

## Artículos originales

(<http://www.siicsalud.com/main/expinv.htm>)

Las normas de divulgación biomédica acotan las posibilidades de comunicación de los investigadores o los someten a rígidos esquemas editoriales que, en oportunidades, limitan la redacción y, en consecuencia, la posterior comprensión de los lectores. SIIC propone escribir sin ataduras a renombrados médicos del mundo. Las estrictas supervisiones científicas y literarias a que son sometidos los Artículos originales aseguran documentación de calidad, en temas de importancia estratégica.

# 1 - Mutaciones del Gen *rpoB* en Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* Resistentes a Rifampicina Aisladas de Pacientes con Tuberculosis Pulmonar de México



**Cosme Alvarado Esquivel\***

Columnista experto de la Sociedad Iberoamericana de Información Científica

**Función que desempeña:** Profesor e investigador del Departamento de Microbiología. Coordinador del Programa de Doctorado en Ciencias Médicas. Coordinador del Programa de Doctorado en Farmacología Facultad de Medicina, Durango, México

**Otro trabajo de su autoría:** Alvarado Esquivel C, Briones

Ezcarzaga ML, Castruita Limones DE, Lazalde Ramos BP,

Salas EV, Gutiérrez AA, Medrano JC, Castellanos S. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in registered female sex workers in northern Mexico, *Sexually Transmitted Diseases* 30(3):195-198, 2003

\*En colaboración con los doctores Rudi Rossau (PhD), Innogenetics S.A., Gante, Bélgica; Wouter Mijls (PhD), Innogenetics S.A., Gante, Bélgica; Sergio Martínez García (Cirujano, Maestro en Ciencias Médicas), Universidad Juárez del Estado de Durango, Durango, México; Miguel Francisco Mercado Suárez (Cirujano, Patólogo Clínico), Instituto Mexicano del Seguro Social, México

*Mycobacterium tuberculosis* es un patógeno distribuido en todo el mundo.<sup>1,2</sup> Y peor aun, han aparecido cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiples drogas; diversos informes indican que estas cepas resistentes también se hallan ampliamente distribuidas.<sup>3-6</sup> Los métodos clásicos para el diagnóstico de laboratorio de tuberculosis consumen mucho tiempo y la tardanza resultante puede afectar adversamente el cuidado del paciente y el control de la enfermedad. Recientemente han surgido nuevos métodos rápidos de biología molecular que sirven para la amplificación de ácidos nucleicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que aumentan la sensibilidad de detección de *M. tuberculosis*. La PCR no sólo permite hacer el diagnóstico de infección por *M. tuberculosis* sino que también hace posible la identificación de cepas mutantes de este patógeno que son resistentes a múltiples drogas.<sup>7-9</sup> En México, muchos de los Estados no cuentan con la metodología de la PCR y se desconoce la prevalencia de infección por *M. tuberculosis* resistente a múltiples drogas. Debido a la importancia del problema de la tuberculosis en México, es esencial iniciar la utilización de la PCR no sólo para hacer el diagnóstico temprano de la enfermedad sino también para el rápido reconocimiento de resistencia a los principales agentes antituberculosos. Sólo de esta manera se logrará mejorar el control de la tuberculosis.

La rifampicina es una de las drogas antituberculosas de primera línea. La resistencia de *M. tuberculosis* a rifampicina ha sido asociada con mutaciones en el gen que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*) y con resistencia a otras drogas antituberculosas.<sup>8</sup> Estas mutaciones pueden ser identificadas por varios métodos de biología molecular, como PCR y ensayo de sonda lineal (LiPA),<sup>9-11</sup> polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción<sup>12,13</sup> y secuenciado.<sup>6,14</sup> La prevalencia de infección por *M. tuberculosis* resistente a rifampicina y los tipos de mutaciones asociadas con tal resistencia varían ampliamente en todo el mundo.<sup>7,15-17</sup> Sin embargo, hay muy poca información respecto de la epidemiología molecular de las infecciones por *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina en México en general, y carencia de comunicaciones sobre Durango en particular. Por ese motivo hemos diseñado el presente estudio; el objetivo fue estimar mediante métodos moleculares la frecuencia de infecciones por cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina en pacientes que sufren tuberculosis pulmonar y determinar las mutaciones del gen *rpoB* asociadas con resistencia a rifampicina en cepas de *M. tuberculosis* que circulan en México.

### Material y métodos

#### Aislados de *Mycobacterium*

Se estudiaron 37 aislados de *M. tuberculosis* cultivados en el medio de Löwenstein-Jensen. Los aislados fueron obtenidos de pacientes con tuberculosis captados consecutivamente en cinco hospitales públicos de México. Veintiuna muestras fueron recolectadas en cuatro hospitales de la ciudad de Durango, y 16 en un hospital de la ciudad de México. Los 37 aislados fueron cultivados de los siguientes especímenes: 31 esputos, 4 lavados broncoalveolares y 2 líquidos pleurales.

Veintidós de los 37 pacientes tuberculosos (59.5%) habían recibido previamente tratamiento antituberculoso, mientras que los 15 restantes habían sido recientemente diagnosticados y no habían sido tratados contra la tuberculosis.

#### Reacción en cadena de la polimerasa

De cada cultivo de Löwenstein-Jensen positivo, una muestra de 10 µl de bacterias fue obtenida y suspendida en 500 µl de solución salina, inactivada a 95°C por 15 minutos, y congelada a -20°C hasta que fueron

**Tabla 1.** Cepas de *M. tuberculosis* encontradas en pacientes mexicanos con tuberculosis pulmonar.

Perfil de LiPA	Pacientes tratados	Pacientes no tratados	Todos los pacientes
	No. (%)	No. (%)	No. (%)
Ts	12 (54.5)	11 (73.3)	23 (62.2)
ΔS1 (L511P)	4 (18.2)	3 (20.0)	7 (18.9)
R4b (H526D)	1 (4.5)	-	1 (2.7)
R5 (S531L)	4 (10.8)	1 (6.7)	5 (13.5)
ΔS1/R4b	1 (18.2)	-	1 (2.7)
Total	22 (100)	15 (100)	37 (100)

