHQ para el estudio de CMV para casos de EII refractaria a tratamiento. Otra guía más antigua del Colegio

Americano de Gastroenterología, 2004, (Kornbluth, 2004) recomienda biopsia de colon y cultivo viral en casos refractarios de colitis.

1.7.4 SIGNIFICADO DE LA ENFERMEDAD POR CMV EN PACIENTES CON EII

Una vez que el CMV ha sido detectado en pacientes con EII, surgen dos preguntas: ¿es el CMV quien lleva al desarrollo de EII en pacientes previamente sanos o la reactivación del CMV quien exacerba la severidad de la enfermedad en aquellos pacientes con enfermedad establecida?

Aunque hay casos descritos de pacientes que desarrollan la enfermedad tras una infección por CMV, la enfermedad por CMV es rara en pacientes con CU y enfermedad de Crohn's media-moderada, lo que le hace un agente improbable como factor etiológico de novo (Domenèch, 2008; Ovar, 1993 y Knosel, 2009).

Sin embargo, la mayoría de los pacientes con EII establecida son seropositivos para infección por CMV, la reactivación del virus latente es más que probable durante periodos de inflamación intestinal. Pacientes con EII tienen actividad celular NK y defectos en la inmunidad de la mucosa, lo que crea un ambiente susceptible de la reactivación del CMV (Targan, 2005 y Ginsburg, 1983). Además, estos pacientes están a menudo bajo tratamiento inmunosupresor por fármacos como los corticoides, que por sí solos predisponen a reactivación viral.

Antes de llamar al papel del CMV patógeno, hay varias preguntas que deben de ser respondidas:

- ¿Con qué frecuencia es el CMV detectado en el colon en pacientes con EII?
- ¿La detección del CMV se asocia a un pronóstico peor?
- ¿El tratamiento con antivirales mejora a pacientes con CMV +?

La alta prevalencia de seropositivos para CMV en pacientes EII, definiciones de "severa" o enfermedad refractaria a esteroides, y los diferentes métodos para la detección de CMV ha generado resultados dispares (Ayre, 2009).

1.7.5 LA FRECUENCIA DE DETECCIÓN DE CMV EN COLON EN PACIENTES CON EII.

Algunas revisiones han hablado de la prevalencia de CMV en EII (Ayre, 2009; Kandiel, 2006 y Hommes, 2004). Estos estudios han sido detallados en la tabla previa. Aunque algunas publicaciones previas en el estudio de la prevalencia del CMV en EII sólo emplearon la H&E y la IHQ, los más recientes han empleado la técnica de la PCR.

En la enfermedad de Crohn, los estudios en tejido no han detectado CMV por IHQ, o en contadas ocasiones (<5% de los pacientes) por PCR en tejido o material fecal (Knosel, 2009; Takahashi, 2004; Kaufman, 1999 y Hommes, 2004). Esto es, a pesar de los altos índices de seropositividad de la población. Varios autores detectaron DNA del CMV en 66% de los 29 tejidos con Crohn estudiados usando una técnica de PCR muy sensible, detecta menos de 10 copias de DNA (Hommes, 2002; D'Ovidio, 2008; Wakefield, 1992). En este mismo estudio el 29% de las muestras control también fueron positivas para DNA del CMV, y no había asociación entre la detección del CMV y la actividad de la enfermedad, lo que sugiera que las pequeñas cantidades de DNA viral no son clínicamente relevantes.

De la misma manera, pacientes con CU inactiva no muestran evidencia de colitis por CMV en estudios publicados. En el estudio de Domenèch (Domenèch, 2008) no encontraron presencia de CMV por H&E o IHQ en 50 pacientes con CU inactiva en tratamiento con Azatioprina o mesalamina, a pesar de la prevalencia de seropositividad del 72%. Kojima, 2006 también afirmaron que no encontraron CMV por IHQ en las piezas de colectomía de pacientes con CU que han sido operados por displasia o cáncer (n=22).

Numerosos estudios han sacado piezas de colectomía de archivo, con fecha límite retrospectivamente, para buscar CMV. En pacientes descritos como “resistentes a esteroides”, los estudios hablan de CMV por IHQ del 20-40% en biopsias endoscópicas y piezas de colectomía (ver tabla anterior) (Kambham, 2004; Domenèch, 2008 y Cottone, 2001; Kojima, 2006 y Maconi, 2005). Incluso cuando las técnicas de detección de CMV por IHQ son bajas (6%), en el mismo estudio técnicas para la detección de DNA de CMV en colon fueron de hasta el 60% (Yoshino, 2007).

Por ello, la presencia de CMV en CU severas parece ser transitorio, y puede desaparecer con la mejora clínica sin la necesidad de tratamiento antiviral (Matsuoka, 2007 y Hommes, 2004). Matsuoka en 2007 afirmó que la reactivación del CMV ocurría en un 79% de sus pacientes con moderada-severa CU, pero que en 10 semanas todos habían resuelto sin la necesidad de ninguna terapia antiviral.

Entre los pacientes con CU severa, la enfermedad por CMV se da más frecuentemente en pacientes mayores y mujeres (Kojima, 2006; Watanabe, 2006; Kishore, 2004 y Wada, 2003). También es detectado más frecuentemente en pacientes con esteroides que pacientes sin esteroides, y que en pacientes con enfermedad inactiva (Domenèch, 2008). Dado que no hay datos de la prevalencia de pacientes con esteroides que no tienen enfermedad severa, no podemos determinar si el uso de esteroides es un factor etiológico o un marcador de la severidad de la enfermedad (Lawlor, 2010). Sin embargo, datos in vitro de Widmann en 2008, sugieren un efecto dosis dependiente de esteroides en la función supresora de células T específicas de CMV.

El Infliximab no ha sido asociado con un aumento del riesgo de reactivación del CMV en pacientes con EII (D'Ovidio, 2008 y Lavagna, 2007) siguieron a 60 pacientes que comenzaron con Infliximab para EC activa y observaron seroprevalencia del 70%, aunque todos ellos tenían PCR negativas en sangre durante las 14 semanas de seguimiento. De hecho, estudios in vitro han demostrado que el factor de necrosis tumoral (TNF) aumenta la replicación viral del CMV en células infectadas latentes y la ausencia de TNF en monocitos lleva a la latencia viral (Adler, 1998).

1.7.6 ¿LA DETECCIÓN DE CMV ESTÁ ASOCIADO A UN PRONÓSTICO PEOR?

En pacientes con enfermedad cortico-resistente , uno podría esperarse que los pacientes CMV+ tienen peor pronóstico a CMV-. Yoshino, 2007, en un pequeño estudio informaron que el hallazgo de CMV en el colon de pacientes con CU cortico-resistente no estaba asociado a la actividad de la enfermedad, medicación o tasas de colectomía. Otros estudios tampoco han encontrado diferencias en la severidad de la enfermedad o extensión, marcadores inflamatorios o el tiempo para la colectomía entre pacientes con CMV+ y CMV- con severa CU (Kambham, 2004;

Domenèch, 2008; Kojima, 2006 y Alcalà, 2000). Matsuoka en 2007 puso de manifiesto el seguimiento de 48 pacientes con CU moderada-severa que se les valoró la prueba de antigenemia, la remisión y las colectomías y los datos fueron similares para pacientes con CMV+ y pacientes con CMV-. Esto sugiere que los antígenos de CMV pueden encontrarse en el colon en un tercio de los pacientes con CU refractaria a esteroides, pero su presencia no parece indicar la severidad de la enfermedad comparado con pacientes CMV+. Por ello, en la mayoría de los pacientes con CU cortico-resistente, la reactivación local es secundaria a la severidad de la enfermedad e independiente del pronóstico según Lawlor, 2010. Estas conclusiones están limitadas por las diferencias entre los diferentes estudios existentes.

1.7.7 ¿EL TRATAMIENTO ANTIVIRAL MEJORA EL PRONÓSTICO DE LOS PACIENTES CON CMV+?

Si se detecta CMV en el colon de un paciente con EII, se espera que un tratamiento antiviral mejora la clínica o produce remisión en estos pacientes si el virus es quien exacerba la enfermedad. La colitis por CMV se trata habitualmente con ganciclovir, aunque también se han propuesto foscarnet, valganciclovir y cidofovir. Ganciclovir tiene poca biodisponibilidad cuando se da vía oral, por ello se administra vía intravenosa al comienzo (Faulds, 1990). La dosis recomendada es de 5mg/kg IV dos veces al día al menos durante tres semanas (Tessier, 2006). Si el paciente debe de cambiar a tratamiento oral, 1g tres veces al día es la recomendación, pero la cantidad es incierta. Los beneficios de la terapia antiviral para tratar la enfermedad por CMV en el colon deben de tenerse en cuenta con los riesgos que la medicación conlleva. El efecto adverso más importante del ganciclovir es la neutropenia (Markhan, 1994).

Esta tabla refleja la respuesta al tratamiento antiviral en pacientes que no respondieron al tratamiento y precisaron de colectomía. La respuesta de la terapia antiviral en pacientes con enfermedad cortico-resistente que tuvieron reactivación del CMV fue del 72% (rango 50-83%) (Domenèch, 2008; Cottone, 2001; Yoshino, 2007; Papadakis, 2001). Estos resultados deben de interpretarse con cautela, ya que la mayoría de los pacientes estaban tomando otros medicamentos como la

ciclosporina. Además, los pocos pacientes a los que se les detectó CMV pero no fueron tratados con antivirales también remitieron (Yoshino, 2007). En el pequeño estudio de Papadakis en 2001, las 3/5 partes de los pacientes con CU refractaria al tratamiento, se les interrumpió el tratamiento inmunosupresor y comenzaron con ganciclovir mejoraron. Matsuoka en 2007 y su estudio de pacientes con moderada-severa CU no trataron a aquellos con evidencia de reactivación de CMV en sangre y tuvieron parecido pronóstico a los CMV-. Sólo un estudio control randomizado de ganciclovir o placebo en combinación con cuidados estándares en pacientes con CU cortico-resistente respondería a esta cuestión. Las guías tanto del Colegio Americano de Gastrenterología y la Organización Europea de Crohn y Colitis (ECCO) recomiendan el tratamiento con antivirales cuando el CMV es detectado en tejido del colon. (Rahier, 2009 y Kornbluth, 2004).

TABLA 6. NUMERO DE PACIENTES CON CU REFRACTARIA A CORTICOIDES CON RESPUESTA CLINICA DESPUES DE TRATAMIENTO ANTIVIRAL

Estudio	Tipo	Terapia antiviral	Respuesta pacientes tratados	Respuesta pacientes no tratados	Inmunosupresor es adyuvantes
Cottone	Prospectivo	Ganciclovir y Foscarnet	5/6	SD	No
Domenèch	Prospectivo	Ganciclovir	3/4	SD	Si
Papadakis	Retrospectivo	Ganciclovir	3/5	SD	No
Yoshino	Retrospectivo	Ganciclovir	10/12	2/2	Si

2. OBJETIVOS

1. Evaluar la importancia pronóstica de la presencia de amplificación de virus de la familia Herpes en tejido en pacientes con EII.
2. Relacionar la presencia de amplificación viral en el tejido con el tratamiento recibido en pacientes con EII.
3. Objetivos secundarios
 - A. Evaluar la eficacia del tratamiento antiviral específico en pacientes con EII.
 - B. Definir características histológicas que permiten predecir la presencia de amplificación viral en el tejido de pacientes con EII.
 - C. Valorar las distintas técnicas diagnósticas y su valor predictivo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron todos los pacientes, desde 2005 al 2010, en total 103 pacientes diagnosticados de EII, tanto de colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn o bien inflamación inespecífica en colon si los pacientes ya poseían historia de EII anterior al año 2005. Se realizó PCR con el DNA del tejido fijado en formol e incluido en parafina de cada una de las biopsias (201) diagnósticas de EII o de inflamación inespecífica con historia previa de EII para la detección de virus de la familia Herpes y se realizó seguimiento de cada paciente en relación al tratamiento tanto farmacológico como quirúrgico y estancia hospitalaria.

1 PACIENTES.

Se han estudiado 103 pacientes con historia previa EII, o diagnosticados de EII por primera vez, que han acudido entre los años 2005 y 2010 al servicio de Digestivo o Medicina interna del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander y se les ha realizado una colonoscopia o resección intestinal con posterior envío de las muestras a Anatomía Patológica para su estudio. La distribución por sexos es la siguiente, 63 (61,16%) hombres y 40 (38,83%) mujeres y de edades comprendidas entre los 17 y 87. El tiempo de enfermedad era variable ya que algunos correspondían a estadios iniciales de la enfermedad y otros pacientes mostraban hasta 30 años de evolución de la enfermedad.

Además, se estudiaron 16 pacientes con biopsias de colon por otras razones diferentes a la EII (pólipos de colon) a los que se realizó PCR para detección de virus de la familia Herpes.

2 MUESTRAS.

Las muestras correspondieron a biopsias endoscópicas o piezas quirúrgicas de segmentos de intestino de los pacientes con EII.

Las biopsias endoscópicas comprendían un número variable de fragmentos de mucosa de colon con tamaños que oscilan entre 1 y 4mm de eje máximo.

Las muestras procedentes de pieza quirúrgica eran segmentos de intestino procedentes del servicio de cirugía general, resecados debido a indicación clínica

por la mala evolución de la enfermedad o por la resistencia al tratamiento farmacológico recibido.

2.1 Fase preanalítica. Fijación del material de biopsia endoscópica o pieza quirúrgica, en formol.

Debido a la variabilidad de los análisis moleculares que puede proceder de problemas en la fase preanalítica de fijación tisular, detallamos el proceso y los tiempos utilizados en dicha fase. Las biopsias endoscópicas fueron sumergidas en el momento de la colonoscopia, en formol tamponado al 10% con un tiempo máximo de fijación de 24 horas y un mínimo de 6 horas.

Las piezas quirúrgicas fueron fijadas el mismo día y siguieron el mismo protocolo que las biopsias endoscópicas pero con mayor tiempo de fijación, dado el poder de penetración del formol (1mm/hora), nunca mayor de 48 horas.

Las muestras sufrieron el procesamiento habitual de los laboratorios de Anatomía Patológica de deshidratación mediante alcoholes de concentración creciente e inclusión de parafina. Brevemente, el proceso se llevó a cabo en un procesador tisular automático con los siguientes ciclos:

- Una hora y media en alcohol de 70° (un ciclo)
- Una hora y media en alcohol de 95° (un ciclo)
- Una hora y media en alcohol de 100° (tres ciclos)

Posteriormente a la deshidratación tisular recibieron dos baños sucesivos de aclarado con xilol. Luego se incluyeron en parafina líquida a 65°C con enfriamiento posterior, y corte en microtomo y tinción con hematoxilina y eosina de acuerdo con los procedimientos clásicos de los laboratorios de Anatomía Patológica.

3 DIAGNÓSTICO DE LAS BIOPSIAS: EII, CU, CROHN O INFLAMACIÓN INESPECÍFICA.

Las biopsias endoscópicas o piezas quirúrgicas fueron diagnosticadas por el patólogo responsable del área quirúrgica de digestivo en la rutina hospitalaria con el diagnóstico de EII, CU, enfermedad de Crohn, o inflamación inespecífica. Posteriormente se revisaron de manera ciega por un patólogo más (AAE) durante la realización de nuestro trabajo.

4 TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS DE CMV.

Ante la positividad molecular frente a CMV en las biopsias, se realizó la técnica inmunohistoquímica para la detección de este tipo de virus correspondiente al clon CCH2 + DDG9 (*Monoclonal Mouse Anti-Cytomegalovirus (Clones CCH2 + DDG9), Dako, Dinamarca*).

Este anticuerpo monoclonal marca células infectadas por el citomegalovirus humano y constituye una herramienta útil para la identificación de la infección por el CMV en tejido humanos.

Preparación de las muestras: Los cortes de tejido parafinado fueron pretratados con el sistema de recuperación antigénica Dako Target Retrieval Solution (S3308) a pH alto durante 20 minutos.

Procedimiento de tinción: El anticuerpo se utilizó a una dilución de 1:50 y 30 minutos de incubación a temperatura ambiente.

Visualización: Para dicho procedimiento se utilizó el Kit Dako LSAB tm +/-HRP, número de catalogo K0679, y kits Dako EnVision tm +/-HRP, números de catálogo K4004 y K4006.

Características de tinción: Las células marcadas por el anticuerpo presentan un patrón de tinción nuclear en las fases tempranas de la infección por el CMV. En fases posteriores, puede observarse un patrón aparente de tinción citoplasmática.

5 DETECCIÓN DE VIRUS DE LA FAMILIA HERPES MEDIANTE TÉCNICAS DE PCR.

5.1 PCR semicuantitativa

Se ha realizado una PCR semicuantitativa a todas las biopsias mediante el sistema herplex kit de detección de virus de la familia herpes (Genómica SAU. Madrid. España). Este kit se basa en el diagnóstico in Vitro de los virus de herpes por amplificación de fragmentos específicos de su genoma, lo que conlleva una serie de ventajas:

- Sensibilidad: ya que permite la detección a partir de cantidades mínimas de material genómico vírico.
- Especificidad: al utilizar una secuencia correspondiente a una región altamente conservada dentro del genoma vírico.
- Económico y fácil de estandarizar en un laboratorio hospitalario (Davoli, 1999).
- Rapidez: en menos de 24h, especialmente importante en el caso de pacientes inmunodeprimidos, en los que la rapidez en el comienzo del tratamiento es crucial para conseguir un buen resultado terapéutico (Blank, 2000).

5.1.1. DESCRIPCIÓN DEL KIT HERPLEX

Con el kit Herplex se puede detectar la presencia en muestras clínicas (en nuestro caso en parafina) de los seis virus herpes humanos más importantes: VHS1, VHS2, VZ, CMV, VEB y HHV6. La detección se lleva a cabo mediante la amplificación de un fragmento de 194 pb dentro del gen de la DNA polimerasa viral, cuya secuencia está altamente conservada pero es lo suficientemente específica para cada tipo de virus. De esta manera, se asegura la especificidad de la detección.

La amplificación de los distintos virus se lleva a cabo en dos tipos distintos de tubos de PCR.

La sensibilidad obtenida combinando amplificación genómica y visualización por hibridación en medio líquido con este sistema es tan alta que no es necesario hacer dobles amplificaciones (nested), evitando el riesgo de contaminación que éstas conllevan (Brainard, 1994).

Uno de los principales inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos, los cuales, se deben principalmente a la presencia de inhibidores de la Taq polimerasa en las muestras en las que se quiere detectar el virus. Con el kit Herplex se han eliminado estos falsos negativos gracias a la presencia en cada uno de los tubos de un control interno de la eficiencia de la reacción de amplificación. Este control interno se amplifica con los mismos

cebadores que los distintos virus produciendo un fragmento de mayor tamaño que el obtenido a partir del DNA de cualquiera de los virus herpes que detecta el kit. De este modo, la amplificación del DNA de los virus en presencia del control interno produce dos fragmentos: uno de 194 pb correspondiente al genoma de cualquiera de los virus y otro de 720 pb correspondiente al control interno.

El control interno se introduce para distinguir entre aquellos casos que son realmente negativos, y los casos que son negativos porque se ha inhibido la polimerasa o se ha degradado el DNA de la muestra (falsos negativos).

A su vez, incluimos un control negativo para comprobar que las muestras no habían sufrido contaminaciones en el proceso de extracción, lo que daría lugar a un falso positivo.

5.1.2. PROTOCOLO DE TRABAJO

○ EXTRACCIÓN DEL DNA

- Se realizaron 2 cortes de 5µm de grosor de cada caso y se depositaron en un tubo Eppendorf de 1,5 ml autoclavado.
- Descongelamos a temperatura ambiente un tubo de SD 5X (Solución de digestión 5X), un tubo de PK 10X (Proteinasa K 10X) y un tubo de SD (Solución de Dilución). La proteinasa K se debe mantener en hielo mientras se esté usando y después se debe de guardar a 4°C y nunca volver a congelarla una vez descongelada. Preparar la mezcla de digestión, mezclando las siguientes cantidades por cada muestra a analizar:

70 x (nº tubos 1) = ____µl de SD (Solución de Dilución)

20 x (nº tubos 1) = ____µl de SD5x (Solución de Digestión 5x)

10 x (nº tubos 1) = ____µl de PK 10x (Proteinasa K 10x)

- Añadimos 100 µl de mezcla de digestión a cada muestra e incluimos un tubo de 1,5 ml vacío, que se procesó como control negativo de extracción y visualización.
- Incubamos a 56°C durante tres horas en un termobloque y posteriormente hervimos durante 10 min para inactivar la Proteinasa K tras lo que

centrifugamos inmediatamente en microcentrífuga durante 10min a 14.000 r.p.m. El sobrenadante fue recogido en un tubo de 1,5 ml limpio, atravesando con la micropipeta la capa superior de parafina solidificada. El DNA extraído se conservó a -20°C.

○ REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN

- Añadimos a cada tubo de amplificación 5 µl de la solución de DNA extraído de las muestras.
- Añadimos de la muestra identificada como control negativo 5 µl a otro tubo de amplificación como control negativo de amplificación y visualización.

Programamos en el termociclador (AB Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 2700) los siguientes ciclos de temperaturas:

1 ciclo	94°C 4 min
40 ciclos	94°C 30 seg
	56°C 1 min
	72°C 1 min
1 ciclo	72°C 10min
20°C continuo hasta la recogida de tubo	

○ VISUALIZACIÓN

- Preparamos la solución de lavado diluida añadiendo a una botella limpia de 1 litro, los 200 ml de SL5x (solución de lavado 5x) y 800 ml de agua. Mezclar invirtiendo varias veces.
- Preparar las soluciones de sondas, una por cada virus que se vaya a detectar. Para ello, diluir 10 µl de sonda específica en 90 µl de SUO (Solución de Unión de Oligos) por cada muestra a analizar. Repetir proceso para la sonda de control interno (CI). Se tendrá un tubo por cada una de las sondas que se vayan a utilizar.
- Añadimos a cada pocillo de la tira 100 µl de uno de los tubos de solución de sonda, incluyendo la sonda de control interno.

- Tapamos los pocillos con papel adhesivo e incubamos los pocillos durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Mientras tanto, colocamos las muestras amplificadas en el termociclador e incubamos a 100°C durante 10 minutos.
- Pasamos inmediatamente los tubos a un recipiente con hielo y enfriamos durante 5 minutos.
- Tras un nuevo lavado añadimos 100 µl de SH (solución de hibridación) a cada pocillo y 10 µl de muestra desnaturalizada a cada uno de los pocillos de una tira.
- Tapamos los pocillos con papel adhesivo e incubamos la placa a 50°C durante una hora.
- Lavar los pocillos como anteriormente descrito.

Preparar la solución de Conjugado Diluido. Para ello, mezclar en un tubo 100 µl de DC (Diluyente de Conjugado) y 0,2 µl de CJ (Conjugado) por pocillo a analizar y añadimos 100 µl de solución diluida de conjugado a cada pocillo.

- Tapamos los pocillos con papel adhesivo e incubamos a temperatura ambiente (25°C) durante una hora.

Y por último añadimos 100 µl de SR (Solución de revelado) a cada pocillo y tras la última incubación a temperatura ambiente (25°C) durante 1 hora medimos la absorbancia en un lector de placas microtiter a 405 nm sin filtro de referencia.

○ INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Mediante el Clinical Array Reader (Genomica, España) el resultado es positivo cuando cualquiera de los pocillos específicos de una muestra presente una absorbancia mayor a 0,35. No obstante, si la absorbancia de la muestra está entre 0,35 y 0,45 se recomienda repetir el ensayo de la misma.

El resultado será negativo cuando el pocillo específico de una muestra presente una absorbancia inferior a 0,35 y la del pocillo del control interno sea mayor de 0,4 (color verde claramente visible).

La reacción de amplificación estará inhibida cuando la absorbancia del pocillo específico sea menor de 0,35 y la del control interno menor a 0,4. En este caso habría que repetir todo el procedimiento de extracción, amplificación y visualización.

Si el resultado volviera a dar inhibido entonces se debiera solicitar otra muestra y repetir el proceso.

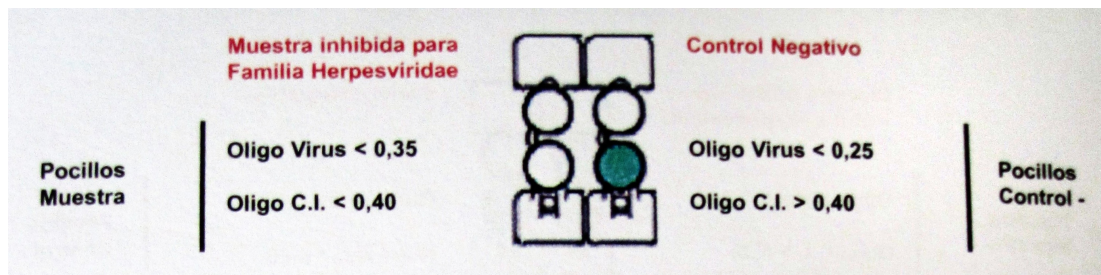


Fig. 5. Ejemplo de muestra inhibida.

Podemos encontrar dos situaciones en las que se produce contaminación:

- Por contaminación del control negativo: cuando la sonda del virus para el control negativo aparece mayor de 0,25.

