

Estudio prospectivo sobre la eficacia de una PCR múltiple en el diagnóstico de las infecciones causadas por los herpesvirus

J. Reina Prieto

Unidad de Virología. Servicio de Microbiología
Hospital Universitario Son Espases. Palma de Mallorca

Resumen

Objetivos: Realizar un estudio prospectivo sobre la eficacia de una PCR múltiple en el diagnóstico de las infecciones causadas por los herpesvirus.

Metodología: A lo largo del período 2000-2009 se ha estudiado la presencia de los herpesvirus en muestras clínicas mediante una técnica comercial de amplificación molecular. La técnica es una PCR múltiple anidada que permite detectar de forma simultánea la presencia del virus herpes simple (HSV), virus varicela-zóster (VZV), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV) y virus herpes tipo 6 (HHV-6).

Resultados: Se han analizado 3.322 muestras, de las cuales 307 (9.2%) fueron positivas (rango 5.5-17%). Las muestras más frecuentes han sido los LCR (70.7%), biopsias intestinales (11.1%), plasmas (7.7%) y muestras oculares (2.3%). Los virus detectados con mayor frecuencia han sido CMV 173 (56.3%), HSV 101 (32.8%), VZV 27 (8.7%), EBV 4 (1.2%) y HHV-6 2 (0.6%). En los LCRs el principal virus detectado fue HSV (72.3%), en las biopsias intestinales el CMV (91.4%), en los plasmas el CMV (93.3%) y en las oculares el CMV (40.9%) y el HSV (31.8%).

Conclusiones: La técnica de PCR múltiple se ha mostrado como la más efectiva en la detección de los herpesvirus en las diferentes muestras clínicas analizadas. Esta técnica molecular debe ser especialmente recomendada en aquellas muestras con bajas cargas virales, como el LCR y las muestras oculares.

Palabras clave: PCR múltiple, infecciones por herpesvirus, diagnóstico

Abstract

Objectives: To present a prospective study about the efficacy of a PCR multiplex in the diagnosis of infections caused by herpesviruses.

Methods: We studied the presence of herpesviruses in clinical samples with a commercial molecular amplification technique in the 2000-2009 period. The technique used was a nested PCR multiplex that simultaneously detects the presence of the herpes simplex virus (HSV), varicella-zoster virus (VZV), cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV) and human herpes type-6 (HHV-6).

Results: We analyzed 3.322 clinical samples, 307 (9.2%) were considered positive (range 5.5-17%) within the period of study. The most frequent studied samples were CSF (70.7%), intestinal biopsies (11.1%), plasma (7.7%) and ocular samples (2.3%). The herpesviruses detected in positive samples were CMV 173 (56.3%), HSV 101 (32.8%), VZV 27 (8.7%), EBV 4 (1.2%) and HHV-6 2 (0.6%). In the CSFs the HSV (72.3%) was the most frequently detected virus, CMV in the intestinal biopsies (91.4%), in plasma (93.3%), and in ocular samples (40.9%). HSV was also detected in ocular samples (31.8%).

Discussion: The nested multiplex PCR studied has been the most effective technique in the detection of herpesviruses in the different clinical samples analyzed. This molecular technique must be the recommended one specially in clinical samples with a low viral load, such as CSF and ocular samples.

Keywords: PCR multiplex, herpesvirus infections, diagnosis

Correspondencia

Jordi Reina. Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases. Carretera Valldemossa 79. 07010 Palma de Mallorca. E-mail: jorge.reina@ssib.es

Introducción

Las infecciones causadas por los principales miembros de la familia Herpesviridae (Herpes simple HSV), citomegalovirus (CMV), varicela-zoster (VZV), virus de Epstein-Barr (EBV) y herpes tipo 6 (HHV-6), representan un importante porcentaje de cuadros clínicos en la población humana¹⁻³.

Todos estos virus se caracterizan por presentar una primoinfección, que generalmente se produce en los primeros años de la vida, con una clínica y sintomatología específica y unos procesos de reactivación (tras un período más o menos prolongado de latencia) cuyas manifestaciones clínicas pueden ser bastante diferentes de las observadas inicialmente^{3,4}.