Ts = tipo salvaje

**Tabla 2.** Distribución geográfica de las cepas de *M. tuberculosis* analizadas.

Perfil de LiPA	Durango	Ciudad de México
	No. (%)	No. (%)
Ts	13 (61.9)	10 (62.5)
ΔS1 (L511P)	4 (19.0)	3 (18.8)
R4b (H526D)	1 (4.8)	-
R5 (S531L)	3 (14.3)	2 (12.5)
ΔS1/R4b	-	1 (6.2)
Total	21 (100)	16 (100)

Ts = tipo salvaje

analizadas. La amplificación del gen *rpoB* de *M. tuberculosis* fue realizada usando el ensayo de amplificación Rif.TB.<sup>11</sup> Brevemente, 5 µl de la suspensión de bacterias fueron agregados a la mezcla maestra conteniendo cebadores biotinilados *rpoB*. La amplificación fue realizada en un termociclador GeneAmp PCR System 9600, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos y 30 ciclos de 95°C por un minuto, 62°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, y extensión terminal a 72°C por 10 minutos. Los productos de la PCR fueron separados sobre geles de agarosa al 2.5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados mediante iluminación ultravioleta.

#### Ensayo de sondeo lineal (LiPA)

Las mutaciones de *M. tuberculosis* asociadas con resistencia a la rifampicina fueron detectadas mediante INNO-LiPA Rif. TB.<sup>11</sup> Brevemente, 10 µl de los productos del PCR marcados con biotina fueron hibridados con el complejo de *M. tuberculosis* (TB), tipo salvaje (S1-5), y sondas específicas de la mutación *rpoB*: R2 (D516V), R4a (H526Y), R4b (H526D) y R5 (S531L) inmovilizadas como líneas paralelas sobre tiras de papel de nitrocelulosa. Después de la hibridación, se realizó un lavado fuerte y se agregó estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina. Las tiras fueron luego lavadas e incubadas con sustrato BCIP/NBT. La reacción fue detenida mediante la adición de agua destilada. Un patrón de líneas café violáceo, como resultado de la hibridación, se configuró sobre las tiras.

#### Resultados

Todos los 37 aislados analizados fueron positivos a la PCR e hibridaron con la sonda del complejo de *M. tuberculosis* sobre las tiras LiPA, confirmando que todos los aislados fueron realmente cepas de *M. tuberculosis*.

Catorce de los 37 aislados (37.8%) dieron patrones de mutaciones asociados a resistencia, esto es, fallaron en hibridar con por lo menos una de las sondas de tipo salvaje y/o hibridaron con las sondas específicas de mutación del gen *rpoB*. Los restantes 23 aislados (62.2%) hibridaron solamente con sondas del tipo salvaje indicando su susceptibilidad a la rifampicina.

Diez (45.5%) de los 22 pacientes previamente tratados estuvieron infectados por cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la rifampicina, mientras que 4 (26.7%) de los 15 pacientes no tratados estuvieron infectados por cepas resistentes a la rifampicina. La Tabla 1 resume los resultados del LiPA y la distribución de cepas de *M. tuberculosis* en pacientes tuberculosos tratados y no tratados.

La distribución geográfica de cepas de *M. tuberculosis* en Durango y en la ciudad de México se muestra en la Tabla 2.

#### Discusión

En este estudio, una prevalencia alarmantemente alta de 37.8% de infección por *M. tuberculosis* resistente a rifampicina fue encontrada en pacientes tuberculosos mexicanos. Esta prevalencia es más alta que la reportada en Estados Unidos, Europa, y en países africanos,<sup>16,18-22</sup> mucho más alta que la prevalencia mundial promedio,<sup>17</sup> pero solo más baja que la reportada en países de la ex Unión Soviética.<sup>6,23</sup> En nuestro estudio, 45.5% de los pacientes previamente tratados para tuberculosis y 26.7% de pacientes no tratados estuvieron infectados por cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina. Estas frecuencias son también más altas que las frecuencias mundiales promedio observadas en pacientes tuberculosos tratados y no tratados, respectivamente.<sup>17,19,22,24</sup>

Trece de los 14 aislados con mutaciones en el gen *rpoB* contenían mutaciones únicas; en solamente un caso se observó doble mutación en los nucleótidos L511P y H526D.

En total, 3 mutaciones diferentes, ya fuera en presentación única o en combinación fueron observadas entre nuestros aislados mexicanos: la mutación en el nucleótido L511P estuvo presente en 8 de los 14 aislados resistentes a la rifampicina (57.1%), la mutación en el nucleótido S531L en 5 (35.7%), y la mutación en el nucleótido H526D en 2 aislados (14.3%). La frecuencia de mutación en el nucleótido L511P encontrada en aislados mexicanos resistentes a rifampicina es considerablemente más alta que la reportada en países asiáticos, Grecia y los Estados Unidos.<sup>15,18,25</sup> La frecuencia de mutación en el nucleótido S531L encontrada fue similar a la informada en los Estados Unidos<sup>18</sup> y ligeramente más baja que la de Brasil, países asiáticos, Grecia y Ruanda.<sup>10,15,25,26</sup>

Respecto de la mutación en el nucleótido H526D, nuestra frecuencia fue similar a la comunicada de países asiáticos,<sup>15,25</sup> pero ligeramente mayor que la observada en los Estados Unidos.<sup>18</sup> Por otro lado, en el presente estudio no hubo casos de mutaciones en los nucleótidos

D516V, H526Y, H526C y L533P, mutaciones generalmente halladas en países asiáticos, europeos, y africanos, así como en los Estados Unidos.<sup>10,11,18</sup> Con respecto a la distribución geográfica de cepas de *M. tuberculosis* en las dos ciudades exploradas, observamos aproximadamente la misma distribución de cepas en la ciudad de Durango que en la ciudad de México, lo que sugiere que las cepas de *M. tuberculosis* pueden circular en grados similares en el norte y centro de México. Además, los resultados indican que por lo menos cinco cepas diferentes de *M. tuberculosis* circulan en México.

