

Evaluación epidemiológico-genética de la infección por citomegalovirus

Jorge Ossa, Carmen Beatriz Zuluaga, Luzmila Acevedo,
Juan Guillermo Maldonado, Oscar Mauricio Arcos

En esta investigación se presenta una aproximación epidemiológico-genética cuya finalidad es discriminar si la seronegatividad persistente para el citomegalovirus humano (CMVH) es debida a un efecto ambiental aleatorio o depende de una característica individual que se transmite hereditariamente. Para tratar de resolver este interrogante, se utilizaron dos procedimientos analíticos de la epidemiología genética: el análisis del orden de nacimientos y el análisis de segregación compleja. La muestra sobre la que se realizó el estudio fue seleccionada a partir de 703 individuos; 242 de ellos pertenecientes a 40 genealogías y 461 fenotipificados aisladamente. Con los individuos que resultaron seronegativos para CMVH se pudo reconstruir

un número de 102 familias nucleares. El análisis del orden de nacimientos no demostró polarización de los individuos seronegativos hacia alguno de los extremos de la hermandad pues la media calculada para la muestra experimental no superó en más de dos desviaciones estándar la media teórica calculada ($714 - (2) (53.44) < 624$). El análisis de segregación compleja no pudo rechazar el modelo de no transmisión hereditaria ($X^2 \text{ 8df} = 5.6979$; $P > 0.05$). Este resultado sugiere que no existe un componente hereditario de importancia en la resistencia a la infección por CMVH y por lo tanto determina que el hecho de permanecer seronegativo para el CMVH a través de la vida puede ser la consecuencia de un fenómeno eminentemente aleatorio de contacto o no contacto con el virus. En la discusión se anotan algunas precauciones que deben tenerse en cuenta, relacionadas con el modelo experimental utilizado en esta investigación, y se propone un nuevo diseño que podría corroborar los resultados de este primer estudio.

En muchas infecciones ha sido posible describir un claro componente de transmisión o susceptibilidad hereditaria para el desarrollo del contagio y la evolución de la enfermedad. Algunos ejemplos claros de este fenómeno son los descritos para la tuberculosis (1-3), la lepra (4-5) y la tripanosomiasis (6). Dicho componente hereditario puede generar umbrales de susceptibilidad (modelo cuantitativo o continuo), o constituir un factor mayor para la misma como ocurre en el caso del modelo mendeliano clásico (modelo cualitativo o discreto) (7,8). La ciencia que se ocupa de la discriminación entre los efectos ambientales y los efectos hereditarios y su caracterización cualitativa y cuantitativa en la génesis de alguna enfermedad se denomina epidemiología genética (9).

Jorge Ossa L., MV, MS, Ph.D: Profesor, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia; Carmen Beatriz Zuluaga, Bacterióloga, Sección Virología Departamento de Microbiología y Parasitología; Luz Mila Acevedo, Bacterióloga, Profesora Sección Virología, Departamento de Microbiología y Parasitología; Juan Guillermo Maldonado. MV, MS: Investigador Asociado, Sección Virología, Departamento de Microbiología y Parasitología; Oscar Mauricio Arcos, MD, MS: Investigador Asociado, Sección Virología, Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín. Este estudio fue financiado por la Universidad de Antioquia y por Colciencias a través del proyecto 1115-05-001-91.

La infección por el citomegalovirus humano (CMVH) ha adquirido especial importancia en los últimos años, puesto que se ha constituido en la enfermedad viral congénita más frecuente en el hombre y a la vez en la infección oportunista causada por un virus con más dramáticas consecuencias en pacientes inmunosuprimidos (10-12). Varias investigaciones han presentado evidencias aisladas que hacen presumir la existencia de un componente hereditario en la susceptibilidad a la infección y a la reactivación del CMVH. Por ejemplo, se ha informado la asociación genética con el HLA-DRW como un indicador de susceptibilidad para la reactivación de la infección en pacientes sometidos a trasplante renal (13). Asimismo, en macrófagos y fibroblastos de ratón se pudo determinar que existe susceptibilidad para adquirir el CMV cuando la línea celular porta antígenos específicos del complejo mayor de histocompatibilidad (H-2) de clase I (14).