Dado su carácter de infecciones latentes, la mayoría de ellas presentan procesos de reactivación a lo largo de la vida de la persona. Los factores responsables de ellos son muy amplios y van desde la exposición solar a los cambios hormonales pasando por el estrés o la senilidad. Aunque la base, probablemente de todos ellos, sea un proceso transitorio de inmunosupresión que facilita la reactivación viral. Este proceso es mucho más intenso y grave en aquellos pacientes con inmunosupresión congénita o adquirida, ya sea infecciosa (enfermos de SIDA) o farmacológica (inmunosupresores para trasplantes). Las reactivaciones son locales para los HSVs (orofaciales y genitales) y el virus VZV (lesiones de zoster) y diseminadas o generalizadas para el CMV (síndromes febriles, leucopenias)^{1,2,6}.

El diagnóstico de las infecciones herpéticas puede realizarse por detección antigénica, cultivo celular, amplificación genómica y estudio serológico. La detección antigénica se puede realizar mediante una inmunofluorescencia directa o un ensayo de inmunoenzima; ambas técnicas presentan baja sensibilidad y son muy dependientes de la calidad de la muestra clínica procesada⁷. El estudio serológico sólo es útil en la primoinfección (detección de IgM específica), ya que a partir de este momento todos los pacientes presentarán IgG de por vida. Las seroconversiones en las reactivaciones son poco frecuentes y específicas, y el carácter local de muchas de ellas determina una escasa respuesta sérica^{5,8}.

El cultivo celular ha sido básicamente la principal técnica de diagnóstico de las infecciones herpéticas. La utilización del método shell vial ha permitido acortar significativamente el tiempo de respuesta y la

especificidad del mismo. Esta técnica es la única que permite demostrar la presencia de virus replicativo en la muestra dado que es capaz de aislarse posteriormente; todas las otras técnicas detectan alguna parte de los virus pero no son prueba de actividad viral²⁻⁴.

La aparición y comercialización de las técnicas de biología molecular basadas en la amplificación genómica de una parte del genoma viral, ha determinado un incremento significativo en el diagnóstico de las infecciones por los herpesvirus. La mayor sensibilidad y especificidad de estas técnicas permite confirmar otras técnicas diagnósticas y sobre todo poder aplicarlas a muestras biológicas o clínicas en las cuales la carga viral, y por lo tanto, la capacidad de aislamiento era muy escasa^{9,10}. Así las principales indicaciones de estas técnicas son las infecciones del sistema nervioso central, las retinitis, viremias y colitis ulcerosas. En estas muestras han mostrado una alta rentabilidad diagnóstica aunque también han comportado, por su excesiva sensibilidad, dificultades de interpretación clínica de los resultados obtenidos^{7,9,10}.

Tras 10 años de utilización continuada de una técnica de amplificación genómica múltiple (PCR, polymerase-chain reaction) para la detección de infecciones herpéticas en muestras clínicas, nos ha parecido interesante presentar los resultados obtenidos y discutir su verdadero significado clínico.

Material y métodos

A lo largo de los últimos diez años (2000-2009) se ha estudiado la presencia de los herpesvirus en todas aquellas muestras clínicas o biológicas procedentes de pacientes con sospecha clínica de presentar una infección por estos virus.

Las diferentes muestras fueron remitidas en su forma original (frasco estéril) o en un medio para transporte y conservación viral (MTV, Vircell, Granada, España). Las sangres fueron remitidas con EDTA, centrifugadas y separadas del plasma para su procesamiento. A su llegada al laboratorio eran homogeneizadas y se prepararon diferentes alícuotas que fueron conservadas a -70°C hasta el momento de su procesamiento diagnóstico.

La técnica de amplificación genómica utilizada en este estudio fue una PCR anidada múltiple o multiplex comercial (Real, Durvitz, Valencia, España) que permite amplificar de forma simultánea el herpes

simple (HSV), el virus varicela-zoster (VVZ), citomegalovirus (CMV), herpesvirus tipo 6 (HHV-6) y virus de Epstein-Barr (EBV). La extracción de los ácidos nucleicos se realizó por la técnica de calentamiento y posterior precipitación criogénica. El proceso de amplificación se basa en la utilización en la primera fase de cebadores o primers comunes pertenecientes al gen de la DNA polimerasa herpética. Tras este proceso, el amplicón generado se mezcla con cebadores específicos para cada uno de los diferentes virus, dando lugar en la segunda fase o ronda de amplificación a amplicones de tamaños moleculares distintos.