Fuimos capaces de identificar los 37 aislados por medio del LiPA. Este método ha sido ampliamente examinado y demostró ser un método altamente sensible para la detección de mutantes resistentes a la rifampicina.<sup>11,18,27</sup> Es fácil de realizar y el equipo necesario suele estar disponible en laboratorios de países en desarrollo (donde la tuberculosis es un problema de salud pública), al contrario que el instrumental necesario para otros métodos moleculares tal como la secuenciación de ADN.

Ya que, según se cree, la resistencia a drogas antituberculosas resulta del tratamiento inadecuado, esto es, de la ingesta irregular de la droga, tiempo insuficiente y escasa aceptabilidad, los resultados del presente estudio podrían estar indicando realización subóptima de los programas actuales de terapia de tuberculosis; y

sugieren que son necesarios mayores esfuerzos urgentemente para proporcionar tratamiento eficiente en México. De verdad, las infecciones por cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiples drogas antituberculosas se han incrementado últimamente en México, en comparación con frecuencias previamente comunicadas.<sup>28-30</sup> Concluimos que las infecciones por *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina son comunes en México, y las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina que circulan en este país son principalmente las que contienen mutaciones únicas en los nucleótidos L511P, H526D o S531L. A fin de proporcionar tratamiento eficaz a los pacientes con tuberculosis es muy importante analizar con métodos moleculares la resistencia de *M. tuberculosis* a la rifampicina.

Frecuentemente, si no siempre, el médico tratante inicia la terapia con fármacos de primera línea, incluida la rifampicina; sin embargo, al menos en México, hemos demostrado que la resistencia a rifampicina es común, y hasta cierto punto no es racional dar inicio al tratamiento sin antes investigar si la bacteria que infecta es resistente a las drogas antituberculosas como la rifampicina.

**Dr. Cosme Alvarado Esquivel**

Copyright © Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC), 2004

## 2 - Nuevas Recomendaciones en la Prevención de Infecciones Oportunistas entre Receptores de Trasplantes de Células Madre Hematopoyéticas



**Clare A. Dykewicz**

Columnista experta de la Sociedad Iberoamericana de Información Científica

**Función que desempeña:** Medical Epidemiologist, Department of Health & Human Services, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), National Center for Infectious Diseases, Atlanta, Georgia, EE.UU.

**Otro trabajo de su autoría:** Dykewicz CA. A summary of the guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients, *Clinical Infectious Diseases* 33(2):139-44, 2001

### Antecedentes

A finales del año 2000 se publicaron las «Recomendaciones para la prevención de infecciones oportunistas en pacientes con trasplante de células madre hematopoyéticas» (TCMH).<sup>1</sup> Con el patrocinio de los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), la *Infectious Disease Society of America* (IDSA) y la *American Society of Blood and Marrow Transplantation*

de los EE.UU., y preparadas con la ayuda del *HSCT Guidelines Working Group* (Grupo de trabajo para las recomendaciones en el trasplante de células madre hematopoyéticas [TCMH]), las pautas proveían recomendaciones basadas en la evidencia para la prevención de infecciones oportunistas en pacientes adultos y pediátricos que reciben trasplante autólogo o alogénico de células madre hematopoyéticas (CMH). A cada recomendación se adjudica un puntaje de acuerdo con su importancia (Tabla 1) y la calidad de la evidencia que la apoya (Tabla 2). El sistema de puntaje originariamente fue creado por el *United States Public Health Service* y la IDSA para las recomendaciones de prevención de infecciones oportunistas en personas infectadas por HIV.<sup>2-4</sup> En 2001 se publicaron los puntos sobresalientes de las «Recomendaciones para la prevención de infecciones oportunistas en pacientes con trasplante de células madre hematopoyéticas».<sup>5</sup> El texto que sigue las actualiza y complementa.

### Infecciones bacterianas

Las recomendaciones de TCMH no dan pautas en cuanto al uso de antibióticos para la profilaxis de

infecciones bacterianas en receptores afebriles, asintomáticos o neutropénicos porque se dispuso de información limitada. A pesar de que existen pruebas de que el uso de antibióticos profilácticos puede reducir las tasas de bacteriemia luego del TCMH,<sup>6</sup> las tasas de mortalidad relacionadas con infecciones no se reducen.<sup>7</sup> Si los médicos optan por utilizar antibióticos de forma profiláctica para prevenir infecciones en receptores de TCMH afebriles, asintomáticos, neutropénicos, deberían revisar los perfiles de sensibilidad antibiótica en los hospitales y centros de TCMH, especialmente cuando se prescribe un único antibiótico (categoría BIII). La vancomicina no debe ser utilizada para la profilaxis (DIII) por el riesgo de seleccionar especies de *Enterococcus* resistentes a este antibiótico.

Se recomienda profilaxis antibiótica para prevenir infecciones con organismos encapsulados (por ejemplo *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*) en pacientes con TCMH alogénico y enfermedad crónica de injerto contra huésped (EICH) mientras se prolongue el tratamiento crónico contra la EICH (BIII).<sup>6</sup> La descontaminación de rutina del intestino no se recomienda en candidatos para el TCMH (DIII).<sup>7-9</sup>

La inmunoglobulina intravenosa (IGIV) no se debe administrar como rutina a los receptores de TCMH para prevenir las infecciones bacterianas (DII), aunque la IGIV ha sido utilizada para producir modulación del sistema inmune para la prevención de EICH. La IGIV puede administrarse para prevenir las infecciones bacterianas (por ejemplo, infecciones seno pulmonares por *Streptococcus pneumoniae*)<sup>10</sup> en aproximadamente 20% a 25% de los receptores de TCMH con injertos de médula ósea de dador no familiar que presenten hipogammaglobulinemia grave (por ejemplo, valores séricos de IgG < 400 mg/dl) dentro de los primeros 100 días posteriores al trasplante (CIII). Cuando se emplea IGIV en receptores de TCMH, los profesionales deben utilizar dosis más altas y más frecuentes de IGIV que la estándar para no receptores, debido a que la vida media de IGIV en receptores de TCMH es mucho más corta que en adultos sanos (aproximadamente 18 a 23 días).<sup>11-13</sup> Además, las infecciones pueden aumentar el catabolismo de la IGIV. En consecuencia, las dosis de IGIV se deben individualizar para mantener niveles séricos de IgG superiores a 400 a 500 mg/dl (BII).<sup>13</sup>

### **Virus herpes simple**

En la prevención de la enfermedad por virus herpes simple (HSV), las pautas recomiendan ofrecer aciclovir a todos los pacientes seropositivos para HSV que reciban un TCMH alogénico para prevenir la reactivación durante el período temprano postrasplante (AI).<sup>10-14</sup> Las normas recomiendan comenzar con aciclovir al principio de la terapia de condicionamiento y continuarlo hasta el injerto o hasta la resolución de la mucositis (cualquiera sea su duración o aproximadamente 30 días posteriores al TCMH) (BIII). En receptores autólogos de TCMH seropositivos para HSV se puede considerar la administración de aciclovir durante los primeros 30 días postrasplante en pacientes con posibilidad de adquirir mucositis grave por el régimen condicionante (CIII).