Por último, se ha sugerido que la susceptibilidad a la reactivación del virus en pacientes trasplantados es más dependiente del donante que del receptor (15). Mediante técnicas de epidemiología genética sería posible corroborar estos hallazgos para luego proceder a hacer la caracterización molecular que permita realizar el mejor abordaje de las personas susceptibles con el fin de adoptar las medidas preventivas o terapéuticas adecuadas. En CMVH los estudios familiares existentes son muy reducidos y hasta donde tenemos información no existe ningún trabajo en el cual se utilicen meto-

dologías epidemiológico-genéticas. Ello es explicable debido a la dificultad para abordar esta población, ya que la entidad no siempre implica para el individuo un alto riesgo de morbimortalidad; por otro lado, la colaboración de esta población es escasa. Además, la frecuencia de individuos seropositivos en la población es predominante. Así, la consecución de familias susceptibles de análisis sólo puede ser realizada a partir de la serotipificación de muchos grupos genealógicos, con la selección posterior de las familias de interés. Tal fue nuestro enfoque en esta oportunidad para tratar de determinar si la seronegatividad para el CMVH a través del tiempo tiene un componente familiar, posiblemente de transmisión hereditaria.

Material y métodos

Población

La población en la cual se realizó el estudio estaba constituida por 40 genealogías seleccionadas a partir de casos índice afectados por epilepsia idiopática en la Liga Antioqueña contra la Epilepsia (LACE) de Medellín, Colombia, y por un grupo de 461 individuos seleccionados retrospectivamente a partir de registros del Laboratorio de Virología y mediante la búsqueda activa en individuos asociados a la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia. Con los sueros del primer grupo (familias de la LACE) se caracterizó a los individuos en seropositivos y seronegativos; después se comprobó mediante un análisis de contingencia convencional la no existencia de asociaciones entre algún fenotipo de epilepsia idiopática y alguno

de los fenotipos relacionados con el CMVH. A partir de los individuos caracterizados como seronegativos se escogieron las familias que se utilizaron en el análisis. Es obvio suponer que se excluyeron las familias en las que no existían casos de individuos seronegativos, puesto que para el análisis familiar es necesario la existencia de por lo menos un individuo "afectado" (para nuestro caso seronegativo o resistente). Todos los casos seronegativos dieron lugar a la conformación de familias nucleares. En el caso del segundo grupo (Laboratorio de Virología), a partir de los individuos que resultaron seronegativos se tipificó al padre y la madre.

Análisis

epidemiológico-genético

Dos enfoques analíticos fueron considerados para contrastar nuestra hipótesis: análisis del orden de nacimientos y análisis de segregación compleja. El primero corresponde al contraste de una de las tesis extrapolables, originadas desde el modelo multifactorial de Falconer. Esta tesis asume que la existencia de efectos ambientales en el desarrollo de algún fenotipo introduce una vectorización significativa del fenotipo hacia alguno de los extremos de la hermandad. En otras palabras, los individuos sometidos al ambiente generador de un determinado fenotipo se encuentran ocupando los primeros o los últimos lugares de la hermandad y no se espera que se distribuyan en los lugares intermedios. Para nuestro caso específico se debe suponer que si existe sólo un componente ambiental, los individuos con un fenotipo seronegativo serán de

preferencia los menores, dado que la posibilidad de contacto con el virus ha sido más escasa (16-18).

El segundo tipo de análisis constituye el modelo más sofisticado disponible desde el punto de vista estadístico y matemático para discriminar entre el medio ambiente y la herencia. En éste se introduce una serie de modelos hipotéticos que se contrastan con la población problema y se les define su verosimilitud o falibilidad. Dichos modelos se han estructurado mediante un modelo formal unificado que incluye: 1) el medio ambiente aleatorio (casos que pueden ser explicados como esporádicos y en los que no existe transmisión hereditaria), 2) el modelo de transmisión hereditaria poligénica y 3) el modelo de transmisión de gen mayor o de transmisión hereditaria mendeliana clásica.