Finalmente los productos de esta amplificación son sometidos a un proceso de electroforesis en geles de agarosa al 20% y revelados por su posición en el gel tras la adición de bromuro de etidio y observación en el transiluminador.

Los cálculos estadísticos comparativos entre las diferentes técnicas diagnósticas fueron realizados empleando el Statistical Package of Social Science (SPSS), versión 11.0. Todos los valores de p son con dos colas y se ha considerado como significativo un valor de $p < 0.05$.

Resultados

A lo largo del estudio se han analizado por PCR 3.322 muestras, pasando de 97 muestras en 2000 a 561 en 2009 con un aumento del 578% (Figura 1). De todas estas muestras, 307 (9.2%) fueron consideradas como positivas. Los porcentajes globales anuales de positividad han ido desde el 5.5% de 2007 al 17% de 2001.

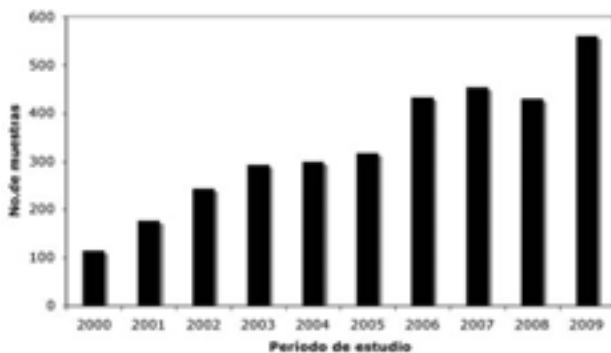


Figura 1. Evolución del número de muestras en las que se ha realizado la PCR frente a los herpesvirus.

Estudio prospectivo sobre la eficacia de una PCR múltiple en el diagnóstico de las infecciones causadas por los herpesvirus

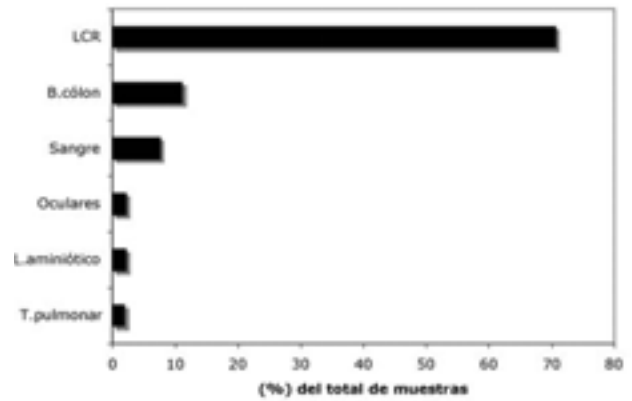


Figura 2. Porcentajes de distribución de las diferentes muestras estudiadas por PCR.

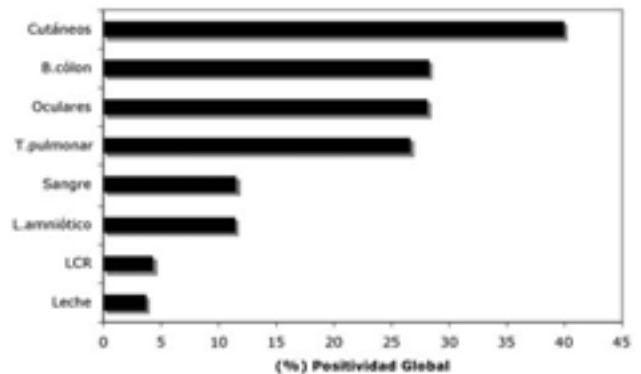


Figura 3. Porcentajes de positividad global detectados en las PCRs realizadas en las diferentes muestras