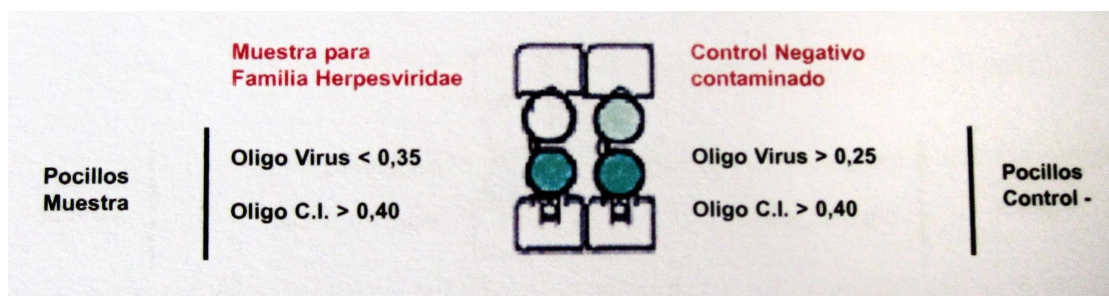


Fig. 6. Ejemplo de control negativo contaminado.

- Por contaminación del control negativo y de la muestra: entonces la sonda del virus para la muestra aparece mayor de 0,35 y la sonda del virus para el control sea mayor de 0,25.

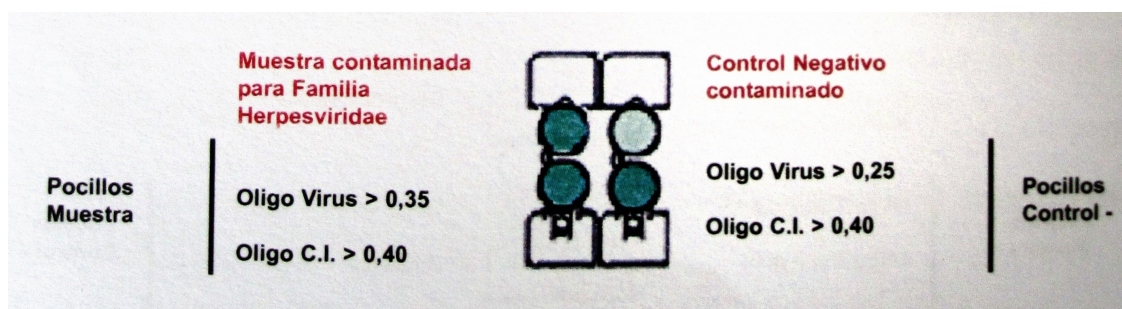


Fig. 7. Ejemplo de contaminación de la muestra y el control negativo.

Ante estos resultados se debe repetir todo el procedimiento de extracción, amplificación y visualización.

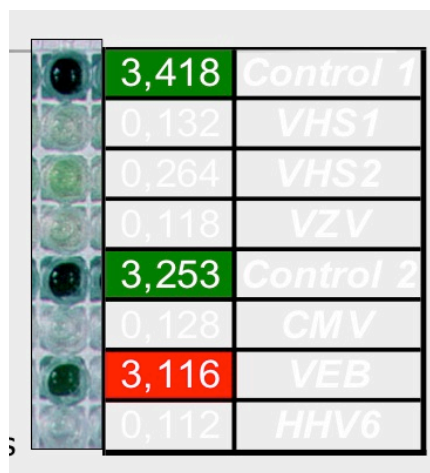


Fig. 8. Visualización de Virus Herpes tras detección molecular por PCR semicuantitativa.

5.2 PCR real time mediante el Kit CMV R-gene™ ref 69-003.

El Kit CMV R-gene™ de Argene (Varilhes, France) permite la determinación rápida de la carga viral de CMV por medio de una gamma estándar, de un control interno contra testigos de inhibición y testigos negativos incluidos. La carga viral de CMV se mide mediante una cuantificación incluida en el kit y se expresan en número de copias por mililitros de muestra. La técnica empleada es la de la PCR en tiempo real tras la extracción del ADN viral de las mismas muestras fijadas en parafina y positivas mediante PCR semicuantitativa para CMV.

○ GAMA ESTÁNDAR Y TESTIGOS

Es imprescindible la utilización del rango de estándares cuantitativos internos para la cuantificación de las muestras.

- Estándares de cuantificación internos (QS1, QS2, QS3, QS4):
 - Los estándares de cuantificación son utilizados para generar una curva estándar, a partir de la cual se calcula la carga viral.
 - Cada uno de los cuatro puntos de la gama estándar se compone de plásmido específico de CMV.
 - Los estándares de cuantificación se denominan “estándares”, y sus concentraciones respectivas deben de ser especificadas durante el registro de las muestras en el software de análisis de datos.

- Control de sensibilidad (SC)

- El control de sensibilidad (SC) contiene un plásmido específico del CMV.
- El control de sensibilidad para CMV se compone de la premix de amplificación R5 y del reactivo SC.
- Sometido a test sistemáticamente, el testigo de sensibilidad (SC) permite controlar el correcto desarrollo del experimento de cuantificación de CMV. No obstante, este testigo equivale a una muestra débilmente positiva, por esta razón podrá salir negativo ocasionalmente.

- Controles de extracción e inhibición

- Control de extracción + inhibición de la muestra (IC2sample) a 560nm.

Este control se añade a las muestras de pacientes, extraído y amplificado con el fin de controlar la eficacia de la extracción y detectar la posible presencia de inhibidores. Su señal se detecta a 560 nm.

- Controles negativos

- El control negativo extracción amplificación (IC2W0) a 530nm.

Se trata del mismo tubo descrito en control de extracción + inhibición de referencia pero cuando la lectura se hace a 530nm constituye un testigo negativo que permite verificar la ausencia de contaminación en la extracción y amplificación. Su señal se detecta a 530nm.

- PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN.

Para esta determinación utilizamos el mismo ADN que habíamos extraído para realizar la PCR semicuantitativa

- AMPLIFICACIÓN

La amplificación se realizó mediante la técnica de las sondas de hidrólisis 5 nucleasa TaqMan® (nº de patente: 5210015, 5487972). Las mezclas de amplificación están listas para su uso y contienen los dNTPs, el tampón de amplificación, la Hot StarTaq® Polymerasa (QIAGEN), así como las sondas y los

primers específicos de cada uno de los parámetros virales y de control interno (IC2) introducido desde el momento de la extracción.

El programa de amplificación es el siguiente (AB Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 2700):

ETAPAS	DURACIÓN	TEMPERATURA	CICLOS
Activación Hot Start taq polimerasa	15 min	95°C	1
Amplificación:			
Desnaturalización	10 seg	95°C	45
Hibridación-Elongación	40 seg	60°C	
Refrigeración (opcional)	30 seg	40°C	1

Los resultados cuantitativo se expresan en número de copias virales/de muestra. La gama de cuantificación para el CMV es lineal con 500 copias/mL a 10^7 copias/mL, es decir, 10 copias/PCR a 200.000 copias/PCR. Los resultados se validan gracias al control de extracción, al control de inhibición y a los controles positivos y negativos proporcionados con el Kit de extracción CMV R-gene™.

○ UTILIZACIÓN DE LOS RESULTADOS

El análisis de los datos fue realizado con la plataforma 2700 de Applied Biosystems:

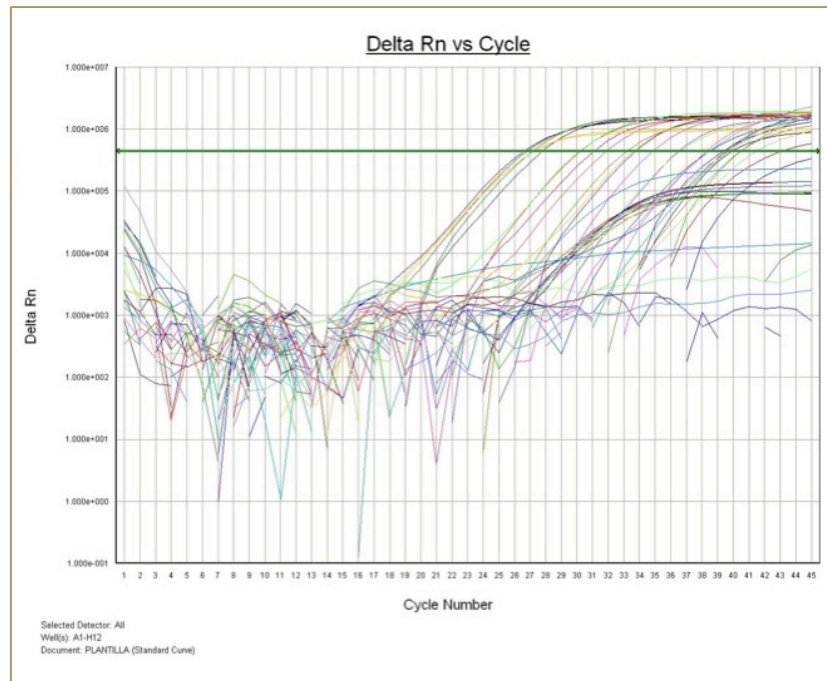


Fig. 9. Gráfica de curvas de la rtPCR.

6 DETECCIÓN DE VIRUS DE LA FAMILIA HERPES MEDIANTE TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN IN SITU.

Es utilizado para la identificación cualitativa de transcripciones tempranas de RNA de genes de citomegalovirus humano en tejidos fijados en formol e incluidas en parafina (Wu, 1992), mediante hibridación *in situ* (ISH). El método es reproducible y debe dar lugar a una tinción intensa, predominantemente citoplasmática, de color marrón, de las células que contienen RNA de genes tempranos de CMV.

Preparación de las muestras: Los cortes de tejido fijado en formol e incluidas en parafina fueron pretratados con proteinasa K durante 15min a temperatura ambiente.

Hibridación: Durante dos horas a una temperatura de 37°C, para después pasar al proceso de conjugado durante 15 minutos a temperatura ambiente. Ponemos en contacto con el polímero durante 8 minutos también a temperatura ambiente y por último, el DAB 10 minutos a temperatura ambiente.

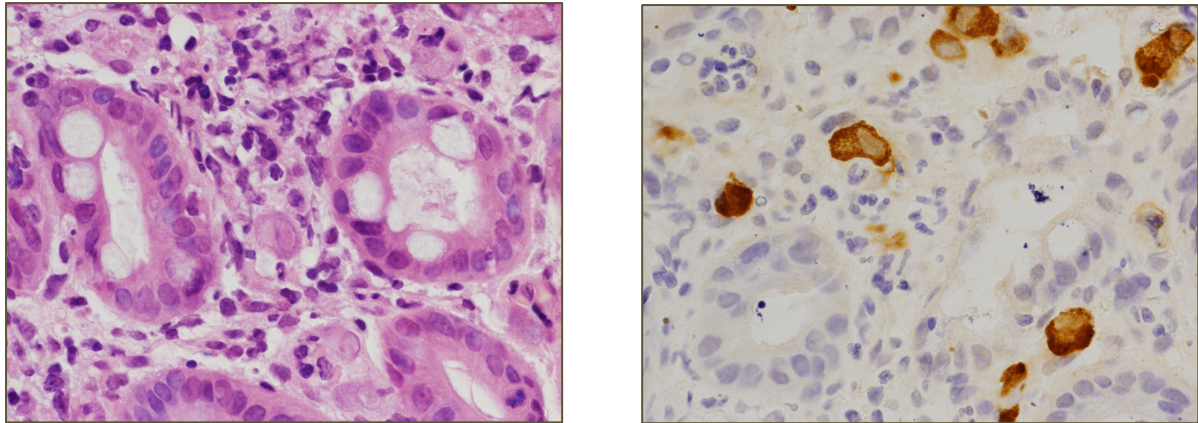


Fig. 10. Imágenes de inclusiones virales de CMV en la lámina propia de la mucosa de colon con HE (izquierda) y tras técnicas de hibridación in situ para CMV (derecha).

7 OBSERVACIÓN SOBRE TEJIDO DE DATOS HISTOLÓGICOS SOSPECHOSOS DE INFECCIÓN POR VIRUS Y TIPO DE VIRUS DE LA FAMILIA HERPES: APOPTOSIS, VASCULITIS (ESTIGMAS DE INFECCIÓN).

Se han estudiado todas las biopsias que han resultado positivas para alguno de los virus de la familia Herpes y también las biopsias negativas para los virus estudiados, independientemente al patólogo que realizó el diagnóstico. Lo que se pretendía era buscar datos objetivos que nos hicieran sospechar de la presencia de virus, además de las claras inclusiones del CMV o el Herpes. Se hizo hincapié en las apoptosis glandulares, en las mitosis dentro de las células epiteliales de las glándulas y en las vasculitis de la lámina propia del colon.

Se ha pretendido ser estricto en estos criterios y excluir aquellas apoptosis que nos hicieran confundir con polimorfonucleares en las glándulas y las dudosas imágenes de vasculitis.

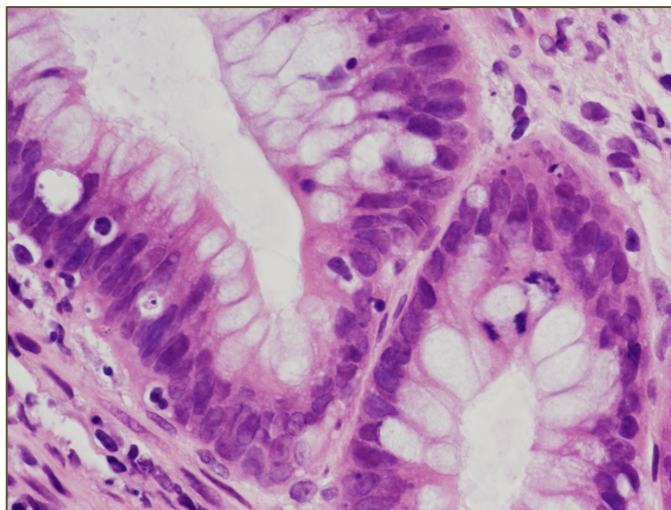


Fig. 11. Dos glándulas de colon que muestran apoptosis y mitosis.

8 RECOGIDA DE DATOS DE SEROLÓGICOS.

Se ha indagado en la historia clínica de cada paciente para conocer los datos serológicos de los pacientes para conocer la presencia o no de virus de la familia Herpes en sangre. Nuestro objetivo es conocer la presencia de estos virus en tejido, pero se ha investigado este dato serológico en la misma fecha en la que se realizó la biopsia endoscópica o la resección de la pieza quirúrgica para su correlación. En ningún momento se ha interferido con el procedimiento habitual por parte de médicos y enfermos con este tipo de enfermedad. Se ha seguido el procedimiento habitual y nosotros hemos recogido retrospectivamente los datos de la historia clínica, por lo que no siempre contamos este dato serológico.

9 RECOGIDA DE OTROS.

De la misma forma se han recogido la información del número de hematíes, hemoglobina, hematocrito, linfocitos, VCM, HCM, plaquetas y proteína C reactiva de los análisis de sangre realizados al paciente en la misma fecha en la que se le practicó la endoscopia o la resección de la pieza quirúrgica.

10 SEGUIMIENTO DE LOS TRATAMIENTOS DE CADA PACIENTE EN RELACIÓN A CADA BIOPSIA.

Se estudió detenidamente cada historia clínica para conocer los tratamientos de cada paciente. El tratamiento habitual, es decir, lo que tomaba el paciente hasta la fecha en la que se realizó la biopsia o la resección quirúrgica. Con estos datos se pretende conocer el grado de inmunosupresión del paciente o si ciertos fármacos predisponen la reactivación o aparición de algún tipo de virus de la familia Herpes. Así mismo, se recogieron los datos farmacológicos al alta del paciente. Sobre todo en relación a fármacos antivirales. Si tras PCR positivas, en tejido, para los virus de la familia Herpes los pacientes habían recibido fármacos antivirales o no. Y si estos fármacos habían mejorado la clínica de cada paciente.

11 REVISIÓN DE LA HISTORIA CLÍNICA DE CADA PACIENTE PARA NUEVOS DATOS: GEN NOD2 EN CASO DE ENFERMEDAD DE CROHN, MANIFESTACIONES EXTRADIGESTIVAS, COLECTOMÍAS PREVIAS A 2005, AMILOIDOSIS Y COLITIS LINFOCÍTICAS, ESTAS DOS ÚLTIMAS RELACIONADAS CON LA TOMA DE INFLIXIMAB.

El objetivo de nuestra tesis no era este, pero al ser un estudio retrospectivo hemos indagado en la historia clínica de cada uno de los 103 pacientes y hemos podido, en algunos casos, conocer estos datos.

12 NÚMERO DE EPISODIOS DE INGRESO DE CADA PACIENTE Y EL NÚMERO EN DÍAS DE ESTANCIA HOSPITALARIA EN LA UNIDAD DE DIGESTIVO Y MEDICINA INTERNA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA.

Se ha recurrido a la historia clínica tanto en papel como la historia digitalizada de cada paciente, además de los programas informáticos del propio hospital, para recabar dicha información, no sólo los números de ingresos anuales sino también los días de estancia por cada episodio.

13 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se generó una base de datos empleando el paquete estadístico SPSS versión 15. Para la descripción de las variables cualitativas se emplearon los porcentajes con los intervalos de confianza del 95% para las variables principales. En las variables cuantitativas se comprobó el ajuste de los datos a la distribución normal por medio del test de Kolmogorov-Smirnov; empleando según los casos, la media aritmética y la desviación estándar o la mediana y los percentiles P25 y P75.

Para evaluar diferencias entre grupos para variables cualitativas se empleó el test de Chi cuadrado o el test de Fisher. Para evaluar las diferencias entre dos grupos para variables cuantitativas se realizara por medio de los test de t de Student o la U de Mann-Whitney; para comprobar diferencias entre tres o más grupos se empleó el análisis de varianza o el test de Kruskal-Wallis.

En la evaluación de la concordancia entre test diagnósticos empleamos el índice Kappa, además se calculó el área bajo la curva (ABC) de la características operativas del receptor (ROC), tomando como test de referencia los resultados de la colectomía, en la comparación del ABC de dos curvas ROC empleamos el procedimiento de DeLong (DeLong, 1988); para la estimación y representación gráfica de las curvas ROC se empleó el software MEDCALC versión 12.7.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

14 REALIZACIÓN DE UNA TABLA EXCEL CON TODOS LOS DATOS ARRIBA MENCIONADOS (ANEXO I). EN CD ADJUNTO.

4. RESULTADOS

4.1 OBJETIVOS PRINCIPALES

OBJETIVO 1: EVALUAR LA IMPORTANCIA PRONÓSTICA DE LA PRESENCIA DE LA AMPLIFICACIÓN DE VIRUS DE LA FAMILIA HERPES EN TEJIDO EN PACIENTES CON EII.

PRESENCIA VIRAL POR MÉTODOS SEMICUANTITATIVOS

Se analizaron por PCR semicuantitativa 16 biopsias correspondientes a 16 pacientes que no tenían enfermedad inflamatoria intestinal y que fueron biopsiados por otras razones (patología benigna, pólipos de colon). El resultado fue de ausencia de amplificación efectiva para todos los virus Herpes en las 16 muestras de colon fijadas en formol e incluidas en parafina.

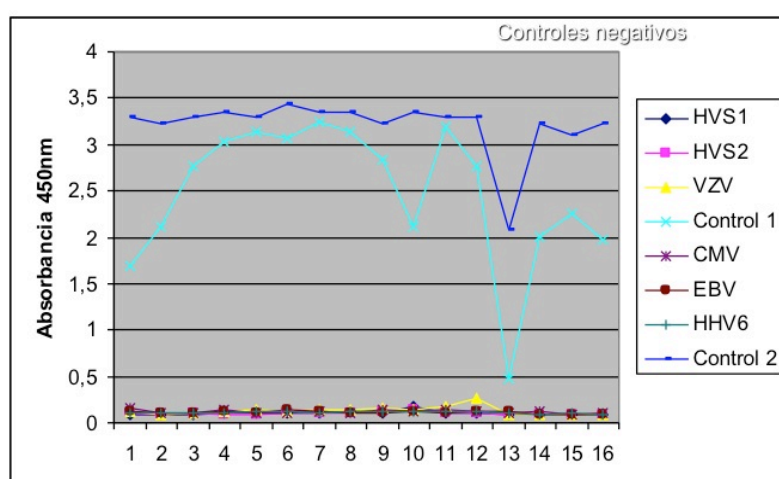


Fig. 12. Amplificación de 16 controles de mucosa colónica sin EII.

De las 201 biopsias analizadas por PCR semicuantitativa para la evaluación de presencia viral 79 casos resultaron negativos para todos los tipos incluidos en el ensayo (39,3%) y 122 biopsias mostraron positividad para alguno de ellos (60,7%). En cuanto a la distribución viral, se encontraron casos con Virus de Epstein Barr (EBV), Citomegalovirus (CMV), Virus herpes simple tipo 1 (VHS1), Virus herpes simple tipo 2 (VHS2) y Virus herpes humano tipo 6 (VHH6). No encontramos ningún caso en el que se apreciara amplificación del Virus Varicela Zóster. Es decir, un porcentaje importante de las biopsias de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal mostraron amplificación mediante técnicas moleculares para alguno de los

tipos de virus de la familia herpes en la mucosa del colon obtenida por técnicas endoscópicas o quirúrgicas.

TABLA 7. DISTRIBUCIÓN DE HALLAZGOS EN LA PCR SEMICUANTITATIVA

	FRECUENCIA	PORCENTAJE	IC
PCR NEGATIVA	79	39,3	32,3-46,3
PCR POSITIVA	122	60,6	53,7-67,7
1 VIRUS	89	44,3	37,2-51,4
2 VIRUS	29	14,4	9,3-19,5
3 VIRUS	4	2	0,5-5,0
TOTAL	201	100	

Un porcentaje importante de los casos analizados por PCR semicuantitativa resultaron positivos para algún tipo de virus de la familia herpes humano (60,6%). Resulta llamativo, asimismo, la frecuente asociación entre tipos con un 27% de todos los casos positivos en los que aparecían en combinación. Sólo cuatro biopsias presentaron replicación por tres tipos virales a la vez. No se encontró ninguna biopsia en la que amplificara más de tres tipos.

En cuanto a la distribución de tipos virales encontrados en el tejido de pacientes con EII es la siguiente, teniendo en cuenta que existen casos de positividad múltiple, con lo que la tabla indica los casos en los que aparece cada tipo viral y los porcentajes están considerados con respecto al total de biopsias analizadas, sean estas positivas o negativas. Es decir, por ejemplo en el caso del CMV, en nuestra serie aparece en el 26,4% de todas las biopsias.

TABLA 8. DISTRIBUCIÓN DE TIPOS VIRALES EN LAS BIOPSIAS

	BIOPSIAS	%	IC
VEB	78	38,8	31,8-45,8
CMV	53	26,4	20,0-32,7
HHV6	17	8,5	4,4-12,6
VHS1	9	4,5	1,4-7,6
VHS2	2	1	0,1-5,6

Como se observa en la Tabla 8. El virus más frecuentemente encontrado fue el VEB, seguido del CMV y los virus herpes simples.

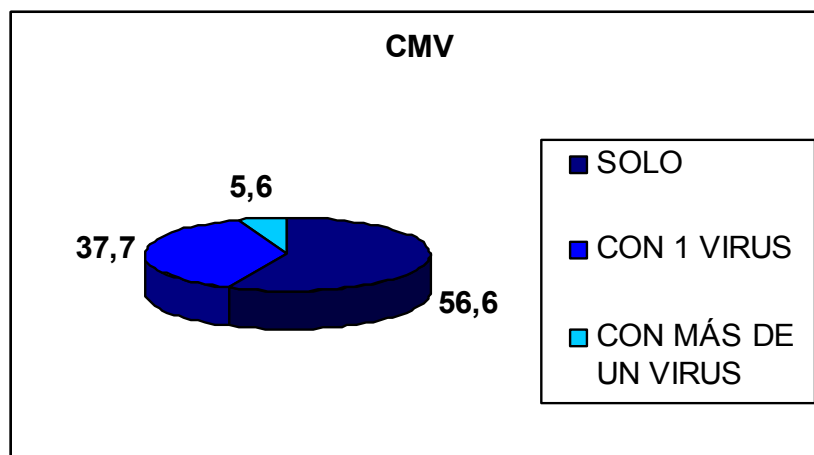


Fig. 13. Representa los porcentajes en los que el CMV aparece sólo en las biopsias, con un virus o con más virus.

El CMV aparece en el 26,4% de las 201 biopsias analizadas. En un porcentaje apreciable de casos (56%) lo hace de forma aislada sin asociación con otro tipo de la familia del virus herpes, como indica la figura 13. Sin embargo, este dato puede ser leído asimismo como que un importante número de casos positivos para CMV (44%) muestran amplificación asimismo de otro tipo viral con lo que los mecanismos de reactivación viral parecen ser comunes en tejido de pacientes con EII.

TABLA 9. NÚMERO Y PORCENTAJE DE VIRUS POR BIOPSIAS

	CU		CROHN	
	n	%	N	%
PCR NEGATIVA	57	34,80%	22	61,80%
PCR POSITIVA	108	65,20%	14	38,20%
1 VIRUS	78	47,60%	11	29,40%
2 VIRUS	26	15,20%	3	8,80%
3 VIRUS	4	2,40%	0	0%

Si analizamos los virus por la histología, según el diagnóstico clínico sea de CU o EC, observamos que es más frecuente encontrar amplificación viral en las biopsias de CU (65,2%, IC:57,7-72,8) que en la EC (38,20%; IC:20,4-56,0), siendo estadísticamente significativo ($p < 0,005$). En el caso de la EC, además, es mucho menos frecuente la positividad para varios tipos virales en la misma biopsia, lo que

puede estar relacionado con el nivel de inmunosupresión diferente alcanzado por los tratamientos en ambas enfermedades.