Las dosis óptimas y la duración de la profilaxis con

aciclovir todavía no han sido definidas. Se han comunicado casos de virus herpes simple resistentes al aciclovir como problema emergente en receptores alogénicos de TCMH, en Europa.<sup>19</sup> Los clínicos deben vigilar la susceptibilidad a drogas antivirales en receptores de TCMH que están recibiendo profilaxis para HSV y que manifiestan enfermedad clínica por HSV.

### **Citomegalovirus**

Los centros de TCMH deben seleccionar dadores seronegativos para citomegalovirus (CMV) para receptores también negativos si existe la posibilidad de elegir entre donantes que, por lo demás, son comparables.

Esto es importante, ya que datos recientes demuestran que los receptores alogénicos de TCMH seronegativos para CMV sin depleción de células T con dadores seropositivos para CMV (R-/D+) presentan mortalidad más alta por bacteriemia o por infección micótica invasiva que las personas con dadores seronegativos para CMV (R-/D-) (18% versus 9.7%, respectivamente,  $p < 0.001$ ).<sup>20</sup> Sumado a esto, los receptores alogénicos de TCMH seronegativos para CMV sin depleción de células T tienen, en caso de dadores seropositivos, una incidencia notablemente mayor de bacteriemia por gramnegativos y notoria por grampositivos (estafilococos no difteroides y coagulasa negativos) que en caso de dadores seronegativos para CMV (48.4% versus 33.7%,  $p < 0.001$ ).<sup>20</sup> Las pautas recomiendan que los receptores alogénicos de TCMH seronegativos para CMV de donantes seronegativos (R-/D-) deben recibir sólo células de la serie roja reducida en leucocitos o seronegativa para CMV y plaquetas reducidas en leucocitos ( $< 1 \times 10^6$  leucocitos/unidad). Esta recomendación apunta a prevenir la infección asociada con transfusiones (AI).<sup>21</sup> Además, los receptores de TCMH autólogos seronegativos para CMV deberían también recibir derivados sanguíneos negativos para CMV o reducidos en leucocitos (CIII).

En todos los receptores alogénicos de TCMH con riesgo de enfermedad por CMV postrasplante (como todos los receptores de TCMH seropositivos para CMV y todos los receptores seronegativos de un donante positivo) se debería instituir uno de los dos regímenes de prevención de infección por CMV desde el injerto hasta el día 100 posterior a la transfusión (AI); éstos son la profilaxis o el tratamiento preventivo mediante ganciclovir (AI).

La estrategia de profilaxis para CMV incluye la administración de ganciclovir a todos los receptores de TCMH alogénicos en riesgo, desde el injerto hasta los 100 días postrasplante (AI). Algunos centros también otorgan profilaxis con ganciclovir durante el condicionamiento pretrasplante (CIII). Un centro ha recomendado administrar profilaxis para CMV en lugar de terapia preventiva a los receptores de TCMH con riesgo de contraer enfermedad por CMV si reciben tratamiento con corticoides por EICH o si el riesgo para EICH es muy alto (por ejemplo, en trasplantados con depleción de células T cuando la globulina antitimocito es utilizada para trasplantes compatibles no emparentados o idénticos genéticamente de CMH).<sup>22</sup> La

terapia preventiva para CMV requiere tamizaje para receptores de TCMH en forma periódica luego del injerto (por ejemplo, una o más veces por semana desde los 10 hasta los 100 días posteriores al trasplante) para buscar antigenemia o excreción viral de CMV (AIII). Los médicos deberían seleccionar una de las dos pruebas diagnósticas para determinar la necesidad de tratamiento preventivo.

La detección del antígeno pp65 de CMV en leucocitos (antigenemia)<sup>23,24</sup> es preferible en el rastreo para tratamiento preventivo, ya que es más rápida y sensible que el cultivo y posee alto valor predictivo positivo.<sup>23-25</sup> La detección directa de ADN (ácido desoxirribonucleico) de CMV por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>26</sup> es muy sensible pero posee valor predictivo positivo muy bajo.<sup>24</sup> A pesar de que la PCR de ADN del CMV es menos sensible que la PCR de sangre entera o de leucocitos, la PCR de ADN del CMV plasmático es útil durante la neutropenia, cuando el número de leucocitos por portaobjeto es demasiado bajo para permitir la prueba del antígeno pp65 del CMV. Las técnicas de cultivo rápido en *shell vial*<sup>27</sup> o el cultivo viral de rutina<sup>28,29</sup> son menos sensibles que la PCR para ADN de CMV o la prueba de la antigenemia, y por ello menos satisfactorias.