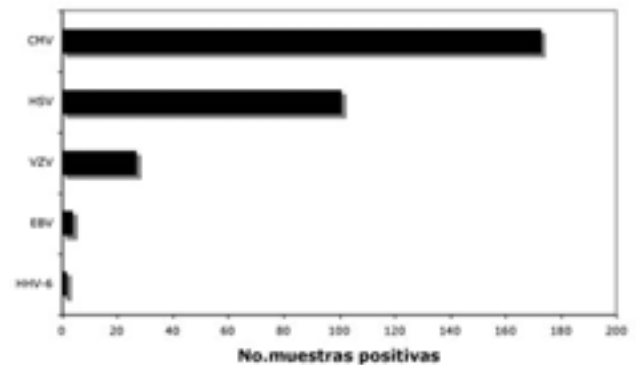


Figura 4. Número total de muestras positivas por PCR frente a los diferentes herpesvirus estudiados

En cuanto al número de las diferentes muestras estudiadas, destacan los LCRs con 2.350 (70.7%) ($p < 0.05$), las biopsias intestinales con 372 (11.1%), los plasmas sanguíneos con 257 (7.7%), las muestras oculares y los líquidos aminóticos con 78 (2.3%) respectivamente y las biopsias pulmonares con 72 (2.1%) (Figura 2). Así mismo se han estudiado 26 leches maternas, 21 frotis faríngeos, 20 biopsias cutáneas, 10 médulas óseas, 9 biopsias de placenta, 4 líquidos pericárdicos, 3 líquidos peritoneales, 3 liqui-

dos articulares, 3 líquidos pleurales y 17 muestras variadas.

Los porcentajes de positividad global en cada una de las muestras estudiadas se presentan en la Figura 3. Las 307 muestras positivas correspondían a 173 CMV (56.3%) ($p < 0.05$), 101 HSV (32.8%), 27 VZV (8.7%), 4 EBV (1.2%) y 2 HHV-6 (0.6%) (Figura 4).

Los LCRs han sido las muestras más numerosas estudiadas. Su número ha variado en los diferentes años presentado 86 muestras en 2000 y 360 en 2006 ($p < 0.05$). Los porcentajes de positividad de estas muestras han oscilado entre el 0.6% de 2009 y el 8.1% de 2006 con una media global acumulada del 4.4%. El número total de LCRs positivos ha sido de 105, correspondiendo a 76 HSV (72.3%) ($p < 0.05$), 18 CMV (17.1%), 9 VZV (8.5%) y 2 HHV-6 (1.9%) (Figura 5).

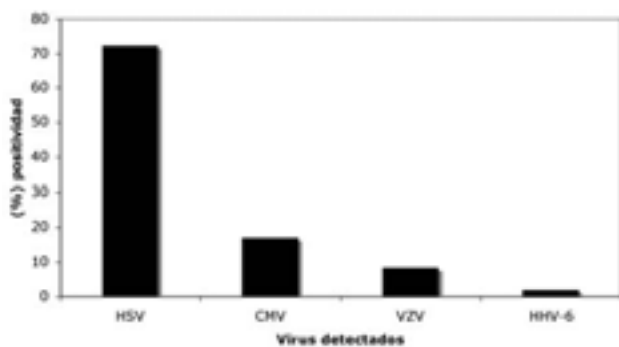


Figura 5. Porcentaje de positividad en los LCRs frente a los diferentes herpesvirus

El segundo tipo de muestra más estudiada han sido las biopsias intestinales con 372; su número ha variado desde 7 en 2000 hasta las 97 de 2008 ($p < 0.05$). Los porcentajes de positividad han presentado un patrón inverso al número de muestras procesadas. Así el porcentaje mas elevado se presentó en el año 2000 con un 100% ($p < 0.05$) y el menor en 2007 con un 15%. Las 105 muestras positivas correspondían a 96 CMV (91.4%) ($p < 0.05$), 5 HSV (4.7%) y 4 EBV (3.8%).

Los plasmas sanguíneos han sido estudiados en 257 casos, observándose un incremento significativo en su número en el año 2009, con 110 muestras (42%). El porcentaje global acumulado de positividad de estas muestras ha sido del 11.6%, con variaciones significativas. El año con el porcentaje máximo de positividad fue 2003 con un 33.3%, mientras que el

año del mayor número de muestras sólo se obtuvo una positividad del 10.5%. Las 30 muestras positivas correspondían a 28 CMV (93.3%) ($p < 0.05$) y 2 HSV (6.7%).