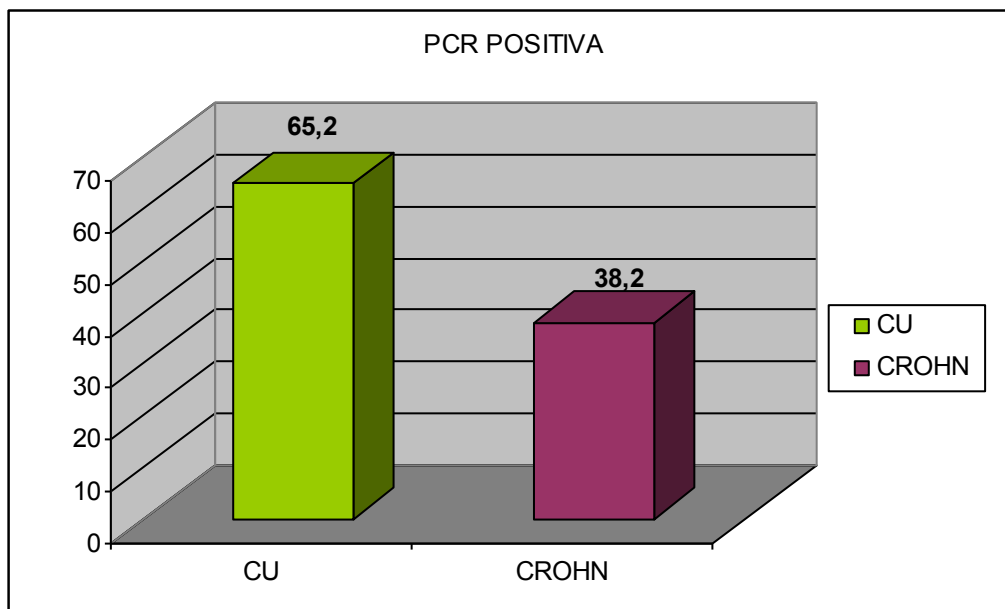


Fig. 14. PCR positivas para virus de la familia herpes en CU y EC.

En la figura 14 se indica el porcentaje de virus de la familia herpes mediante técnica de PCR tanto en la CU como en la EC. El dato es estadísticamente significativo ($p < 0,005$).

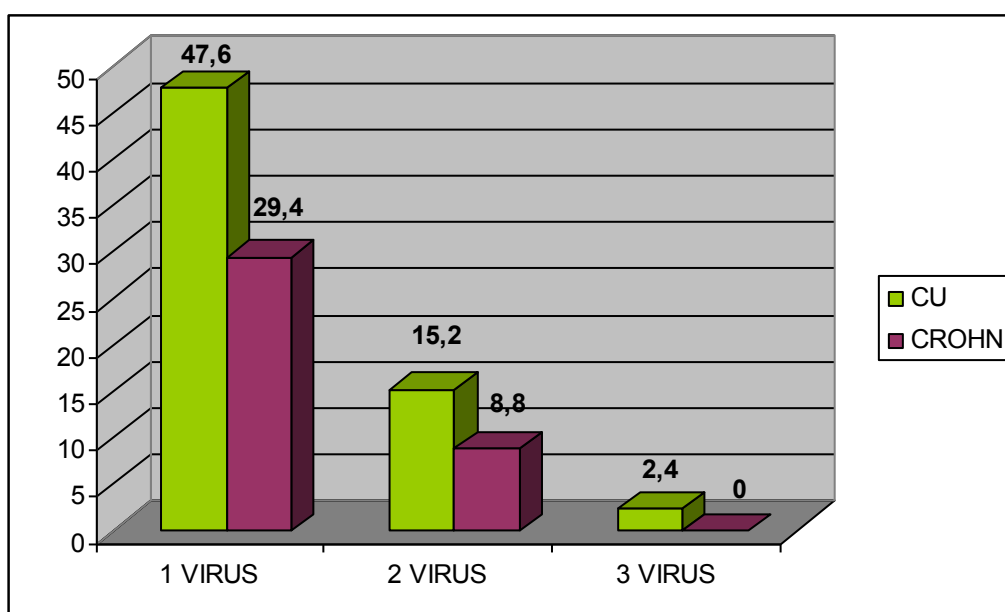


Fig. 15. Presencia de uno o más virus de la familia herpes por PCR en la CU y EC.

El porcentaje de virus de la familia herpes es siempre mayor en la CU que en la EC, casi el doble tanto para la presencia de un virus, de dos virus o de tres. Los datos son estadísticamente significativos para el primer grupo (un virus), $p < 0,05$. Para dos virus y tres virus no son estadísticamente significativos, probablemente a que la n es muy pequeña.

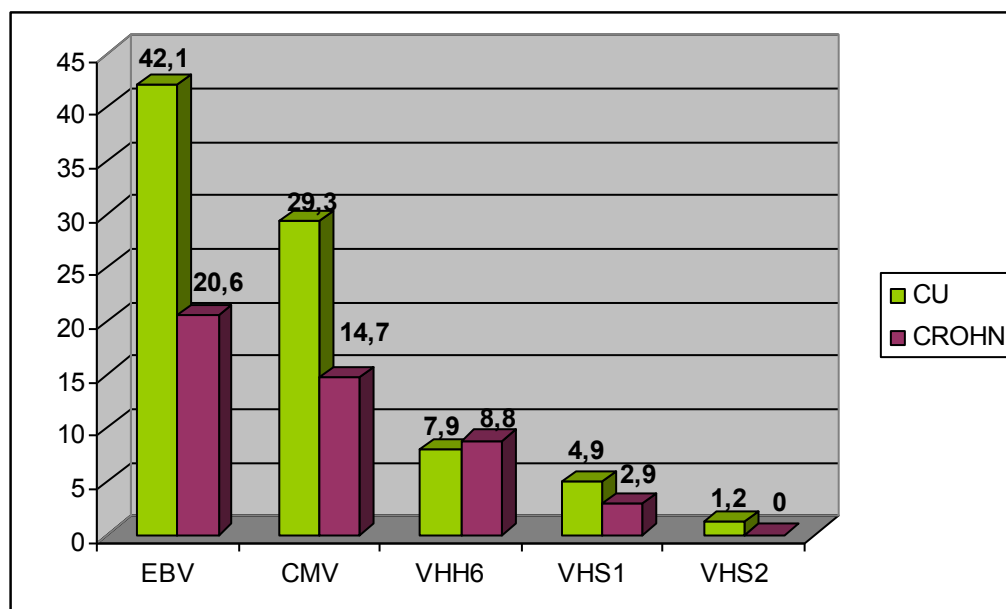


Fig. 16. Presencia de cada virus en la CU y EC.

La figura 16 presenta los datos de porcentaje de biopsias que han resultado positivas para cada tipo viral. Como se aprecia, todos los tipos de virus son más frecuentes en la CU que en la EC. La única excepción se da con el HHV6 que es incluso ligeramente más frecuente en el caso de la EC.

El VEB es el virus que aparece más frecuentemente en la CU, seguido del citomegalovirus (CMV). Los datos de positividad diferente en los dos tipos de EII sólo son estadísticamente significativos ($p < 0,05$) en el caso del VEB, si bien esto puede ser debido al escaso número de biopsias de enfermos con EC.

DÍAS DE INGRESO

La mayoría de los procesos donde se realizó toma de biopsia no conllevaron ingreso. Fueron endoscopias de control, realizadas en consultas con alta al mismo día, no por un brote que obligó al ingreso del paciente.

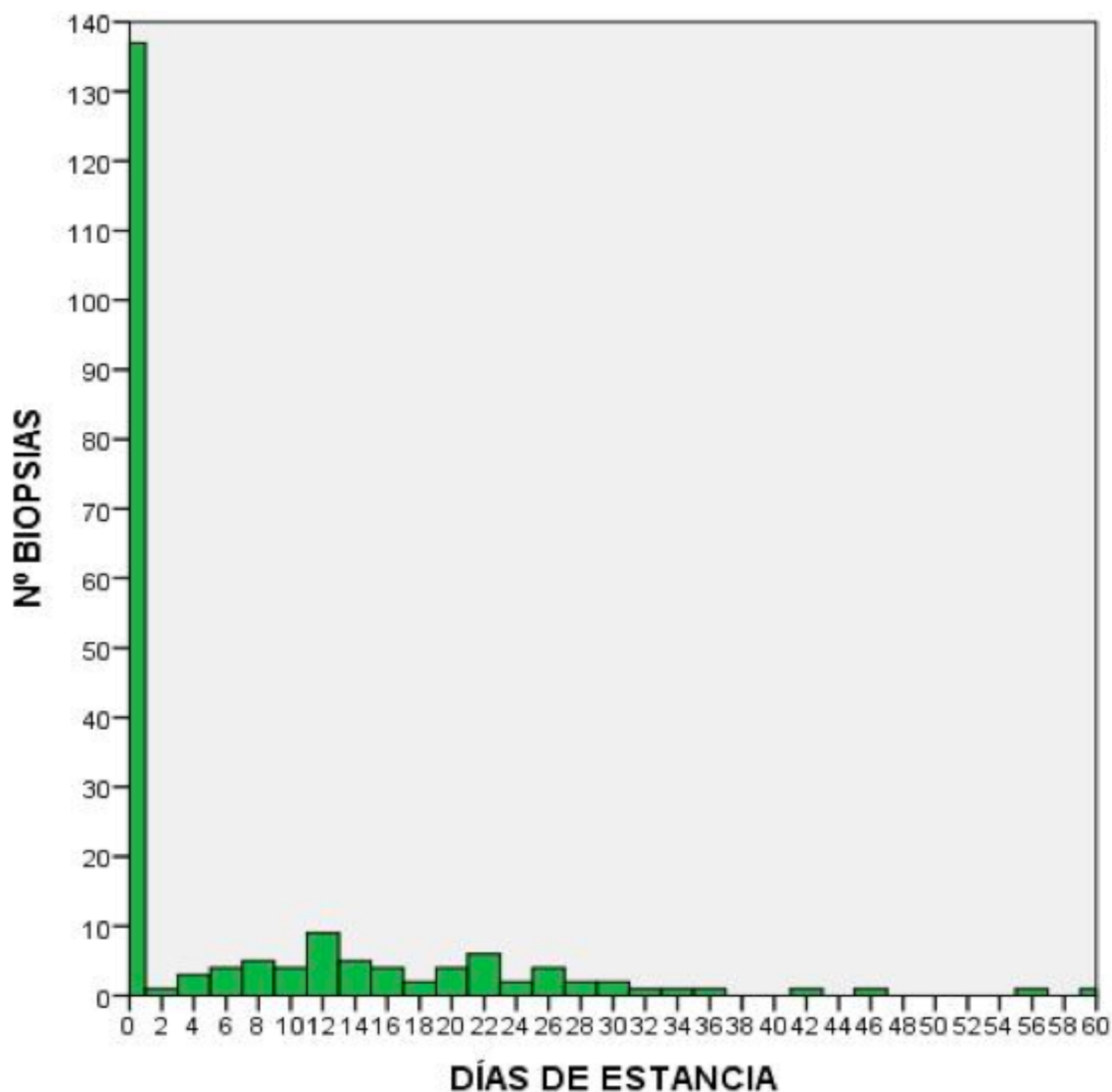


Fig. 17. Días de estancia asignadas por cada biopsia.

Como se indica en la figura 17, 137 biopsias de un total de 201 no conllevaron ingreso del paciente (68,16% biopsias). La distribución de los tiempos de ingreso hospitalario asociados a cada episodio con biopsia se detalla en la siguiente figura. El máximo de días de estancia en uno de los episodios fue de 60 días.

Si mostramos sólo las biopsias que estuvieron asociadas a ingreso hospitalario, (64 biopsias lo que supone un 31,84% del total de biopsias analizadas) observamos que el mínimo tiempo de ingreso fueron dos días y el máximo 60 días con una distribución normal. La media fue de 19,05 días, la mediana de 15,50 días y el percentil 75 de 24,75 días.

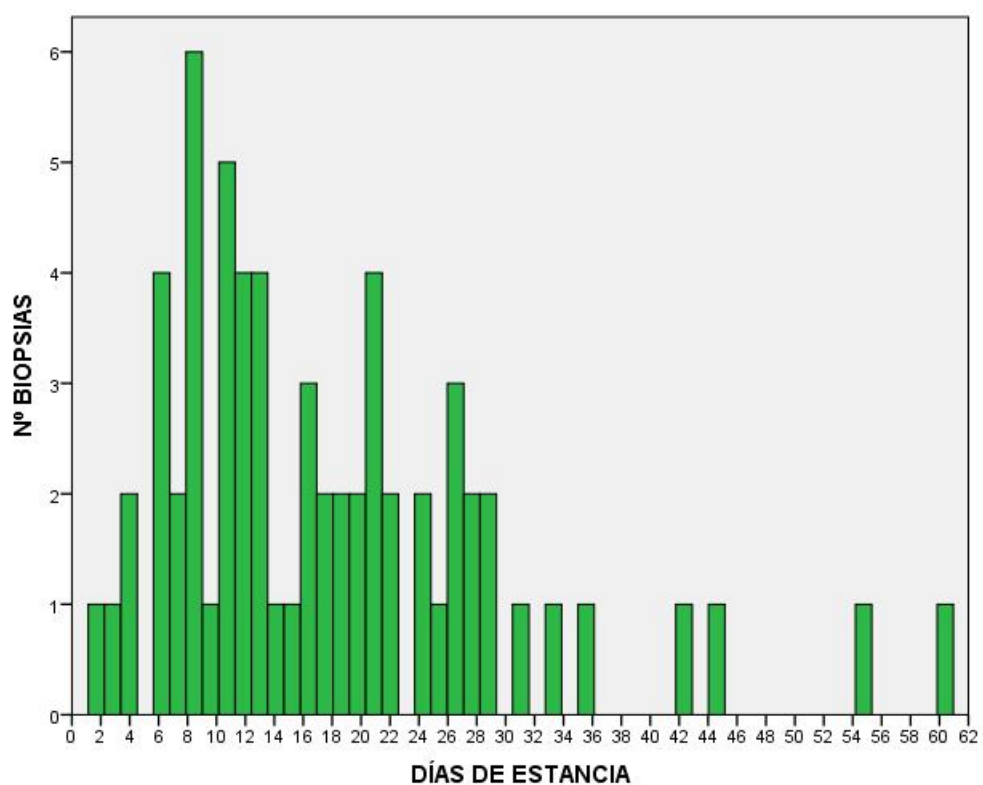


Fig. 18. Días de estancia para sólo aquellas biopsias que conllevaron ingreso.

Media: 18 Desviación típica: 12,075 (sobre una N: 63).

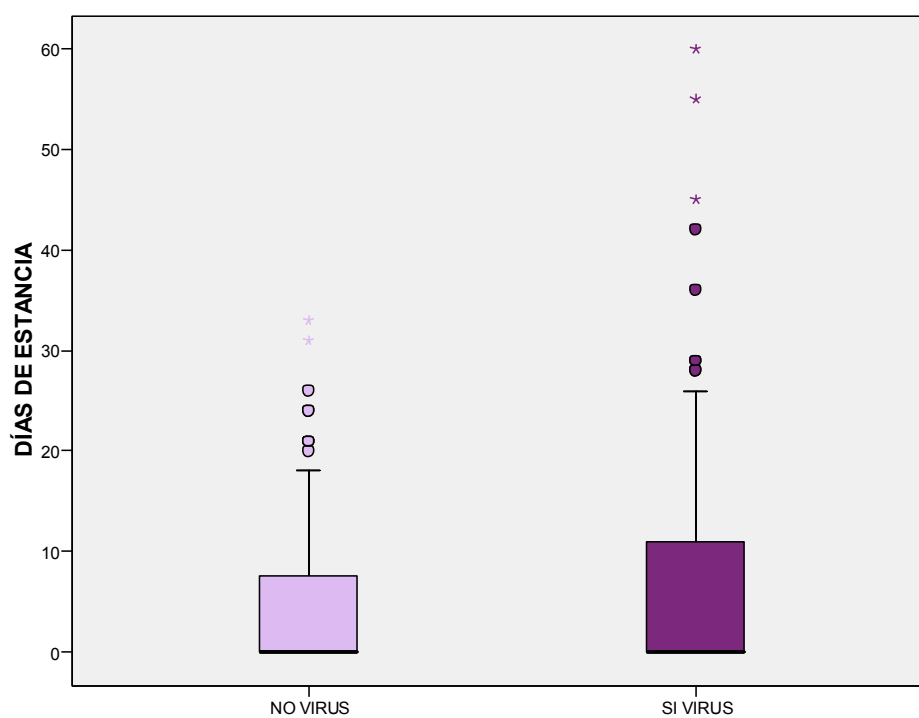


Fig. 19. Días de estancia para biopsias con virus y sin virus.

El análisis de la estancia hospitalaria asociada con la presencia o ausencia de positividad en la PCR para agentes virales en tejido revela que la mediana, de días de estancia asociados a las biopsias (analizadas como episodios independientes), para los dos grupos de biopsias (positivas y negativas en el análisis viral) fue en ambos casos cero (0) días, debido a que la inmensa mayoría de las biopsias se realizaron de manera programada en consulta sin que el enfermo precisara ingreso hospitalario.

Sin embargo, el análisis de la media aritmética de estancia de los pacientes sin virus en sus biopsias fue de 4,75 días y de 6,38 días para los pacientes con positividad para virus en sus biopsias. Observamos también en esta misma figura, que el percentil 75 de las biopsias con virus fue de 11 días respecto a los 8 días de las biopsias sin virus. Los datos no son estadísticamente significativos ($p>0,05$), si bien se aprecia una tendencia al mayor tiempo de estancia hospitalaria para los pacientes con presencia de replicación viral detectada por PCR en sus biopsias.

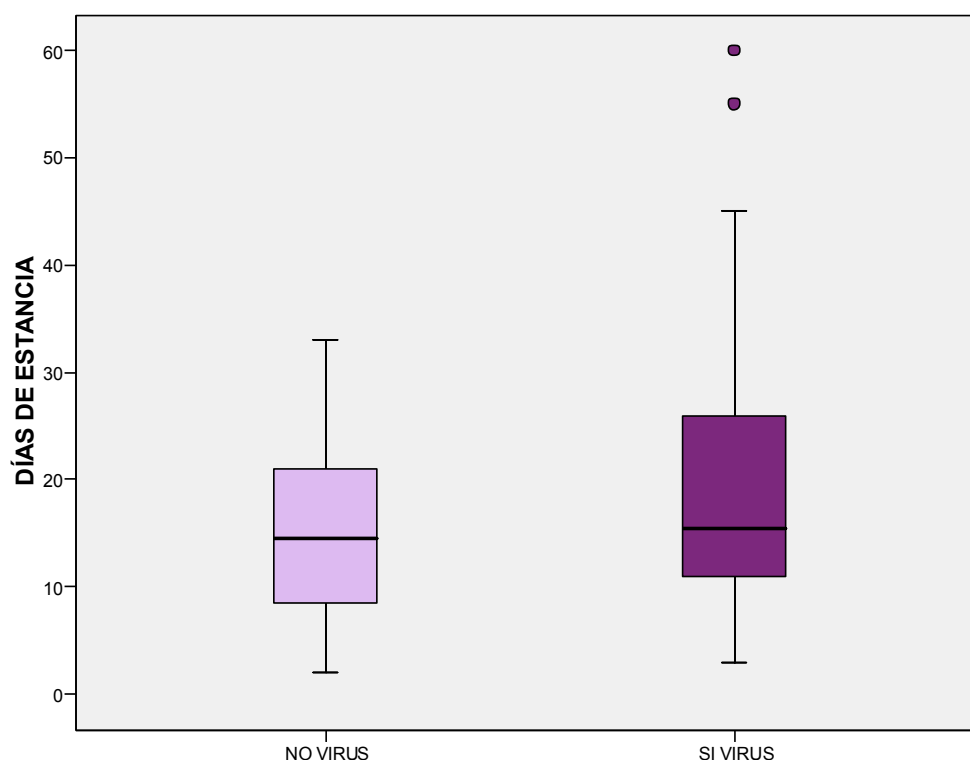


Fig. 20. Días de estancia para las biopsias, con virus y sin virus, que conllevaron ingreso.

Debido al elevado número de pacientes a los que se realizó la biopsia de manera programada en consulta sin ingreso se analizaron todos los episodios de biopsia en los que el paciente sí precisó de ingreso hospitalario. En este grupo de pacientes (64), observamos que la mediana es mayor para los pacientes con positividad en la PCR para virus (15,50 días) que en el caso de aquellos negativos en el análisis molecular (14,50 días). La media también es ligeramente superior para las biopsias que sí tenían virus (15,63 días frente a 19,45 días). El percentil 75 para los que no están asociados a positividad viral es de 21 días y para las biopsias con virus de 26 días. Los datos no son estadísticamente significativos ($p>0,05$).

Se realizaron los estudios diferenciando tipos virales y agrupando los datos por pacientes para evaluar el posible efecto diferencial del CMV sobre otros tipos con escasa patogenicidad y el papel de la presencia latente de CMV con picos de replicación en la evolución de los pacientes.

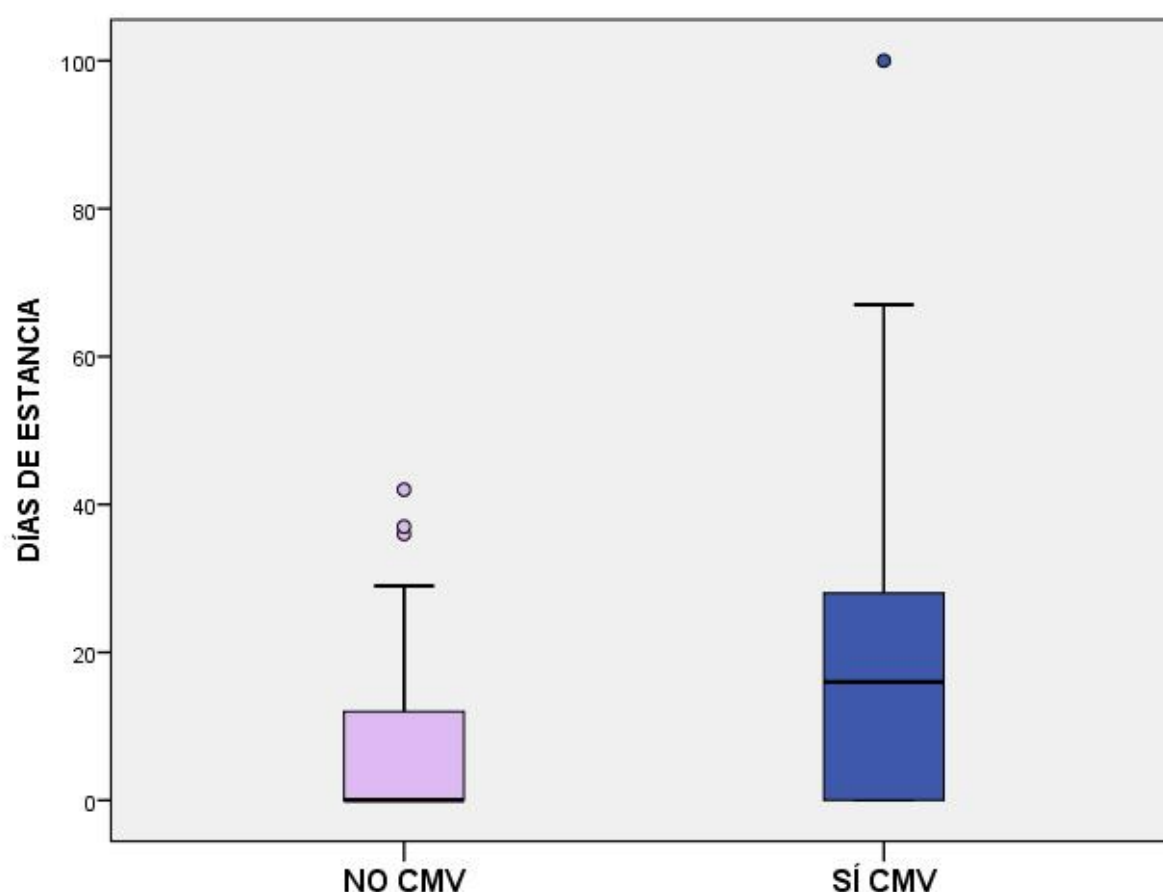


Fig. 21. Días de estancia por pacientes dependiendo si tenían historia de picos de replicación viral de CMV o no.

Esta figura indica los días de estancia por paciente para aquellos pacientes que no tienen ningún virus a lo largo de su evolución y para aquellos pacientes que tienen positividad para CMV en alguna de sus biopsias. De los 102 pacientes, tuvieron episodios de CMV 33 pacientes (32,35%) y 69 pacientes no (67,65%).

La mediana para los pacientes sin virus, eran cero días de ingreso (la mayoría no ingresaban y se trataba de biopsias realizadas de manera programada en consultas) mientras que para los pacientes con CMV son 16 días. Por tanto la mayor parte de los casos asociados a CMV mostraban sintomatología que obligó a ingreso y toma de biopsia fuera de programa.