Los receptores alogénicos, dentro de los 100 días postrasplante, deberían comenzar con ganciclovir si se detecta viremia o antigenemia de CMV o si el paciente muestra 2 o más PCR de ADN del CMV positivas (BIII). Cualquier centro de TCMH sin la capacidad de efectuar las pruebas de antigenemia o de PCR debería utilizar profilaxis en vez del régimen de terapia preventiva para la prevención de la enfermedad por CMV (BII).<sup>30</sup>

Aunque la mayoría de las enfermedades por CMV ocurren luego del injerto, ésta aparece en al menos el 1% de los receptores de TCMH y en al menos el 10% de los receptores autólogos seropositivos para CMV seleccionados por CD-34.<sup>31</sup> Los pacientes cuyos dadores son parientes HLA incompatibles o son HLA compatibles no parientes, o quienes poseen EICH hiperaguda, y aquellos que reciben altas dosis de esteroides preinjerto, se encuentran con mayor riesgo de contraer CMV preinjerto. Es importante diagnosticar rápidamente la enfermedad por CMV preinjerto ya que la tasa de casos fatales es superior al 90%.<sup>31</sup> Utilizando un ensayo muy sensible de PCR en plasma, el centro de Seattle encontró que los receptores de TCMH con enfermedad preinjerto por CMV tenían más posibilidades de presentar ADN de CMV en plasma (14 de 15, 93%) que los receptores de TCMH sin enfermedad preinjerto (5 de 33, 15%,  $p < 0.0001$ ).<sup>31</sup> Este centro recomienda el tamizaje en receptores seropositivos para CMV con injertos HLA incompatibles de parientes o HLA compatibles de personas no emparentadas o autoinjertos seleccionados por CD-34 para ADN de CMV utilizando el ensayo cuantitativo altamente sensible de la PCR dos veces por semana preinjerto. Si el paciente produce 1 000 copias de ADN de CMV por ml de plasma, este centro recomienda la administración de foscarnet para el tratamiento de CMV preinjerto.<sup>31</sup> Sin embargo, no existen datos actuales que demuestren que tal método de tamizaje y dicho protocolo de tratamiento preventivo disminuyan las tasas de enfermedad y la mortalidad por CMV preinjerto.

El uso de profilaxis con ganciclovir desde en el día del injerto hasta el día 100 postrasplante disminuye de forma importante la enfermedad por CMV dentro de los primeros 100 días luego del TCMH alogénico, pero no mejora la sobrevida general a los 100 y 180 días.<sup>30</sup> Ya que el ganciclovir se usa ahora preventiva o profilácticamente para el CMV desde el día 30 al 100 postrasplante, la mayoría de las enfermedades ocurren tardíamente (por ejemplo después de los 100 días postrasplante).<sup>32</sup> En Seattle, la enfermedad tardía ocurrió en 26 (17.8%) de 146 receptores de TCMH seropositivos para CMV, con una mediana de 169 días posteriores al TCMH (rango, 96-784 días). De los que sobrevivieron al primer episodio de la enfermedad por CMV tardía, el 38% adquirió la enfermedad nuevamente, y esto ocurrió con una mediana de 79 días posteriores al primer episodio.<sup>32</sup> En total, la tasa de mortalidad para la enfermedad tardía por CMV fue 46%; la muerte ocurrió dentro de las 6 semanas del diagnóstico, o con enfermedad por CMV diagnosticada durante la autopsia. Los factores de riesgo para la enfermedad tardía en receptores de TCMH alogénicos seropositivos para CMV comprenden bajos recuentos de CD4 ( $< 50$  células/ $\mu$ l), EICH, antigenemia pp65 de CMV anterior a los 95 días, carga viral de CMV ( $> 103$  copias/ml de ADN de CMV por PCR luego del día 95), linfopenia ( $< 300$  linfocitos/ $\mu$ l luego del día 95), y respuesta indetectable de células T específicas para CMV.<sup>32</sup> Las pautas recomiendan que las personas con alto riesgo de contraer enfermedad tardía por CMV deben ser evaluadas por pruebas de tamizaje 2 veces por semana en búsqueda de indicios de reactivación del CMV mientras persista un inmunocompromiso apreciable (BIII).

Si el CMV es todavía detectable por pruebas de tamizaje de rutina luego de los 100 días del trasplante, se debe continuar con ganciclovir hasta que el CMV sea indetectable (AI). Si se detecta bajo grado de antigenemia ( $< 5$  células/portaobjetos) en una rutina de tamizaje, se debe repetir la prueba de antigenemia a los 3 días (BIII). Si la antigenemia de CMV es  $> 5$  células/portaobjeto, la PCR es positiva o el cultivo en *shell vial* detecta viremia, se debe comenzar con tratamiento preventivo de ganciclovir de 3 semanas (BIII). También se debe administrar ganciclovir si el receptor del TCMH ha tenido 2 o más viremias o PCR positivas (por ejemplo, en una persona que recibe esteroides para EICH, o ganciclovir o foscarnet antes de los 100 días del TCMH). Para receptores de TCMH con enfermedad tardía, el centro de Seattle ha propuesto recientemente extender el tratamiento de mantenimiento con ganciclovir por al menos 3 meses o continuar con el control virológico cuidadoso luego del tratamiento con ganciclovir.<sup>32</sup> Sin embargo, si el ganciclovir se administra por largos periodos puede surgir resistencia a la droga.<sup>33</sup> Los receptores autólogos de TCMH con seropositividad para el CMV deberían ser considerados para terapia preventiva con ganciclovir si presentan enfermedades malignas hematológicas (por ejemplo, linfoma o leucemia), si reciben regímenes intensos de condicionamiento o manipulación de injerto o si recientemente han recibido fludarabina o 2-clorodesoxiadenosina (2-CDA) (CIII). Este grupo de receptores autólogos seropositivos para CMV debe ser vigilado hasta los 60 días posteriores al trasplante para

detectar reactivación, preferentemente utilizando antígeno pp65 de CMV cuantitativo<sup>21</sup> o PCR cuantitativa (BII). Se debe dar terapia preventiva solamente cuando estas pruebas son positivas. Algunos expertos recomiendan dar terapia preventiva para infección por CMV a receptores autólogos seropositivos de TCMH que reciben corticoides luego del trasplante.<sup>22</sup>

### Especies de Candida

Las pautas recomiendan con énfasis la administración de fluconazol 400 mg/día vía oral o intravenosa para la prevención de la infección por especies de *Candida* susceptibles a la droga (AI).<sup>35,36</sup> El fluconazol se debe dar a receptores alogénicos de TCMH desde el día del trasplante hasta el injerto (aproximadamente 30 días luego de éste) o hasta que la cuenta absoluta de neutrófilos (ANC) supere las 1 000 células/mm<sup>3</sup> (AII). Ya que los receptores autólogos tienen generalmente un riesgo menor de infección micótica invasiva que los receptores alogénicos de TCMH, muchos receptores autólogos de TCMH no requieren profilaxis antilevaduras (DIII). Sin embargo, los expertos recomiendan administrar profilaxis antilevaduras a los receptores autólogos con hematológicos malignos subyacentes como linfoma o leucemia y que tienen o tendrán neutropenia prolongada y daño mucoso por los intensos regímenes de condicionamiento o manipulación de injertos, o que han recibido fludarabina o 2-CDA recientemente (BIII).