Las muestras oculares (humor acuoso y vítreo) han representado el 2.3% de las muestras (78 total); así de ellas 22 fueron positivas (Figura 6), correspondiendo a 9 CMV (40.9%), 7 a HSV (31.8%) y 6 a VZV (27.2%). El número de muestras procesadas ha oscilado desde 3 en 2006 hasta 14 en 2001. Los porcentajes de positividad han variado ampliamente desde el 0% en 2004 hasta el 66% en 2005.

Las muestras del tracto respiratorio inferior, preferentemente biopsias pulmonares, han representado 72 muestras (2.1%), con una positividad global del 26.7%. De las 19 muestras positivas (Figura 19), 12 (63.1%) lo fueron a CMV ($p < 0.05$), 4 (21.1%) a HSV y 3 (15.7%) a VZV.

Entre otras muestras numéricamente inferiores destaca los líquidos aminóticos que presentaron una positividad global del 11.5%; de modo que 7 (77.7%) fueron positivos a CMV y 2 a VZV (22.3%). De las 20 biopsias cutáneas, 7 (87.5%) fueron positivas a VZV y 1 (12.5%) a HSV. En los frotis faríngeos estudiados se detectaron 6 muestras positivas, todas ellas a HSV. En 1 leche materna se detectó la presencia de CMV, en 1 líquido peritoneal un HSV y en exudado conjuntival 1 CMV.

Conclusiones

La técnica de PCR es una de las más utilizadas como método de amplificación genómica; tiene la ventaja de que puede ser única o múltiple, es decir puede detectar la presencia del genoma de un solo virus o varios de ellos, de la misma familia (ej. herpesvirus) o familias distintas. La PCR utilizada en este estudio es lo que se denomina PCR multiplex o nested y permite detectar de forma simultánea varios virus diferentes pertenecientes a la familia Herpesviridae. Esta técnica es actualmente la única recomendada para el diagnóstico de infecciones herpéticas en muestras del SNC y áreas corporales de baja carga viral. Se la considera como la técnica "gold standard" con la que deben compararse otras técnicas diagnósticas, ésta ha demostrado no sólo la máxima sensibilidad diagnóstica; sino también la máxima especificidad al utilizar cebadores diseñados especialmente para los virus que desea amplificar^{9,10}.

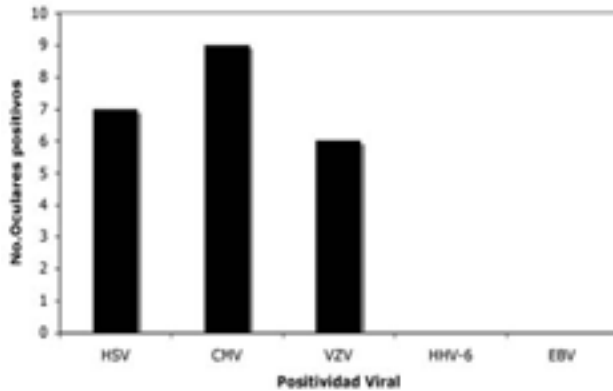


Figura 6. Número de muestras oculares positivas por PCR frente a los diferentes herpesvirus

En el presente estudio se han analizado 3.322 muestras consideradas adecuadas para la aplicación de la PCR como técnica diagnóstica. El número de muestras ha ido aumentando con el paso de los años debido a la buena aceptación de la técnica por los clínicos y la elevada rentabilidad diagnóstica. A pesar de este incremento el número de muestras se ha estabilizado en los últimos años en unas 400 que corresponde a los estándares internacionales para un hospital de tercer nivel^{6,11}.

La muestra clínica más estudiada ha sido el LCR, muestra en la que las otras técnicas diagnósticas prácticamente son insensibles. El 70% de todas las muestras procesadas han sido LCRs con diagnósticos de encefalitis o meningoencefalitis¹². Tras estas muestras destacan las biopsias intestinales y los plasmas sanguíneos, procedentes de pacientes con colitis ulcerosa y transplantados de médula ósea (inmunodeprimidos). Además de todas ellas, deben destacarse por su importante significación diagnóstica las punciones oculares (sospecha de retinitis herpética en enfermos de SIDA) y los líquidos amnióticos (sospecha de infección intrauterina por CMV).