Análisis del orden de nacimientos

El análisis del orden de nacimientos se realizó mediante la metodología de Haldane y Smith (19). En este método, la suma de los órdenes de nacimientos de todos los hermanos afectados es comparada con el valor teórico calculado, sobre la consideración de que no existe efecto de orden de nacimientos. Si la suma del grupo experimental supera por más de dos desviaciones estándar el valor teórico calculado, se puede concluir que los hijos nacidos más tardíamente son más afectados. Por el contrario, si la suma del grupo experimental es dos desviaciones estándar menor que la suma teórica calculada, los individuos afectados estarán ocupando los primeros lugares (20).

Análisis

de segregación compleja

Todas las genealogías con individuos seronegativos fueron subdivididas en sus componentes nucleares o familias nucleares y sometidas a un análisis de segregación compleja. Este análisis fue realizado usando el modelo unificado de Lalouel, Rao, Morton y Elston (21, 22), implementado en el programa de computador POINTER (23), facilitado gentilmente por la Dra. Mary Marazita del Departamento de Genética Humana del Colegio Médico de Virginia. El modelo distribuye la variación total de los fenotipos de la susceptibilidad o resistencia subyacente a CMVH, en tres componentes independientes: un componente de locus mayor único con características de dialelismo, un trasfondo multifactorial y un componente medioambiental aleatorio.

Los parámetros del modelo son: **q**, la frecuencia del alelo de alto riesgo A (en nuestro caso alelo de resistencia); **t**, el desplazamiento o varianza sobre el locus mayor único, de tal forma que **t** = 0 corresponde a un gen recesivo, **t** = 1 corresponde a un gen dominante, y $0 < t < 1$ corresponde a algún grado de aditividad con **t** = 0.5 referido a codominancia; **H**, la herencia poligénica en la descendencia; **Z**, la razón de la herencia de adulto a niño; y **t1**, **t2** y **t3**, las respectivas probabilidades de que los genotipos AA, Aa, y aa transmitan el alelo A. Por ejemplo, si el locus mayor único es mendeliano, **t1** = 1, **t2** = 0,5 y **t3** = 0, mientras que si los valores **t** son iguales no existe transmisión. La probabilidad de pesquisa o de selección **p** fue

calculada separadamente de la muestra, de acuerdo con la metodología de Simpson (24).

Serotipificación

La serotipificación fue realizada por la prueba de ELISA de acuerdo con la técnica estandarizada por nuestro grupo (25). Brevemente, el suero de los pacientes diluido 1:100 se incubó en microplatos sensibilizados con antígeno viral obtenido de células HLF (*Human Lung Fibroblast*) inoculadas con virus de la cepa AD169; luego se adicionó antisuero (IgG) de ratón marcado con fosfatasa alcalina, dirigido contra IgG humana; se incubó nuevamente y finalmente se adicionó el sustrato (p-nitrofenol fosfato). El resultado se determinó mediante lectura de densidad óptica (DO) a 410 nm, en un microlector de Elisa-Titterteck II. Se consideró positiva una muestra cuando la diferencia de DO entre los pozos con antígeno y los pozos sin antígeno fue mayor de 0.3.

Resultados

A partir de las 40 genealogías originarias de la LACE, se tipificaron 242 individuos de los cuales 46 (19%) fueron seronegativos. Con estos individuos seronegativos se reconstruyeron las familias nucleares posibles y al final sólo fue factible considerar 54 familias como informativas para el análisis (el número de familias nucleares supera el número de individuos seronegativos, puesto que un individuo seleccionado puede generar hasta dos de ellas dado que se trata de genealogías con múltiples generaciones). Sólo 27 hermandades poseían individuos seronegativos y al mismo tiem-

po estaban conformadas al menos por dos individuos.