En el año 2000, Marr y col. analizaron los datos del estudio de Slavin de 1995 (en el cual las recomendaciones para la profilaxis con fluconazol ya disponían de una base parcial) y extendieron el seguimiento de los pacientes. Marr y col. informaron que la administración de profilaxis con fluconazol (400 mg/día) por 75 días en receptores autólogos y alogénicos de TCMH se asoció con una tasa de 17.5% mayor de sobrevida luego de 8 años comparada con la de los que recibieron placebo.<sup>37</sup> Sumado a esto, los pacientes que recibieron fluconazol por 75 días tuvieron una tasa marcadamente menor de EICH intestinal que aquellos que recibieron placebo ( $p = 0.019$ ). El diseño del estudio no incluyó una comparación del fluconazol dado (400 mg/día) hasta el injerto. Marr y col. recomendaron la administración de fluconazol en dosis de 400 mg/día por 75 días luego del TCMH a receptores alogénicos de TCMH.<sup>37</sup> Los riesgos de candidiasis invasiva y mortalidad relacionada con la candidiasis han decrecido desde la implementación de la profilaxis con fluconazol.<sup>38</sup> Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar la duración de la profilaxis antifúngica en receptores de TCMH.

### Hongos

Las pautas expresan que no se ha descrito un régimen que sea claramente efectivo o superior para prevenir la aspergilosis, y que por ello las normas no hacen ninguna recomendación para la administración de profilaxis para hongos. Walsh y Dixon escribieron que las infecciones intrahospitalarias por hongos entre los pacientes con TCMH ocurrían principalmente por exposición aérea y contacto directo con esporas de los hongos.<sup>39</sup> En consecuencia, las pautas recomiendan minimizar el número de esporas en los cuartos de los pacientes de la

siguiente manera:

- Filtración de partículas aéreas de alta eficacia (HEPA) (99.7% de eficacia) capaz de remover partículas de 0.3  $\mu\text{m}$  de diámetro o más (AIII).<sup>40-43</sup>
- Flujo de aire dirigido, de tal forma que el aire fluya desde el cuarto del paciente hacia el corredor (esto es, una presión positiva en el cuarto del paciente en relación con la del corredor) (BIII).<sup>42</sup>
- Diferencias de presión marcadas entre el cuarto del paciente y el hall de entrada o antesala a  $> 2.5$  Pa (esto es 0.01 pulgadas por bomba de presión de agua) (BIII).<sup>43-44</sup>
- Cuartos sellados correctamente, incluso ventanas y enchufes (BIII).
- Alta tasa de cambio de aire ( $> 12$  cambios por hora) (AIII).<sup>43,44</sup>

El uso de cuartos con flujo laminar es opcional (CII). Durante la construcción del hospital o su renovación, los hospitales deberían construir barreras rígidas contra el polvo con sellos herméticos<sup>45</sup> entre la locación del paciente y las áreas de construcción o renovación para prevenir la entrada de polvo a las áreas de atención de pacientes (BIII).

Anaissie y col. informaron que en los sistemas de distribución de agua de hospitales han sido hallados hongos patogénicos, y postularon que estos hongos pueden transportarse en forma de aerosoles y causar infecciones en receptores de TCMH.<sup>46</sup> Sin embargo, se necesitan más estudios para probar esta hipótesis.

En Seattle, la tasa probada o posible de aspergilosis en receptores autólogos y alogénicos de TCMH se elevó de 5.7% en 1987 a 11.2% en 1993 ( $p = 0.02$ ).<sup>47</sup> Además, la probabilidad de adquirir aspergilosis invasiva probada o posible en receptores de TCMH fue significativamente más alta en la cohorte de 1993-1998 que en la de 1987-1992 ( $p = 0.001$ ).<sup>48</sup> Sin embargo, la tasa de incidencia acumulativa en un año de aspergilosis invasiva en los receptores alogénicos de TCMH en Seattle, de diciembre de 1997 a octubre de 2001, no fue significativamente diferente en aquellos bajo condicionamiento mieloablatoivo (10%) que en aquellos sin este tratamiento 14%.<sup>38</sup> Actualmente, la aspergilosis invasiva ocurre tardía, en lugar de inmediatamente, después del trasplante convencional con condicionamiento mieloablatoivo. Este cambio podría obedecer al uso de protocolos de TCMH con inmunosupresión incrementada, incluyendo depleción de células T y uso de dadores de alto riesgo.<sup>49</sup> La Universidad de Florida, EE.UU., ha informado que el tiempo mediano de aparición de aspergilosis invasiva en receptores alogénicos de TCMH en 1997-1998 fue de 92 días (rango, 31-459 días), posterior a la mediana de 50 días durante los años '80; el hallazgo registra aumento de la probabilidad de adquirir aspergilosis en la comunidad que en el medio hospitalario.<sup>49</sup> El cambio hacia la adquisición tardía de aspergilosis invasiva puede obedecer a los episodios acortados de neutropenia posteriores al TCMH por uso de injertos de células madre de sangre periférica o factores de crecimiento hematopoyéticos.<sup>38</sup> Los factores de riesgo para aspergilosis invasiva en receptores de TCMH incluyen la