La media de días de estancia para los pacientes sin virus es 7,12 días y para los pacientes con CMV es de 20,06 días. El percentil 75 es de 12,50 días para los pacientes sin virus y 34,50 días para los pacientes con CMV. Estos datos son estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

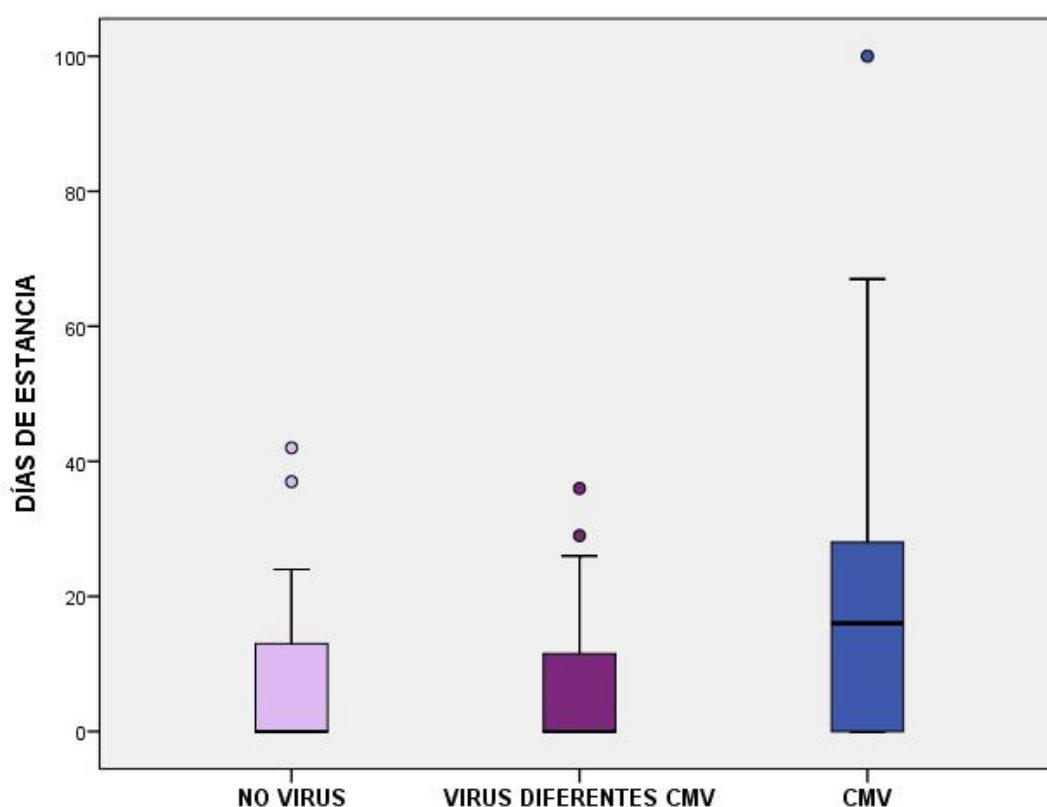


Fig. 22. Días de estancia por paciente según tengan historia de CMV, otros virus o ningún virus.

El análisis realizado era de pacientes con CMV en alguna de sus biopsias frente a los casos en los que ninguna de las determinaciones resultó positiva para CMV. Sin embargo, los pacientes podrían haber resultado positivos para alguno de los virus de la familia herpes no CMV. Por tanto realizamos el mismo análisis para este tipo de pacientes, dividiéndolos en tres grupos, negativos para cualquier tipo viral a lo largo del seguimiento, positivos para CMV y positivos para alguno de los tipos virales analizados diferentes al CMV.

Hemos observado que los pacientes que tienen CMV tienen estancias hospitalarias más largas que los pacientes sin virus y además sufren más días de estancia que los pacientes con virus diferentes al CMV, es decir, virus VEB, VHH6, VHS1 y VHS2. Estos últimos virus se comportan de forma parecida a los pacientes que no tienen virus en el análisis estadístico de relación con días de ingreso hospitalario. Esta diferencia del CMV tanto a los pacientes sin presencia viral como a los que presentan virus diferentes al CMV fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

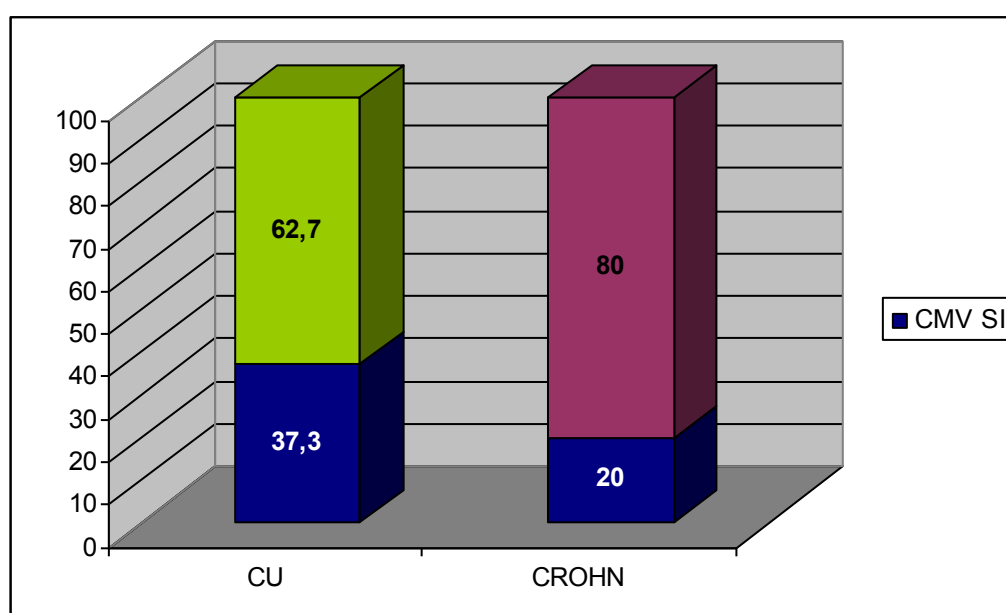


Fig. 23. Presencia de CMV en la CU y EC.

En cuanto a la relación con el tipo de EII de los diferentes tipos virales, nos hemos centrado en el análisis de CMV, y así de los 33 pacientes que mostraron en algún momento picos de replicación asociados a positividad de PCR para CMV, 28 pacientes eran enfermos de CU mientras que cinco lo eran de EC.

Del total de pacientes incluidos en el estudio, un 37,3% de enfermos con CU han mostrado biopsias con positividad para CMV en algún momento de su seguimiento (IC:25,7-49,0), mientras que en el caso de la EC dicho porcentaje es de un 20% (IC:6,8-40,7). Es decir, uno de cada tres (1/3) pacientes de CU ha mostrado positividad para CMV en sus biopsias en algún momento de su enfermedad, mientras que para la EC el porcentaje es de uno de cada cinco pacientes (1/5). No es estadísticamente significativo ($p>0,05$) pero el riesgo de presencia de CMV en los pacientes con CU fue casi el doble respecto a los pacientes con EC. El RR es de 1,97; IC: 0,81-4,8.

COLECTOMÍAS Y PRESENCIA VIRAL

Las piezas quirúrgicas de las colectomías subtotales o totales de los pacientes con EII también fueron analizadas con la misma metodología para comprobar la presencia o ausencia de positividad en la PCR semicuantitativa para virus. De los 102 pacientes incluidos en el análisis, nueve fueron intervenidos quirúrgicamente mediante colectomía total. Siete piezas quirúrgicas de colectomía (7/9) mostraron positividad para alguno de los tipos virales analizados mientras que las dos restantes resultaron negativas.

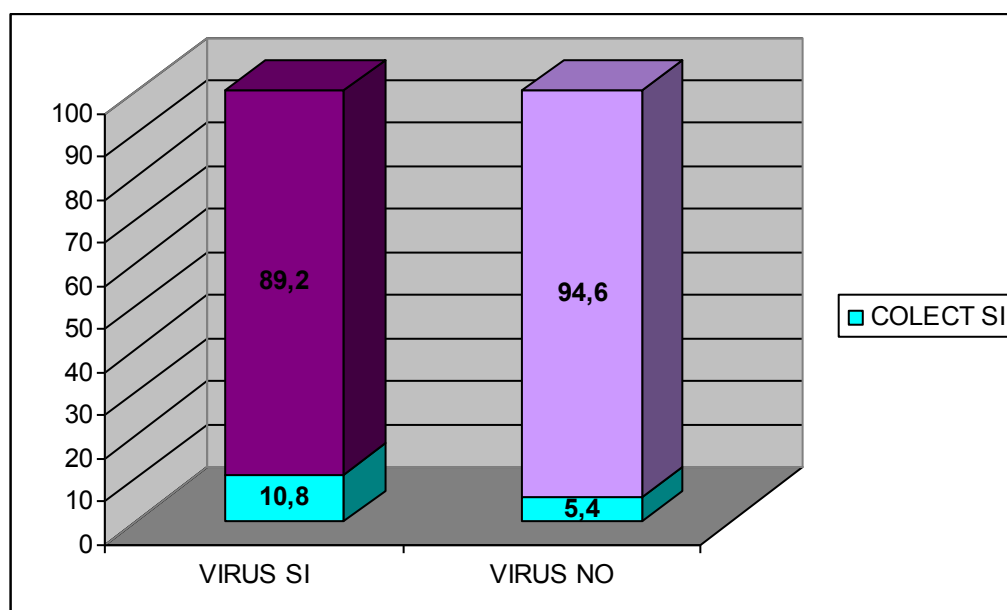


Fig. 24. Porcentaje de colectomías y positividad viral.

En el análisis de la presencia viral como agente predisponente a la necesidad de procedimientos quirúrgicos agresivos en la EII, observamos que de aquellos pacientes que habían mostrado algún episodio de positividad viral en algún momento de su evolución un 10,8% precisó de una colectomía frente al 89,2% que no fueron intervenidos quirúrgicamente y tuvieron control únicamente farmacológico. Sin embargo, entre aquellos pacientes que nunca mostraron ningún episodio de positividad viral el 5,4% precisó de colectomía y un 94,6% no fue intervenido quirúrgicamente.

Estos datos no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$) probablemente debido a la escasez de pacientes en ambos grupos y a que la potencia del contraste es del 12%. Recalamos, sin embargo, que el porcentaje de pacientes que precisó de un tratamiento agresivo como es la colectomía fue del doble en los enfermos con positividad viral en algún momento de su evolución.

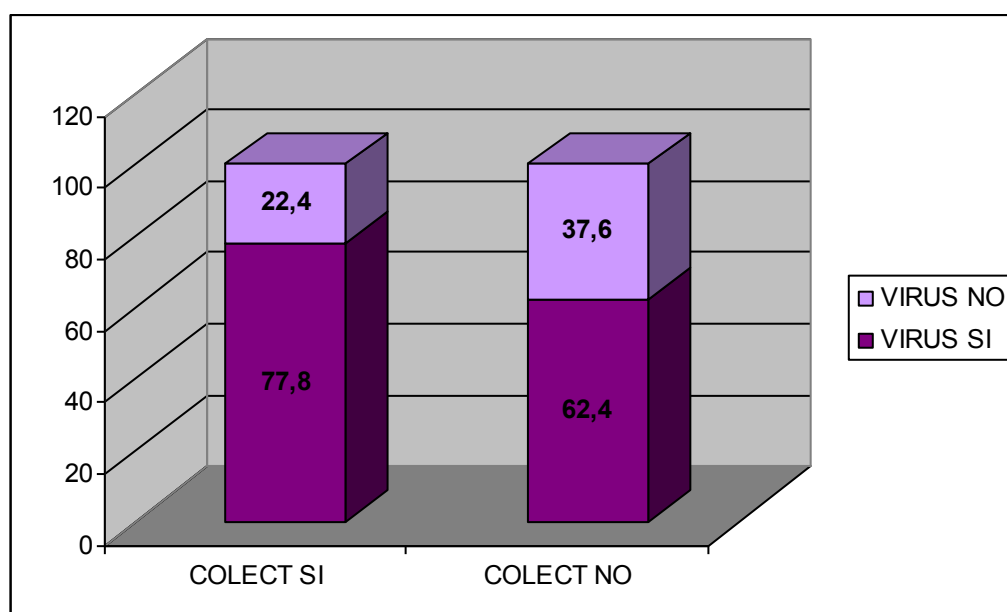


Fig. 25. Representa las colectomías y la presencia viral en las mismas.

En el análisis de las piezas quirúrgicas de colectomía, la mayoría (77,8%; IC:40,0-97,1) resultaron positivas para la PCR frente a un 22,4% (IC:52,0-72,8) que no lo tienen. Los resultados no son estadísticamente significativos. El porcentaje de piezas quirúrgicas positivas en el análisis molecular para virus es mayor que las biopsias de toda la serie si bien como comentamos los resultados no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$).

Y si miramos las colectomías atendiendo al tipo de virus al igual que para los días de estancia. Lo reflejamos en la figura 26, abajo:

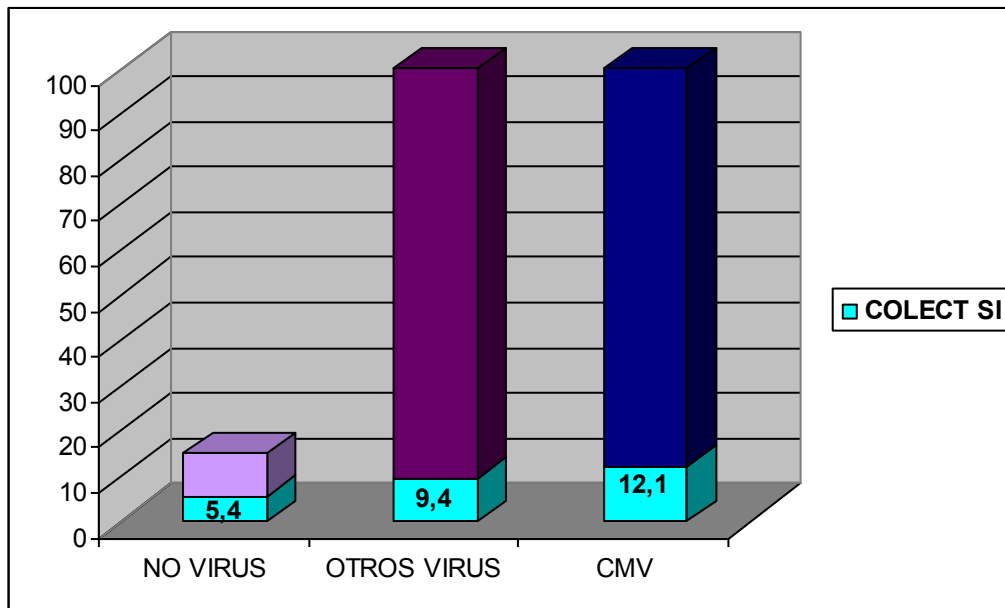


Fig. 26. Porcentaje de colectomías según presencia de virus y tipo.

Observamos que los pacientes con CMV tienen mayores porcentajes de colectomía, 12,1%, en relación a los otros tipos de virus de la familia *herpesviridae*, 9,4%, y sobre todo en relación a los pacientes sin virus, 5,4%. De las nueve colectomías totales cuatro tenían CMV (4/9).

OBJETIVO 2: RELACIONAR LA PRESENCIA DE CMV CON EL TRATAMIENTO RECIBIDO.

De las 201 biopsias analizadas por PCR se recogieron mediante la revisión de la historia clínica, tanto en su versión electrónica como en papel, los datos completos del tratamiento recibido por el paciente en la fecha coincidente y posterior a la realización de la biopsia. Sólo se desconoce el tratamiento recibido en dos biopsias, en las que no se recoge este dato en la historia clínica.

Son pocos los episodios asociados a biopsias en los que los pacientes no recibieron tratamiento alguno (sólo en el caso de diez biopsias). En la mayor parte de los casos, se trata, de biopsias practicadas a pacientes con tratamiento esteroideo convencional (104 biopsias). Recibieron tratamiento con inmunomoduladores tipo Azatioprina debido a enfermedad refractaria a tratamiento esteroideo 67 de los episodios y en algunos casos se les administró tratamiento anti-TNF (18).

De las 201 biopsias 53 tenían presencia de DNA viral de CMV mediante PCR como ya hemos detallado previamente. De las 53 biopsias 48 son referentes a pacientes con CU (90,57%) y 5 biopsias con EC (9,43%). En una de las 53 biopsias se desconoce el tratamiento que tomaba el paciente, por tanto, para este análisis se evaluaron las 52 biopsias restantes.

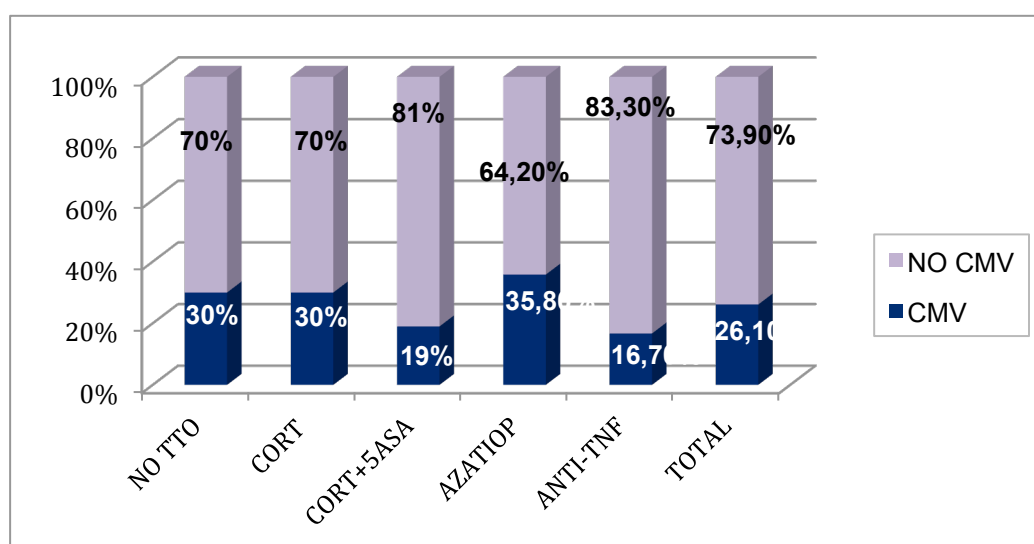
TABLA 10. BIOPSIAS CON CMV Y RELACIÓN CON EL TRATAMIENTO RECIBIDO

	NO TTO	CORTIC	CORT+5-ASA	AZATIOP	ANTI-TNF	TOTAL
CMV	3	6	16	24	3	52
NO CMV	7	14	68	43	15	147
TOTAL	10	20	84	67	18	199
IC	9,9-81,6	11,9-54,3	10,1-28,0	23,6-48,1	3,6-41,4	26,1 (19,8-32,5)

En la tabla 10 observamos que de las 52 biopsias evaluables con positividad para CMV un 46,15% correspondía a episodios asociados a tratamiento con Azatioprina y un 33,77% a pacientes que tomaban corticoides con 5-ASA.

En la distribución de los tratamientos administrados, observamos que la mayoría de las biopsias están relacionadas con la toma de esteroides con o sin 5-ASA asociado (104), seguido de los tratamientos con Azatioprina, Imurel® (67).

También se puede observar que no sólo hay presencia de amplificación para CMV en pacientes con tratamiento de corticoides, inmunomoduladores y anti-TNF sino que algunos pacientes que no toman tratamiento de ninguna de estas categorías también tienen DNA del CMV detectable en la mucosa de colon. Es decir, que la presencia de DNA del CMV no es exclusivo de aquellos pacientes con un cierto grado de inmunosupresión farmacológica, aunque en estos últimos la presencia del CMV es mayor.



Episodios: No tto: 10; Cort: 20; Cort+5ASA: 84 ; AZA:67; AntiTNF: 18

Fig. 27. Relación de CMV con el tratamiento recibido.

Como observamos en la figura 27, los pacientes que tomaban Imurel® tenían PCR positiva para CMV en un 35,80% frente a los pacientes que tomaban corticoides, 30%. Es decir, que los pacientes que toman Imurel® tienen mayor presencia de CMV en sus biopsias. Estos datos no son estadísticamente significativos ($p>0,05$) probablemente debido a que la n del grupo es pequeña ($n=20$). Si comparamos los que toman Imurel® con aquellos pacientes que no toman nada los datos no son estadísticamente significativos ($p>0,05$) probablemente

debido también a que la n del grupo que no toman estos medicamentos es pequeña (n=10). Si comparamos el grupo que toma Imurel® (35,80%) respecto al grupo que toma corticoides y 5ASA (19%) los datos son estadísticamente significativos ($p<0,05$).

Llama la atención el hecho de que los pacientes que han incorporado 5ASA y otros tratamientos de nueva aparición (anti-TNF) muestran una menor proporción de biopsias con positividad para CMV, algo que debe de analizarse con mayor profundidad ya que los pacientes analizados no son los suficientes como para permitir un análisis estadístico concluyente acerca del posible efecto antiviral de estos tratamientos.

De las 18 biopsias relacionadas con la toma de anti-TNF solamente en una de ellas se observó la presencia de HHV-6 (5,55%). En nuestro estudio la mayoría de las biopsias con HHV-6 están relacionadas con la toma de Imurel® (47,05%) muy seguidas de las de tratamiento esteroideo (35,29%).

4.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

A/ EVALUAR LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO ANTIVIRAL.

Se ha seleccionado los episodios de pacientes que tras una biopsia positiva para CMV por PCR han sido tratados con tratamiento específico antiviral (valganciclovir) o no han recibido dicho tratamiento específico y tienen una nueva biopsia en menos de seis meses con datos valorables en el análisis molecular para CMV. Y se han valorado tanto el resultado como los posibles cambios en los niveles de absorbancia. En total se han podido analizar con estas premisas 18 episodios asociados a biopsia con repetición.

No se poseen datos de serología de todos los pacientes, pero de los que se tiene constancia todos fueron IgG+ e IgM- para CMV.

TABLA 11. EVOLUCIÓN Y TRATAMIENTO ANTIVIRAL PARA CMV

	TRATADOS	NO TRATADOS
VIRUS IGUAL O AUMENTO DE ABSORBANCIA	3	0
VIRUS DESAPARECE O DISMINUYE ABSORBANCIA	5	10
TOTAL	8	10

Como observamos en la tabla 11, de los ocho pacientes que fueron tratados tras biopsia positiva de CMV, cinco pacientes disminuyeron los niveles de absorbancia respecto a la biopsia previa o no se detectó DNA viral para CMV. Y tres pacientes tratados con antiviral, el virus no modificó el nivel de absorbancia o aumentó dicho nivel. De los 10 pacientes no tratados con fármacos antivirales, en todos ellos se disminuyó el nivel de absorbancia o desaparecieron los niveles.

El IC del 95% para los pacientes tratados es 62,5 (IC:25,9-89,8) y para los no tratados IC del 95% es 100 (65,6-100). Estos datos no son estadísticamente significativos ($p>0,05$).

Por lo tanto podemos decir, que según nuestros datos el tratamiento antiviral con valganciclovir no disminuye los niveles de absorbancia del CMV en mucosa de colon en niveles significativamente diferentes a los pacientes que no reciben tratamiento. La evolución natural del virus, por lo que observamos, es la de desaparecer o disminuir espontáneamente.

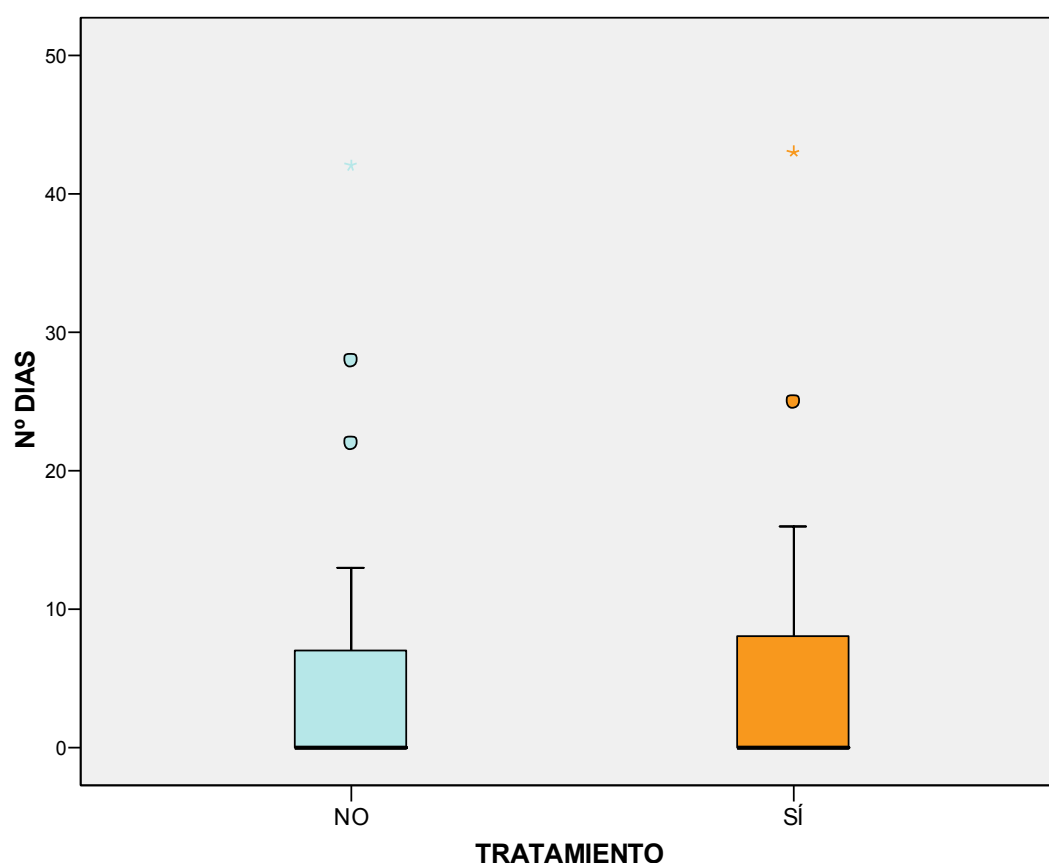


Fig. 28. Relación de días de ingreso tras tratamiento antiviral.