Para el segundo grupo seleccionado, de los 461 individuos tipificados, 94 (20%) fueron seronegativos. A partir de ellos sólo fue posible fenotipificar al padre y a la madre en 48 de los casos; por lo tanto, el grupo general de familias nucleares disponibles para el análisis fue de 102.

Análisis

del orden de nacimientos

Sólo 27 familias del total de familias seleccionadas a partir de los individuos seronegativos pudieron ser sometidas a prueba. En la Tabla 1 se presenta el análisis del orden de nacimientos para estas familias. Este análisis no demostró polarización de los individuos seronegativos hacia alguno de los extremos de la hermandad, pues la media calculada para la muestra experimental no superó en más de dos desviaciones estándar la media teórica calculada ($714 - (2) (53.44) < 624$). Esto descarta posibles efectos ambientales pero no comprueba la existencia de agregación familiar por transmisión hereditaria.

Análisis

de segregación compleja

Nueve modelos hipotéticos fueron sometidos a contraste utilizando como muestra experimental 102 familias nucleares (Tabla 2). El modelo número 1, en el que se contrasta la hipótesis de no transmisión genética, no pudo ser rechazado cuando se comparó con el modelo general no restringido (modelo número 9) ($X^2 8df = 5.6979$; $p > 0.05$). El significado de este hallazgo puede ser explicado en los siguientes

términos: la probabilidad de que exista algún modelo de transmisión hereditaria del carácter seronegativo es altamente reducida. Todos los casos seronegativos pueden ser explicados en términos del medio ambiente aleatorio.

Con este resultado, obviamente, es innecesario continuar las comparaciones de los otros modelos. No obstante, se presentan sus contrastes, en los que se puede observar *a priori* que las probabilidades de los otros modelos son muy similares (Tabla 2). Es importante destacar que en el modelo general (modelo número 9) los resultados de t1 (0.97) y t3 (1.0) son similares, lo que corrobora los hallazgos relacionados con la imposibilidad de rechazar el modelo 1 y, al mismo tiempo, que la varianza fenotípica encuentra en el ambiente ($H=0.70$) su mayor representación (Tabla 2).

Discusión

La infección por CMVH ha sido asociada con transmisión intrafamiliar, siendo la madre el principal origen de la infección. Nos inclinamos a considerar el problema opuesto: discriminar el origen de la seronegatividad sostenida de un individuo a través de la vida con relación a la condición serológica del grupo familiar, padres y hermanos. Nuestra conjetura inicial pretendía considerar que esta seronegatividad persistente era el resultado de un carácter transmitido hereditariamente; no obstante, en los resultados de los análisis llevados a cabo en este estudio existen evidencias que permiten sustentar que tal susceptibilidad transmitida hereditariamente no existe. El primero de tales análisis

Familia	Hermandad	k	h	A ¹	6A	μ	s
1	AANNN	5	2	1-2	18	36	108
2	AA	2	2	1-2	18	18	0
3	AA	2	2	1-2	18	18	0
4	AA	2	2	1-2	18	18	0
5	AA	2	2	1-2	18	18	0
6	NNNNNNNNNANNNN	15	1	11	66	48	672
7	AAA	3	3	1-2-3	36	36	0
8	NA	2	1	2	12	9	9
9	NANN	4	1	2	12	15	45
10	NNNANNNN	8	1	4	24	21	105
11	NNA	3	1	3	18	12	24
12	NNNNNNA	7	1	7	42	24	144
13	NAA	3	2	2-3	30	24	24
14	NNNAANNNN	9	2	4-5	54	60	420
15	NNA	3	1	3	18	12	24
16	NNANN	5	1	3	18	18	72
17	NNNA	4	1	4	24	15	45
18	NNNNNNNNNNA	11	1	11	66	36	360
19	NANNNN	6	1	2	12	21	105
20	AAN	3	2	1-2	18	24	24
21	NANN	4	1	2	12	15	45
22	NNNNNAN	7	1	6	36	24	144
23	NNA	3	1	3	18	12	24
24	NNNNNNANNN	9	1	7	42	30	240
25	NAA	3	2	2-3	30	24	24
26	NNNANNNN	8	2	4	24	27	189
27	NA	2	1	2	12	9	9
Total		135	39		714	624	2856
					DS= 53.44		
N = Seropositivo A = Seronegativo K = Número de hermanos clasificados H = Número de hermanos afectados A ¹ = Orden de nacimiento 6A = Media de la hermandad μ = Media teórica s = Varianza de la hermandad DS = Desviación estándar							