edad mayor a 40 años, diagnóstico subyacente de cualquier otra condición que no sea leucemia mieloide crónica en su fase crónica o enfermedad maligna hematológica en su primera remisión y un dador HLA incompatible o no emparentado.<sup>50</sup> Sumado a esto, el grupo de la Universidad de Florida notó que receptores de TCMH alogénicos que recibían más de 21 días de terapia con corticoides de más de 1 mg/kg/día tenían mayores posibilidades de adquirir aspergilosis invasiva que aquellos que no habían recibido tratamiento esteroide (21% versus 5%,  $p = 0.034$ ).<sup>49</sup> La tasa de infección pulmonar con especies de *Aspergillus* no *fumigatus* se incrementó luego de 1995 en receptores de TCMH de 23 de 126 lavados broncoalveolares o cultivos de biopsias positivos en 1993-1995 (18.3%) a 35 de 104 cultivos en 1996-1998 (33.7%,  $p = 0.01$ ).<sup>50</sup> También se incrementó el número de infecciones por especies de *Fusarium* y *Zygomycetos* en Seattle, a final de los años '90.<sup>50</sup> La terapia con corticosteroides ( $> 2$  mg/kg/día de equivalentes de prednisona) y el diagnóstico probado de infección fúngica invasiva son factores de riesgo importantes para la muerte relacionada con infecciones fúngicas.<sup>38</sup> Próximos estudios en la profilaxis antifúngica en receptores alogénicos de TCMH deberían centrarse en pacientes que requieran esteroides o tengan EICH de importancia.<sup>51</sup> El lanzamiento de nuevas drogas antifúngicas al mercado, como voriconazol y caspofungin, puede ser útil en la profilaxis de infecciones fúngicas en receptores de TCMH. Actualmente, la *Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network*,<sup>52</sup> con fondos de los *United States National Institutes of Health*, está realizando un estudio prospectivo multicéntrico de 3 años denominado "Estudio aleatorizado a doble ciego de fluconazol versus voriconazol para la prevención de infecciones fúngicas invasivas en receptores de trasplantes alogénicos de sangre y médula ósea". En el estudio, las drogas aleatorizadas se administrarán hasta el día 100 postrasplante o hasta que ocurra una infección fúngica invasiva. En algunos pacientes se seguirá con el tratamiento hasta el día 180; éstos son pacientes que estén recibiendo  $> 1$ mg/kg/día de prednisona al día 90 a 100 y aquellos con injertos deplecionados de células T que reciban inmunoprofilaxis posterior al TCMH cuya cuenta de CD4 sea menor a 200/ $\mu$ l al día 90 a 100.<sup>52</sup>

### Pneumocystis jiroveci

Las pautas recomiendan administrar profilaxis para neumonía causada por *Pneumocystis jiroveci* (anteriormente *Pneumocystis carinii*)<sup>53</sup> (NP) a todos los pacientes con TCMH alogénico durante todos los períodos de inmunocompromiso luego del injerto, a menos que el injerto se retrase; en caso de retraso la profilaxis se puede comenzar antes del injerto (CIII). La profilaxis para NP debe darse hasta los 6 meses luego del TCMH (AII). Los centros de TCMH deberían continuar con la profilaxis más allá de este tiempo durante toda la duración del inmunocompromiso<sup>54</sup> en receptores de TCMH que estén recibiendo terapia

inmunosupresora (por ejemplo, prednisona o ciclosporina) (AI) o tengan EICH crónica (BII).

El uso de trimetoprima sulfametoxazol (TMP-SMZ) se prefiere para la profilaxis de esta neumonía en los receptores de TCMH (AII). En pacientes que no toleran TMP-SMZ, la dapsona<sup>55</sup> (BIII) o la pentamidina en aerosol<sup>56</sup> (CIII) pueden ser los sustitutos adecuados. Sin embargo, entre los receptores de TCMH alogénicos, la profilaxis con dapsona se ha relacionado con una tasa de aparición más alta de enfermedad en comparación con TMP-SMZ (7.2% versus 0.37% respectivamente) (RR = 18.8; IC 95%, 4.0-88.6;  $p < 0.001$ ).<sup>57</sup> De la misma manera, la pentamidina en aerosol es menos efectiva que TMP-SMZ para prevenir la neumonía en pacientes con TCMH.<sup>58</sup> Se encontró que el atovaquone es más seguro y menos tóxico que TMP-SMZ cuando se utiliza

**Tabla 1.** Sistema de puntaje basado en la evidencia utilizado en las guías de TCMH.

Importancia de la recomendación	
Categoría	Definición
A	Existe fuerte evidencia de eficacia y de sustancial beneficio clínico basado en la evidencia que apoyan la recomendación de su uso. <b>Se deben ofrecer siempre.</b>
B	Evidencia de eficacia moderada o fuerte, pero de beneficio clínico sólo limitado, apoyan la recomendación de su uso. <b>Generalmente deben ser ofrecidas.</b>
C	La evidencia de eficacia es insuficiente para apoyar la recomendación de su uso o contra su uso, o la evidencia de eficacia puede no tomar en cuenta los efectos adversos (por ejemplo, toxicidad de la droga, interacciones medicamentosas) o el costo de la quimioprofilaxis u otros abordajes alternativos. <b>Opcional.</b>
D	Evidencia moderada de falta de eficacia o de resultados adversos que apoyan la recomendación contra su uso. <b>Generalmente no deben ser ofrecidas.</b>
E	Buena evidencia de falta de eficacia o de resultados adversos que apoyan la recomendación contra su uso. <b>Nunca deben ser ofrecidas.</b>

para la profilaxis en receptores autólogos de TCMH de sangre periférica;<sup>59</sup> sin embargo es caro y se necesitan más estudios para determinar su eficacia en la prevención de esta neumonía en receptores alogénicos. Es por ello que, aunque el receptor de TCMH efectúe una reacción alérgica a TMP-SMZ, se debería intentar la desensibilización antes de administrar otra droga para la profilaxis.<sup>57</sup> Algunos expertos recomiendan dar profilaxis durante 1 a 2 semanas anteriores, desde los días 14 al 2 previos al trasplante (CII). La profilaxis para la neumonía por *P. jiroveci* debe ser considerada para los receptores autólogos de TCMH que tienen enfermedades malignas hematológicas subyacentes como linfoma o leucemia, se

**Tabla 2.** Sistema de puntaje basado en la evidencia utilizado en las guías de TCMH.

Calidad de la evidencia que apoya la recomendación	
Categoría	Definición
I	Evidencia de por lo menos un estudio apropiadamente controlado y aleatorizado.
II	Evidencia de por lo menos un estudio clínico bien diseñado sin aleatorización, de estudios analíticos de cohortes o de casos y controles (preferentemente de más de un centro), o de múltiples series de tiempo o resultados notables de experimentos no controlados.
III	Evidencia de opiniones de autoridades respetadas basadas en experiencias clínicas, estudios descriptivos o informes de expertos.