El porcentaje global de muestras positivas ha sido del 9.2% dentro de la media presentada por otros estudios amplios, que oscilan entre el 5.1 y el 16% (5,8); sin embargo este valor depende mucho del tipo de pacientes que se analizan y de si la PCR se realiza sólo en muestras seleccionadas o dentro de un programa de screening rutinario, especialmente en las muestras del SNC, como en nuestro caso. También el porcentaje ha variado en función de la distribución de las muestras, oscilando a lo largo del estudio entre el 5.5 y el 17%, de este modo hemos abarcado el rango comunicado en otros estudios^{8,11}.

Cabe destacar el 28.2% de positividades detectadas en las biopsias intestinales y las muestras oculares. Porcentajes parecidos se han obtenido con los frotis faríngeos, a expensas de las gingivostomatitis herpéticas, y las biopsias pulmonares (infecciones por CMV y HSV-1 en pacientes inmunodeprimidos y de SIDA) (14). Cabe señalar que los LCRs que han representado el 70% de las muestras, sólo han presentado un porcentaje global de positividad del 4.4%^{1,2}.

De los diferentes virus detectables, destaca que el 56.3% correspondían al CMV, básicamente a expensas de los plasmas y las biopsias intestinales, el 32.8% para el HSV-1, procedentes la mayoría de los LCRs de los pacientes con encefalitis, el 8.7% para el VZV, también la mayoría procedentes de los LCRs, el 1.2% al EBV, todos detectados en las biopsias intestinales de pacientes con linfomas intestinales, y el 0.6% al HHV-6 de origen cerebral (meningoencefalitis). Estos resultados son bastante similares a los descritos por otros autores^{7,12}, aunque es importante desglosar los diferentes virus en función del tipo de muestras. De acuerdo con ello, coincidimos con otros estudios en que el HSV es el principal agente etiológico viral de las meningitis y encefalitis asépticas o linfocitarias, seguido del virus VZV, generalmente presentadas como encefalitis por varicela en pediatría^{7,11,12}.

La mayoría de las infecciones del SNC diagnosticadas por PCR han correspondido al HSV (72.3%), seguidas de muy lejos por otros virus. De los 18 casos con presencia de CMV en el LCR, 15 (83%) correspondían a pacientes con SIDA en fases avanzadas e infección diseminada por este virus (aislamiento en otros territorios orgánicos). En este tipo de pacientes el CMV debe siempre ser considerado como la primera causa de encefalitis e iniciarse tratamiento inmediato con ganciclovir^{13,14}.

Todos los casos con PCR positiva a VZV han correspondido a pacientes con antecedentes de varicela (66%) o de zóster (33%). Los 2 casos de encefalitis por el virus HHV-6 correspondían a dos niños de 2 y 5 años con exantema súbito y afectación neurológica, cuadros descritos en el 3-5% de las primoinfecciones por este tipo de virus^{15,16}.

Las biopsias intestinales con sospecha de colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn han constituido el segundo gran grupo de muestras analizadas. El valor medio de positividad de estas muestras ha sido del

15%, porcentaje bastante menor que el comunicado en otros estudios aunque en la mayoría de ellos se realizaba una selección muy estricta de los pacientes analizados^{17,18}. El CMV se ha detectado de forma mayoritaria (91%) en este tipo de muestras, siendo necesario en muchos de estos pacientes iniciar una terapia antiviral o como mínimo intentar disminuir los niveles de inmunosupresión química para conseguir eliminar la actividad replicativa de este virus^{17,18}. Los casos asociados al HSV correspondían a biopsias duodenales y rectales de pacientes con SIDA y presencia de esofagitis y proctitis por este virus^{6,12}. Los cuatro casos causados por el virus EBV pertenecían a dos enfermos pediátricos hematológicos con linfoma intestinal, cuadro frecuente en las fases avanzadas de este tipo de pacientes^{1,2}.