Tabla 1. Análisis del orden de nacimientos de acuerdo con la metodología de Haldane y Smith en familias seleccionadas a partir de individuos seronegativos para CMVH.

Infección por citomegalovirus

Hipótesis	Parámetros										
	d	t	q	H	t1	t2	t3	Z	-2ln(L)+C	df	X2
1-No transmisión (q=H=0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(1.)	129.0778	8	5.6979
2-Multifactorial Locus mayor	(0)	(0)	(0)	.43	(1.)	126.8703	7	3.4904
3-Dominante	(1)	1.1	.22	(0)	(1.)	(.5)	(0)	(1.)	126.1842	6	2.8043
4-Codominante	(.5)	1.6	.50	(0)	(1.)	(.5)	(0)	(1.)	126.1839	6	2.8040
5-Recesivo	(0)	1.6	.50	(0)	(1.)	(.5)	(0)	(1.)	126.1839	6	2.8040
6-No restringido	0.1	1.8	.22	(0)	(1.)	(.5)	(0)	(1.)	126.7625	5	3.3826
7-t1=t2=t3	.25	1.8	.52	(0)	(1.)	(1.)	(1.)	(1.)	127.0216	5	3.6417
8-Modelo mixto	.25	1.8	.31	.60	(1.)	(.5)	(0)	(1.)	126.3643	4	2.9844
9-Modelo general	.25	1.8	.31	.70	.13	.97	.61	1.0	123.3799
Familias= Total N=102; p=0.92											

Tabla 2. Resultados del análisis de segregación compleja para familias nucleares seleccionadas a partir de individuos seronegativos para CMVH, usando el programa POINTER.

sis, el del orden de nacimientos, no detectó efectos ambientales. El segundo análisis, un modelo sincrético que incluye ambiente, poligenes y genes mayores, es categórico en no descartar la posibilidad de que todos los casos sean debidos a un evento aleatorio ambiental, en el que, como consecuencia, no tendrían ninguna influencia los componentes hereditarios de cualquier índole. Actualmente no existen, hasta donde los autores están informados, publicaciones que permitan hacer comparaciones con este diseño; no obstante, se deben tomar algunas precauciones con estos resultados. La primera de ellas tiene que ver con los problemas técnicos y conceptuales que aparecen cuando se determina a un individuo como seronegativo o seropositivo y es preferible realizar la fenotipificación en términos cuantitativos. Esto es crucial para obtener una mejor verosimilitud de los

resultados del análisis de segregación compleja. En segundo lugar, es preferible utilizar poblaciones seleccionadas de una manera dirigida para analizar específicamente la infección por CMVH.

Nuestro grupo de estudio investigado en la LACE, a pesar de no presentar asociaciones entre el fenotipo de epilepsia idiopática y algunos de los fenotipos de infección por CMVH, puede dar lugar a sesgos de selección que pueden ser determinantes en los análisis realizados. Sin embargo, el hecho de encontrar un porcentaje de seronegatividad similar entre los dos grupos seleccionados, puede ser indicativo de un comportamiento de la infección que es independiente de esta situación.

Dos aspectos deben ser resaltados como importantes y particulares del estudio. El primero tiene que ver con la muestra, cuyo origen es una población

en condiciones de "subdesarrollo" y, como consecuencia, ello permite contrastar más objetivamente el componente hereditario; el segundo aspecto está relacionado con la muestra de familias analizadas, cuyo número, aparentemente reducido, es muy significativo si se tienen en cuenta los problemas de selección.