encuentran bajo intensos regímenes de condicionamiento o manipulación de injerto o han recibido recientemente fludarabina o 2-CDA (BIII).<sup>54-60</sup>

### Imunizaciones

Los anticuerpos de enfermedades evitables mediante el uso de vacunas (por ejemplo, tétanos, polio, paperas, sarampión, rubéola y por organismos encapsulados) disminuyen en 1 a 4 años siguientes al trasplante en los receptores autólogos y alogénicos de TCMH si el receptor no es vuelto a vacunar.<sup>61-65</sup> Por esta razón las pautas recomiendan dar vacunas para difteria, tétanos, pertussis acelular (DTaP) o tétanos-difteria (Td), polio inactiva, *H. influenzae* y hepatitis B a los receptores de TCMH a los 12, 14 y 24 meses posteriores al trasplante. La vacuna DTaP debe ser administrada a niños menores de 7 años, la Td a personas mayores de esa edad. La administración de la MMR está contraindicada dentro de los 2 primeros años postrasplante debido a que se trata de una vacuna a virus vivos. La vacunación con MMR está recomendada a los 24 meses o más del trasplante si se supone que el paciente es inmunocompetente (BII). Las pautas suponen que los receptores de TCMH son inmunocompetentes recién a los 24 meses si no se encuentran bajo terapia inmunosupresora y no tienen EICH. La vacuna inactiva de la gripe debe ser administrada por estación a los receptores de TCMH, comenzando antes del trasplante y continuando más allá de los 6 meses posteriores a éste durante toda la vida (BIII). Los familiares, contactos cercanos y los profesionales sanitarios que trabajan con TCMH deben ser vacunados anualmente contra la gripe.

Las pautas recomiendan administrar la vacuna 23-valente antineumocócica a los receptores de TCMH a los 12 y 24 meses postrasplante (BIII). Sin embargo, se notó segura la vacuna heptavalente conjugada antineumocócica (PCV7) e inmunogénica en receptores alogénicos de TCMH sin depleción de células T<sup>66</sup>. Los centros de TCMH pueden elegir administrar la PCV7 a receptores de TCMH para protegerlos contra la infección neumocócica durante el primer año postrasplante. Todavía debe ser estudiado si pacientes inmunizados con la PCV7 se beneficiarían de la subsecuente vacunación con la 23-valente.

De la misma manera se tendría que analizar la eficacia de la PCV7 en receptores de TCMH. El plan de inmunización con PCV7 incluye la administración de ésta a pacientes y sus donantes aproximadamente 7 a 10 días antes del trasplante y luego a los 3, 6 y 12 meses posteriores al TCMH a los receptores.

**Dra. Clare A. Dykewicz**

Copyright © Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC), 2004

### Bibliografía

1. CDC. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients: recommendations of CDC, the Infectious Disease Society of America, and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *MMWR* 2000; 49(No. RR-10):1-125 and *Biol Blood and Marrow Transplant* 2000;6(6a):659-734.
2. CDC. USPHS/IDSA guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus: a summary. *MMWR* 1995;44. (No. RR-8):1-34.
3. CDC. 1997 USPHS/IDSA guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus. *MMWR* 1997;46(No. RR-12):1-46.
4. CDC. 1999 USPHS/IDSA guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus. *MMWR* 1999;48(No. RR-10):1-66.
5. Dykewicz CA. Summary of the guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2001;33:139-44.
6. Cruciani M, Rampazzo R, Malena M, et al. Prophylaxis with fluoroquinolones for bacterial infections in neutropenic patients: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 1996;4(4):23:795-805.
7. Murphy M, Brown AE, Sepkowitz KA, et al. Fluoroquinolone prophylaxis for the prevention of bacterial infections in patients with cancer-is it justified? [Letter] *Clin Infect Dis* 1997;25(2):346-8.
8. Bowden RA, Myers JD. Infection complicating bone marrow transplantation. In: Rubin RH, Young LS, eds. *Clinical approach to infection in the compromised host*. 3rd edition. New York, NY:Plenum Medical Book Co. 1994:601-628.
9. Cometta A, Calandra T, Billie J, Glauser MP. *Escherichia coli* resistant to fluoroquinolones in patients with cancer and neutropenias. *N Engl J Med* 1994;330(17):1240-1241.
10. Kessinger A, Armitage JO. Use of peripheral stem cell support of high-dose chemotherapy. In: DeVita VT Jr., Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Important advances in oncology 1993*. Philadelphia, PA:J.B. Lippincott Co. 1993.
11. Rand KJ, Houck H, Ganju A, Babington RG, Elfenbein GJ. Pharmacokinetics of cytomegalovirus specific IgG antibody following intravenous immunoglobulin in bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant* 1989;4(6):679-683.
12. Bosi A, De Majo E, Guidi S, et al. Kinetics of anti-CMV antibodies after administration of intravenous immunoglobulins to bone marrow transplant recipients. *Haematologica* 1990;75(2):109-112.
13. Buckley RH, Schiff RI. Use of intravenous immune globulin in immunodeficiency diseases. *N Engl J Med* 1991;325(2):110-107.
14. Saral R, Burns WH, Laskin OL, et al. Acyclovir prophylaxis of herpes simplex infections. *N Engl J Med* 1981;305:63-67.
15. Gluckman E, Lotsberg J, Devergie A, et al. Prophylaxis of herpes infections after bone marrow transplantation by oral acyclovir. *Lancet* 1983;2:706-708.
16. Wade JC, Newton B, McLaren C, et al. Intravenous acyclovir to treat mucocutaneous herpes simplex virus infection after marrow transplantation. *Ann Intern Med* 1982;96:265-269.

© **Atención al Lector:** Las referencias bibliográficas de los artículos originales, suplementaria y otros detalles o consultas pueden solicitarse a SIIC <atencionlector@siicsalud.com> o ingresando en <www.siicsalud.com>.