Las viremias por CMV se han constituido como la principal causa de infección vírica diseminada en los pacientes inmunodeprimidos, especialmente en los de tipo hematológico^{13,14}. La presencia de CMV en el plasma es un buen marcador predictivo del desarrollo de infección diseminada, de modo que la búsqueda rutinaria del mismo forma parte de los protocolos de seguimiento de este tipo de pacientes¹⁹. El porcentaje de positividad ha mostrado variaciones muy amplias, pero el valor medio del 11% es bastante semejante al comunicado en otros estudios más amplios^{13,19}. Aunque debería estratificarse este porcentaje en función del tipo de patología hematológica y grado de inmunosupresión, ya que en cada grupo los porcentajes descritos de implicación del CMV muestran rangos muy amplios^{13,14}. El 93.3% de todas las muestras positivas lo han sido frente al CMV, destacando 2 pacientes con LLA que presentaron la presencia del HSV en el plasma sanguíneo, es decir viremia por este virus. La detección de HSV en este tipo de pacientes en la sangre periférica (plasma) no es hecho frecuente y sólo se ha descrito en pacientes en fase terminal con una muy importante inmunosupresión y caquexia⁷.

La retinitis vírica es una entidad descrita desde hace mucho tiempo que tomó prevalencia durante las fases iniciales del SIDA^{2,3}. En la actualidad el tratamiento de estos pacientes con las terapias HAART ha disminuido enormemente el número de estos pacientes^{2,20}. A lo largo de este estudio hemos detectado 9 casos asociados CMV, 5 asociados HSV y 5 asociados al virus VZV correspondientes al diagnóstico oftalmológico de retinitis viral²¹. En el resto de casos la detección de los genomas virales no parece que se correspondan con cuadros oftalmológicos compati-

bles, de modo que la posible contaminación sanguínea o local (en el caso del HSV) pueden haber determinado su presencia en la muestra. En la mayoría de los casos (75%) existía una correlación entre los hallazgos del fondo de ojo, sospecha clínica, y la presencia del virus correspondiente, tal y como se ha descrito en otros estudios^{1,2}. En este tipo de muestras la única técnica diagnóstica recomendada por su rentabilidad y por lo escasez de la muestra es la PCR, de modo que no debe malgastarse parte de la misma en otras técnicas diagnósticas⁷.

Finalmente del resto de muestras procesadas, cabría destacar las procedentes del tracto respiratorio inferior, especialmente los lavados broncoalveolares y las biopsias pulmonares. En este tipo de muestras, utilizadas en pacientes con neumonitis o neumonías en inmunodeprimidos, el CMV ha sido el principal virus implicado. La invasión del este virus, tras un proceso de reactivación y viremia previa, del parénquima pulmonar determina una afectación masiva del mismo que compromete la vida del paciente²². Sin embargo en algunos pacientes más que como agente etiológico principal debe considerárselo como asociado a otros patógenos primarios¹³⁻¹⁵; esto se debe a la capacidad del CMV de reactivarse en cualquier territorio orgánico cuando el sistema inmune celular no mantiene una funcionalidad efectiva^{13,14}.

El diagnóstico de las infecciones congénitas por CMV debe realizarse a través de la serología materna (presencia de IgM específica) y PCR del líquido amniótico^{2,23}. Aunque nuestra experiencia en este tipo de muestras es escasa, destacamos una positividad del 11%, siendo el CMV y el VZV los virus principalmente implicados en este proceso. En todos los casos existía el antecedente de una primoinfección por CMV o contacto directo con otro paciente con varicela activa; siendo estos los principales mecanismos de transmisión de estas enfermedades²³.

En definitiva, la PCR es la técnica recomendada para la detección del genoma y diagnóstico específico de las infecciones por herpesvirus, especialmente en aquellas muestras de baja carga viral. El 9.2% de positividad global obtenido en este estudio está en el rango medio comunicado por otros estudios y que varía ampliamente en función del tipo y cantidad de muestras estudiadas. La rentabilidad, sencillez y aplicabilidad de esta técnica permite utilizarla de forma rutinaria en la mayoría de muestras clínicas procedentes de cualquier territorio corporal.