La pregunta que continúa sin resolverse es: ¿por qué individuos sometidos a un ambiente plagado por el CMVH continúan siendo seronegativos, incluso aquellos que, como se evidenció en este estudio, conviven hasta 50 años con una persona infectada? (resultado no incluido). Si consideramos que todas las vías de contagio descritas epidemiológicamente han sido muy probables, ¿cómo es posible que perdure tal condición? La única hipótesis que es capaz de explicar este fenómeno, tiene que ver con la existencia de una característica individual. A la luz de nuestros resultados es menester involucrar modelos que introduzcan, dentro de las variables a considerar, el comportamiento personal; factor que a diferencia de la herencia, es el único que establece no aleatoriedad al fenómeno. Un estudio que podría arrojar resultados definitivos en este sentido consistiría en un análisis de concordancia y discordancia entre gemelos dicigóticos y monocigóticos respectivamente. Debe anotarse que en este trabajo hemos definido la susceptibilidad por la presencia de anticuerpos; sin embargo, en años recientes se ha determinado que puede existir positividad para el CMVH por amplificación de DNA, en ausencia de anticuerpos (26). No se sabe aún qué tan

prevalente sea este fenómeno, pero Zhang y colaboradores informan hasta 27% (27), lo que hace necesario reformular las preguntas y proponer nuevos trabajos. Así, las preguntas serían: 1) ¿Por qué no todos los infectados producen anticuerpos y cuál es la dinámica de este fenómeno en el tiempo? 2) ¿Es la tendencia a la no respuesta de anticuerpos una condición hereditaria o ambiental (por ejemplo, por la ruta o la dosis de la infección primaria)? 3) ¿Qué efecto puede tener esta condición en la capacidad de contrarrestar la infección viral? y 4) ¿Cómo se correlaciona esta situación con la capacidad de reactivación y transmisión del virus?

Summary

This article presents a genetic epidemiologic approximation in order to discriminate whether the persistent seronegativity to human cytomegalovirus (HCMV) is explained by an environmental factor or is dependent on individual characteristics which are inheritable. To solve this question we used two analytical procedures from the discipline of genetic epidemiology: assessment of the order of birth and analysis of complex segregation. A sample of 703 individuals was used, with whom 102 nuclear families were reconstructed. The average of the order of birth calculated for the sample was over two standard deviations from the expected theoretic average, assuming no effect of this factor, which means that most of the seronegative individuals in these families were in the last birth positions. On the other hand the analysis of complex segregation could not reject the model

of non-genetic transmission. These results suggest that an important hereditary component doesn't occur in persistent seronegativity to HCMV. Consequently it could be speculated that being seronegative throughout life could be the effect of an aleatory environmental factor or a personal condition which other than genetics is the only which could explain non-aleatory phenomena. Some precautions are discussed pertaining to this experimental design and to the results of the study, to the light of molecular epidemiological facts recently described for this infection.

Agradecimientos

El presente proyecto fue realizado con la colaboración de la Universidad de Antioquia y Colciencias a través del proyecto 1115-05-001-91. Igualmente queremos expresar nuestros agradecimientos a todos los pacientes e individuos que colaboraron amablemente con la investigación.

Referencias

1. **Skamene E.** Genetic control of resistance to mycobacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986; **124**: 49.
2. **Skamene E, Gros P, Forget A, et al.** Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* 1983; **297**: 506.
3. **Schurr E, Skamene E, Forget A, Gros P.** Linkage analysis of the beg gene on chromosome 1. Identification of a tightly linked marker. *J Immunol* 1989; **142**: 4507.
4. **Beiguelman B.** Some remarks on the genetics of leprosy resistance. *Acta Genet Med Gemellol* 1968; **17**: 584-594.
5. **Chakravarti M R, Vogel F.** A twin study on leprosy. Stuttgart: Georg Thieme Publishers; 1973.
6. **Feitosa MF.** Aspectos genético-epidemiológicos da infecção chagásica em nordestinos brasileiros. Tese de Mestrado. Universidade de Sao Paulo Brasil. 1982.
7. **Morton NE.** The detection of major genes under additive continuous variation. *Am J Hum Genet* 1967; **19**: 23-34.
8. **Falconer DS.** The Inheritance of liability to certain diseases estimated from the inci-

dence in relatives. *Ann Hum Genet* 1965; **29**: 51-71.