Si valoramos los pacientes en cuanto al número de días ingresados en el año tras tratamiento antiviral con respecto a aquellos que no han sido tratados, observamos que de los 44 episodios valorables, 15 habían recibido tratamiento y 29 no. La media de días de ingreso para los pacientes sin tratamiento fue de 5,28 días mientras que los que tuvieron tratamiento fue de 6,67 días. La mediana en ambos casos fue cero (la mayoría no ingresaron). Y el percentil 75 para los que no recibieron tratamiento fue de 9,50 días frente a los 16 días de los que sí tuvieron tratamiento antiviral. Estos datos no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$).

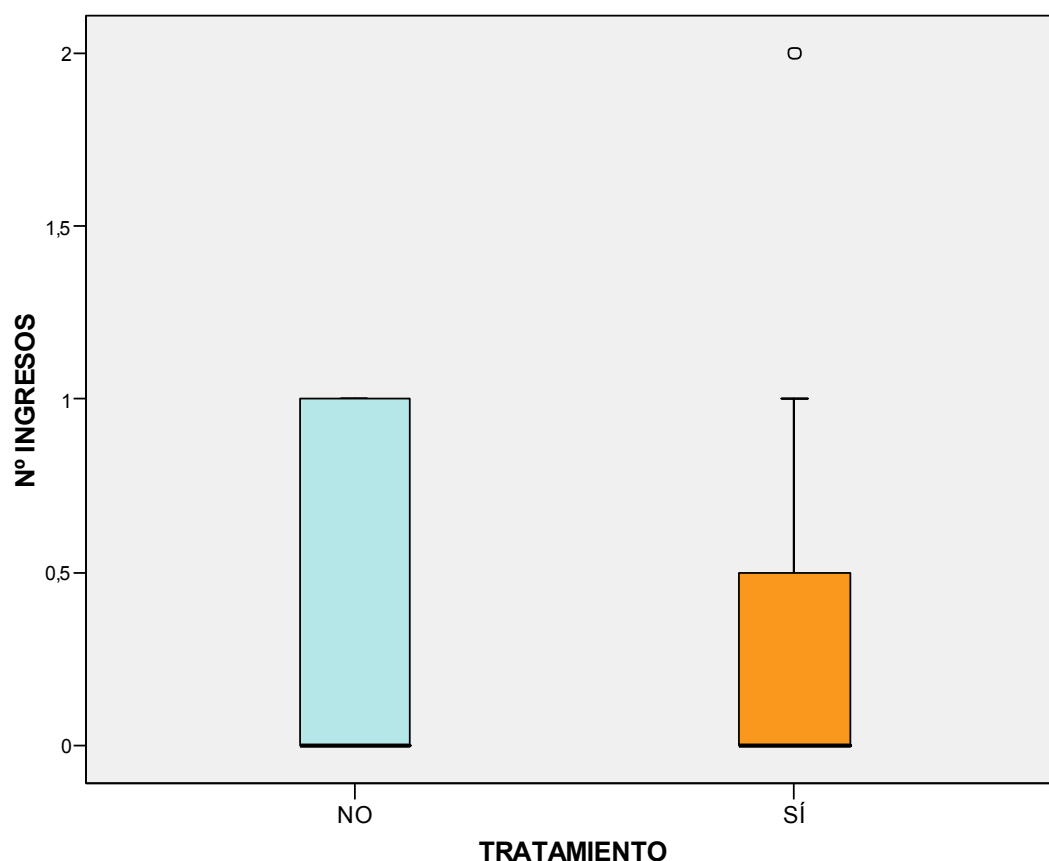


Fig. 29. Relación de números de ingresos tras tratamiento antiviral.

En la figura 29 se representan los números de ingreso en el año para los pacientes que tras CMV positivo por PCR han tenido más de un ingreso durante el año y valorar el tratamiento antiviral en estos casos. Se evaluaron un total de 43 episodios (biopsias positivas para CMV por PCR) y que hubo conocimiento de la toma de fármaco antiviral y también del número de ingresos durante ese año. Uno de los ingresos falleció por sepsis. La media de ingresos para los no tratados con tratamiento antiviral fue de 0,29 frente a los 0,33 de los tratados con tratamiento antiviral. La mediana para ambos grupos fue de 0 y el percentil 75 para ambos grupos fue de 1 día. Estos datos no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$).

Quisimos ver la respuesta de tratamiento antiviral y si el uso de estos fármacos evita colectomías. Solamente se tienen biopsias consecutivas en dos pacientes con biopsias positivas por PCR para CMV. Las biopsias tienen una diferencia en el tiempo menor a tres meses. Los pacientes con biopsias positivas para CMV tras PCR no tomaron tratamiento antiviral y en las piezas de colectomía tenían

positividad para CMV con absorbancias altas (2,9-3,3) por PCR. En otro paciente desconocemos si ha tomado tratamiento antiviral tras positividad para CMV por PCR.

Debido a que de nueve pacientes con colectomía sólo dos pacientes tienen biopsias anteriores a las colectomías en breve espacio de tiempo y ambas con datos de absorbancia para CMV y conocimiento de tratamiento antiviral y con uno con desconocimiento de tratamiento antiviral no podemos conocer si el tratamiento antiviral hubiera evitado las colectomías.

B/ DEFINIR CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS QUE PERMITEN PREDECIR LA PRESENCIA VIRAL EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON EII. RESULTADOS.

Nuestro objetivo era observar las características histológicas de las biopsias sobre las que se realizó PCR, y sobre todo saber si hay características propias que nos definan la presencia o ausencia viral así como el tipo de virus de la familia herpes.

Se valoró la apoptosis prominente como primer indicador. Se evaluaron las biopsias con presencia de CMV sin otro virus acompañante. 17 biopsias tenían apoptosis marcada y 10 no. Dos biopsias no fueron valorables. Para el VEB 48 fueron las biopsias valorables siendo el VEB el único virus presente. 31 tenían apoptosis y 17 no.

TABLA 12. APOPTOSIS Y PRESENCIA VIRAL

	CMV		VEB		NO VIRUS	
	n	%	n	%	n	%
SI	17	62,9	31	64,6	14	20
NO	10	37,1	17	35,4	56	80
TOTAL	27	100	48	100	70	100
	p=0,888				p=0,000	

Como observamos en la tabla 12, los porcentajes son muy parecidos entre sí. Estos resultados no son estadísticamente significativos ($p>0,05$).

Se valoró también la presencia de vasculitis o no. De las 27 biopsias con positividad para CMV por PCR valorables, seis tenían vasculitis y 21 biopsias no. Para el VEB en un total de 48 biopsias, 11 sí tenían vasculitis y 37 no. Estos datos no son estadísticamente significativos.

TABLA 13. VASCULITIS Y PRESENCIA VIRAL

	CMV		VEB		NO VIRUS	
	n	%	n	%	n	%
SI	6	22,2	11	22,9	11	15,7
NO	21	77,8	37	77,1	59	84,3
TOTAL	27	100	48	100	70	100
	p= 0,945				p=0,695	

Como observamos en la tabla 13, los datos para vasculitis en biopsias con presencia de virus CMV y VEB son muy parecidos, y las diferencias no son estadísticamente significativas ($p>0,05$).

Para el VHS-1 sólo hubo tres biopsias en el que el virus estaba presente mediante técnicas de PCR. La mayoría de las veces estaba acompañado de CMV y VEB. De las tres biopsias en una se observó apoptosis, en otra vasculitis y en una tercera ninguna de las dos.

El resto de los virus hallados por PCR en la mucosa de colon: VHH-6 y VHS-2 nunca se encontraron aislados sino junto a otros virus de la familia herpes para poder definir sus características histológicas, si las hubiera.

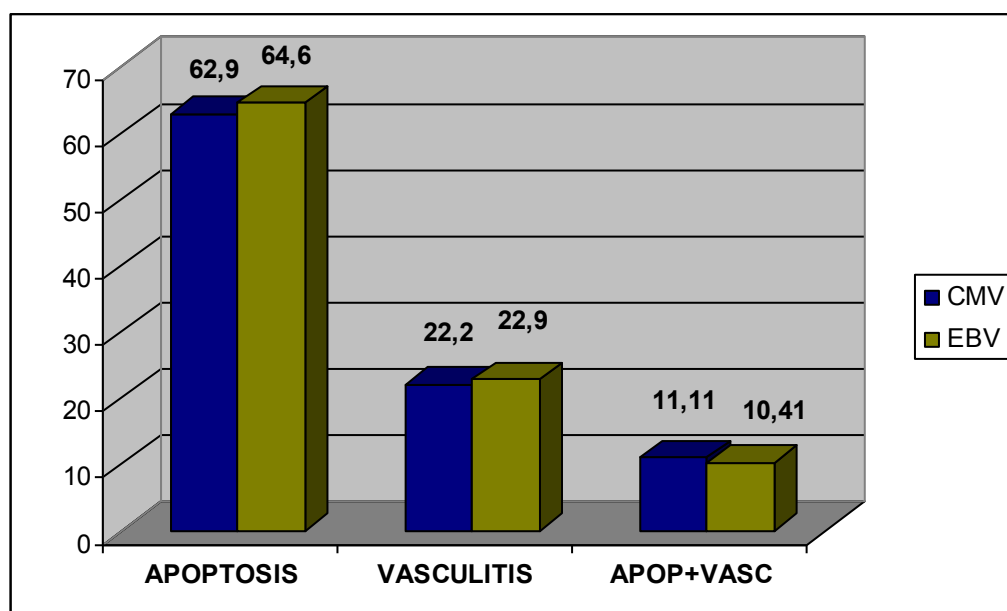


Fig. 30. Características histológicas del CVM y VEB.

Como observamos en la figura 30 no hay diferencias entre apoptosis y vasculitis para distinguir VEB y CMV histológicamente, ya que ambas poseen porcentajes parecidos en cuanto a apoptosis y vasculitis.

Pero si analizamos todas las biopsias valorables (187 biopsias) en cuanto a apoptosis y vasculitis prominentes y la relacionamos con la presencia de los dos virus principales: CMV y VEB, obtenemos los siguientes resultados:

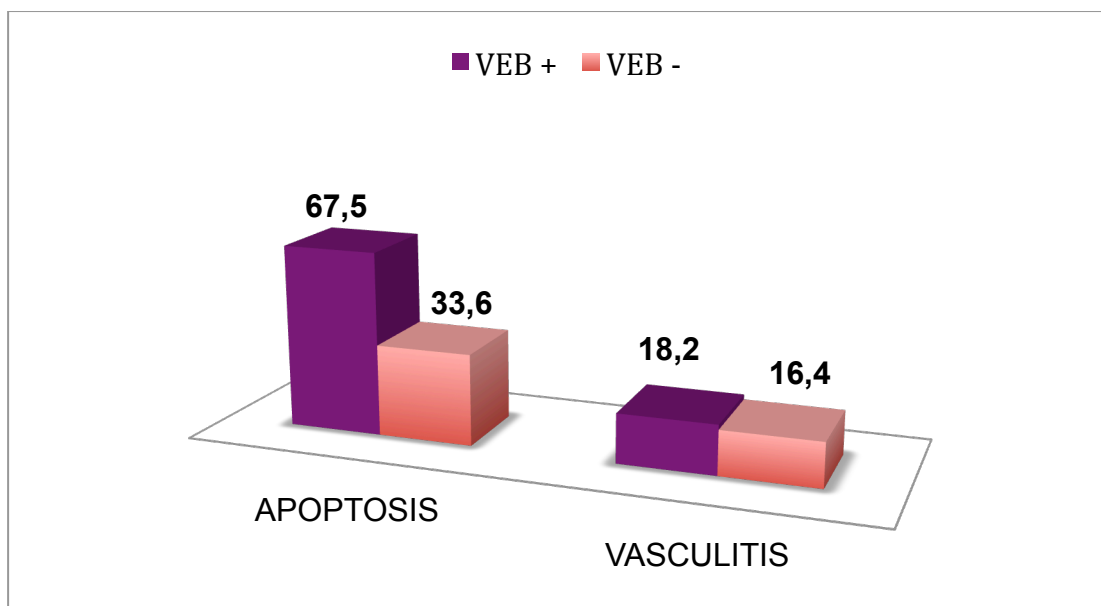


Fig. 31. Relación de VEB apoptosis y vasculitis.

Como observamos en la figura 31, el porcentaje de apoptosis en las biopsias positivas para virus VEB por PCR es el 67,5% frente al las biopsias negativas para el virus VEB, el doble. Este dato es estadísticamente significativo ($p < 0,001$). Sin embargo, las diferencias de la presencia de vasculitis para las biopsias con o sin presencia de virus VEB por PCR son similares, y los datos no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$).

Realizamos el mismo ejercicio para el virus CMV y recogemos los siguientes resultados:

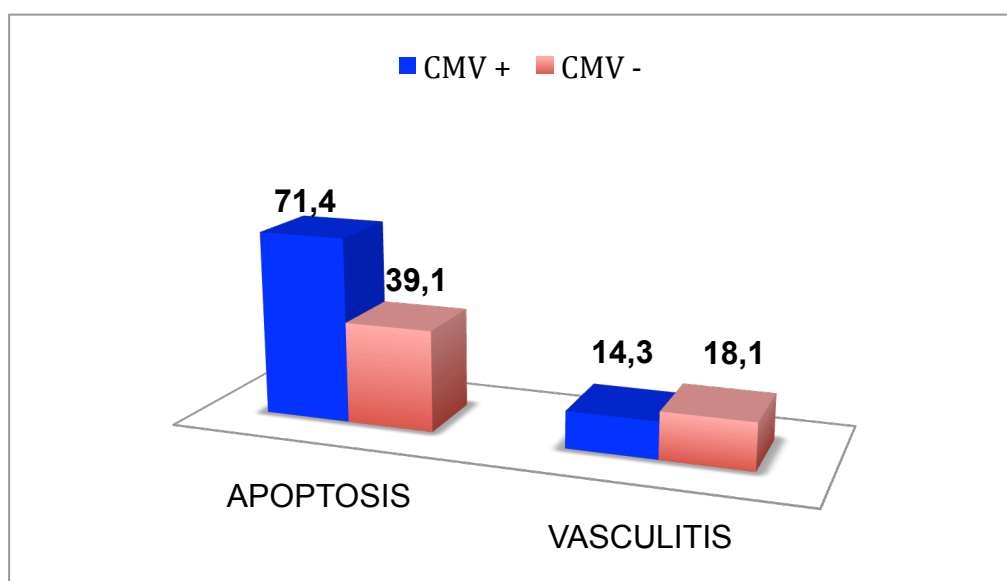


Fig. 32. Relación del virus CMV y las apoptosis y vasculitis.

Como muestra la figura 32, la presencia de apoptosis en las biopsias con presencia de virus CMV por PCR es mucho mayor que en la encontrada en las biopsias sin virus CMV por PCR. Estos datos son estadísticamente significativos ($p < 0,001$). Sin embargo, la vasculitis se encuentra en porcentajes muy similares tanto en las biopsias positivas como negativas para CMV por la técnica de PCR. Estos datos no son estadísticamente significativos.

Se conoce que algunos fármacos producen apoptosis en las células epiteliales de la mucosa del colon. Por ello se valoraron las apoptosis y vasculitis según el tratamiento habitual de cada paciente en 185 biopsias valorables y con el conocimiento del tratamiento recibido.

Mostramos los resultados en la figura siguiente:

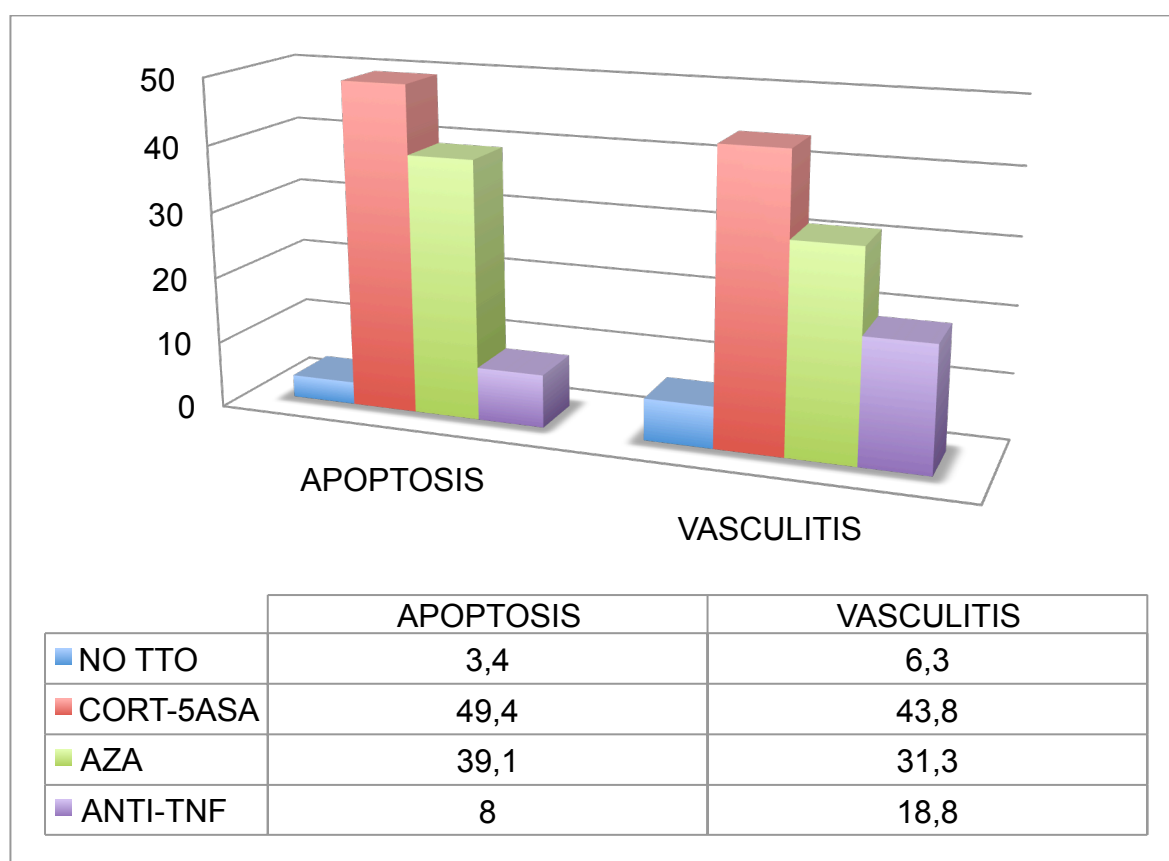


Fig. 33. Relación del los tratamientos y la presencia de apoptosis y vasculitis.

En la figura 33, podemos ver claramente que no hay diferencias entre vasculitis y apoptosis entre cada grupo de tratamiento recibido por el paciente. A excepción del primer grupo (los que no reciben ningún tipo de tratamiento), las apoptosis y

vasculitis son mayores en los grupos de tratamiento de corticoides + 5ASA y Azatioprina, lo mismo que ocurre con la presencia de CMV en estos grupos de pacientes con estos tratamientos. Estos datos no son estadísticamente significativos ($p>0,05$).

C/ VALORAR LAS DISTINTAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS COMO VALOR PREDICTIVO.

Por datos serológicos, cuando las hubo, todas las pruebas indicaron negatividad para CMV y demás virus de la familia herpes. Por IHQ sólo una biopsia fue positiva para CMV y en esta biopsia se desconocen datos serológicos y la PCR y rtPCR fueron positivas, mientras que no había material suficiente para detectar RNA viral.

Mediante técnica de PCR 53 biopsias fueron positivas para CMV, ocho para rtPCR, una sólo para IHQ, ninguna para RNA (tres biopsias no se pudieron valorar por falta de material) y ninguna por estudio serológico cuando se tenía este dato (16 casos) aunque en todas fueron IgG+ e IgM-. Nos planteamos si estos datos podían servirnos como valor predictivo para colectomías.

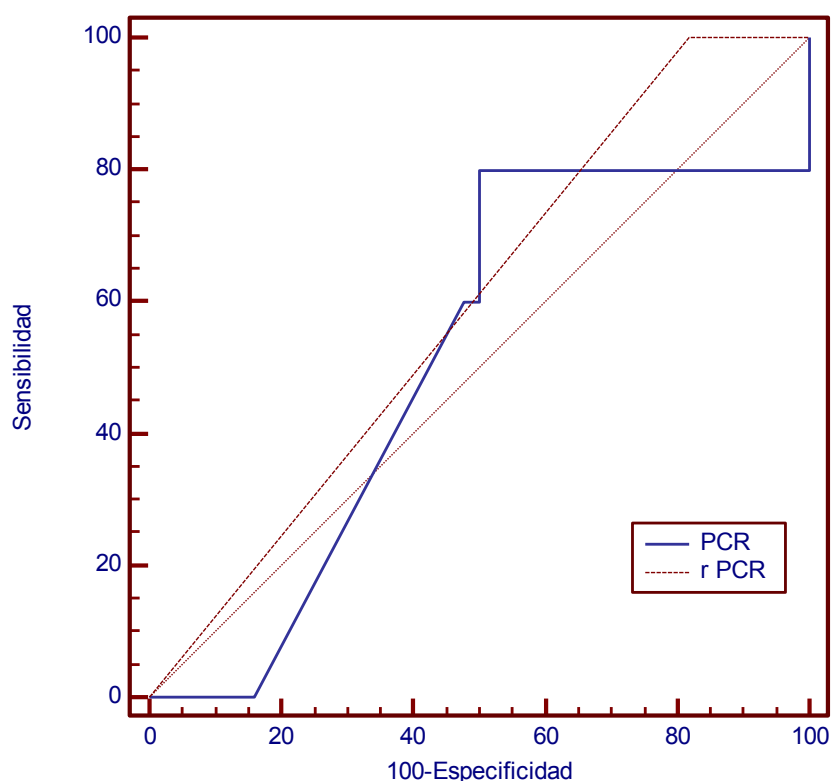


Fig. 34. Curva COR.

TABLA 14. PCR Y rtPCR COMO VALORES PREDICTIVOS

	PCR	rtPCR
VP-	94,3	92,7
VP+	14,8	0
SENSIBILIDAD	28,6	0
ESPECIFICIDAD	87,7	95,7
kappa	0,114	-0,053

En la tabla 14 tenemos los datos de las biopsias con absorbancias para CMV por PCR. Se consideraron biopsias positivas para CMV aquellas cuya absorbancia era mayor a 2,7 y biopsias negativas para CMV por PCR para las biopsias con absorbancias menores a 2,7.

Para estos datos el valor predictivo negativo (VP-) fue de 94,3 y el valor predictivo positivo (VP+) 14,8. La sensibilidad es 28,6% y la especificidad de 87,7%.

Para la rtPCR se realizó la misma tabla con los siguientes resultados:

TABLA 15. BIOPSIAS POR COLECTOMÍA Y CMV POR rtPCR

	COLECTOMIA			
	SI		NO	
	n	%	n	%
CMV NEG	14	100	179	95,7
CMV POS	0	0	8	4,3
TOTAL	14	100	187	100

Para estos datos el VP- fue: 92,7 y el VP+: 0. La sensibilidad del 0% y la especificidad del 95,7%.

5. DISCUSIÓN

5.1 OBJETIVOS PRINCIPALES

OBJETIVO 1: EVALUAR LA IMPORTANCIA PRONÓSTICA DE LA PRESENCIA DE LA AMPLIFICACIÓN DE VIRUS DE LA FAMILIA HERPES EN TEJIDO EN PACIENTES CON EII.

PRESENCIA VIRAL

El citomegalovirus es miembro de la familia herpes virus y es una infección viral frecuente en humanos, que ocurre en el 40-100% de los adultos (Maher, 2009). La prevalencia de la infección por CMV en pacientes con EII es muy variable y no bien descrita en pacientes con enfermedad moderada y no está resuelta la controversia acerca de la importancia de la replicación vírica de CMV en la clínica. La seroprevalencia del CMV es alta en todas las áreas geográficas, incluyendo los países desarrollados (Banerjee, 2008).

La historia natural de la infección no está detalladamente descrita ya que la infección primaria en individuos sanos es generalmente asintomática y el virus permanece en un estado latente (Polić, 1998). Sin embargo, la reactivación es frecuente. Se conoce que los pacientes inmunocomprometidos son más susceptibles de la reactivación a partir de un estado latente del CMV (Bennekov, 2004 y Yoshikawa, 2003), que puede presentarse como una variedad de síndromes clínicos o enfermedades (Ho, 2008).