Bibliografía

1. Whitley RJ, Roizman B. Herpes simplex viruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (eds). *Clinical Virology* (2nd). American Society for Microbiology, Washington DC, 2002, pp.375-401.
2. Pellett PE, Roizman B. The family herpesviridae. En: Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields Virology* (5th). Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, p.2479-2499.
3. Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ. Herpes simplex viruses. En: Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields Virology* (5th). Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, p.2501-2601.
4. Buddingh GH, Scrum DI, Lanier JC, Guidy DJ. Studies of the natural history of herpes simplex infections. *Pediatrics* 1953; 11:595-601.
5. Johnson RE, Nahmias AJ, Magder LS, Lee FK, Brooks C, Snowden C. A seroepidemiologic survey of the prevalence of herpes simplex virus infection in the United States. *N Engl J Med* 1989; 321:7-12.
6. Middlebrooks M, Whitley RJ. Herpesviruses. En: Baron S (ed). *Medical microbiology* (3rd). Churchill Livingstone Inc., New York. 1991, p.865-879.
7. Melon S, Santamaria JM. Infecciones por los virus del herpes simple tipos 1 y 2. En: Ausina V, Moreno S (eds.). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Editorial Panamericana. Barcelona, 2006, p.731-737. Roizman B, Whitley RJ. The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes* 2001; 23-27.
8. Roizman B, Whitley RJ. The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes* 2001; 23-27.
9. Reina J, Macia MD, Gutierrez O, Ruiz de Gopegui E. Clinical evaluation and significance of Herpesviruses DNA amplification in the central nervous system of neurological patients (2000-2004). 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen (Denmark), 2005. Abstract No.P1539. *Clin.Microbiol.Infect.* 2005; 11(S2):500.
10. Reina J, Ruiz de Gopegui E, Mena A, Macia A. Efficacy of a commercial multiplex herpes viruses PCR in the viral diagnosis of different clinical samples. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Munich (Germany), 2007. Abstract No.R2193. *Clin. Microbiol. Infect (CD)*. 2007; 13(S1):S635.
11. Whitley RJ, Gnann JW. The epidemiology and clinical manifestations of herpes simplex infections. En: Roizman B, Whitley RJ, Lopez C (eds.). *The human herpesviruses*. Raven Press, New York. 1993, p.69-105
12. Olson LC, Buescher EL, Artenstein MS. Herpesvirus infections of the human central nervous system. *N Engl J Med* 1967; 277:1271-1277.
13. Ho M. *Cytomegalovirus. Biology and infection*. Plenum Medical Press (2nd). New York. 1991.
14. Britt WJ, Alford CA. Cytomegalovirus. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (ed.). *Fields Virology* (3rd). Lippincott-Raven Press, Philadelphia. 1996, p.2493-2524.
15. Yamanishii K. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. En: Richman DD (ed). *Clinical Virology* (2nd ed). ASM Press, Washington DC, 2002, p.463-478.
16. Yoshikawa T, Asano Y, Takahashi Y. Detection of DNA of six human herpesviruses in the cerebrospinal fluid of immunocompetent non-herpetic acute limbic encephalitis patients. *Microbiol Immunol.* 2010; 54:471-474.
17. Lawlor G, Moss AC. Cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: pathogen or innocent bystander?. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16:1620-1627.
18. Herfarth HH, Long MD, Rubinas TC, Sandridge M, Miller MB. Evaluation of a non-invasive method to detect cytomegalovirus (CMV)-DNA in stool samples of patients with inflammatory bowel disease (IBD): a pilot study. *Dig Dis Sci.* 2010; 55:1053-1058.
19. Griffiths PD, Emery VC. Cytomegalovirus. En: Richman DD (ed). *Clinical Virology* (2nd ed). ASM Press, Washington DC, 2002, p.433-461.
20. Binder PS, Jacobs SE. Herpes simplex keratitis. *Surv Ophthalmol* 1977; 21:313-331.
21. Liesegang T. Diagnosis and therapy of herpes zoster ophthalmicus. *Ophthalmology* 1991; 98:1216-1220.
22. Weiner RS, Bortin MM, Gale RP. Interstitial pneumonitis after bone marrow transplantation. *Ann Intern Med* 1986; 104:168-175.
23. Demmler GJ. Acquired cytomegalovirus infections. En: Feigin RD, Cherry JD, editores. *Textbook of pediatric infectious diseases*. 3ª edición. Philadelphia. WB Saunders, 1992, p.1532-1543.