9. **Morton NE.** Outline of genetic epidemiology. New York: Academy Press, Inc; 1981.
10. **Demier GJ.** Summary of a workshop at CDC on surveillance for congenital cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis* 1991; **13**:315-329.
11. **Kotler DP.** Cytomegalovirus colites and wasting. *J Acq Immun Def Syn* 1991; **4**: S36-S41.
12. **Henell KR, Chous S, Norman DJ.** Use of cytomegalovirus-seropositive donor kidneys in seronegative patients: results of prospective serotesting and matching in one center. *Transpl Proc* 1989; **21**: 2082-2083.
13. **Roehorst HW, Tegzess AM, Beelen JM, et al.** HLA-DRw6 as a risk factor for active cytomegalovirus but not for herpes simplex virus infection after renal allograft transplantation. *Brit Med J* 1985;291:619-622.
14. **Price P, Gibbons AE, Shellam GR.** H-2 class I loci determine sensitivity to MCMV in macrophages and fibroblasts. *Immunogenetics* 1990; **32**: 20-26.
15. **Weir Mr, Henry ML, Blackmore M, et al.** Incidence and morbidity of cytomegalovirus disease associated with a seronegative recipient receiving seropositive donor-specific transfusion and living-related donor transplantation. *Transplantation* 1988; **45**: 111-116.
16. **McFarlane ES, Golbloom AL, Embil JA.** Prolonged excretion of identical cytomegalovirus strain by two siblings and the intermittent isolation of an adenovirus from the urine of one of them. *J Med Virol* 1987; **23**: 283-287.
17. **Adler SP.** The molecular epidemiology of cytomegalovirus transmission among children attending a day care center. *J Infect Dis* 1985; **152**: 760-768.
18. **Taber LH, Frank AL, Yow MD.** Acquisition of cytomegalovirus infection in families with young children: A serological study. *J Infect Dis* 1985; **151**: 948-952.
19. **Haldane JB, Smith CA.** A simple exact test for birth-order effect. *Ann Eugenics* 1947; **14**: 117-124.
20. **Emery AEH.** Methodology in medical genetics. An introduction to statistical methods. New York: Churchill Livingstone eds; 1986.
21. **Lalouel JM, Rao DC, Morton NE, Eiston RC.** A unified model for complex segregation analysis. *Am J Hum Genet* 1983; **35**: 816-826.
22. **Morton NE.** Segregation analysis in human genetics. *Science* 1958; **127**: 79-80.
23. **Lalouel JM, Morton NE.** Complex segregation analysis with pointers. *Human Heredity* 1981; **31**: 312-321.
24. **Simpson SP.** Estimating the ascertainment probability from the number of ascer-

Infección por citomegalovirus

- tainments per proband. *Human Heredity* 1983; **33**: 103-108.
25. **Correa MR, Arango AE, Ossa JE.** Estandarización de una técnica de ELISA para citomegalovirus humano. *Acta Med Colomb* 1990; **15**:180-186.
26. **Velzing J, Rothbarth PH, Kroes ACM, Quint GV.** Detection of cytomegalovirus mRNA and DNA encoding the immediate early gene in peripheral blood leukocytes from immunocompromised patients. *J Med Virol* 1994; **42**: 164-169.
27. **Zhang LJ, Hanff P, Rutherford C, Churchill WH, Crumpacker Cs.** Detection of Human Cytomegalovirus DNA, RNA, and Antibody in Normal Donor Blood. *J Infect Dis* 1995; **171**: 1002-1006.