Se debe distinguir entre infección por CMV, donde una persona asintomática muestra pruebas positivas para CMV en las pruebas moleculares de PCR o en los análisis serológicos, y la enfermedad por CMV, donde la sintomatología clínica se pone de manifiesto (Kandiel, 2006 y Rahier, 2009). Por tanto, existen situaciones donde pueden obtenerse pruebas de laboratorio positivas para la detección de CMV donde el paciente no sufre sintomatología, pero desconocemos cuáles de estos pacientes van a evolucionar a una enfermedad por CMV, es decir, quiénes van a presentar sintomatología debido a la replicación viral. La colitis por CMV, causa diarrea sanguinolenta, dolor abdominal, e incluso fiebre, síntomas que pueden ser atribuidos a la colitis ulcerosa con lo que el problema de diagnóstico diferencial entre los pacientes que únicamente presentan una EII refractaria a tratamiento, los que

presentan picos de replicación asintomática y aquéllos en los que realmente la replicación viral tiene un efecto patógeno es extremadamente difícil y hasta el momento no se ha alcanzado un acuerdo en cuanto a cómo alcanzar el diagnóstico adecuado.

La prevalencia y la patogenia de la infección del CMV en pacientes con EII es variable. El CMV se identifica frecuentemente en la mucosa colónica de pacientes con EII activa y a menudo representa un desafío diagnóstico y terapéutico. Algunos investigadores han estimado la prevalencia de la infección del CMV en pacientes hospitalizados por EII en 0,5-3,4% sin que tengamos datos claros de la prevalencia de infección por CMV en pacientes sin EII (Papadakis, 2001 y Vega, 1999).

Criscuoli, 2004 en su estudio asegura que la enfermedad por CMV fue sólo vista en pacientes con enfermedad resistente a corticoides. Encontraron una prevalencia del 32% de enfermedad por CMV en pacientes con CU resistentes a corticoides, que coincide con otros estudios confirmados por también por histología e IHQ (Kambhan, 2004 y Cottone, 2001).

Por el contrario, algunos autores afirman que el CMV se comporta solamente como un huésped no patogénico (Hommes, 2004).

El virus VEB es más frecuente en CU que en EC o en controles y es poco probable de que tenga una papel etiológico en la EII (Spieker, 2000) mientras que Yanai, 1999 dicen que la presencia de VEB en piezas de colectomías indica que el VEB puede estar relacionado con la enfermedad.

En nuestro estudio las 201 biopsias analizadas por PCR semicuantitativa 79 biopsias no tenían presencia de virus (39,3%) y sí tenían algún virus de la familia herpes 122 biopsias (60,7%). Se encontraron virus VEB, CMV, VHS1, VHS2 y HHV6. Es decir, la mayoría de las biopsias de EII tienen virus en la mucosa del colon mediante técnica de PCR.

En nuestro estudio la mayoría de las biopsias presentaban algún virus de la familia herpes (60,7%) y también en su mayoría estos virus se presentaban como único germen. Sólo cuatro biopsias presentaron tres virus a la vez. No se encontró ninguna biopsia con más de tres virus. El virus encontrado más frecuentemente fue el virus VEB, seguido del CMV y los virus herpes simples HHV6, VHS1 y VHS2.

El CMV aparece en el 26,4% de las 201 biopsias analizadas. Más de un cuarto de las biopsias analizadas tienen la presencia del CMV. En su mayoría, en el 56% lo hace de forma aislada sin otro virus de la familia herpes. Este 26,4% refiere a la presencia de CMV en distintas poblaciones de EII tanto aquellos pacientes que no toman ningún tratamiento, pacientes corticodependientes y corticoresistentes.

Todos los tipos de virus son más frecuentes en la CU que en la EC, a excepción del HHV6 que es ligeramente mayor en la EC en nuestro estudio. El virus Epstein-Barr (VEB) es el virus más frecuente, seguido del citomegalovirus (CMV). Los datos sólo son estadísticamente significativos ($p < 0,05$) para el VEB.

La infección por HHV6 se observa en pacientes inmunodeprimidos (De Bolle, 2005). El VEB se ha encontrado en un 60% (Yanai, 1999) pero no aparece en controles y se ha sugerido su papel en la cronificación de la enfermedad (Bertalot, 2001).

Una alta presencia de DNA de HHV6 se ha encontrado en intestino grueso tanto en la CU como en la EC, y la presencia simultánea de HHV6 y CMV ha sido significativamente mayor en la CU que en la EC o en controles sin EII (Wakefield, 1992). En amplias cohortes de pacientes con EII que recibían Infliximab, la infección vírica como primaria o reactivación de virus herpes simple (VHS), CMV, Epstein-Barr virus (VEB) o virus varicela zoster (VZV) han sido descritos pero datos sobre el HHV6 son escasos (Rahier, 2009 y Wakefield, 1992). Wakefield, 1992 detectó una alta prevalencia tanto de CMV y HHV6 especialmente en CU en la mucosa de los pacientes. Por otra parte, Knosel, 2009, examinó tejidos de archivo de pacientes con EC mediante PCR y encontraron positividad para HHV6 en 2/56 (3.6%) de las muestras. Recientemente, el HHV-6, detectado mediante PCR, PCR a tiempo real e IHQ, ha demostrado la ubicuidad en bloques de tejido ileal resecados de 23 pacientes de EC. Este estudio muestra un porcentaje de positividad para HHV6 semejante tanto para pacientes de CU (43%) como EC (44%). Este número es comparable a aquellos vistos en pacientes con trasplante de órganos sólidos (Halme, 2008). En pacientes con EII la coexistencia de CMV y HHV6 es desconocida.

Strenger, 2010, asegura que deben de tenerse en cuenta que en los casos positivos de HHV6 positivos por PCR en tejido el DNA del HHV6 puede ser que el DNA esté integrado en el cromosoma y de ahí la positividad de la prueba.

En nuestro estudio hemos separado los virus por la histología, según CU o EC, y observamos que es más frecuente encontrar virus en las biopsias de CU que en la EC, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Y estos virus en su mayoría aparecen aislados, sin otros virus de la familia herpes, en ambos grupos de enfermedad.

Hay numerosos estudios que relacionan el CMV con la CU pero se ha propuesto una menor asociación de esta infección viral con la EC (Hommes, 2004; De Saussure, 2004 y Takahashi, 2004) tal y como demostramos en nuestro estudio.

DÍAS DE INGRESO

La mayoría de las biopsias no conllevaron ingreso. Fueron endoscopias realizadas por control, no por un brote que obligó al ingreso del paciente.

Si mostramos sólo las biopsias que conllevaron ingresos, que representan 64 biopsias (31,84%) observamos que el mínimo tiempo de ingreso fueron dos días y el máximo 60 días de ingreso para el paciente, en nuestro estudio.

La infección por CMV conlleva morbilidad y mortalidad añadida en pacientes tratados con fármacos inmunosupresores o esteroides (Goodgame, 1993), algo que pretendemos relacionar con el incremento de días de estancia hospitalaria por procesos complejos en nuestra población analizada.

Podemos decir que la mediana, de días que estancia que conllevaron las biopsias, para los dos grupos de biopsias (con virus y sin virus) fue en ambos casos cero (0) días, debido a que la mayoría de las biopsias no conllevaron ingreso del paciente. La media de la estancia de los pacientes sin virus en sus biopsias fue de 4,75 días y de 6,38 días para los pacientes con presencia de virus en sus biopsias. Observamos también, que el percentil 75 de las biopsias con virus fue de 11 días respecto a los 8 días de las biopsias sin virus. Los datos no son estadísticamente significativos.

Sin embargo, si nos fijamos sólo en aquellos pacientes que fueron ingresados y los distribuimos por aquellos pacientes que no tienen ningún virus y por aquellos pacientes que tienen CMV en alguna de sus biopsias encontramos que de los 102 pacientes, tienen CMV 33 pacientes (1/3) y 69 pacientes no tienen CMV (2/3).

La mediana para los pacientes sin virus, era de cero días de ingreso (la mayoría no ingresaban) mientras que para los pacientes con CMV era de 16 días. La media de días de estancia para los pacientes sin virus es 7,12 días y para los pacientes con CMV es de 20,06 días. El percentil 75 es de 12,50 días para los pacientes sin virus y 34,50 días para los pacientes con CMV. Estos datos son estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Hemos observado que los pacientes que tienen CMV tienen mayores días de estancia hospitalaria respecto a los pacientes sin virus. Observamos también que tienen mayores días de estancia respecto a los pacientes que tienen virus diferentes al CMV, es decir, virus VEB, HHV6, VHS1 y VHS2. Estos últimos virus se comportan de forma parecida a los pacientes que no tienen virus en lo relativo a ingresos de los pacientes. Este dato es estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

De los 33 pacientes con CMV, 28 pacientes eran enfermos de CU mientras que cinco lo eran de la EC. Un 37,3% de los pacientes de CU tienen CMV mientras que para los EC es de un 20%. Es decir, uno de cada tres (1/3) pacientes de CU tiene CMV, mientras que para la EC es uno de cada cuatro pacientes (1/4). No es estadísticamente significativo ($p > 0,05$). La OR= 2,38.

El tratamiento con corticoides (Domènech, 2008) y ciclosporina (Minami, 2007) ha sido asociado con un aumento del riesgo de infección por CMV. Sin embargo, otros estudios han desafiado la patogenicidad del CMV en EII activa demostrando la falta de correlación del CMV y la severidad clínica de la EII (Matsuoka, 2007). Otros autores (Kim, 2010) dicen que basados en la asociación del CMV y la severidad clínica de la EII resistente a corticoides, podría establecerse la hipótesis que el CMV juega un papel en la exacerbación de la EII, causando directamente colitis por CMV o exacerbando una EII subyacente. Sin embargo, estos autores, también dicen que es posible que el CMV juegue un papel como “huésped inocente” detectado en la mucosa colónica durante la EII activa. El problema añadido es que con las nuevas terapias inmunosupresoras emergentes, es necesario conocer el papel de la

infección por CMV en la EII. Los estudios hasta ahora, están limitados en el número, fueron realizados en población muy seleccionada con tecnologías de sensibilidad limitada y/o no informan sobre las consecuencias clínicas a largo plazo. En su estudio de 120 pacientes sugieren que el CMV está asociado con una CU de mayor severidad (no encontraron CMV en los pacientes con EC) y ninguno de los pacientes con CU e infección por CMV precisó cirugía en los 6 meses siguientes de seguimiento, ni desarrollaron colitis fulminante o murieron, a pesar de la falta de tratamiento antiviral y el uso de medicamentos inmunosupresores. Todos los pacientes se recuperaron de su brote de EII sin la asociación de morbilidad o mortalidad. Esto contrasta con otras series de CMV en EII que muestran tasas de colectomías del 64% y tasas de mortalidad del 44% (Pfau, 2001 y Hommes, 2004).

COLECTOMÍAS Y PRESENCIA VIRAL

Las piezas quirúrgicas de las colectomías subtotales o totales de los pacientes con EII también fueron analizadas. De los 102 pacientes nueve fueron intervenidos quirúrgicamente. Siete colectomías (7/9) tenían presencia de virus mientras que dos colectomías (2/9) carecían de virus mediante técnicas de PCR semicuantitativa.

Observamos que entre aquellos pacientes que tenían positividad en el análisis molecular para virus, un 10,8% tuvo colectomía frente al 89,2% que no fueron intervenidos quirúrgicamente. Mientras que los pacientes que no tenían virus el 5,4% tuvo colectomía y un 94,6% no fue intervenido quirúrgicamente. Por tanto el porcentaje de las colectomías con virus fue exactamente el doble que a las colectomías sin virus (10,8% respecto al 5,4%). Estos datos no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$) y la potencia del contraste es del 12%.

Si analizamos las piezas quirúrgicas de colectomía vemos que la mayoría un 77,8%, tiene virus mientras un 22,4% que no lo tienen. Los resultados no son estadísticamente significativos.

Y si miramos las colectomías atendiendo al tipo de virus al igual que para los días de estancia, vemos que los pacientes con CMV tienen mayores porcentajes de colectomía, 12,1%, en relación a los otros tipos de virus de la familia *herpesviridae*,

9,4%, y sobre todo en relación a los pacientes sin virus, 5,4%. De las nueve colectomías cuatro tenían CMV (44%).

El impacto clínico de la enfermedad del CMV en la CU activa es difícil de evaluar. Numerosos estudios aprecian enfermedad por CMV en piezas quirúrgicas de colectomías, y asociaron infección por CMV a la refractariedad de la enfermedad o megacolon tóxico (Cooper, 1977; Alcalá, 2000; Takahashi, 2004).

Minami, 2007, encontró que la reactivación del CMV en pacientes con CU resistentes a corticoides estaba relacionado con un empeoramiento clínico y biológico que conllevaba a una mayor tasa de colectomías. Mientras que Domènech, 2008, no encontraron diferencias clínicas y biológicas entre pacientes resistentes a esteroides con o sin enfermedad por CMV (pero la muestra era muy pequeña para conclusiones sólidas).

El papel del CMV en EII activa ha sido controvertido. Los primeros estudios realizaron la asociación de la infección del CMV con altas dosis de inmunosupresores. Algunos estudios pusieron de manifiesto inclusiones de CMV en piezas de colectomía con CU fulminante o resistente a corticoides (Kuwabara, 2007; Cooper, 1977 y Alcalá, 2000).

Como se ha explicado en el apartado anterior, Kim, 2010, en su estudio de 120 pacientes sugiere que el CMV está asociado con una CU de mayor severidad (no encontraron CMV en los pacientes con EC) y ninguno de los pacientes con CU e infección por CMV precisó cirugía en los seis meses siguientes de seguimiento, ni desarrollaron colitis fulminante o murieron, a pesar de la falta de tratamiento antiviral y el uso de medicamentos inmunosupresores. Todos los pacientes se recuperaron de su brote de EII sin la asociación de morbilidad o mortalidad.

Esto contrasta con otras series de CMV en EII que tienen colectomías del 64% y tasas de mortalidad del 44% (Pfau, 2001 y Hommes, 2004).

Yanai, 1999 dice que la presencia de VEB en piezas de colectomías indica que el VEB puede estar relacionado con la enfermedad.

OBJETIVO 2: RELACIONAR LA PRESENCIA DE CMV CON EL TRATAMIENTO RECIBIDO.

A pesar de que el principal tratamiento es el tratamiento esteroideo y es efectivo para muchos pacientes, una proporción de pacientes no responden a dicho tratamiento (Creed, 2007).

Domènech, 2008 encontró una prevalencia del 32% de enfermedad por CMV en pacientes con CU resistentes a corticoides, que coincide con otros estudios confirmados también por histología e IHQ (Criscuoli, 2008; Kambhan, 2004, Cottone, 2001) y estos autores (Cottone, 2001) concluyeron que el CMV es una causa frecuente de las colitis rebeldes no respondedoras. Sin embargo para Maher, 2009, en su estudio de 72 pacientes de EII activa el CMV fue encontrado sólo en 9 pacientes (12,5%).

Marszalek, 2011, encontró que los pacientes con historia de infecciones por Epstein-Barr (VEB) o citomegalovirus (CMV), así como, tratamiento esteroideo, tienen mayor susceptibilidad para el desarrollo de EII. El diagnóstico de EII fue confirmado por histología. Las infecciones previas por VEB y CMV fueron probadas por PCR y técnicas de hibridación in situ. Y encontraron infección viral latente, por PCR, en el 30-50% de los pacientes estudiados. Pero en estos mismos pacientes fueron incapaces de demostrar la presencia de antígenos virales por IHQ para VEB o CMV. Su estudio puede apoyar la teoría que la EII podría estar relacionada con infecciones virales previas o el uso de corticoides.

TABLA 16. ANÁLISIS LITERATURA

ESTUDIO	AÑO	PCR	HIBRIDACIÓN IN SITU
Cottone et al.	2001		
Domènech et al.	2008	42%	
Kambham et al.	2004		
Minami et al.	2007		
Yoshino et al.	2007	57%	
Maher et al.	2009		
Marszalek et al.	2011	30-50%	
Azueta et al.	2014	35,80%	0%

El tratamiento sistémico esteroideo sigue siendo el tratamiento estándar en CU moderada-severa. Sin embargo, hasta el 30-40% de los enfermos son no respondedores a este tratamiento y necesitan terapias como la ciclosporina, infliximab o la colectomía (Faubion, 2001 y Ho, 2004).

Numerosos estudios previos han propuesto que la terapia inmunosupresora podría jugar un papel en el desarrollo de la enfermedad por CMV en pacientes con EII (Saussure P, 2004; Eyre-Brook, 1986; Papadakis, 2001; Kaufman, 1999; Vega, 1999; Criscuoli, 2004; Kambhan, 2004, Cottone, 2001 y Kishore, 2004). La ciclosporina y dosis altas de esteroides tienen especialmente potentes efectos amplificantes en el CMV (Pereyra, 2004).

Además, el tratamiento con corticoides (Domènech, 2008) y ciclosporina (Minami, 2007), ha sido asociado con un aumento del riesgo de infección del CMV. Sin embargo, otros estudios han cuestionado la patogenicidad del CMV en EII activa demostrando la falta de correlación del CMV y la severidad clínica de la EII (Matsuoka, 2007). Algunos autores (Kim, 2010), dicen que basados en la asociación del CMV y la severidad clínica de la EII resistente a corticoides, uno puede hacer la hipótesis que el CMV juega un papel en la exacerbación de la EII, causando directamente colitis por CMV o exacerbando una EII subyacente. Sin embargo, estos autores, también dicen que es posible que el CMV juegue un papel como “huésped inocente” detectado en la mucosa colónica durante la EII activa. Dicen, que con las nuevas terapias inmunosupresoras emergentes, es necesario conocer el papel de la infección por CMV en la EII. Los estudios hasta ahora, están limitados en el número, fueron realizados en población muy seleccionada y/o no informan sobre las consecuencias clínicas a largo plazo. En su estudio de 120 pacientes sugieren que el CMV está asociado con una CU de mayor severidad (no encontraron CMV en los pacientes con EC) y ninguno de los pacientes con CU e infección por CMV precisó cirugía en los seis meses siguientes de seguimiento, ni desarrollaron colitis fulminante o murieron, a pesar de la falta de tratamiento.

Matsuoka, 2007, ha descrito, en un estudio prospectivo, que la reactivación del CMV (definido por antigenemia positiva en plasma o por estudios de PCR para CMV) sólo se observó en pacientes con tratamiento de corticoides pero no en aquellos con enfermedad activa antes de comenzar con corticoides. Para los autores Domènech, 2008 ni la terapia inmunosupresora ni la inflamación por si solas

son capaces para desarrollar enfermedad por CMV. Ninguno de sus pacientes con CU quiescente fueron diagnosticados de enfermedad de CMV incluso cuando la mesalacina o AZA eran utilizados como tratamiento de mantenimiento.

Kambhan, 2004, en un estudio casos control, compararon las características histopatológicas de pacientes con tratamiento esteroideo respondedor y tratamiento esteroideo resistente y demostraron que la enfermedad por CMV es más prevalente entre los segundos.

En pacientes con EII con una variedad de medicamentos inmunosupresores, la reactivación evidente de CMV (detectado por PCR) es un hallazgo frecuente, aunque la enfermedad grave parece ser poco frecuente. En estudios prospectivos el efecto del tratamiento con Infliximab en reactivaciones virales en pacientes con enfermedad de Crohn's o artritis reumatoide, no evidencian reactivación sistémica de CMV (demostrado por PCR) (Torre-Cisneros, 2005 y Lavagna, 2007).

Un número pequeño de reactivación severa del CMV ha sido informada en pacientes, con diferentes enfermedades, tratados con terapias anti-TNF que incluyen hepatitis, retinitis y diseminación infecciosa, todos tratados satisfactoriamente con ganciclovir (Sari, 2008).

En amplias cohortes de pacientes con EII que recibían Infliximab, la infección vírica como primaria o reactivación de virus herpes simple (VHS), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (VEB) o virus varicela zoster (VZV) está asociada a la mayoría de las complicaciones virales, sin embargo no aparecen datos sobre el papel de HHV6 (Rahier, 2009).

El tratamiento con Azatioprina en pacientes con enfermedad de Crohn condiciona un mayor riesgo de infección oportunista por *Herpesvirus*. Sin embargo, y en ausencia de otros factores que incrementen el estado de inmunosupresión, ésta suele presentar una evolución benigna con tratamiento antiviral específico (Bernal, 2003).

Se sabe que el desarrollo de infecciones en pacientes que reciben Azatioprina está en relación con la acumulación de metabolitos activos en el interior de los glóbulos rojos, para lo que son necesarios largos periodos de tratamiento, meses, incluso años (Sandborn, 1996).

En el caso de la EII, además de la utilización habitual de inmunosupresores (Sandborn, 1996) pueden existir diversos factores que aumentan el riesgo de infecciones. Localmente, los cambios inflamatorios de la mucosa intestinal podrían favorecer la sobreinfección por *Salmonella*, *Clostridium* (Szilagy, 1957; Trnka, 1981 y Vega, 1999). La elevada incidencia de malnutrición energético proteica en la EII facilita, asimismo, el desarrollo de infecciones (O'Sullivan, 1998).

Mouzas, 1999, describió cuatro casos de varicela en pacientes con EII e inmunosupresión farmacológica, todos ellos de evolución favorable independientemente de recibir o no tratamiento específico. A pesar de ello, estos autores recomendaban instaurar tratamiento antiviral y retirar tratamiento inmunosupresor para evitar complicaciones.

Hay que anotar que un número de casos de enfermedades linfoproliferativas han sido descritas en pacientes tratados con anti-TNF, que regresaron tras el cese de la terapia (Shale, 2008).

La infección por CMV concomitante con el tratamiento de Infliximab en la CU resistente a corticoides ha sido reflejada en la bibliografía (Isaacs, 2005; Actis, 2002 y Papadakis, 2001) .

Se disponen de pocos datos en los efectos específicos de anti- TNF- α (Infliximab) que se emplea en el tratamiento de pacientes con EII severa, complicada y resistente a esteroides (Isaacs, 2005).

Por el contrario el TNF- α por sí mismo puede provocar que el CMV pase de la latencia a la infección y el riesgo de enfermedad por CMV está relacionado con los niveles de TNF- α (Docke, 1994 y Reddy, 2005) sin embargo esto no ocurre así en la enfermedad de Crohn (Eyre-Brook, 1986; Papadakis, 2001 y Kambham, 2004).

Para el autor D'Ovidio, 2008 en un pequeño grupo evaluado de forma retrospectiva, con la mayoría de enfermos diagnosticados de enfermedad de Crohn, la prevalencia de CMV no aumenta tras tratamiento con Infliximab demostrado por antígeno pp65 AG en suero, PCR cuantitativa o DNA colónico, por histología e inmunohistoquímica. Y en estos pacientes se decidió no administrar la terapia antiviral. En ninguno de los pacientes se deterioraron las condiciones de salud mientras tomaban Infliximab, incluso en uno de ellos el DNA por PCR resultó negativa. Además, no se encontró clínica de enfermedad de CMV colónica en

pacientes con infección activa por CMV. Por ello, opinan estos autores que el CMV puede actuar como un “espectador invitado”, como han apuntado algunos autores y su papel desencadenante en las exacerbaciones de la EII severa son controvertidas (Kaufman, 1999).

5.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS:

A/ EVALUAR LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO ANTIVIRAL.

El Valganciclovir es un fármaco que inhibe la síntesis de ADN y la replicación de los virus herpes. Hasta ahora tras serología positiva para CMV se administra durante tratamiento antiviral durante 21 días.

Nosotros hemos observado, de forma retrospectiva, qué sucedía tras la administración de Valganciclovir o no administración en las biopsias que eran positivas para CMV. La observación se hizo en base a valorar la absorbancia tras tratamiento o no de fármaco antiviral tras biopsias positivas para CMV por PCR. Se hicieron dos categorías, aquellos que disminuía la absorbancia del CMV por PCR o desaparecía y aquellos que aumentaba la absorbancia del CMV por PCR o no mostraban cambios, ambos grupos separados según tomaban tratamiento antiviral o no. Sólo se valoraron aquellos episodios en los que había una biopsia posterior y en un tiempo menor a seis meses.

Y nosotros en nuestro estudio, a este respecto, hemos encontrado que el tratamiento antiviral no disminuye la absorbancia del virus CMV en tejido. Todos aquellos que no fueron tratados disminuyeron su nivel de absorbancia para CMV de forma espontánea.. Este se ha observado de forma retrospectiva. Pero para poder valorar el tratamiento antiviral para esto creemos que sería más conveniente un estudio de cohortes, en el que después de la administración del tratamiento antiviral habría que realizar una nueva biopsia y ver qué ocurre con el DNA viral en tejido.

La decisión de poner o no tratamiento antiviral, una vez la colitis por CMV se ha confirmado, es todavía incierto (Eyre-Brook, 1986), si bien nuestro estudio apoyaría la decisión de no tratar de manera específica.

Mouzas, 1999, describió cuatro casos de varicela en pacientes con EII e inmunosupresión farmacológica, todos ellos de evolución favorable independientemente de recibir o no tratamiento específico. A pesar de ello, estos autores recomendaban instaurar tratamiento antiviral y retirar tratamiento inmunosupresor para evitar complicaciones.

Domènech, 2008 siguiendo la práctica clínica, los diagnosticados por enfermedad por CMV fueron tratados con ganciclovir. El tratamiento antiviral aclaró el CMV en todos ellos, y tres de los cuatro pacientes evitaron la colectomía, como indican otros estudios (Saussure, 2004; Cottone, 2001; Minami, 2007 y Wada, 2003).

Cottone, 2001, afirmó que el ganciclovir sin ciclosporina podría ser suficiente para inducir la remisión de la enfermedad en pacientes con enfermedad de CMV y con tratamiento corticoide resistente.

El tratamiento con azatioprina en pacientes con enfermedad de Crohn condiciona un mayor riesgo de infección oportunista por *Herpesvirus*. Sin embargo, y en ausencia de otros factores que incrementen el estado de inmunosupresión, ésta suele presentar una evolución benigna con tratamiento antiviral específico (Bernal, 2003).

Un número pequeño de reactivaciones severas de CMV han sido informadas en pacientes, con diferentes enfermedades, tratados con terapias anti-TNF que incluyen hepatitis, retinitis y diseminación infecciosa, todos tratados satisfactoriamente con ganciclovir (Sari, 2008).

OBJETIVO B/ DEFINIR CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS QUE PERMITEN PREDECIR LA AMPLIFICACIÓN VIRAL EN TEJIDO DE PACIENTES CON EII.

CMV

El espectro histológico de la infección del CMV es variable; varía desde mínima inflamación a úlceras con prominente tejido de granulación y necrosis. Las inclusiones virales del CMV se encuentran en mayor número alrededor de los vasos de la mucosa o en la base de las úlceras, por lo que las biopsias de mucosa superficial no siempre son idóneas (Roskell, 1995 y Tatum, 1989).

Las inclusiones características del CMV, en “ojo de buho”, pueden verse en las preparaciones de H&E de rutina y pueden ser intracitoplasmáticas o intranucleares. Las inclusiones se encuentran preferentemente en las células endoteliales y en las células estromales, y raramente en células epiteliales. A diferencia del adenovirus y herpesvirus, las inclusiones del CMV se encuentran a menudo en zonas profundas de la úlcera que en la mucosa superficial. Cambios histológicos asociados incluyen criptitis, infiltrado inflamatorio mixto que generalmente incluye numerosos neutrófilos, y ulceraciones de la mucosa (Chetty, 1994). Los abscesos de cripta, atrofia y pérdida de criptas, y numerosos enterocitos apoptóticos pueden ser vistos (Kraus, 1998).

En las biopsias, el diagnóstico puede pasar desapercibido cuando hay pocas inclusiones presentes. El realizar seriaciones del tejido para ver varios niveles, y el estudio inmunohistoquímico cuando se ven las inclusiones, puede ayudar al diagnóstico. Otros procedimientos diagnósticos incluyen cultivo viral, estudio serológico-estudio de antigenemia, PCR e hibridación in situ. La presencia de CMV en cultivo, sin embargo, no implica infección activa viral (Chetty, 1994).

El diagnóstico diferencial es fundamentalmente con otras infecciones virales, particularmente adenovirus (Yan, 1998). Las inclusiones del adenovirus son en forma de media luna, generalmente en la superficie del epitelio y solamente intranucleares. Las inclusiones del CMV tiene morfología, se localizan dentro de las células endoteliales o células estromales, y pueden estar dentro del núcleo o citoplasma.

HERPESVIRUS

Las infecciones herpéticas pueden verse a lo largo de todo el tracto digestivo, pero es más frecuente en el esófago o región anorrectal. Se ven, sobre todo, en pacientes inmunodeprimidos, pero no están limitados a este grupo.

La proctitis herpética es la causa más común de proctitis no gonocócica en hombres homosexuales, y generalmente se presenta como fuerte dolor anorrectal, tenesmo, fiebre así como con linfadenopatía inguinal (Goodell, 1983).

Los hallazgos en la región anal incluyen ulceración y friabilidad de la mucosa y ocasionalmente vesículas a nivel del recto o canal anal (McBane, 1991 y Goodell, 1983).

Los hallazgos histológicos típicos de los herpesvirus incluyen ulceración focal, neutrófilos en la lámina propia y un exudado inflamatorio que incluye células epiteliales descamativas. En la región anorrectal incluyen linfocitos perivasculares y abscesos de criptas. Las inclusiones virales características y las células gigantes sólo se ven en una minoría de biopsias (Goodell, 1983). El mejor lugar para buscar estas inclusiones virales es dentro del epitelio escamoso, en los bordes de la úlcera y en células descamadas de la úlcera. El diagnóstico diferencial principal es con otras infecciones virales como el CMV y VZ. Y hay que recordar que se pueden dar en muchas situaciones donde se encuentra la infección herpética. En personas inmunocomprometidas, la infección herpética suele ser limitada, mientras que en las personas inmunodeprimidas la infección puede diseminarse.

Nuestro objetivo era observar las características histológicas de las biopsias sobre las que se realizó PCR, y sobre todo saber si hay características propias que nos definan la presencia o ausencia viral así como el tipo de virus de la familia herpes.

De las 79 biopsias positivas para virus herpes por PCR sólo en una biopsia se observaron claramente inclusiones virales, sugestivas de CMV y confirmado el diagnóstico por IHQ, mientras que en las otras 78 biopsias no había signos de infección por virus, por lo que basamos nuestra observación en otros datos indirectos y no específicos como la apoptosis y la vasculitis (Miszczak, 2013; Hansen, 1999; Brune, 2011 y Fliss, 2012). La apoptosis no es exclusiva de la presencia de

CMV o VEB, sino que también se observa en enfermedad injerto contra huésped (Hansen, 1999), drogas como el micofenolato (Parfitt, 2008).

OBJETIVO C/ VALORAR LAS DISTINTAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS COMO VALOR PREDICTIVO.

¿CÓMO SE DETECTA MEJOR EL CMV?

1. Serología.

Los anticuerpos IgG reflejan exposición y dan positividad hasta al 70% de la población (Knez, 1976 y Pfau, 2001) por lo que un resultado positivo no proporciona información (Kambhan, 2004). Aproximadamente el 30% de los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal no estarán en riesgo de reactivación del CMV dado que no han tenido infección previa. La serología de la IgG es una forma rápida de identificar este subgrupo y excluir la reactivación del CMV del diagnóstico diferencial.

Por otra parte, los anticuerpos IgM indican infección reciente (Rahier, 2009 y Berkelhammer, 2007), pero no son específicos de la enfermedad colónica (Pfau, 2001).

Los estudios de antigenemia del CMV, que son en leucocitos de sangre periférica, están abiertas a interpretaciones subjetivas (Kandiel, 2006), y los resultados pueden ser positivos sin afectación gastrointestinal (Yoda, 2006 y Yoshino, 2007). Los estudios de antigenemia han sido remplazados por detección y cuantificación de CMV a través de técnicas moleculares como la PCR. En nuestra serie no han aportado nada relevante.

2. Histopatología.

El estudio histológico de la mucosa rectal, teñida con H&E, parece un método fiable para detectar enfermedad por CMV (colitis) en mucosa del colon que es clínicamente relevante (Kandiel, 2006). Las inclusiones virales del CMV se encuentran en mayor número alrededor de los vasos de la mucosa o en la base de las úlceras, por lo que las biopsias de mucosa superficial no siempre son idóneas (Roskell, 1995 y Tatum, 1989).

La técnica de H&E tiene una especificidad del 92-100%, pero a menudo es poco sensible (10-87%) (Beaugerie, 1997). En ocasiones no se encuentran inclusiones en la biopsia (Takahashi, 2004).

La inmunohistoquímica (IHQ) parece que es más sensible que la tinción de H&E (78-93%) pero generalmente se emplea solamente para confirmar los hallazgos por el microscopio convencional (Beaugerie, 1997). En nuestra serie no hemos encontrado beneficio a la realización de inmunohistoquímica, mientras que con técnicas de microscopía óptica convencional no hemos hallado casos en nuestra serie con criterios claros de diagnóstico de enfermedad por CMV.

3. PCR.

Las técnicas de diagnóstico molecular como la PCR a tiempo real se emplean para cuantificar la viremia. Son sensibles, pero no específicas para colitis clínicamente importantes por CMV. La PCR en biopsia es el método más sensible.

En un estudio, 24 pacientes con CU que fueron colectomizados por refractariedad del tratamiento médico (corticoides y en algunos casos ciclosporina o infliximab) fueron comparados con pacientes sometidos a colectomía por cáncer colorectal (Lavagna, 2006). A pesar de que el CMV fue detectado por PCR en el 13% y por histología en el 4% de los casos de CU, comparado con ningún caso dentro de los controles, la diferencia entre casos y controles no fue estadísticamente significativa. La baja tasa de detección de CMV es notable en una población inmunocomprometida, pero los números son muy bajos para establecer conclusiones definitivas. Por ello, la importancia clínica es incierta, porque no se ha demostrado que el tratamiento para el CMV pueda haber alterado el curso de la colectomía.

Un estudio japonés afirma que la PCR detectó el CMV en mucosa inflamada de 17 (57%) de 30 pacientes con CU refractaria a inmunomoduladores y ninguno de los cuatro pacientes respondió a tratamiento específico (Yoshino, 2007).

La disparidad numérica sugiere que la selección de pacientes estaba altamente sesgada, dado que la respuesta a inmunomoduladores se estima generalmente en el 70%. El estudio histológico con H&E e IHQ en este estudio detectó el CMV en uno de los 17 pacientes que fueron positivos por PCR. Los autores administraron terapia antiviral a aquellos identificados como positivos por PCR e intensificaron el tratamiento inmunomodulador en pacientes con CMV negativo y confirmaron un alto índice de remisión, pero los números son muy pequeños y la falta de controles hace inapropiado ninguna conclusión.

En nuestra experiencia, por datos serológicos, cuando las hubo, todas las pruebas indicaron negatividad para CMV y demás virus de la familia herpes. Por IHQ sólo una biopsia fue positiva para CMV y en esta biopsia se desconocen datos serológicos y la PCR y rtPCR fueron positivas, mientras que no había material suficiente para detectar RNA viral.

Mediante técnica de PCR 53 biopsias fueron positivas para CMV, ocho para rtPCR, una sólo para IHQ, ninguna para RNA (tres biopsias no se pudieron valorar por falta de material, corresponden a biopsias endoscópicas que se perdió el material por las diferentes pruebas diagnósticas) y ninguna por estudio serológico cuando se tenía este dato (16 casos) aunque en todas fueron IgG+ e IgM-.

El empleo de la PCR para las absorbancias de CMV nos dio unos resultados en el que el valor predictivo negativo (VP-) fue de 94,3 y el valor predictivo positivo (VP+) 14,8. La sensibilidad es 28,6% y la especificidad de 87,7%.

Con la técnica de rtPCR obtuvimos estos resultados, el VP- fue: 92,7 y el VP+: 0. La sensibilidad del 0% y la especificidad del 95,7%.

6. CONCLUSIONES

PRESENCIA DE AMPLIFICACIÓN VIRAL

- Hemos hallado positividad por métodos moleculares en un 60,6% de las biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.
- El CMV estaba presente en un 26,4% de las biopsias.
- Fue más frecuente encontrar amplificación viral en las biopsias de colitis ulcerosa (65,2%) que en la enfermedad de Crohn (38,2%).

RELACIÓN ENTRE DETECCIÓN MOLECULAR Y DÍAS DE INGRESO

- Existió una tendencia hacia un mayor tiempo de estancia hospitalaria en los pacientes con presencia de replicación viral de CMV detectada por PCR semicuantitativa.
- La mediana de días de estancia para los pacientes sin amplificación viral era de cero días de ingreso mientras que para los pacientes con amplificación de CMV era de 16 días.
- La media de días de estancia para los pacientes sin amplificación viral fue de 7,2 días y para los pacientes con CMV de 20,26 días. El percentil 75 fue de 12,5 días para los pacientes sin virus y 34,50 días para los pacientes con virus ($p < 0,05$).

RELACIÓN ENTRE COLECTOMÍAS Y PRESENCIA VIRAL

- Nueve de los 102 pacientes precisaron colectomía total. Siete piezas quirúrgicas mostraron positividad molecular para alguno de los tipos virales analizados mientras que las dos restantes resultaron negativas.
- El porcentaje de pacientes que precisó de colectomía, entre aquellos que mostraron positividad viral en algún momento de su evolución fue el doble que entre los enfermos que no la presentaron (10,8% frente a 5,4%).

RELACIÓN DE LA PRESENCIA VIRAL CON EL TRATAMIENTO RECIBIDO

- Los pacientes en tratamiento con azatioprina tuvieron una tendencia no significativa a la mayor presencia de CMV en sus biopsias.
- Los pacientes en tratamiento con anti-TNF mostraron una menor proporción de biopsias con positividad para CMV no significativa.

- La mayoría de las biopsias con replicación viral de HHV6 se produjeron en pacientes en tratamiento con azatioprina (47,05%).

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO ANTIVIRAL

- El tratamiento antiviral con valganciclovir no disminuyó la absorbancia de CMV en niveles significativamente diferentes a los pacientes que no recibieron tratamiento en los casos donde se pudo evaluar el seguimiento.

DEFINICIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS QUE PERMITEN DEFINIR LA PRESENCIA VIRAL EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON EII

- El porcentaje de células en apoptosis en las biopsias positivas para VEB por PCR fue del 67,5% frente a las biopsias negativas (33,6%) ($p < 0,05$).
- El porcentaje de células en apoptosis en las biopsias con presencia de CMV por PCR fue significativamente mayor (71,4%) que la encontrada en las biopsias sin CMV por PCR, 39, 1% ($p < 0,05$).
- No existieron diferencias en cuanto a las lesiones de vasculitis en ninguno de los grupos de biopsias analizados.
- No encontramos diferencias en la morfología de las lesiones al comparar entre grupos de tratamiento recibido por el paciente.

VALORACIÓN DE LAS DISTINTAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS COMO VALOR PREDICTIVO

- Todos los datos obtenidos del análisis de sangre periférica, cuando los hubo, fueron negativos para CMV.
- La PCR cuantitativa a tiempo real detectó ocho casos de los 53 que encontró la PCR semicuantitativa frente a CMV.
- Por IHQ sólo una biopsia resultó positiva y por hibridación in situ todas resultaron negativas para CMV.
- Ninguna prueba sirvió como elemento predictivo para la necesidad de colectomía.
- El análisis de curvas COR reveló que ninguna de las pruebas analizadas (PCR semicuantitativa y PCR a tiempo real) mostró utilidad clínica.

7. A TENER EN CUENTA

- Al ser un estudio retrospectivo se carecen de algunos datos.
- Además de valorar la presencia o no de virus en relación a días de estancia o colectomías, hubiera sido interesante valorar las absorbancias de cada virus con diferentes escalas para valorar la gravedad de la enfermedad como la de Truelove-Witts para la CU y el índice de Harvey Bradshaw o el cálculo de Índice de Actividad de Enfermedad de Crohn (CAI).
- Algunos datos no son estadísticamente significativos debido a que la n de la muestra es pequeña. En el caso de las colectomías sólo había 9 colectomías en relación a las 93 pacientes que no tenían colectomía. La proporción de los pacientes con virus y colectomía (10,8) y colectomías sin virus (5,4%) es el doble. Para que la p fuera significativa necesitamos 76 sujetos en un grupo y 684 en el segundo. Para ello necesitaríamos ampliar el estudio con un tamaño muestral mayor, probablemente un estudio multicéntrico, dado que los datos orientan a un papel del CMV en la mala evolución de la enfermedad. Lo mismo ocurre con pacientes que toman azatioprina y los anti-TNF.
- Para valorar con rigor el papel de los tratamientos farmacológicos antivirales es necesario una biopsia en el momento del brote agudo con presencia de virus y una biopsia posterior tras la finalización del tratamiento antiviral. Dato que desconocemos, por lo que no podemos analizar en profundidad el papel del tratamiento antiviral.

8. OTROS HALLAZGOS

- Ninguno de los pacientes de nuestro estudio desarrolló amiloidosis secundaria por tratamiento con infliximab durante el periodo de seguimiento (Seijo Ríos, 2008; Verschueren, 2003 y Lizuka, 2006).
- Ninguno de los pacientes desarrolló carcinoma colorrectal en el periodo de seguimiento de los pacientes (Langholz, 1992).
- Los niveles de absorbancia de CMV por PCR semicuantitativa no tuvieron correlación con ninguno de los diferentes datos serológicos recogidos.
- Sólo uno de los pacientes, tiene recogida en su historia del hospital, apendicectomía para poder valorar la mejoría o no de la enfermedad tras dicha cirugía (Russel, 1997 y Logan, 1995).

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Actis GC, Bruno Pintor M, Rossini FP, Rizzeto M. Infliximab for treatment of steroid-refractory ulcerative colitis. *Dig Liv Dis*. 2002;34:631-4.
- 2) Adler SP, Hempffing SH, Starr SE, et al. Safety and immunogenicity of the Towne strain cytomegalovirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 1998;17:200-6.
- 3) Alcalà MJ, Casellas F, Pallares J, et al. Infection by cytomegalovirus in patients with ulcerative colitis requiring colonic resection. *Med Clin (Barc)*. 2000;114:201-4.
- 4) Alford CA, Stagno S, Pass EF, et al. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis*. 1990;12(suppl 7):S745-S753.
- 5) Ayre K, Warren B, Jeffrey K, et al. The role of CMV in steroid-resistant ulcerative colitis: a systematic review. *J Crohn's Colitis*. 2009;3:141-8.
- 6) Banerjee D, Deb R, Da L, et al. High frequency of parasitic and viral tool pathogens in patients with active ulcerative colitis: report from a tropical country. *Scand J Gastroenterol*. 2008;28:1-7.
- 7) Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007;369:1627-40.
- 8) Beaugerie L, Cywiner-Golenzer C, Monfort L, et al. Definition and diagnosis of cytomegalovirus colitis in patients infected by human immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Deficiency Syndr Hum Retrovirol*. 1997;14:423-9.
- 9) Bennekov T, Spector D, Langhoff E. Induction of immunity against human cytomegalovirus. *Mt Sinai J Med*. 2004;71(2):86-93.
- 10) Berkelhammer C. Cytomegalovirus negative blood transfusions in CMV-negative inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(9):1184.
- 11) Bernal I, Domènech E, García-Planella E, Cabré E, Gasull M.A. Infecciones oportunistas en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal bajo tratamiento inmunosupresor. *Gastroenterol Hepatol*. 2003;26(1):19-22.
- 12) Bertalot G, Villanacci V, Gramegna M et al. Evidence of Epstein-Barr virus infection in ulcerative colitis. *Dig Liver Dis*. 2001;33:551-8.
- 13) Betts RK, Hanshaw JB. Cytomegalovirus in the compromised host. *Ann Rev Med*. 1977;28:103-10.

- 14) Bianchi Porro G, Cassinotti A, Ferrara E et al. Review article: the management of steroid dependency in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26:779-94.
- 15) Blank B.S, Meenhorst PL, Mulder JW et al. Value of different assays for detection of human cytomegalovirus (HCMV) in predicting the development of HCMV disease in human immunodeficiency virus-infected patients. *Journal of Clinical Microbiology.* 2000;38: 563-9.
- 16) Bogomeletz WV, Flejou JF: Newly recognized forms of colitis: Collagenous colitis, microscopic (lymphocytic) colitis and lymphoid follicular proctitis. *Semin Diagn Pathol.* 1991;8:178-89.
- 17) Boivin G, Handfield J, Toma E, et al. Evaluation of the AMPLICOR cytomegalovirus test with specimens from human immunodeficiency virus infected subjects. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2509-13.
- 18) Boyco EJ, Theis MK, Vaughan TL, Nicol-Blades B. Increased risk of inflammatory bowel disease associated with oral contraceptive use. *Am J Epidemiol.* 1994;140:268-78.
- 19) Brainard J.A, Greenson JK, Vesey CJ et al. Detection of Light microscopy, immunohistochemistry, duplex PCR and Nested PCR. *Transplantation.* 1994;57:1753-7.
- 20) Brant SR, Fu Y, Fields C, et al: American families with Crohn's disease have strong evidence for linkage to chromosome 16 but not chromosome 12. *Gastroenterology.* 1998;115:1056-61.
- 21) Brant SR, Panhuysen CIM, Bailey-Wilson JE, et al: Linkage heterogeneity for the IBD 1 locus in Crohn's disease pedigrees by disease location and severity. *Gastroenterology* 2000;119:1483-90.
- 22) Brullet E, Bonfill X, Urrutia G, et al. Estudio epidemiológico sobre la incidencia de la enfermedad inflamatoria intestinal en cuatro áreas españolas. *Med Clin (Barc).* 1998;110:651-6.
- 23) Brune W. Inhibition of programmed cell death by cytomegaloviruses. *Virus Res.* 2011;157:144-50.
- 24) Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis.* 1989;34:1841-54.

- 25) Chetty R, Roskell DE: Cytomegalovirus infection in the gastrointestinal tract. *J Clin Pathol.* 1994;47:968-72.
- 26) Chuanh SY. Dietary fats and inflammatory bowel disease in Asians. *Ital J Gastroenterol.* 1992;21:386-8.
- 27) Colugnati FA, Staras SA, Dollard SC, et al. Incidence of cytomegalovirus infection among general population and pregnant women in the United States. *BMC Infect Dis.* 2007;7:71.
- 28) Cooper HS, Raffensperger EC, Jonas L, et al. Cytomegalovirus inclusions in patients with ulcerative colitis and toxic dilatation requiring colonic resection. *Gastroenterology.* 1977;72:1253-6.
- 29) Cosnes J. Oral contraceptive use and the clinical course of Crohn's disease: a prospective cohort study. *Gut.* 1998; 45:218-22.
- 30) Cottone M, Pietrosi G, Martorana G, et al. Prevalence of cytomegalovirus infection in severe refractory ulcerative and Crohn's colitis. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:773-5.
- 31) Creed TJ, Probert CS. Review article: steroid resistance in inflammatory bowel disease-mechanisms and therapeutic strategies. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;25:111-22.
- 32) Criscuoli V, Casà A, Orlando A, et al. Severe acute colitis associated with CMV: a prevalence study. *Dig Liver Dis.* 2004;36:818-20.
- 33) Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med.* 2000;67:263-8.
- 34) Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:76-98.
- 35) D'Ovidio V, Vernia P, Gentile G, et al. Cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease patients undergoing anti-TNF α therapy. *Journal of Clinical Virology* 2008;43:180-3.
- 36) Davies NM. Toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the large intestine. *Dis Colon Rectum.* 1995;38:1311-21.
- 37) Davoli, E.H. Evaluation of the Prime Capture CMV DNA detection plate system for detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 1999;37:2587-91.

- 38) De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on Human Herpesvirus 6 biology, clinical features and therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:217-45.
- 39) De la Hoz RE, Stephens G, Sherlock C. Diagnosis and treatment approaches of CMV infections in adult patients. *J Clin Virol.* 2002;25 (suppl 2):S1-12.
- 40) DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics.* 1988;44:837-45.
- 41) De Saussure P, Lavergne-Slove A, Mazon MC, et al. A prospective assessment of cytomegalovirus infection in active inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20:1323-7.
- 42) Docke WD, Prosch S, Fietze E, et al. Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor. *Lancet* 1994;343:268-9.
- 43) Domènech E, Vega R, Ojanguren I, et al. Cytomegalovirus infection in ulcerative colitis: a prospective, comparative study on prevalence and diagnostic strategy. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:1373-9.
- 44) Eyre-Brook IA, Dundas S. Incidence and clinical significance of colonic cytomegalovirus infection in idiopathic inflammatory bowel disease requiring colectomy. *Gut.* 1986;27:1419-25.
- 45) Faubion WA, Loftus EV Jr, Harmsen WS, et al. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population based study. *Gastroenterology.* 2001;121:255-60.
- 46) Faulds D, Heel RC. Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. *Drugs.* 1990;39:597-638.
- 47) Fiocchi C. Inflammatory Bowel Disease: Etiology and pathogenesis. *Gastroenterology.* 1998;115:182-205.
- 48) Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1984;86:104-113.
- 49) Flejou JF, Potet F, Bogomoletz WV, et al: Lymphoid follicular proctitis. A condition different from ulcerative proctitis? *Dig Dis Sci.* 1988;33:314-20.
- 50) Fliss PM, Brune W. Prevention of cellular suicide by cytomegaloviruses. *Viruses.* 2012;4:1928-49.

- 51) Gasche C, Schölmerich J, Brynskov J, et al. A simple classification of Crohn's disease: Report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:8-15.
- 52) Gerna G, Lilleri D. Monitoring transplant patients for human cytomegalovirus: Diagnostic update. *Herpes*. 2006;13:4-11.
- 53) Gilat T, Grossman A, Fireman Z, Rosen P. Inflammatory Bowel Disease in Jews. *Front Gastrointest Res*. 1986;11:135-40.
- 54) Ginsburg CH, Dambrauskas JT, Ault KA, et al. Impaired natural killer cell activity in patients with inflammatory bowel disease: evidence for a qualitative defect. *Gastroenterology*. 1983;85:846-51.
- 55) Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995;37:668-73.
- 56) Goodell SE, Quinn TC, Mkrtichian E, et al: Herpes simplex virus proctitis in homosexual men: Clinical, sigmoidoscopic, and histopathological features. *N Engl J Med*. 1983; 308:868-71.
- 57) Goodgame RW. Gastrointestinal cytomegalovirus disease. *Ann Intern Med* 1993;119:924-35.
- 58) Gower Rousseau C, Salomez JL, Dupas JL, et al. Incidence of inflammatory bowel disease in northern France (1988-90). *Gut* 1994;35:1433-8.
- 59) Halme L, Arola J, Hockerstedt K, Lautenschlager I. Human herpesvirus 6 infection of the gastroduodenal mucosa. *Clin Infect Dis*. 2008;46:434-9.
- 60) Hansen PR, Holm AM, Svendsen UG, Olsen PS, Andersen CB. Apoptosis in acute pulmonary allograft rejection and cytomegalovirus infection. *APMIS*. 1999;107:529-33.
- 61) Harries AD, Baird A, Rhodes J. Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. *Br Med J*. 1982;284:706.
- 62) Hawthorne AB, Logan RF, Hawkey CJ et al. Randomised controlled trial of azathioprine withdrawal in ulcerative colitis. *Br Med J*. 1992;305:20-2.
- 63) Ho GT, Mowat C, Gooddard CJR, et al. Predicting the outcome of severe ulcerative colitis: development of a novel risk score to aid early selection of patients for second-line medical therapy or surgery. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;19:1079-87.

- 64) Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol.* 2008;197:65-73.
- 65) Hommes DW, Sterringa G, van Deventer SJ, et al. The pathogenecity of cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: a systematic review and evidence-based recommendations for future research. *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10:245-50.
- 66) Hugot JP, Chamaillard M, Zuoali H, Lesage S et al. Association of NOD2 leucin-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
- 67) Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al: Mapping of a susceptibility for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature.* 1996;379:821-3.
- 68) Isaacs KL, Lewis JD, Sandborn WJ, Sands BE, Targan SR. State of the art: IBD therapy and clinical trials in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2005 Nov;11(Suppl 1):S3-12.
- 69) Kambhan N, Vij R, Catwright CA, Longacre T. Cytomegalovirus infection in steroid-refractory ulcerative colitis: a case control study. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:365-73.
- 70) Kandiel A, Lashner B. Cytomegalovirus colitis complicating inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:2857-65.
- 71) Kaufman HS, Kahan AC, Iacobuzio-Donahue C, et al. Cytomegaloviral enterocolitis: clinical associations and outcome. *Dis Colon Rectum.* 1999;42:24-30.
- 72) Kim J, Simpson N, Klipfel N, DeBose Renee, Barr N, Laine L. Cytomegalovirus Infection in Patients with Active Inflammatory Bowel disease. *Dig Dis Sci,* 2010;55:1059-65.
- 73) Kishore J, Ghoshai U, Ghoshal UC et al. Infection with cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease: prevalence, clinical significance and outcome. *J Med Microbiol.* 2004;53:1155-60.
- 74) Knez V, Stewart JA, Ziegler DW. Cytomegalovirus specific IgM and IgG response in humans studied by radioimmunoassay. *J Immunol* 1976;117:2006.

- 75) Knosel T, Schewe C, Petersen N, et al. Prevalence of infectious pathogens in Crohn's disease. *Pathol Res Pract*. 2009; 205:223-30.
- 76) Kobayashi K, Atoh M, Kanoeda Y, Yagita A, Inoko H, Sekiguchi S. HLA-DR, QD and T cell antigen receptor constante beta genes in japanese patients with ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*. 1990;80:400-3.
- 77) Kojima T, Watanabe T, Hata K, et al. Cytomegalovirus infection in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2006;41:706-11.
- 78) Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterology*. 2004;99:1371-85.
- 79) Kraus MD, Feran-Doza M, García-Moliner ML, et al: Cytomegalovirus infection in the colon of bone marrow transplant patients. *Mod Pathol*. 1998;11:29-36.
- 80) Krech UJ. Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the World. *Bull World Health Organ*. 1973;49:103-6.
- 81) Kuramoto S, Oohara T, Ihara O, et al: Granulomas of the gut in Crohn's disease. A step sectioning study. *Dis Colon Rectum* 1987;30:6-11.
- 82) Kuwabara A, Okamoto H, Hatakeyma K, et al. Clinicopathologic characteristics of clinically relevant cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease. *J Gastro*. 2007;42:823-9.
- 83) Lamps LW, Madhusudhan KT, Havens JN, et al: Pathogenic *Yersinia* DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:220-7.
- 84) Landry ML, Ferguson D. Comparison of quantitative cytomegalovirus antigenemia assay with culture methods and correlation with clinical disease. *J Clin Microbiol*. 1993;31:2851-6.
- 85) Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. Colorectal cancer risk and mortality in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1992;103:1444-51.
- 86) Lavagna A, Bergallo M, Daperno M et al. Infliximab and the risk of latent viruses reactivation in active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13, 896-902.

- 87) Lavagna A, Bergallo M, Daperno M, et al. The hazardous burden of Herpesviridae in inflammatory bowel disease: the case of refractory severe ulcerative colitis. *Dig Liver Dis.* 2006; 38:887-93.
- 88) Lawlor G, Moss AC. Citomegalovirus in Inflammatory Bowel Disease: Pathogen or Innocent Bystander? *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:1620-7.
- 89) Le Berre N, Heresbach D, Kerbaol M et al. Histological discrimination of idiopathic inflammatory bowel disease from other types of colitis. *J Clin Pathol.* 1998;548:749-53.
- 90) Lennard-Jones JE. Classification of Inflammatory Bowel Disease. *Scand J Gastroenterol.* 1989;24:2-6.
- 91) Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case-control study. *Gut.* 1988;29:352-7.
- 92) Lizuka M, Konno S, Horie Y, Itou H, Shindo K, Watanabe S. Infliximab as a treatment for systemic amyloidosis associated with Crohn's disease. *Gut.* 2006;55:744-5.
- 93) Logan RFA, Duggan AE, Usmani I, Neal KR. Appendicectomy, tonsillectomy and risk of inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol.* 1995;21:283-6.
- 94) Logan RFA, Somerville KW, Edmond M, Langman MJS. Smoking and inflammatory bowel disease. *Front Gastrointest Res* 1986; 11:146-54.
- 95) Maconi G, Colombo E, Zerbi P et al. Prevalence, detection rate and outcome of cytomegalovirus infection in ulcerative colitis patients requiring colonic resection. *Dig Liver Dis.* 2005; 37:418-23.
- 96) Maher MM y Nasar MI. Acute Cytomegalovirus Is a risk Factor in Refractory and Complicated Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci.* 2009; 54:2456-62.
- 97) Markhan A, Faulds D. Ganciclovir. An update of its therapeutic use in cytomegalovirus infection. *Drugs.* 1994;48:455-84.
- 98) Markowitz J, Kahn E, Grancher K, et al: Atypical rectosigmoid histology in children with newly diagnosed ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 1993; 95:469-73.
- 99) Marszalek A, Marciniak R, Szkaradkiewicz A, et al. Inflammatory bowel disease-is there something new in the immunological background? *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2011;49:357-62.

- 100) Maté Jiménez J, Pajares García JM, Ruiz Aladros E. Epidemiología de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal: sexo, edad, raza, herencia y genética. *Rev Esp Ap Enferm Dig*. 1994;86:606-11.
- 101) Matsuoka K, Iwao Y, Mori T, et al. Cytomegalovirus is frequently reactivated and disappears without antiviral agents in ulcerative colitis patients. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:331-7.
- 102) Mayberry JF, Rhodes J. Epidemiological aspects of Cronh's disease: a review of the literature. *Gut*. 1984;25:885-9.
- 103) McBane RD, Gross JB: Herpes esophagitis: Clinical Síndrome, endoscopic appearance, and diagnosis in 23 patients. *Gastrointest Endosc*. 1991;37:600-23.
- 104) Meucci G, Vecchi M, Astegiano M, et al.: The natural history of ulcerative proctitis: A multicenter, retrospective study. Gruppo di Studio per le Malattie Inflamatorie Intestinali (GSMII). *Am J Gastroenterol*. 2000;95:469-73.
- 105) Meuwissen SG, Ewe K, Gasull MA et al. IOIBD questionnaire on the clinical use of azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporine A and methotrexate in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000;12:13-8.
- 106) Michaelides A, Liolios L, Glare EM, et al. Increased human cytomegalovirus (HCMV) DNA load in peripheral blood leucocytes after lung transplantation correlates with HCMV pneumonitis. *Transplantation*. 2001;72:141-7.
- 107) Minami M, Ohta M, Ohkura T, et al. Cytomegalovirus infection in severe ulcerative colitis patients undergoing continuous intravenous cyclosporine treatment in Japan. *World J Gastroenterol*. 2007;13:754-60.
- 108) Miszczak D, Slonska A, Golke A, Cymerys J. Herpesviruses survival strategies- latency and apoptosis. *Postepy Hig Dosw*. 2013;15:276-87.
- 109) Mouzas IA, Greenstein AJ, Giannadaki E, Balasubramanian S, Manousos ON, Sachar DB. Management of varicella infection Turing the course of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 1999;9:1534-7.
- 110) Nagington J. Cytomegalovirus antibody production in renal transplant patients. *J Hyg (Lond)*. 1971;69:645-60.

- 111) Nakajima A, Matsushashi N, Kodama T, et al: HLA-linked susceptibility and resistance genes in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1995;109:1462-7.
- 112) Nelson MR, Erskine D, Hawkins DA, et al. Treatment with corticosteroids – a risk factor for the development of clinical cytomegalovirus disease in AIDS. *AIDS*. 1993;7:375-8.
- 113) O'Sullivan MA, O'Morain CA. Nutritional therapy in Crohn disease. *Infla Bowel Dis*. 1998;4:45-53.
- 114) Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:603-6.
- 115) Ohmen JD, Yang HY, Yakamoto KK, et al: Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet*. 1996;5:1679-84.
- 116) Orholm M, Munkholm P, Langholz E, et al: Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 1991;324:84-8.
- 117) Ovar K, Murray J, Carmen G, et al. Cytomegalovirus infection associated with onset of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1993;38:2307-10.
- 118) Papadakis KA, Tung JK, Binder SW, et al. Outcome of cytomegalovirus infections in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:2137-42.
- 119) Parfitt JR, Jayakumar S and Driman DK. Mycophenolate Mofetil-related Gastrointestinal Mucosal Injury: Variable Injury Patterns, Including Graft-versus-Host Disease-like changes. *Am J Surg Pathol*. 2008;9:1367-72.
- 120) Pereyra F, Rubin RH. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis*. 2004;17:357-61.
- 121) Pérez-Miranda M, Pajares JM, Maté J. Role of Tonsilectomy in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 1994;106:A751.
- 122) Persson OG, Leijonmarck CE. Risk indicators for inflammatory bowel disease. *Int J Epidemiol*. 1993;22:268-88.
- 123) Petri M, Poulsen SS, Christensen K, et al: The incidence of granulomas in serial sections of rectal biopsies from patients with Crohn's disease. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scan [A]*. 1982;90:145-7.

- 124) Pfau P, Kochman ML, Furth EE, et al. Cytomegalovirus colitis complicating ulcerative colitis in the steroid-naive patients. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:895-9.
- 125) Polić B, Hengel H, Krompotić A et al. Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J Expl Med.* 1998;188:1047-54.
- 126) Powell RD, Warner NE, Levine RS et al. Cytomegalic inclusion disease and ulcerative colitis. Report of a case in a young adult. *Am J Med.* 1961;30:334-40.
- 127) Rahier JF, Ben-Horin S, Chowers Y, et al. European evidence-based consensus on the prevention, diagnosis and Management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. *J Crohn's and Colitis.* 2009;2:47-91.
- 128) Reddy V, Winer AG, Eksioglu E, Meier-Kriesche HU, Schold JD, Wingard JR. Interleukin 12 is associated with reduced relapse without increased incidence of graft-versus-disease after allogeneic hematopoietic stem cell. *Biol. Blood Marrow Trqansplant.* 2005;11:1014-21.
- 129) Rhodes J, Thomas GAO. Smoking: Good or bad for Crohn's disease? *Gastroenterology.* 1994;106:807-10.
- 130) Ridell RH, Goldman H, Ransohoff DF, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: Standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol.* 1975;6:7-29.
- 131) Roskell DE, Hyde GM, Campbell AP, Jewell DP, Gray W. HIV associated cytomegalovolitis as a mimic of inflammatory bowel disease. *Gut.* 1995;37:148-50.
- 132) Rotterdam H, Korelitz BI, Sommers SC: Microgranulomas in grossly normal rectal mucosa in Crohn's disease. *Am J Clin Pathol.* 1977;67:550-4.
- 133) Ruiz Ochoa V. Epidemiología de la enfermedad inflamatoria intestinal en España ¿Presenta características que la diferencian de los países anglosajones? En *Controversias en la enfermedad inflamatoria intestinal*. Ed. J. Hinojosa del Val y F. Díaz de Rojas 1998; Capítulo I:1-13.
- 134) Russel MG, Dorant E, Brummer RJM, Van de Kruijs M, Muris J, Bergers JM et al. Appendicectomy and the risk of developing Ulcerative Colitis or Crohn's

- disease: results of a large case-control study. *Gastroenterology*. 1997;113:377-82.
- 135) Russel MG, Engels LG, Muris JW et al. Modern life's in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1998;10:243-9.
- 136) Rutgeers P, D'Haens G, Hiele M, Geboes K, Vantrappen G. Apendicectomy protects against ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1994;106:1251-3.
- 137) Sandborn WJ. A review of immune modified therapy for inflammatory bowel disease: azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporine, and methotrexate. *Am J Gastroenterol*. 1996;91:423-33.
- 138) Sandler RS. Childhood exposure to environmental tobacco smoke and the risk of ulcerative colitis. *Am J Epidemiol*. 1992;135:603-8.
- 139) Sari I, Birlik M, Gonen C et al. Cytomegalovirus colitis in a patient with Behcet's disease receiving tumor necrosis factor alpha inhibitory treatment. *World J Gastroenterol*. 2008;14,2912-4.
- 140) Saro Gismera C, Lacort Fernández M, Argüelles Fernández G et al. Incidencia y prevalencia de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal Crónica en Gijón. Asturias. *Gastroenterol y Hepatol* 2000;23:322-7.
- 141) Saro Gismera C, Lacort Fernández M, Riestra S, et al. Enfermedad Inflamatoria Intestinal Crónica. Incidencia y Prevalencia en Asturias. España. *Gut*. 1999; 45 (suppl V):A125.
- 142) Saussure P, Lavergne-Slove A, Mazrnon MC, et al. A prospective assessment of cytomegalovirus infection in active inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;30:1323-7.
- 143) Schumacher G: First attack of inflammatory bowel disease and infectious colitis. A clinical, histological and microbiological study with special reference to early diagnosis. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1993;198:1-24.
- 144) Seijo Ríos S, Barreiro de Acosta M, Vieites Pérez-Quintela B, Iglesias Canle J, Forteza J y Domínguez Muñoz J.E. Amiloidosis secundaria en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Rev Esp Enferm Dig*. 2008;100:792-7.
- 145) Shale M, Kanfer E, Panaccione R, Ghosh S. Hepatoesplenic T-cell lymphoma in Inflammatory bowel disease. *Gut*. 2008;57:1639-41.

- 146) Shivanda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. Incidence of Inflammatory Bowel Disease across Europe: is there any difference between north and South? Result of the European Collaborative Study on Inflammatory bowel disease. Gut. 1996;39:690-7.
- 147) Smithson JE, Radford-Smith G and Jewell GP. Appendicectomy and Tonsilctomy in patients with Inflammatory Bowel Disease. J Clin Gastroenterol 1995;21:283-6.
- 148) Somerville KW, Logan RFA, Edmon M, et al: Smoking and Crohn's disease. BMJ. 1984;289:954-6.
- 149) Spanish Epidemiological and Economic Study Group on Crohn's disease. Epidemiological and clinical features of Spanish patients. Eur J gastroenterology & Hepatol. 1999;11:1121-7.
- 150) Spieker T, Herbst H. Distribution and Phenotype of Epstein-Barr Virus infected Cells in Inflammatory Bowel Disease. Am J Pathol. 2000;157:51-7.
- 151) Stack WA, Williams D, Stevenson M, Logan RF. Immunosuppressive therapy for ulcerative colitis: results of a nation-wide survey among consultant physician members of the British Society of Gastroenterology. Aliment Pharmacol Ther. 1999;13:569-75.
- 152) Stange EF, Travis SPL, Vermeire S et al. European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: definitions and diagnosis. J Crohn's Colitis. 2008;2:1-23.
- 153) Strenger V, Aberle SW, Wendelin G et al. Chromosomal integration of the HHV-6 genome as a possible cause of HHV-6 detection in cardiac tissues. J Clin Pathol. 2010;63(12):1129-30.
- 154) Surawicz CM, Meisel JL, Ylvisaker T, et al: Rectal biopsy in the diagnosis of Crohn's disease: Value of multiple biopsies and serial sectioning. Gastroenterology. 1981;80:66-71.
- 155) Szilagyi A, Gerson M, Mendelson J, Yusuf NA. *Salmonella* infections complicating inflammatory disease. J Clin Gastroenterol. 1957;7:251-5.
- 156) Takahashi Y, Tange T. Prevalence of cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease patients. Dis Colon Rectum. 2004; 47:722-6.

- 157) Targan SR, Karp LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev.* 2005;206:296-305.
- 158) Tatum ET, Sun PC, Cohn DL. Cytomegalovirus vasculitis and colon perforation in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Pathology.* 1989;21:235-8.
- 159) Teahon K, Smethurst P, Pearson M, et al: The effect of elemental diet on intestinal permeability and inflammation in Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1991;101:84-9.
- 160) Torre-Cisneros J, Del Castillo M, Castón JJ, Castro MC, Pérez V, Collantes E. Infliximab does not activate replication of lymphotropic herpesviruses in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2005;44:1132-5.
- 161) Toyoda H, Wang S-J, Yang H-J, et al: Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1993;104:741-8.
- 162) Toyoda H, Yamaguchi M, Uemura Y, et al: Successful treatment of lymphoid follicular proctitis with sulfasalazine suppositories. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95:2403-4.
- 163) Trnka YM, Lamont JT. Association of *Clostridium difficile* with symptomatic relapse of chronic inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1981;80:693-6.
- 164) Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, et al: Ulcerative colitis and Crohn's disease in unselected population of monozygotic and dizygotic twins: A study of heretability and the influence of smoking. *Gut.* 1988;29:990-6.
- 165) Van der Giessen M, van den Berg, van der Bij W, et al. Quantitative measurement of cytomegalovirus-specific IgG and IgM antibodies in relation to cytomegalovirus and disease activity in kidney recipients with an active cytomegalovirus infection. *Clin Exp Immunol.* 1990;80:56-61.
- 166) Vega R, Bertrán X, Menacho M, et al. Cytomeaglovirus infection in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:1053-6.
- 167) Verschueren P, Lensen F, Lerut E et al. Benefit of anti-TNF α treatment for nephrotic syndrome in a patient with juvenile inflammatory bowel disease associated spondyloarthropaty complicated with amyloidosis and glomerulonephritis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:368-9.

- 168) Wada Y, Matsui T, Matake H, et al. Intractable ulcerative colitis caused by cytomegalovirus infection: a prospective study on prevalence, diagnosis and treatment. *Dis Colon Rectum*. 2003;46:S59-S69.
- 169) Wakefield AJ, Fox JD, Sawyerr AM, et al. Detection of herpesvirus DNA in the large intestine of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease using the nested polymerase chain reaction. *J Med Virol*. 1992;38:183-90.
- 170) Watanabe T, Inoue M, Harada K et al. A case of exacerbation of ulcerative colitis induced by combination therapy with PEG-interferon alpha-2b and ribavirin. *Gut*. 2006;55:1682-3.
- 171) Wu TC, Lee WA, Pizzorno MC et al. Localization of the human cytomegalovirus (CMV) 2.7-kb mayor early beta-gene transcript by RNA in situ hybridization in permissive and nonpermissive infections. *Am J Pathol*. 1992;141:1247-54.
- 172) Wurzelmann JI, Lyles CM, Sandler RS. Childhood infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1994;39:550-60.
- 173) Yanai H, Shimizu N, Nagasaki S et al. Epstein-Barr virus infection of the colon with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:1582-6.
- 174) Yoda Y, Hanaoka R, Ide H, et al. Clinical evaluation of patients with inflammatory connective tissue diseases complicated by cytomegalovirus antigenemia. *Mod Rheumatol*. 2006;16:137-4.
- 175) Yoshikawa T. Significance of human herpes viruses to transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16:601-6.
- 176) Yoshino T, Nakase H, Ueno S, et al. Usefulness of quantitative realtime PCR assay for early detection of cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:1516-21.
- 177) Zhang LJ, Hanff P, Rutherford KW, et al. Detection of human cytomegalovirus DNA, RNA, and antibody in normal donor blood. *J Infect Dis*. 1995;171:1002-6.

10. ANEXOS

ANEXO I

ANEXO II

Comparison of ROC curves

Variable 1	CMV_ABSORBAN
Variable 2	RT_PCR_CMV
Classification variable	COLEC_POST_C

Sample size		49
Positive group :	COLEC_POST_C = 1	5
Negative group :	COLEC_POST_C = 0	44

	AUC	SE ^a	95% CI ^b
CMV_ABSORBAN	0,509	0,140	0,362 to 0,655
RT_PCR_CMV	0,591	0,0294	0,441 to 0,729

^a DeLong et al., 1988^b Binomial exact

Pairwise comparison of ROC curves

CMV_ABSORBAN ~ RT_PCR_CMV	
Difference between areas	0,0818
Standard Error ^c	0,147
95% Confidence Interval	-0,207 to 0,370
z statistic	0,556
Significance level	P = 0,5783

^c DeLong et al., 1988

ANEXO II

ROC curve

Variable	RT_PCR_CMV
Classification variable	COLEC_POST_C

Sample size		49
Positive group :	COLEC_POST_C = 1	5
Negative group :	COLEC_POST_C = 0	44

Disease prevalence (%)	unknown
------------------------	---------

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,591
Standard Error ^a	0,0294
95% Confidence interval ^b	0,441 to 0,729
z statistic	3,091
Significance level P (Area=0.5)	0,0020

^a DeLong et al., 1988^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,1818
95% Confidence interval ^a	0,06818 to 0,2727
Associated criterion	≤0
95% Confidence interval ^a	0 to 0

^a BC_a bootstrap interval (1000 iterations).

Summary Table

Estimated specificity at fixed sensitivity			
Sensitivity	Specificity	95% CI ^a	Criterion
80,00	18,18	6,82 to 27,27	≤0
90,00	18,18	6,82 to 27,27	≤0
95,00	18,18	6,82 to 27,27	≤0
97,50	18,18	6,82 to 27,27	≤0
Estimated sensitivity at fixed specificity			
Specificity	Sensitivity	95% CI ^a	Criterion
80,00	100,00	100,00 to 100,00	≤0
90,00	100,00	100,00 to 100,00	≤0
95,00	100,00	100,00 to 100,00	≤0
97,50	100,00	100,00 to 100,00	≤0

^a BC_a bootstrap interval (1000 iterations).

Criterion values and coordinates of the ROC curve [\[Hide\]](#)

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
<0	0,00	0,0 - 52,2	100,00	92,0 - 100,0		1,00
≤0	100,00	47,8 - 100,0	18,18	8,2 - 32,7	1,22	0,00
≤7,7	100,00	47,8 - 100,0	0,00	0,0 - 8,0	1,00	

Variable	CMV_ABSORBAN
Classification variable	COLEC_POST_C

Sample size		53
Positive group :	COLEC_POST_C = 1	5
Negative group :	COLEC_POST_C = 0	48

Disease prevalence (%)	unknown
------------------------	---------

Area under the ROC curve (AUC)

Area under the ROC curve (AUC)	0,538
Standard Error ^a	0,141
95% Confidence interval ^b	0,395 to 0,675
z statistic	0,266
Significance level P (Area=0.5)	0,7900

^a DeLong et al., 1988

^b Binomial exact

Youden index

Youden index J	0,3417
95% Confidence interval ^a	0,1958 to 0,4375
Associated criterion	>2,8
95% Confidence interval ^a	0,491 to 2,963

^a BC_a bootstrap interval (1000 iterations).

Summary Table

Estimated specificity at fixed sensitivity			
Sensitivity	Specificity	95% CI ^a	Criterion
80,00	54,17	21,87 to 71,34	>2,8
90,00	2,08	1,04 to 4,17	>0,4375
95,00	2,08	1,56 to 2,08	>0,4107
97,50	2,08	1,82 to 2,08	>0,3974
Estimated sensitivity at fixed specificity			
Specificity	Sensitivity	95% CI ^a	Criterion
80,00	11,14	0,00 to 39,34	>2,9931
90,00	0,00	0,00 to 0,00	>3,2228
95,00	0,00	0,00 to 0,00	>3,4032
97,50	0,00	0,00 to 0,00	>3,5

^a BC_a bootstrap interval (1000 iterations).

Criterion values and coordinates of the ROC curve [\[Hide\]](#)

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0,384	100,00	47,8 - 100,0	0,00	0,0 - 7,4	1,00	
>0,384	100,00	47,8 - 100,0	2,08	0,05 - 11,1	1,02	0,00
>0,491	80,00	28,4 - 99,5	2,08	0,05 - 11,1	0,82	9,60
>2,8	80,00	28,4 - 99,5	54,17	39,2 - 68,6	1,75	0,37
>2,9	60,00	14,7 - 94,7	54,17	39,2 - 68,6	1,31	0,74
>2,963	60,00	14,7 - 94,7	56,25	41,2 - 70,5	1,37	0,71
>3	0,00	0,0 - 52,2	85,42	72,2 - 93,9	0,00	1,17
>3,842	0,00	0,0 - 52,2	100,00	92,6 - 100,0		1,00

